

**La aplicación exógena de ácidos  
orgánicos aumenta la tolerancia a  
metales pesados en plantas**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

Para Optar Al Grado De

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Andrea Cecilia Vega Duque**

**Primer semestre, 2022**

**Director de Tesis:**

**Dr. Michael Handford**

**Co-Directora de Tesis:**

**Dra. Ninoska Delgado**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la  
Facultad de Ciencias que la Tesis de magíster  
presentada por la candidata.

Andrea Cecilia Vega Duque

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como  
requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias  
Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido  
el día .....

Director de Tesis:

Dr.

Michael Handford

Co-Director de Tesis

Dr.

Ninoska Delgado

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr.

Víctor Castro

Dr.

José O'Brien

## Índice

Índice de contenidos.....	3
Índice de tablas.....	4
Índice de figuras.....	5
Lista de símbolos y abreviatura.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	9
1. Introducción.....	11
1.1 Efectos morfológicos, fisiológicos de los metales pesados sobre las plantas.....	13
1.2 Estrategias para evitar y/o mitigar la contaminación por metales pesados.....	14
1.2.1 Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.....	17
2. Ácidos orgánicos.....	17
2.1 Ácidos carboxílicos.....	19
2.1.1 Ácido cítrico.....	19
2.1.2 Ácido málico.....	22
2.1.3 Ácido oxálico.....	24
2.1.4 Ácido lipoico.....	26
2.2 Fitohormonas.....	27
2.2.1 Ácido salicílico.....	27
2.2.2 Ácido jasmónico.....	29
2.3 Ácidos fenólicos.....	32
2.3.1 Ácido gálico.....	32
2.3.2 Ácido cafeico.....	34
2.4 Algunas consideraciones sobre la aplicación exógena de ácidos orgánicos.....	47
2.5 Aplicaciones biotecnológicas.....	47
2.5.1 Genes que codifican para la biosíntesis de ácidos orgánicos.....	47
2.5.2 Sobreexpresión de otros genes involucrados en la resistencia/tolerancia a los metales pesados.....	48
3. Discusión.....	49
4. Conclusiones.....	51
5. Bibliografía.....	51
6. Anexos.....	65

## Índice de tablas

<b>Tabla I.</b> Ácidos orgánicos.....	18
<b>Tabla II.</b> Efectos morfológicos, fisiológicos y genéticos en respuesta a la aplicación exógena de ácidos orgánicos.....	46

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Modelo que representa la liberación activada por MP de AO.....	19
<b>Figura 2.</b> Esquema que representa la respuesta de la planta por contaminación a MP.....	36

|

|

## Lista de símbolos y abreviaturas

<b>ABC</b>	Casete de unión ATP	<b>IRT</b>	Transportadores de hierro
<b>AC</b>	Ácido cafeico	<b>K</b>	Potasio
<b>AC</b>	Ácido cítrico	<b>LOX</b>	Lipoxigenasa
<b>ADHL</b>	Ácido dihidrolipoico	<b>MDA</b>	Malonaldehído
<b>AF</b>	Ácido fítico	<b>MDHAR</b>	Monodeshidroascorbato Reductasa
<b>AG</b>	Ácido gálico	<b>Mg</b>	Magnesio
<b>AJ</b>	Ácido jasmónico	<b>Mn</b>	Manganeso
<b>AL</b>	Ácido lipoico	<b>MP</b>	Metales pesados
<b>Al</b>	Aluminio	<b>MT</b>	Metalotioneínas
<b>AM</b>	Ácido málico	<b>MTP</b>	Proteínas de Tolerancia a Metales
<b>AOx</b>	Ácido oxálico	<b>NAS</b>	Nicotianamina Sintasa
<b>AO</b>	Ácidos orgánicos	<b>Ni</b>	Níquel
<b>APX</b>	Ascorbato Peroxidasa	<b>NOX</b>	NADPH oxidasa
<b>AS</b>	Ácido salicílico	<b>NPT</b>	Compuestos de sulfhídrico no proteicos
<b>As</b>	Arsénico	<b>NRAMP</b>	Resistencia Natural Asociada Familia de Proteínas de Macrófagos
<b>AsA</b>	Ácido ascórbico	<b>P</b>	Fosfato
<b>AT</b>	Ácido tartárico	<b>PAL</b>	Fenilalanina Amonio Liasa
<b>CAT</b>	Catalasa	<b>Pb</b>	Plomo
<b>Cd</b>	Cadmio	<b>PC</b>	Fitoquelatinas
<b>CDF</b>	Facilitadores de Difusión de Cationes	<b>POD</b>	peroxidasa
<b>Co</b>	Cobalto	<b>PPO</b>	Polifenol oxidasa
<b>Cr</b>	Cromo	<b>RWC</b>	Contenido Relativo de Agua
<b>Cu</b>	Cobre	<b>Se</b>	Selenio
<b>DHAR</b>	Dehidroascorbato reductasa	<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético	<b>TBARS</b>	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
<b>EL</b>	Fuja de electrones	<b>TCA</b>	Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno	<b>Vn</b>	Vanadio
<b>Fe</b>	Hierro	<b>ZIP</b>	Zrt-Irt proteínas
<b>GPX</b>	Guaiacol peroxidasa	<b>Zn</b>	Zinc
<b>GR</b>	Glutación reductasa		
<b>GSH</b>	Glutación		
<b>GSSG</b>	Glutación disulfuro		
<b>GST</b>	Glutación-S transferasa		
<b>Hg</b>	Mercurio		
<b>HMA</b>	ATPasa de Metales Pesados		
<b>IAA</b>	Ácido indol-3 acético		

## Resumen

Los metales pesados son un grupo heterogéneo de metales y metaloides que existen de manera natural en la superficie terrestre. No existe un consenso en cuanto a la definición de metal pesado, sin embargo, se puede definir que cualquier metal que posea una densidad superior a 5 g/cm<sup>3</sup> o densidad 20 g/mol, es pesado. Estos elementos pueden o no cumplir funciones biológicas como cofactores enzimáticos, sitios para receptores, funciones hormonales y transporte de proteínas en determinadas concentraciones. Cuando cumplen una función biológica se denominan esenciales, tales como cobre, cromo, hierro, manganeso, zinc, molibdeno y níquel, pero cuando no cumplen una función biológica se denominan no esenciales como el arsénico, cadmio, cobalto, plomo, mercurio y vanadio. En ambos casos, los metales pesados esenciales y no esenciales, en altas concentraciones, pueden generar daños en los organismos y problemas medioambientales, debido a que pueden interrumpir las funciones catalíticas de enzimas o transporte de proteínas, causando la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, y así desencadenar estrés oxidativo en plantas. Sus efectos son observados en la peroxidación de lípidos, la consiguiente desestructuración de la membrana plasmática, daño a los pigmentos fotosintéticos y proteínas, y daños inespecíficos al material genético.

Las plantas no están exentas de sufrir daños por contaminación por metales pesados, y han desarrollado mecanismos que permiten mitigar los efectos que estos producen, a través de la producción endógena de ácidos orgánicos. Estos compuestos provienen del metabolismo primario o secundario, y a parte de las funciones propias de estos, cumplen un papel importante en la respuesta y tolerancia a la contaminación por metales pesados. En una respuesta primaria, los ácidos orgánicos son exudados a través de las raíces para disminuir el pH de la rizosfera y quelar los cationes metálicos a formas menos tóxicas, para evitar el ingreso de ciertos metales pesados que no son esenciales. Sin embargo, debido a que ciertos metales pesados pueden presentar propiedades fisicoquímicas similares, pueden ingresar cationes no esenciales para el funcionamiento, con sus respectivas consecuencias. La quelación puede funcionar a nivel de xilema (donde los cationes metálicos o complejos metal-ácido, son solo transportados al ápice de las plantas) e intracelularmente. También hay ácidos orgánicos endógenos que quelan los metales pesados; una vez formado el complejo, son compartimentalizados dentro de la vacuola, con ayuda de transportadores/canales ubicados en el tonoplasto.

A consecuencia de la actividad humana, la cantidad de metales pesados está aumentando, afectando negativamente los cultivos. Por ello, se han desarrollado nuevas estrategias para mitigar los efectos de los metales pesados, y una de esas opciones es aplicar ácidos orgánicos exógenos a plantas que estén sometidas a estrés por metales pesados. Esta estrategia ha demostrado ser eco amigable, económica y no genera un impacto fuerte en las plantas. Por otro lado, los ácidos orgánicos exógenos mejoran parámetros morfológicos, fisiológicos y pueden inducir la expresión de ciertos genes que están relacionados con la tolerancia y/o resistencia a metales pesados.

Finalmente, los resultados presentados en esta tesis bibliográfica fueron publicados en mayo de 2022 en la edición especial titulada "Antioxidative and Chelating Molecules of Plants under the Excess of Metals" del International Journal of Molecular Sciences en una revisión denominada "La aplicación exógena de ácidos orgánicos aumenta la tolerancia a metales pesados en plantas", del cual soy el primer autor. La revisión se puede encontrar en el Anexo 1 y [doi.org/10.3390/ijms23105438](https://doi.org/10.3390/ijms23105438).



## Abstract

Heavy metals are a heterogeneous group of metals and metalloids that exist naturally on the earth's surface. There is no consensus regarding the definition of heavy metal, however, it can be defined that any metal that has a density greater than 5 g/cm<sup>3</sup> or a density of 20 g/mol is heavy. These elements may or may not fulfill biological functions such as enzyme cofactors, receptor sites, hormonal functions, and protein transport at certain concentrations. When they fulfill a biological function, they are called essential, such as copper, chromium, iron, manganese, zinc, molybdenum and nickel, but when they do not fulfill a biological function, they are called non-essential such as arsenic, cadmium, cobalt, lead, mercury and vanadium. In both cases, high concentrations of essential and non-essential heavy metals can cause damage to organisms and environmental problems, because they can interrupt the catalytic functions of enzymes or protein transport, causing the overproduction of reactive oxygen species, and thus trigger oxidative stress in plants. Their effects are observed in lipid peroxidation, the consequent destabilization of the plasma membrane, damage to photosynthetic pigments and proteins, and nonspecific damage to genetic material.

Plants are not exempt from suffering damage from heavy metal contamination, and have developed mechanisms that allow the mitigation of the effects that these produces, through the endogenous production of organic acids. These compounds arise from primary or secondary metabolism, and apart from their own functions, they play an important role in the response and tolerance to heavy metal contamination. In a primary response, organic acids are exuded through the roots to lower the pH of the rhizosphere and chelate metal cations to fewer toxic forms to prevent the entry of certain non-essential heavy metals. However, since certain heavy metals can have similar physicochemical properties, cations that are not essential for operation can enter, with their respective consequences. Chelation functions at the xylem level (where metal cations or metal-acid complexes are only transported to the apex of plants) and intracellularly. There are also endogenous organic acids that chelate heavy metals; once the complex is formed, they are compartmentalized within the vacuole, with the help of transporters/channels located in the tonoplast.

As a result of human activity, the amount of heavy metals is increasing, negatively affecting crops. Therefore, new strategies have been developed to mitigate the effects of heavy metals, and one of those options is to apply exogenous organic

acids to plants that are subjected to heavy metal stress. This strategy has proven to be eco-friendly, economical and does not generate a strong impact on the plants. On the other hand, exogenous organic acids improve morphological and physiological parameters and can induce the expression of certain genes that are related to tolerance and/or resistance to heavy metals.

Finally, the findings presented in this bibliographic thesis were published in May 2022 in the Special Issue entitled "Antioxidative and Chelating Molecules of Plants under the Excess of Metals" of the International Journal of Molecular Sciences in a review termed "Increasing heavy metal tolerance by the exogenous application of organic acids", of which I am the first author. The review can be found in Annex 1 and [doi.org/10.3390/ijms23105438](https://doi.org/10.3390/ijms23105438).

## 1. Introducción

Los MPs son componentes naturales de la corteza terrestre, presentes en esta a diferentes concentraciones. Proceden desde las rocas sedimentarias, erupciones volcánicas, formación del suelo y meteorización de rocas (Shahid et al., 2014), y son un grupo no específico de metales y metaloides. Aunque no existe un consenso sobre las características de un MP, se indica que todos los metales y metaloides que posean una densidad mayor a 5 g/cm<sup>3</sup> o masa atómica sobre los 20 u.m.a. se considera MP (Emamverdian et al., 2015).

En bajas concentraciones, ciertos MPs se consideran "esenciales" como Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo, and Ni, ya que cumplen funciones como cofactores enzimáticos y en la estructura y función de proteínas, regulación de genes, protección de las células, transducción de señales, todas fundamentales para el crecimiento de las plantas (DalCorso et al., 2019). Otro grupo de MP se consideran "no esenciales" como Cd, Sb, Cr, Pb, As, Co, Ag, Se, y Hg, ya que no cumplen ninguna función biológica. En algunos casos, debido a que presentan propiedades fisicoquímicas similares a otros iones metálicos esenciales, reemplazan a estos en funciones biológicas en proteínas, modificando/interrumpiendo la actividad proteica al interactuar con los grupos tiol (-SH) de estas (Emamverdian et al., 2015). En estos casos, los MPs presentan actividad mutagénica, interrumpen la actividad fotosintética, desestructuran la membrana plasmática (por peroxidación de lípidos, producción de malonaldehído), generan especies reactivas de oxígeno (ERO) en el interior de la célula (Riyazuddin et al., 2022), disminuyen la tasa de germinación, longitud de la raíz y tallo, y disminuyen el peso húmedo y seco (Shahid et al., 2014). En lo que respecta a la fisiología de las plantas, reducen la cantidad de la clorofila, de pigmentos fotosintéticos, y de prolina (un importante regulador osmótico, especialmente en la pared celular), además de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), y glutatión reductasa (GR) (Guo et al., 2019; Jia et al., 2021; Li et al., 2019; Lu et al., 2018; Metwally et al., 2003; Moustafa-Farag et al., 2020; Safari et al., 2019a, 2019b; Sihag et al., 2019; Soltani Maivan et al., 2017; Zawoznik et al., 2007).

Ambos grupos de MP, en altas concentraciones se consideran perjudiciales, atribuyéndose el aumento de la contaminación por MP, a la actividad antropogénica que incluye minería, utilización de pesticidas/fertilizantes, utilización de combustibles fósiles, la agricultura y actividad forestal,

desechos en el agua y procesos industriales (Alengebawy et al., 2021).

Las plantas, siendo organismos sésiles, han desarrollado una serie de estrategias que permiten mitigar y/o tolerar la contaminación por MP, partiendo por la producción endógena de ácidos orgánicos (AO), producidas en el metabolismo primario o secundario, y que por la presencia de grupos carboxilo (-COOH) tienen la capacidad de quelar los MP, así transformándolos en complejos menos tóxicos. Estos complejos metal-ácido pueden aumentar su solubilidad y ser incorporados al interior de la célula o disminuir su solubilidad quedando atrapados en la interfase raíz- rizosfera (sin ingresar), o quedando intracelularmente en forma de complejos metal-ácido secuestrados en el interior de la vacuola (Osmolovskaya et al., 2018).

Con el aumento de las concentraciones de MP en la corteza terrestre, es fundamental comenzar a utilizar distintas estrategias para mitigar este problema medioambiental, ya que no solo afecta a las plantas, sino también a humanos y animales, que de todos modos sufrirán las consecuencias, ya que los MP se bioacumulan y pasan a través de las cadenas tróficas.

## 1.1 Efectos morfológicos y fisiológicos de los metales pesados sobre las plantas

Los efectos de los MPs sobre las plantas a nivel morfológico son la pérdida/reducción de la fertilidad, reducción en la germinación de semillas, reducción en biomasa, reducción en productividad vegetal, inhibición del crecimiento, reducción del peso seco/húmedo, inhibición de la expansión de las raíces, senescencia, apariencia clorótica y necrosis de las hojas, defoliación, y reducción en la cantidad de hojas (Abbas et al., 2018; Riyazuddin et al., 2022). La reducción en la germinación y el crecimiento del embrión se puede deber a la interacción directa de ciertos MPs con los grupos -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH de las proteínas, además de interactuar con el sitio activo de las proteínas, generando pliegues anormales que las inactivan. Por ejemplo, el Hg<sup>2+</sup> interactúa con los grupos -SH de las proteínas, lo que resulta en la formación de un puente S-Hg-S causando una modificación desigual en las estructuras de las proteínas, afectando ciertas proteínas como amilasas y proteasas (fundamentales para el crecimiento) u otras relacionadas con la regulación de la división celular. Además, los cationes de MP pueden reemplazo del grupo fosfato en las moléculas de ATP (Riyazuddin et al., 2022). Se ha observado que el Pb<sup>2+</sup> tiene la capacidad de interactuar con los grupos -COOH de las proteínas (Shahid et al., 2014).

Los MPs también afectan la fisiología vegetal. Por ejemplo, en la fotosíntesis, se ha observado que el As<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, y Zn<sup>2+</sup> reemplazan el Mg<sup>2+</sup> en el anillo de porfirina, inhabilitando la actividad fotosintética. Cuando las plantas son expuestas a MP, metales como Cu<sup>2+</sup> o Fe<sup>2+</sup>, catalizan la reacción de Haber-Weiss/Fenton que convierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a OH<sup>•</sup> a pH neutro, generando como producto EROs que causan daños inespecíficos al ADN o ARN, inhibición de enzimas, oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos.

Por efecto de la interacción de los MPs como Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, As<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, se inactivan enzimas como RuBisCO y otras relacionadas con el ciclo de Calvin producto de la interacción de estos con los grupos -SH (Riyazuddin et al., 2022; Shahid et al., 2014).

La peroxidación de lípidos se da por efecto del aumento de las oxilipinas, generando un deterioro de las membranas celulares, cambios en la fluidez, fuga anormal de sustancias que normalmente no ingresan en la membrana

plasmática, y la inactivación de receptores, canales iónicos o enzimas presenten en las membranas celulares (Shahid et al., 2014).

Interacciones de EROs con el ADN o ARN da como resultado: daño a los enlaces cruzados, deleciones o modificaciones de bases, roturas de hebras, errores de replicación, inducción de transducción de señales, inducción de la transcripción, y destrucción de la membrana nuclear. En el ADN existen cuatro potenciales sectores de mayor interacción con MPs: I) los grupos hidroxilos de la ribosa, II) los átomos de oxígenos cargados negativamente de los grupos fosfatos y IV) nitrógenos del anillo base. Pero, en general los MPs interactúan con las bases (N7 en las purinas o N3 en las pirimidinas) o con los grupos fosfatos. Adicionalmente, se ha observado que los MPs pueden alterar la expresión de genes y parecen interactuar con los dedos de Zn (Shahid et al., 2014).

Los carbohidratos son ubicuamente los dadores de energía a las células, formados en el proceso fotosintético. Son fundamentales para la germinación, crecimiento, y como almacén de energía, también en la respuesta a estresores, ajuste osmótico, señalización molecular (interactuando con hormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno), y en la integridad de la membrana celular, permitiendo la reducción de NADPH (clave para antioxidantes enzimáticos). Un aumento en las concentraciones de MPs (y, por ende, ERO) disminuye las cantidades de azúcares disponibles en la célula, afectando los procesos mencionados.

## **1.2 Estrategias para evitar y/o mitigar la contaminación por metales pesados**

La tolerancia y/o resistencia de las plantas comienza desde las raíces, estructuras capaces de exudar ciertos compuestos de bajo peso molecular como AO (citrato, malato, oxalato), aminoácidos (histidina, cisteína, asparagina, glutamato), péptidos cortos (glutatión, fitoquelatinas) y proteínas (p. ej., metalotioneínas) (Kutrowska & Szelag, 2014). Los AOs quelan los MPs a través de sus grupos carboxilos (-COOH), formando un complejo MP-AO (menos tóxico), modificando su solubilidad y permitiendo el ingreso al interior de las células o xilema vía simplasto/apoplasto, o inmovilizando el complejo MP-AO a nivel de rizosfera para impedir el ingreso (Tahjib-Ul-Arif et al., 2021). Por otro lado, los AOs disminuyen el pH de la rizosfera (más K<sup>+</sup>) para evitar

una caída brusca de pH y aumentan la solubilidad de ciertos iones metálicos, como por ejemplo  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Al}^{2+}$  quienes se vuelven solubles y tóxicos a pH 7 (ver figura 2) (Fryzova et al., 2018; Osmolovskaya et al., 2018). Los MPs atraviesan la membrana plasmática de la epidermis de la raíz (o endodermis, si fueran transportados apoplásticamente hasta las bandas de Caspari), o bien son transportados a las vacuolas o sufren un transporte simplástico hacia el cilindro vascular; en todo caso la translocación hacia los brotes termina con la descarga desde el xilema. Los MPs presentes en la savia del xilema son absorbidos por células circundantes y transportadas simplásticamente en la hoja tejido, o continúan distribuyéndose apoplásticamente en la hoja (Kutrowska & Szlag, 2014). Para la planta, lo ideal es que micronutrientes esenciales como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ , etc. son absorbidos, y que otros iones metálicos  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , etc., sean excluidos, pero esto no siempre ocurre debido a que los MPs no esenciales pueden presentar propiedades fisicoquímicas similares a los esenciales (Thakur et al., 2022).

La exclusión de los MPs también puede ocurrir a nivel de pared celular gracias a la presencia de polisacáridos, proteínas, aminoácidos y fenoles, que proveen una cantidad importante de sitios de unión con MP ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$ , especialmente los polisacáridos), siendo los Homogalacturonano (rico en  $-\text{COOH}$ ) responsable de la unión con cationes monovalentes y divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). La pared celular puede sufrir modificaciones producto de la interacción con MP, gracias a las enzimas pectinesterasa y pectinmetilesterasa (que producen cambios en el grado de esterificación y acetilación); los carbohidratos también producen cambios en la pared celular producto de la interacción con MP (Thakur et al., 2022). El fluido del xilema posee carga negativa, pH 5 a 6,5, además de una mezcla de ácidos carboxílicos (2-9 mM) y aminoácidos (1-3 mM). Los complejos MP-AO normalmente tienen cargas negativas, por ende, son fácilmente transportados (Osmolovskaya et al., 2018). El ingreso al interior de las células está mediado por una serie de transportadores/bombas de protones dependientes de ATP que catalizan la extrusión de  $\text{H}^+$  a través de la membrana (Fryzova et al., 2018). Los metales y/o complejos con AO son ingresados al interior de las células, donde son secuestrados por transportadores específicos ubicados en el tonoplasto (NRAMP4, NRAMP3, MTPs, HMAs, etc.) (Tahjib-Ul-Arif et al. 2021).

Los procesos de transporte permiten que la disponibilidad de iones metálicos en el citosol se mantenga en un rango óptimo a través de un adecuado secuestro y/o recuperación en las vacuolas. El número creciente de transportadores vacuolares conocidos corresponde esencialmente a la diversidad estructural y funcional de los iones metálicos necesarios en las células (Sharma et al., 2016). Sin embargo, puede ocurrir que exista un exceso de cationes metálicos libres en el citosol, lo que puede generar EROs que causan daños inespecíficos en diferentes moléculas importantes para el metabolismo.

La exclusión puede también ocurrir en el simplasto por transportadores especiales ubicados a nivel de membrana celular con la ayuda de bombas de eflujo como P1B de tipo HMAs (con hidrólisis de ATP), NRAMP, la familia de transportadores CDF, ZIP y ABC. La mayoría de los transportadores están involucrados en el transporte de  $Zn^{2+}/Cu^{2+}$  a través del tonoplasto. Existen dos grupos filogenéticos identificados de HMAs; el primer grupo (grupo  $Cu^+$ ) está involucrado en el transporte de cationes monovalentes como  $Cu^+$ ,  $Ag^+$ , etc., mientras que el segundo grupo traslada cationes divalentes como  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  (Thakur et al., 2022). Otra clase importante de transportadores son NRAMP, una familia conservada de proteínas acopladas a protones integrales de membrana posicionadas en la membrana plasmática de las células apicales de la raíz de la planta, relacionadas con el transporte de  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ . Existen dos grupos: AtNRAMP1 y 6, y AtNRAMP2-5 en *Arabidopsis thaliana*, de los cuales AtNRAMP1,3,4,6 son transportadores intracelulares (Cailliatte et al., 2010). Por otro lado, los ZIP estarían relacionados con el transporte de  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^+$  y  $Cd^{2+}$  en arroz, los transportadores ABC facilitan el transporte a través de la membrana plasmática y la familia CDF son transportadores de eflujo (ver figura 2) (Thakur et al., 2022).

### **1.2.1 Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos**

Los EROs pueden ser contrarrestados por antioxidantes endógenos como SOD, peroxidasa (POD), CAT, APX, GR, dehidroascorbato reductasa y monodeshidroascorbato reductasa (DHAR y MDHAR), y metabolitos no enzimáticos como glutatión (GSH) y ácido ascórbico (AsA). Se ha demostrado que aumentan la transcripción de las enzimas respectivas en presencia de MP (Singh et al., 2017). La



mayoría de estas enzimas antioxidantes o metabolitos son donantes de electrones y reaccionan con los radicales libres para formar productos finales no tóxicos e inactivos, como el agua (Kohli et al., 2017).

## **2. Ácidos orgánicos**

Los AOs como citrato, malato, oxalato, succinato, aconitato, y tartrato son producidos a partir del metabolismo primario (ciclo de Krebs, ciclo de Glioxilato, C3 y C4, etc.). Son fundamentales para la producción de energía, la formación de precursores para la biosíntesis de aminoácidos y en la modulación de la adaptación al medio (López-Bucio et al., 2000). La base del fenómeno de desintoxicación de MP con AOs es la capacidad de estos ácidos para formar enlaces fuertes con MP iónicos a través de la quelación de metales con grupos carboxilo (-COOH) (Osmolovskaya et al., 2018). En el último tiempo, se está prestando atención a distintas fitohormonas como ácido salicílico y ácido jasmónico, debido a que también pueden interactuar con distintas rutas metabólicas, además de ser potentes queladores de MPs. Parte del metabolismo secundario como ácido gálico y ácido cafeico, que también poseen la capacidad quelante propia de un AO, son importantes ácidos fenólicos que tienen capacidad antioxidante y son fundamentales para la dieta (Daglia, 2012; Daglia et al., 2014). Otros AOs son el ácido lipoico y el ácido fítico, el primero, fundamental dentro del metabolismo primario, pero reconocido como un potente quelador de MP (Sgherri et al., 2002). Por su parte, el ácido fítico, es un importante nutriente en las plantas durante la germinación, pero no se puede utilizar como quelador exógeno debido a que las plantas utilizan este compuesto como nutriente y existe gran expresión de la enzima fitasa que lo degrada. Se muestran las estructuras de estos AOs en la Tabla I.

La liberación de AO como respuesta a MPs puede ocurrir de tres formas. En la primera, el catión metálico entra directamente e interactúa con los canales de AO, mientras que en la segunda el catión interactúa con una proteína receptora, y ésta induce los genes involucrados en la biosíntesis de AO a través de segundos mensajeros. Finalmente, en la tercera, el catión ingresa e interactúa indirectamente con el canal AO (Thakur et al., 2022) (figura 1).

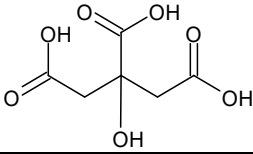
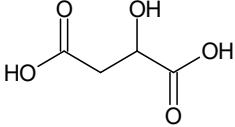
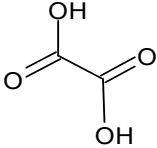
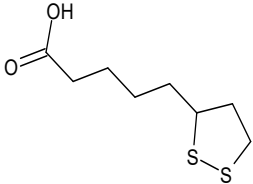
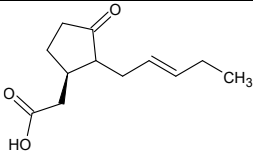
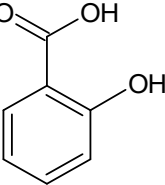
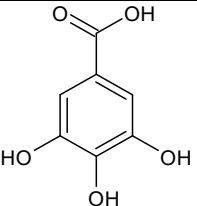
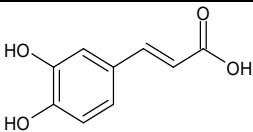
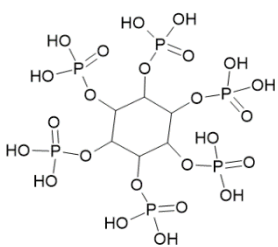
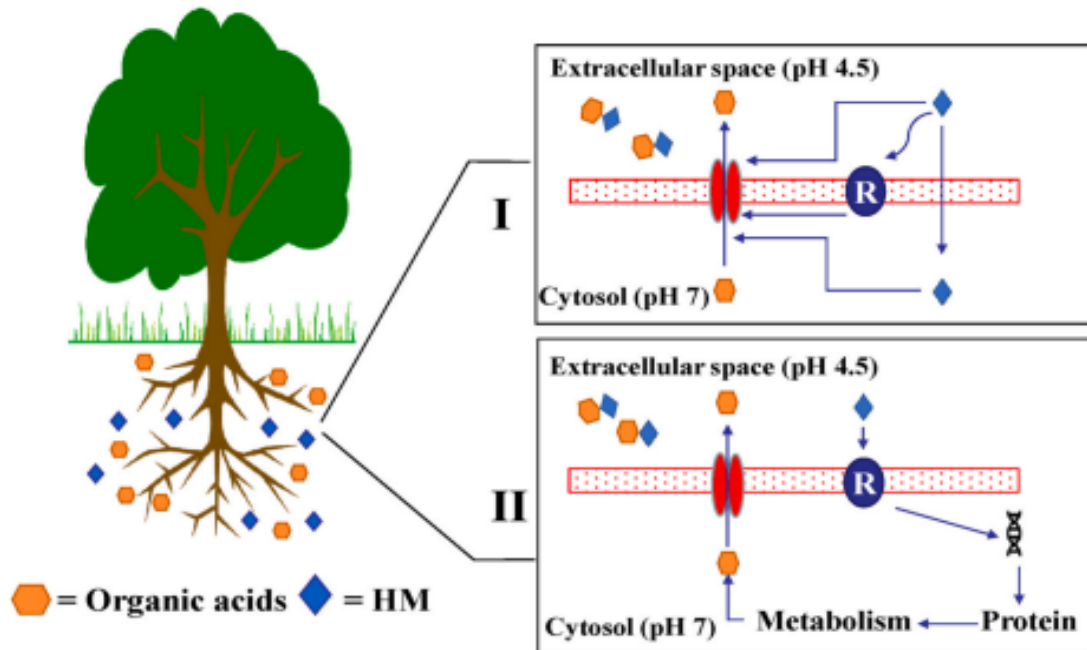
Ácido orgánico	Estructura	Nombre IUPAC
Ácido cítrico		Ácido 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico
Ácido málico		Ácido 2-hidroxiбутanedioico
Ácido oxálico		1,2-Ethandioicácido
Ácido lipóico		Ácido 5-[(3R)-ditiolan-3-yl]pentanoico
Ácido jasmónico		Ácido 2-[(1R,2R)-3-oxo-2-[(Z)-pent-2-enyl]cyclopentil]acético
Ácido salicílico		Ácido 2-hidroxiбензоico
Ácido gálico		Ácido 3,4,5-trihidroxiбензоico
Ácido cafeico		Ácido (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoico
Ácido fítico		1,2,3,4,5,6 ácido hexakisfosfórico

Tabla I. Listado de ácidos orgánicos con sus respectivos nombres IUPAC y grupos carboxílicos.



**Figura 1.** Modelo que representa la liberación activada por MP de AO. En el patrón I, uno de los tres podría operar, es decir, (i) el MP puede directamente interactuar con la proteína del canal y activarla, (ii) el catión interactúa con una proteína receptora (R) que activa aún más la proteína del canal a través de segundos mensajeros, (iii) el catión entra en la célula y activa el canal ya sea directa o indirectamente. En el patrón II, el catión interactúa con R, lo que conduce aún más a la inducción de los genes implicados en el metabolismo de AO o su transporte a través de la membrana plasmática. El complejo AO-MP detoxifica los cationes MP en la rizosfera (imagen obtenida de Thakur et al., 2022).

## 2.1 Ácidos carboxílicos

### 2.1.1 Ácido cítrico

El ácido cítrico (AC) es un compuesto derivado del metabolismo primario, sintetizado por la condensación del acetil-CoA (2 carbonos) y oxalacetato (4 carbonos) para formar citrato con intervención de la enzima citrato sintasa, iniciando el ciclo del ácido cítrico (Haddad & Mohiuddin, 2021). Esta molécula tiene función

antioxidante, pero también se ha demostrado que posee actividad quelante de MP como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{As}^{5+}$  (Afshan et al., 2015; Amir et al., 2020; Aslam et al., 2021; Ehsan et al., 2014; Kumar et al., 2017; Mohammadi et al., 2021; Qiu et al., 2009a; Zaheer et al., 2015). La aplicación exógena de AC en distintos cultivos, mejora la tasa de crecimiento y acumulación de biomasa, mayor contenido de clorofila y, por ende, conduce a mayor actividad fotosintética, mayor eficiencia en el uso del agua, mayor actividad de enzimas antioxidantes y reducción de EROs (Chen et al., 2020). En un estudio donde se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) crecidas en suelos provistos de 10  $\mu\text{M}$  Pb y 10  $\mu\text{M}$  As, el suministro de 250  $\mu\text{M}$  de AC aumentó parámetros como crecimiento, tasa de germinación, cantidad de pigmentos fotosintéticos, longitud de las raíces, y contenido de clorofila  $\alpha$  y  $\beta$ , y también el nivel de moléculas antioxidantes como antocianinas y  $\alpha$ -tocoferol, incrementando la eficiencia de enzimas con capacidad antioxidante como CAT, APX, GR, mientras que otros parámetros disminuyeron como daño al ADN (Kumar et al., 2017). La utilización de AC mejora la resistencia de otros cultivos frente a MPs. Cultivos como canola (*Brassica napus*) que fueron crecidos en condiciones de invernadero con  $\text{Cu}^{2+}$  (50 y 100  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Cd}^{2+}$  (0.6 mM),  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{As}^{5+}$  (10  $\mu\text{M}$ ), o  $\text{Cr}^{3+}$  (100 y 500  $\mu\text{M}$ ), donde se aplicó una dosis de 2.5 y 5.0 mM de AC en medio nutritivo, se observó que se reducía y mitigaba su toxicidad, incrementaba la tolerancia al estrés, y aumentaba su biomasa (Afshan et al., 2015a; Ehsan et al., 2014; Zaheer et al., 2015a). Además, se aumentaron los niveles de actividad de enzimas como CAT, POX y SOD en condiciones de estrés por  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  (1, 2.5, 5 mM) (Amir et al., 2020a). La eficiencia del AC (2.5 mM, 5 mM, 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) como quelador de  $\text{Cd}^{2+}$  (0.6 mM, 300 mg  $\text{Kg}^{-1}$ , 50 mg, 25.0  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  (1, 2.5, 5 mM), también ha sido comprobada en otros cultivos como mostaza (*Brassica juncea*), hierba mora (*Solanum nigrum*), maíz (*Zea mays*), girasol (*Helianthus annuus*), arroz (*Oryza sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*), y canola (Amir et al., 2020; Anwer et al., 2012; Bilal Shakoore et al., 2014; Gao et al., 2010; Kaur et al., 2017; Li et al., 2014; Sebastian & Prasad, 2018). En otros cultivos como caléndula (*Calendula officinalis*) crecidas en suelos calcáreos enriquecidos con  $\text{Cd}^{2+}$  (50 y 100 mg  $\text{kg}^{-1}$ ), los cultivos tratados con AC exógeno en dosis de 0.05 y 0.1 mM no mostraron tener ningún síntoma fisiológico relacionado a toxicidad por  $\text{Cd}^{2+}$ , y haciendo una comparación con otros

agentes quelantes como ácido tartárico y EDTA, demostró tener mejor eficiencia en términos de fitorremediación (Saffari & Saffari, 2020a). En otro cultivo, el sauce (*Salix viminalis* L.), el suministro de AC 20 mM en suelos que se encontraban contaminados con  $\text{Cd}^{2+}$  (3 y 6  $\text{mg kg}^{-1}$ ), mejoró parámetros como biodisponibilidad, movilidad y distribución del Cd en la planta, también la cantidad de clorofila, la tasa fotosintética y el intercambio de gases (Arsenov et al., 2020). En suelos conteniendo  $\text{Pb}^{2+}$  (100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), la aplicación foliar e irrigación con AC exógeno (5 o 10 mM) en plantas de alerce de Gmelin (*Larix olgensis*) disminuyó los efectos tóxicos de  $\text{Pb}^{2+}$ ; el efecto mediado por AC aumentó la actividad y eficiencia de enzimas POD y SOD, la cantidad de clorofila, prolina y carotenoides, y disminuyó la peroxidación de lípidos (Arsenov et al., 2020) (ver table II).

En lo referente a la expresión de los genes, se pueden dividirlos en tres grandes grupos. El primer grupo son los genes de biosíntesis del AC, el segundo grupo son transportadores específicos de MP o metaloides, y el tercer grupo de genes son de tolerancia a MP. Partiendo por el grupo de tolerancia o indicadores de estrés por MP, en los trabajos de (Arsenov et al., 2020) y (Kaur et al., 2017a), se analizó la expresión de tres genes - clorofilasa (*CHLASE*), fitoeno sintasa (*PSY*) y la chalcona sintasa (*CHS*) - que están vinculados a la actividad fotosintética y que son indicadores de estrés por MP - bajo contaminación por  $\text{Cd}^{2+}$  (en forma de  $\text{CdCl}_2$  0.6 mM) en semillas de mostaza. Se encontró que *CHLASE* aumentó su expresión 3,57 veces en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ , pero el AC exógeno (0,6 mM en el suelo) marcó una disminución en la expresión de *CHLASE*. La expresión de *PSY* y *CHS* aumentó significativamente por combinación de tratamiento con castasterona y AC en 2,85 veces y 5,15 veces, respectivamente. Otros genes involucrados en el transporte de MP o metaloides son los genes de la familia NRAMP. La expresión de *OsNramp1*, 2, 3 y 5, se ve inhibida por el estrés por  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdCl}_2$ ) en plantas de arroz, en distintas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  (0.1, 0,6, 2,4  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Sin embargo, la aplicación foliar de AC (5.0 mM) aumentó la expresión del gen *OsNramp5* en un 40% y eliminó la inhibición del  $\text{Cd}^{2+}$  en su expresión. Mientras que *OsNramp1*, 2 y 3 volvieron a niveles basales (sin estrés por  $\text{Cd}^{2+}$ ) (Xue et al., 2021). En otro estudio, también se evaluó la acción del citrato y malato exógeno (50  $\mu\text{M}$  en medio nutritivo) en el mismo gen *OsNramp1*, pero también *OsIRT1* en arroz, así como *OsSOD* y *OsCAT* en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  (como

CdCl<sub>2</sub>, en el medio, 25 µM). En presencia de AO (sin Cd), decae la expresión de *OsNramp1* y *OsIRT1*. Otros genes evaluados también disminuyen su expresión como *OshMA3* y *OsNAS1* que participan en el transporte vacuolar de Cd<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>, respectivamente. Sin embargo, la adición de AO neutralizó los efectos adversos del Cd sobre la expresión de los genes anteriores, tales como *OsNramp1*, *OsIRT1*, *OshMA3*, y *OsNAS1* que aumentaron su expresión con el suministro exógeno de AC, mientras que genes *OssOD* y *OscAT* disminuyeron su expresión (Sebastian & Prasad, 2018b). La expresión de otros transportadores también ha sido estudiada en sauce (*Salix variegata*) expuestas a AC (100 µM en medio hidropónico). La expresión de nueve genes candidatos *HMA1* (P-type metal ATPase protein 1), *PCS1* (PS sintasa 1), *HMA3* (P-type metal ATPase protein 3), *HMA5* (P-type metal ATPase protein 5), *Nramp5*, *MTP1* (metal tolerance protein 1), *MTP4* (metal tolerance protein 4), y *MT1A* y *MT2B* (Metalotioneínas 1A y 2B) se vio interrumpida por la incorporación de Cd<sup>2+</sup> (50 µM en medio hidropónico). Al agregar AC, los niveles de expresión de *NRAMP5*, *MTP1*, *MTP4*, *HMA1*, *HMA3*, *MT1A*, *MT2B* y *PCS1* fueron 6,96, 2,82, 1,70, 2,28, 1,97, 1,82, 2,42 y 2,90 veces mayores en hojas que en el grupo de tratamiento con Cd<sup>2+</sup>, respectivamente. Mientras que, en raíces, solamente la expresión de *PCS1*, *HMA3*, *Nramp5*, *MTP4*, y *HMA3*, aumentó en presencia de AC; *MTP1*, *HMA1* y *MT1A* no mostraron diferencias significativas, y finalmente *MT2B* disminuyó su expresión en presencia de Cd y AC exógeno.

**Conclusión:** La aplicación exógena de AC promueve la productividad vegetal, ya sea por, aumento de parámetros morfológicos (crecimiento, utilización del agua, aumento del peso húmedo/seco, etc.) y/o por aumento de parámetros fisiológicos como tasa fotosintética, la cantidad de pigmentos, etc. Alivia el desequilibrio osmótico inducido por el estrés abiótico al aumentar los osmorreguladores y protegiendo las membranas de daños. Reduce la severidad del estrés oxidativo al regular al alza los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Acelera la tolerancia al estrés por MPs de las plantas al quelar y secuestrarlos y mejora su fitoextracción de suelos contaminados con MP. Proporciona el sustrato para una amplia variedad de vías metabólicas que sintetizan metabolitos que protegen contra el estrés como fitohormonas, aminoácidos, AOs y ácidos grasos.

### 2.1.2 Ácido málico

El ácido málico (AM, malato, ácido 2-hydroxybutanedioico), un ácido dicarboxílico de cuatro carbonos que existe de forma natural y un intermediario en el ciclo del TCA, es formado a partir del ácido fumárico y oxidado a ácido oxoacético. En un estudio comparativo, donde se exponen brotes de sauce a contaminación por Cd<sup>2+</sup> (50 µM en solución acuosa como CdCl<sub>2</sub>) entre tres ácidos orgánicos distintos (AM, AC y ácido tartárico AT; 100 µM en solución acuosa), las plantas tratadas con AM resultaron con un incremento más pronunciado de biomasa de raíz, tallo y total con aumento de 201, 241 y 208%, disminución del contenido de malonaldehído (MDA) en las raíces con AC, AT, AM en un 30, 51 y 68% respectivamente, mientras que el contenido de MDA en hojas, disminuyó al 71% con AM. En las raíces, la adición individual de AC y AM aumentó la actividad de POD al 201% y al 324%, respectivamente en hojas, mientras que el tratamiento con AM aumentó la actividad de POD en un 45%, en comparación con el grupo tratado con Cd<sup>2+</sup> (Zhang et al., 2020). Destacando el rol del AM para permitir la recuperación de parámetros disminuidos por MPs, otros ejemplos de cultivos tratados con AM (concentraciones ver tabla II) incluyen *Miscanthus sacchariflorus*, mostaza y *Alyssum corsicum*, mostaza (Ni en la solución nutritiva no indujo síntomas fitotóxicos, y en su lugar se observó estimulación del crecimiento), espinaca y arroz (Guo et al., 2017; Khan et al., 2016; Qiu et al., 2009b; Sebastian & Prasad, 2018b). Otros cultivos de interés comercial han sido tratados con AM exógeno como maíz (0.1 mmole kg<sup>-1</sup>) y girasol (250 o 500 µM). Cuando brotes de estos cultivos fueron expuestos a Ni<sup>2+</sup> (250 mg Ni kg<sup>-1</sup>) o Cd<sup>2+</sup> (5 µM como CdCl<sub>2</sub> en solución), respectivamente, los síntomas producidos por estos MPs fueron aliviados (Ghasemi-Fasaei, 2012; Hawrylak-Nowak et al., 2015). Este ácido tiene un comportamiento similar en términos de fitorremediación, es decir, incrementa la biomasa total y el radio de crecimiento, mejora la capacidad antioxidante (al incrementar la actividad de enzimas antioxidantes POD, SOD, APX, GR, etc.) y el contenido de pigmentos fotosintéticos como clorofilas, antocianinas, etc., incrementa la expresión de genes asociados a la tolerancia de MPs (*CHLG*, *OsNramp1*, *SOD*, *POD*, etc.), y disminuye especies reactivas de oxígeno (ERO), fuga de electrones (electron leakage, EL), especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ver tabla II). En una investigación se comprobó el efecto de distintos AOs (AC, AM, AT) en los niveles de expresión de nueve

genes candidatos implicados en transporte de metales y desintoxicación en raíces y hojas de sauce bajo estrés por Cd<sup>2+</sup> (100 µM de CdCl<sub>2</sub> en solución acuosa). Estos genes son *Nramp5*, *MTP1*, *MTP4*, *HMA1*, *HMA3*, *HMA5*, *MT1A*, *MT2B* y *PCS1*. En las raíces, el Cd<sup>2+</sup> bajó significativamente el nivel de expresión de *HMA1*, *PCS1*, *MT1A*, *MT2B* y *HMA3*. El AM (100 µM en solución acuosa) en raíces, logró aumentar los niveles de expresión de los genes *HMA1*, *HMA3*, *HMA5*, *MTP4* y *Nramp5*, mientras que *PCS1* fue regulado negativamente. Los otros genes *MTP1*, *MT1A* y *MT2B* no tuvieron cambios. En hojas, el AM aumentó los niveles de expresión de *Nramp5* y *PCS1* (expresión mayor incluso que con otros AOs), mientras que la expresión de *MTP1*, *HMA3*, *HMA5*, *MT1A* y *MT2B* disminuyó, respecto al grupo de tratamiento con Cd<sup>2+</sup> (Zhang et al., 2020). El AM ha demostrado tener capacidad de aumentar la expresión de genes de enzimas antioxidantes. En pasto elefante (*Miscanthus sacchariflorus*) sometida a estrés por Cd<sup>2+</sup> (100 µM de CdCl<sub>2</sub> en solución nutritiva), tanto el tratamiento por Cd o AM (100 µM en solución nutritiva) aumentaron la expresión de *Cu/Zn-SOD*, *POD1*, *GPX1*, *GST1*, *MDHAR* y *DHAR*, mientras que *CAT1* disminuyó su expresión y no hubo diferencias en la expresión de *APX1* cuando se aplicó solo AM. Cuando AM y Cd<sup>2+</sup> se aplicaron simultáneamente, se indujo la expresión de *Cu/Zn-SOD*, *POD1*, *GR1*, *GPX1*, *GST1* que fue de 1.7, 2.0, 4.7, 2.2 y 2.3 veces más altos cuando la relación era de 1:2 (Cd: MA), que solo con Cd<sup>2+</sup> (Guo et al., 2017). En otro ejemplo, en arroz los genes *OsNramp1*, *OsIRT1*, *OsHMA3* y *OsNAS1* decayeron su expresión en respuesta al estrés por Cd<sup>2+</sup> (25 µM CdCl<sub>2</sub> en medio nutritivo), y la expresión de estos genes aumentó cuando se agregaron los OA (AC y AM, 50 µM en medio nutritivo), neutralizando el estrés por MP. Cabe mencionar que, durante la exposición a AM, la expresión del *OsNAS1* redujo (esto puede deberse a que la disponibilidad de este ácido no es compatible con los requerimientos de nicotianamina para la circulación de cationes), *OsCDT1* (cadmium tolerance 1) aumentó su expresión, y *OssOD* disminuyó su expresión (ver tabla II) (Sebastian & Prasad, 2018).

**Conclusión:** El AM aumenta la productividad vegetal al promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, mitigar el estrés por MPs, modular la actividad de genes relacionados con metabolitos protectores del estrés abiótico, y quelar/secuestrar MPs. Al ser un producto natural es una herramienta económica de sintetizar y



aplicar a los cultivos.

### 2.1.3 Ácido oxálico

El ácido oxálico (AOx) es un ácido dicarboxílico simple y fuerte, con constantes de disociación de  $pK_1 = 1,46$  y  $pK_2 = 4,40$  (Franceschi & Nakata, 2005). El AOx y su base conjugada oxalato puede formar sales con  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , y  $Cu^{2+}$  siendo el más importante el oxalato de Ca (CaOx; (Franceschi & Nakata, 2005)), cumpliendo un importante rol en la regulación no solo de Ca sino también de otros iones y MPs, ya que este se acumula dentro de las vacuolas de células especializadas llamadas idioblastos (Nakata, 2003). El AOx y su base conjugada tiene un potente efecto quelador de los MPs  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , efecto que ha sido demostrado en cultivos como la mostaza. En este caso, semillas fueron crecidas en suelos que presentan contaminación por  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . La toxicidad inducida por estos MPs impuso una serie de respuestas, entre ellas caída en la actividad de enzimas antioxidantes como fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), CAT, además de reducir el peso seco y húmedo de las plantas. Para aliviar los síntomas producidos por la contaminación por estos MPs, se agregaron distintos tipos de quelantes (5 mM de EDTA, AC o AOx). Si bien el EDTA es muy efectivo como quelante de MPs, su aplicación presentó efectos negativos en la actividad de PPO, y reducciones de la biomasa de brotes y raíces en un 58,4% y 72,6%. Sin embargo, el tratamiento con 5 mM de AOx, no tuvo ese efecto; por el contrario, mejoró significativamente los parámetros como la actividad antioxidante de PAL, PPO y CAT, el peso seco y húmedo de las planta y raíces (Guo et al., 2019a). En otro estudio más reciente, la aplicación foliar de 2,5 mM de AOx más ácido indol-acético (IAA) en *Sedum alfredii* resultó en la biomasa total más alta y un ligero aumento en el contenido de  $Cd^{2+}$  o  $Pb^{2+}$  de los brotes en comparación con el control, y mejoró la absorción de nutrientes como K en un 38.3% respecto del control. Sin embargo, disminuyó iones como Ca y Mg en un 35.2% y un 14.3% respectivamente (Liang et al., 2021a). En estudios similares, se aplicó AOx al garbanzo (*Cicer arietinum*) cuyas semillas fueron bañadas en una solución acuosa de  $CdCl_2$  200  $\mu$ M, para luego ser lavadas nuevamente en 100  $\mu$ M de AOx. Se midieron parámetros fisiológicos marcadores de estrés como peroxidación de lípidos (concentración de MDA), determinación del contenido de peróxido de hidrógeno, el

contenido de grupos carbonilo en proteínas, cuantificación de nicotinamidas (NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>), determinación del contenido de glutatión y actividad de enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. En raíces y brotes, el estrés por Cd<sup>2+</sup> aumentó considerablemente la cantidad de MDA, el contenido de grupos carbonilo en proteínas, y el contenido de peróxido de hidrógeno. La aplicación exógena de AOx alivió significativamente estos síntomas, marcando valores similares a los valores del grupo control. La exposición de semillas en germinación al estrés por Cd provocó un 28% y un 36% de disminución de la relación GSH/GSSG en raíces y brotes, respectivamente, en comparación con los controles, un marcado incremento en la actividad de GPX (62% y 77% en raíces y brotes, respectivamente, debido a que es la enzima responsable de reciclar a las enzimas antioxidantes) y GR (506% y 77% en raíces y brotes, respectivamente; ver tabla II). Nuevamente en presencia de AOx, estas enzimas marcaron valores similares a los dados por las plantas sin estrés. En presencia de Cd<sup>2+</sup>, el balance de nicotinamidas (NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>) y sus formas reducidas (NADH<sup>+</sup> NADPH), en brotes aumentó en un 37%. El AOx exógeno contrarresta el efecto adverso del Cd<sup>2+</sup> sobre la homeostasis de las nicotinamidas, manifestado por la restauración del equilibrio entre formas oxidadas y reducidas (Sakouhi et al., 2021a).

**Conclusión:** La aplicación exógena de este AO puede ser una alternativa de bajo costo y ecoamigable para cultivos que se encuentren bajo contaminación por MPs, no solo por productividad vegetal, sino porque es un potente quelador sin efectos secundarios como el EDTA.

#### 2.1.4 Ácido lipoico

El ácido lipoico (ácido 6,8-ditiooctanoico, AL) es una molécula de 8 carbonos, cofactor fundamental para la actividad de cinco complejos enzimáticos que forman parte del metabolismo central:  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH), piruvato deshidrogenasa (PDH), glicina descarboxilasa (GDC),  $\alpha$ -ketoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCDH) y acetoín deshidrogenasa (AoDH) (Mooney et al., 2002; Perham, 2000). El AL y su forma reducida ADHL (Navari-Izzo et al., 2002; Turk et al., 2018a) tienen actividad antioxidante y capacidad de quelar MPs; AL puede quelar metales como Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, mientras que ADHL puede quelar Fe (tanto Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>), Co<sup>2+</sup>,

Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>. Aunque está bien documentado que AL tiene la capacidad para quelar iones metálicos además de propiedades antioxidantes (Sgherri et al., 2002b), existen pocos estudios sobre los posibles efectos mejoradores de AL en plantas expuestas a toxicidad por MPs. Uno de ellos es el realizado por (Turk et al., 2018a), donde se demostró el efecto fisiológico y bioquímico relacionado con la aplicación de AL en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.), donde estas fueron embebidas con una solución de 1.5 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> más 2 µM de AL. Se observó que la aplicación exógena de AL es capaz de mitigar los efectos negativos producidos por contaminación por Pb<sup>2+</sup> en los vástagos, como la actividad de la enzima amilasa. Específicamente, esta enzima reduce significativamente su actividad en presencia de Pb<sup>2+</sup>, pero la aplicación de AL aumentó la actividad de la amilasa en el endosperma en un 20% respecto del control. Además, el tratamiento con Pb<sup>2+</sup> aumentó significativamente las cantidades de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un 42 y 58% respectivamente, pero la presencia de AL redujo las cantidades de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un 19 y 20% respectivamente. La presencia de Pb marca también un aumento de 37% en la peroxidación de lípidos, mientras que en vástagos que recibieron tratamiento con AL bajaron 14 y 13%. Otras enzimas como SOD también aumentan su actividad en presencia de este MP en un 25,8% respecto del control. Las plantas tratadas con AL disminuyeron la actividad de SOD en un 10%, aunque la de otras enzimas como GPX, GR y APX no fue afectada con AL (ver tabla II). La presencia de AL marcó también el aumento de GSH e incrementó el radio de GSH/GSSH, incluso sin estrés por Pb<sup>2+</sup>.

**Conclusión:** Considerando lo mencionado y pesar de que no hay muchos estudios que apliquen AL exógeno para aliviar síntomas por MPs, no deja ser una alternativa para la fitorremediación i) es un excelente quelador de MPs; ii) es un cofactor de enzimas del metabolismo primario; iii) AL y ADHL tienen actividad antioxidante y regenerador de otras enzimas antioxidantes. Sin embargo, hay que considerar el costo de producción del AL y la presencia de S en su estructura (que puede implicar un problema medioambiental).

## 2.2 Fitohormonas

### 2.2.1 Ácido salicílico

El ácido salicílico (AS, ácido ortho-hydroxybenzoico) es una fitohormona fenólica presente en el reino vegetal, importante regulador de procesos como la termogénesis, señalización de las plantas, regulador de la morfología de las plantas, desarrollo, floración y cierre de las estomas. También participa como mediador en el estrés biótico como defensa contra patógenos y estrés abiótico como contaminación por MP (Sharma et al., 2020a).

Existen múltiples reportes que la aplicación exógena de AS puede aliviar los síntomas fisiológicos dados por la contaminación de MPs como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ , (Li et al., 2019; Lu et al., 2018; Metwally et al., 2003; Moustafa-Farag et al., 2020; Safari et al., 2019a; Sihag et al., 2019; Zawoznik et al., 2007). El suplemento de AS exógeno ha sido probado en muchos cultivos como papas (*Solanum tuberosum*). Explantes de este cultivo fueron expuestas a  $\text{Cd}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ) y aplicación foliar de AS (600  $\mu\text{M}$  AS), donde mejoró parámetros reducidos por el estrés por  $\text{Cd}^{2+}$ , como el contenido relativo de agua (relative water content, RWC), la cantidad de clorofila y prolina, junto con disminuir el MDA y ERO ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ ) (Li et al., 2019). En otra investigación usando toronjil (*Melissa officinalis*), en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  (desde 0 a 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en solución nutritiva, la aplicación de AS (1,0 mM) por aspersión manual, contrarrestó los efectos negativos de la contaminación de este MP (Safari et al., 2019). Además, en cebada (*Hordeum vulgare*) en contaminación por  $\text{Cd}^{2+}$  (25  $\mu\text{M}$ ), la presencia de AS exógeno (0,5 mM) tuvo efectos similares a los descritos previamente (ver tabla II) (Zawoznik et al., 2007).

En lo referente a la parte molecular, se midió la expresión de dos genes en plantas de toronjil expuestas a contaminación por  $\text{Hg}^{2+}$  ( $\text{HgCl}_2$ , 50  $\mu\text{M}$  en solución nutritiva), clorofila sintasa (*CHLG*), clave para la formación de clorofila, proceso muy sensible al estrés por MPs) y *PAL*, requerido para la formación de fenilpropanoides (y AS) importante para la aclimatación a estrés abiótico. La exposición a  $\text{Hg}^{2+}$ , redujo la expresión de *CHLG* en un 36,90% en comparación con el control, mientras que *PAL* aumentó su expresión. La aplicación de AS (50  $\mu\text{M}$ , en solución nutritiva), aumentó la expresión de *CHLG* mientras la de *PAL* disminuyó, lo que sugiere que AS tendría un rol importante en la regulación de genes relacionados con la biosíntesis de compuestos fenólicos. En otro estudio donde semillas de maíz fueron expuestas a estrés por  $\text{Pb}^{2+}$  (2,5 mM), los genes evaluados fueron *ZmACS6* y *ZmSAMD* (involucrados en el metabolismo de la metionina,

precursor de etileno y de poliaminas). Bajo la influencia de  $Pb^{2+}$ , estos genes aumentaron su expresión (en raíces) 72% y 76%, respectivamente, mientras que en brotes fue fuertemente inhibida en un 52% y 70% respectivamente. El tratamiento con AS (0.5 mM) contrarrestó estos cambios en la transcripción de *ZmACS6* y *ZmSAMD*; disminuyeron en las raíces mientras que se regularon al alza en los brotes de las plantas de maíz, lo que sugiere que AS tendría un rol en la síntesis de etileno y la tolerancia al estrés por MP (Zanganeh et al., 2018). La importancia de AS exógeno también se demuestra en la regulación del crecimiento, contenido de pigmentos, antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y expresión génica en plántulas de mostaza expuestas a diferentes concentraciones de  $Pb^{2+}$  (0,25, 0,50 y 0,75 mM, en medio nutritivo). En un análisis de la expresión, *POD*, *DHAR*, *GST* y *GR* disminuyeron su expresión (0.94, 0.49, 0.64 y 0.90-veces, respectivamente) con  $Pb^{2+}$  solo. Sin embargo, el tratamiento de AS (1 mM, en remojo de semillas) administrada a vástagos estresados con  $Pb^{2+}$  condujo a una mejora máxima en la expresión de *CAT*: 4.08-veces, *POD*: 4,96-veces, *GR*: 3,24-veces, *DHAR*: 3,57-veces), y *GST*: 2,03-veces (ver tabla II) (Kohli et al., 2018).

**Conclusión:** Al igual que otros AOs, este OA mejora parámetros morfológicos, fisiológicos y modula la expresión de genes relacionados con su propia biosíntesis y otros genes relacionados con la tolerancia a MPs y metaloides. Este AO en particular, puede ser especialmente importante para cultivos comerciales ya que es una fitohormona que cumple funciones como señalización, crecimiento, desarrollo, floración, morfología, etc.

### 2.2.2 Ácido jasmónico

El ácido jasmónico (AJ) y sus derivados los jasmonatos (JAs) son fitohormonas lipídicas pertenecientes al grupo de las oxilipinas. Fueron descubiertas en 1962 cuando se aisló el compuesto volátil metil jasmonato (MJ o MeJA) como el componente principal de la esencia del jazmín. Esta fitohormona es parte de procesos como la adaptación al estrés, crecimiento reproductivo de las plantas, movimiento, etc. (Raza et al., 2021).

En lo referente a la parte fisiológica, la aplicación de AJ (y sus derivados) permite aliviar los síntomas producidos por la contaminación por MP y metaloides  $Cr^{6+}$ ,  $As^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ . La aplicación de  $Cr^{6+}$  (150 y

300  $\mu\text{M}$ , en solución cerca de la raíz) en plantas de Choy sum (*Brassica parachinensis*) genera una caída en parámetros morfológicos como longitud de la raíz, altura de la planta, peso fresco y seco de la raíz y brotes, el número de hojas, contenido de clorofila (a y b), carotenoides, absorción de nutrientes ( $\text{Cr}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), con aumentos en la actividad de enzimas antioxidantes lipoxigenasa (LOX), SOD, CAT, APX, GR, GST, MDHAR, DHAR, glyoxalasa I (Gly I) y glyoxalasa II (Gly II), y en los niveles de MDA, metilglioxal (MG), y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, la aplicación foliar (5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) de AJ permite neutralizar los efectos tóxicos del  $\text{Cr}^{2+}$ , siendo 20  $\mu\text{M}$  el tratamiento más efectivo en la recuperación de los parámetros morfológicos, la cantidad de pigmentos fotosintéticos, el intercambio gaseoso, además que redujo la absorción de  $\text{Cr}^{4+}$  por parte de las raíces y restableció la homeostasis de minerales ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ). Se observa un efecto reforzante del AJ sobre las enzimas antioxidantes LOX, SOD, CAT, APX, GR, GST, MDHAR y DHAR. El Gly I mejoró su actividad significativamente cuando se aplicó AJ (20  $\mu\text{M}$ ) y a la vez restauró la actividad de Gly II a valores basales. El AJ exógeno también permite la reducción de los niveles de MDA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y MG (Kamran et al., 2021). En otros cultivos como trigo (100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  más MJ 10  $\mu\text{M}$ ) en spray en los brotes (Kaya et al., 2021), frijoles corredores (*Phaseolus coccineus*, con 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  y MJ 10  $\mu\text{M}$  en medio nutritivo Hanaka et al., 2016), alfalfa (100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  y AJ (1, 5, 10 nM) en medio nutritivo; Dai et al., 2020), y arroz (150 y 300  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  y MJ (0.5 y 1  $\mu\text{M}$ )), también mejoran los parámetros fisiológicos al aplicar este AO (ver tabla II). En este último estudio, se demostró que el MJ puede modular la expresión de ciertos genes tales como *HMA*s, *PCS1*, *PCS2* y *ABCC1* (transportador de Cd hacia la vacuola) (Salavati et al., 2021). La toxicidad del Pb aumentó la expresión de *HMA2* (involucrado en el transporte de  $\text{Cd}^{2+}$  hacia los brotes), *HMA3* y *HMA4* (transportadores de  $\text{Cd}^{2+}$  hacia la vacuola), y también incrementó la expresión de *PCS1*, *PCS2* y *ABCC1*. Cuando se aplicó MJ exógeno, la expresión de *HMA2* disminuyó, mientras que la expresión *HMA3*, *HMA4* se incrementó al igual que *PCS1*, *PCS2* y *ABCC1* (Salavati et al., 2021). Actividad similar se observa cuando a plantas de arroz se les aplica As (25 y 50  $\mu\text{M}$  en medio nutritivo) y MJ (0,5 y 1  $\mu\text{M}$ , en medio nutritivo). Los efectos de MJ son similares, en términos de restauración de parámetros morfológicos (peso seco total) y fisiológicos (cantidad de clorofila a, b; carotenoides). Así mismo, el MJ redujo

la absorción de  $\text{As}^{3+}$  en las raíces y hojas, aumentó significativamente la cantidad de AJ endógeno (especialmente en las plantas tratadas con  $1 \mu\text{M}$  MJ) y redujo la cantidad de MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El tratamiento con MJ también potenció la actividad de enzimas antioxidantes (APX, SOD, CAT) y de antioxidantes no enzimáticos (AsA, DHA, GSH). En la parte molecular, la expresión de ciertos genes relacionados con transportadores de arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ) y de  $\text{Fe}^{2+}$  fueron alteradas. Dado que el arsenito y el fosfato posee similitudes fisicoquímicas, el flujo de arsenito es mediado por transportadores de fosfato, *Lsi1* media el flujo de arsenito, mientras que *Lsi2* transporta arsenito a las partes aéreas de la planta de arroz. Por otro lado, el transporte de Fe ( $\text{Fe}^{3+}$ ) puede ser mediado por *OsNRAMP5* (también tiene la capacidad de transportar  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{As}^{3+}$ ), *OsYSL2* (en conjunto con el ácido mugineico) y *OsFRDL1*. Sin embargo, arroz también puede transportar  $\text{Fe}^{2+}$  con *OsIRT1*. Cuando se aplicó  $\text{As}^{3+}$  ( $25$  y  $50 \mu\text{M}$ ), la expresión de los transportadores de As (*Lsi1*, *Lsi2* y *Lsi6*) aumentó significativamente, donde *Lsi1* subió  $4.9$  y  $6.4$  veces (en variedades de arroz T. hashemi y Fajr), y *Lsi6*  $3.6$  a  $3.5$  veces de cambio a  $50 \mu\text{M}$  en variedades de arroz T. hashemi y Fajr, respectivamente. Aumentó también la expresión de *Nramp1*, *Nramp5* y *IRO6*, mientras la de *OsFRDL1* y *OsYSL2* disminuyó. La co-aplicación de MJ ( $1 \mu\text{M}$ ) más  $\text{As}^{3+}$  redujo la expresión de *Lsi1*, *Lsi2* y *Lsi6*, *Nramp1*, *Nramp5*, lo cual podría estar indicando que las plantas de arroz tienen una reducción de transporte de As. Mientras que transportadores de Fe *IRO6*, *FRDL1* y *YSL2* (máximo a  $50 \mu\text{M}$ ) aumentaron su expresión, lo cual indica que hay mayor transporte de Fe en las plantas de arroz (Mousavi et al., 2020). En otro ejemplo, semillas de tomate fueron remojadas en solución con AJ ( $100 \text{ nM}$ ) por 4 horas para neutralizar los efectos nocivos de  $\text{Pb}^{2+}$  ( $0.25$ ,  $0.50$  y  $0.75 \text{ mM}$ ). Los resultados indican que el AJ exógeno permitió incrementar RWC, contenido de pigmentos fotosintéticos totales, metabolitos secundarios (flavonoides, antocianinas, xantofilas, polifenoles), y se elevó la cantidad de ácido cítrico, succínico, fumárico y málico en vástagos expuestas a  $0,75 \text{ mM}$   $\text{Pb}^{2+}$  más  $100 \text{ nM}$  AJ, en comparación con las plántulas solo expuestas a  $\text{Pb}^{2+}$ . También hay cambios en la expresión de genes cuando se aplica AJ (más Pb), con caídas en la expresión de *citrato sintasa*, *malato sintasa* y *clorofilasa*, y aumentos en la expresión de *succinato deshidrogenasa*, *fumarato hidratasa*, *chalcona sintasa* y *fenilalanina amonía liasa* (Bali et al., 2019).

A parte de los genes mencionados, existen reportes que indica que la contaminación por MPs induce la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de AJ. En arroz, se ha demostrado que el  $\text{Cu}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuCl}_2$  en el medio nutritivo) aumenta la expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de JA tales como fosfolipasa, LOX, 12-Oxo-PDAreductasa, y aleno oxidasa sintasa AOS (Lin et al., 2013). Con la exposición a  $\text{As}^{5+}$  (5 a 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{As}^{5+}$  como  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ , por riego) se hizo un análisis transcriptómico identificando cambios de siete genes, incluidos *OsDAD1; 2, OsDAD1; 3, OsLOX2; 1, OsLOX2; 3, OsAOS1, OsAOS2* y *OsAIM1* con funciones putativas en la biosíntesis de JA (Huang et al., 2012). Niveles de expresión aumentados de los supuestos *OsDAD*, *OsLOX*, *OsAOS* y *OsAOC* son ubicuamente detectado en plantas de arroz con los tratamientos de Cu (ver tabla II) (Lin et al., 2013).

**Conclusión:** El AJ es un AO y también una fitohormona, que al igual que el AS tienen una importancia especial en cultivos comerciales, porque aumentan parámetros similares (morfología y fisiología de la planta), quelación de MPs, comportamiento en términos de expresión, además de que la aplicación exógena de AJ aumenta la cantidad de metabolitos secundarios como flavonoides, polifenoles (aumentan la tolerancia al estrés abiótico) y de otros AOs que también tienen la capacidad de quelar MPs.

## 2.3 Ácidos fenólicos

### 2.3.1 Ácido gálico

El ácido gálico (AG; ácido 3,4,5-trifidroxil-benzoico), es un ácido fenólico ampliamente distribuido en muchas familias de plantas y presente en las distintas partes de éstas como raíces, hojas, semillas, tallos/troncos y frutas (Daglia et al., 2014). El efecto protector del AG y de los ácidos fenólicos tiene correlación por su poder antioxidante y captador de radicales libres, efectos quelantes de metales, inhibición de diferentes enzimas, incluyendo telomerasa, cicloxigenasa y lipoxigenasa, así como su capacidad potencial para interactuar con las vías de transducción de señales y los receptores celulares (Daglia, 2012). Es un metabolito secundario de las plantas y proviene principalmente de la ruta del shikimato, a partir de 3-ácido deshidroshikímico (Bontpart et al., 2016). Para evaluar la expresión de las enzimas



involucradas en la síntesis de AG bajo estrés por MPs, brotes de porotos (*Phaseolus vulgaris*) se expusieron a  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  (1 y 10  $\mu M$   $CdCl_2$  y  $PbCl_2$ , en medio nutritivo; ver tabla II). Se obtuvo un descenso en su actividad, ya sea por exceso de producción de ERO o por inhibición de la actividad enzimática producto de la interacción del  $Pb^{2+}$  con proteínas ricas en tioles que contienen sitios de unión a  $Zn^{2+}$  (Tavsan & Kayali, 2018). El posible mecanismo del AG mejorando la resistencia y/o tolerancia al estrés por MPs no ha sido dilucidado; aun así, la evidencia demuestra que el AG tiene efectos positivos en los cultivos expuestos a MPs. Estos efectos fisiológicos se resumen en I) limitar el exceso de excitación de la clorofila, II) reducción de ERO y peroxidación de lípidos, III) aumentar la capacidad antioxidante (Saidi et al., 2021). El AG ha demostrado tener potencial como fertilizante natural (sin contaminación por MPs), especialmente porque es un excelente neutralizador de ERO y radicales libres ( $H_2O_2$  y  $O_2^-$ ), además de incrementar otros parámetros como la tasa de germinación, longitud de raíces y vástagos, y la cantidad de clorofila total y carotenoides. En el cultivo de arroz, se ha demostrado que más AG (60  $\mu g mL^{-1}$ ) puede aumentar la expresión de genes relacionados con actividad antioxidante como *PAL* (5.33 veces de cambio), *CHS* (4.19 veces) y *OsWRKY71* (3.15 veces). *PAL* y *CHS* son las enzimas claves de la vía fenilpropanoide que produce compuestos fenólicos y de biosíntesis de flavonoides/isoflavonoides respectivamente, mientras se ha informado que *OsWRKY71* es inducida por moléculas de señalización como MJ. Por otro lado, *LOX* disminuyó su expresión en presencia de AG (Singh et al., 2017). En lo referente a la contaminación por MPs, este ácido fenólico puede aliviar los síntomas fisiológicos que se producen por el estrés por  $Cd^{2+}$ . Semillas de girasol irrigadas con 20  $\mu M$   $CdCl_2$  (en solución nutritiva) sufrieron caídas en la cantidad de clorofila (51% menos), el total de tioles (47% menos), *CAT* (48% menos), *APX* (46% menos) y *GR* (50% menos), e incrementos en los niveles endógenos de  $H_2O_2$  (2 veces de cambio), de *MDA* (3 veces), de *EL* (1,7 veces), de *AsA* (22,5% más), y de *SOD* (44% más). Otro cambio notorio fue en la composición de lípidos neutrales que disminuyeron un 37%, también los fosfolípidos en un 50% y galactolípidos en un 23%, aunque la cantidad de ácidos grasos menos insaturados o saturados aumentó. Sin embargo, el pretratamiento de las semillas con AG (75  $\mu M$ ; en baño) mejoró todos estos efectos: mayor contenido de clorofila (45% más), reducción

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (42% menos), MDA (38% menos), EL (30% menos) y ASA (35% menos), y una regulación de la actividad de SOD, CAT, APX y GR a valores similares al control sin Cd. Además, aumentó la cantidad de fosfolípidos (40% más), galactolípidos (20% más), lípidos neutrales (28% más) y el perfil de ácidos grasos también se fortaleció incrementando los ácidos grasos insaturados y disminuyendo los saturados (Saidi et al., 2021). Resultados similares se obtuvieron en brotes de maíz crecidas en Cu<sup>2+</sup> (1 mM, en solución nutritiva), generando síntomas similares descritos arriba como reducción del RWC, incremento de la producción de prolina, reducción de la actividad SOD, CAT, APX y GPX, e incrementos en la producción de MDA, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La aplicación de AG (1,5 mM, en solución nutritiva), redujo ERO, previno la oxidación de lípidos e incrementó la actividad de enzimas antioxidantes (Yetişsin & Kurt, 2020). Otro trabajo similar, realizado para determinar la efectividad de AG en la mantención de la capacidad antioxidante, incluído el ciclo ascorbato-glutación, su estado redox y la peroxidación de lípidos fue realizado en trigo sometido a estrés por Cd<sup>2+</sup> (100 y 200 µM). Hubo una activación de SOD y APX, pero inactivación de otras enzimas como CAT, POX, GR y NADPH oxidasa (NOX), y el balance de GSH/GSSG se redujo durante la exposición a Cd. Mientras que el cotratamiento con AG (25 µM, en solución nutritiva) resultó en un aumento en el contenido de GSH (pero no en GSSG), y el ciclo de ascorbato-glutación también fue inducido a concentraciones mayores de AG (75 µM; ver tabla II; Ozfidan-Konakci & Kabakci, 2020).

**Conclusión:** Al ser ácido fenólico, AG tiene la capacidad de quelar MPs, también es una molécula antioxidante, captador de radicales libres, inhibe enzimas como telomerasa, cicloxigenasa y lipoxigenasa, interactúa con vías de transducción de señales y los receptores celulares. Aumenta las cantidades de fosfolípidos, galactolípidos, lípidos neutrales y ácidos grasos insaturados. Al igual que otros AOs, tiene efecto sobre la morfología y fisiología de las plantas. Aun no hay estudios sobre la expresión génica cuando se aplica AG a las plantas.

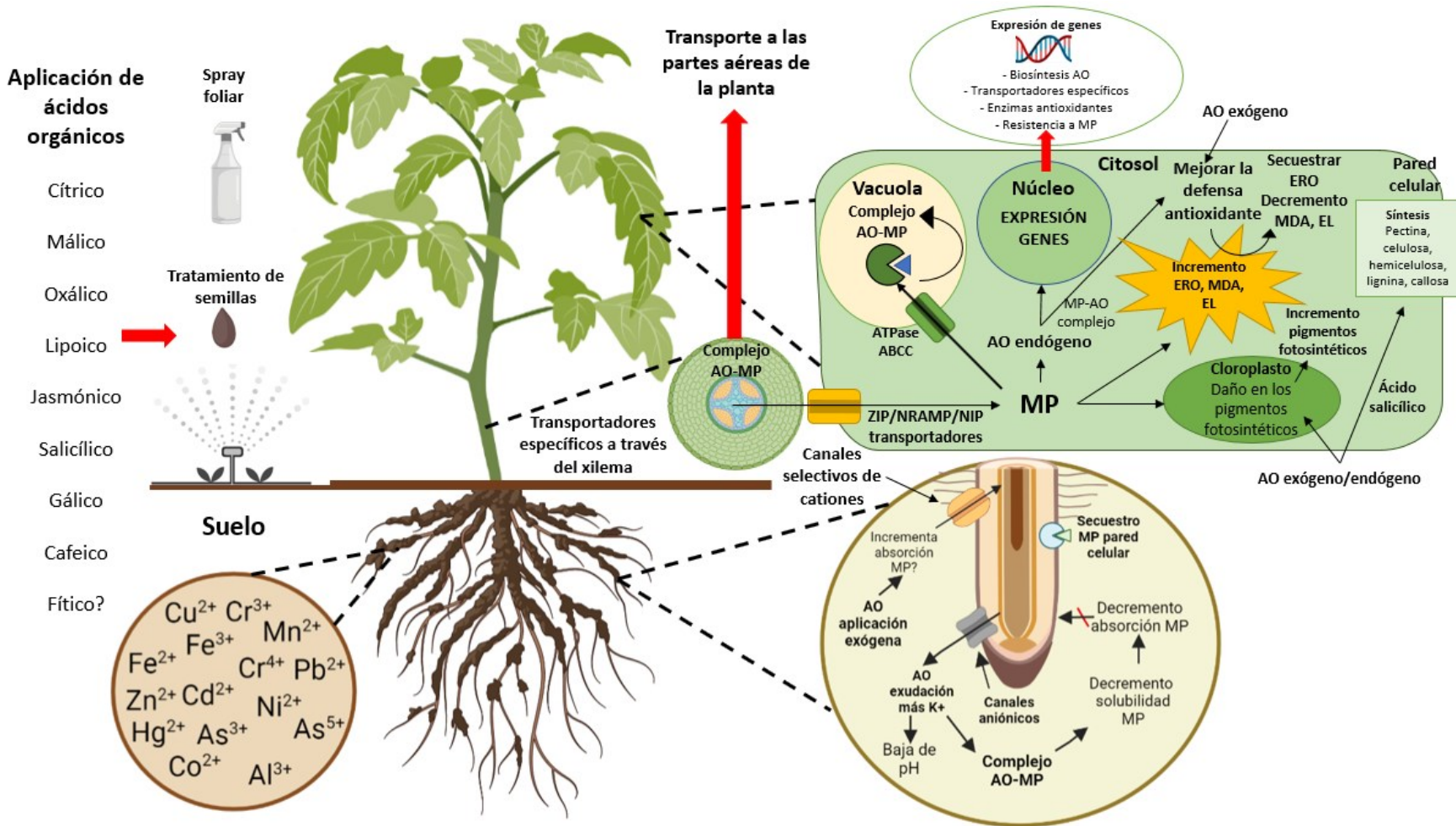
### 2.3.2 Ácido cafeico

El ácido cafeico (ACf; ácido 3, 4-dihidroxicinámico) es un ácido cinámico y un fenilpropanoide, metabolito

secundario presente en todas las plantas, involucrado inicialmente en la síntesis de lignina, pero también cumple roles en la expansión de las células, turgencia, fototropismo, flujo de agua y crecimiento. En lo que respecta a su síntesis, es un intermediario de la ruta fenilpropanoide sintetizado a partir de fenilalanina o L-tirosina (Riaz et al., 2018). El ACf y sus derivados son conocidos por su rol en la tolerancia al estrés biótico y abiótico como altas y bajas temperaturas, ataque de patógenos, estrés por MPs, estrés por sequía, etc. (Imperato, 2006). En lo que respecta al estrés por MPs, se ha propuesto que el ACf genera I) cambios en la pared celular aumentando su durabilidad, producto de la acumulación de lignina (Díaz et al., 2001) y II) neutralizando ERO, impidiendo la peroxidación de lípidos, y eliminando radicales aniónicos  $O_2^-$  y actividad quelante de metales (Fe) (Gülçin, 2006). Sin embargo, hay muy pocos estudios sobre la aplicación exógena de ACf sobre plantas que estén bajo estrés por MPs, aunque considerando que los AOs presentan comportamientos similares en términos fisiológicos, se podría considerar que el ACf, siendo un compuesto fenólico endógeno, permite a las plantas, tolerar la contaminación por MPs. En lo que respecta a una respuesta primaria de los cultivos sometidos a estrés por MPs, se sabe que los compuestos fenólicos (como ACf, ácido rosmarínico (éster del ácido cafeico), fenoles y flavonoides totales) aumentan su cantidad directamente proporcional al tipo de estrés ( $Cd^{2+}$  0.2, 1.8 mmol L<sup>-1</sup>),  $Pb^{2+}$  y  $Al^{3+}$  (0.04, 0.16 mmol L<sup>-1</sup>) (do Prado et al., 2022). También se destaca que el ACf es un importante precursor de otros compuestos químicos que tienen roles fundamentales en la tolerancia al estrés por MPs, como son el ácido ferúlico y melatonina (Lee et al., 2017; Narnoliya et al., 2021). La enzima clave para la conversión es la *O*-metiltransferasa de ACf (COMT), que cataliza la conversión de ACf en ácido ferúlico, y también en melatonina. Aunque COMT posee una afinidad relativamente mayor por los sustratos (ACf o quercetina) que producen lignina en condiciones normales, COMT puede aparecer como una enzima crítica para la biosíntesis de melatonina en condiciones de estrés. En una investigación donde se somete a semillas de alfalfa a estrés por  $Cu^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  (250  $\mu$ M; por riego) se investigaron los genes expresados diferencialmente (DEG) para identificar cuáles de ellos estarían siendo regulados por este tipo de estrés, resaltando que *COMT* está siendo sobreexpresado durante la exposición a  $Cd^{2+}$  (Lee et al., 2015). La

melatonina (como metabolito final) también tiene un rol en la tolerancia al estrés por MPs (ver tabla II). Específicamente, en un estudio se demostró que la melatonina (50 y 100  $\mu\text{M}$ , en medio nutritivo) puede aliviar los síntomas producidos por  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  (25  $\mu\text{M}$ , en medio nutritivo) en brotes de canola. Estos MPs causaron el desarrollo de síntomas como menor biomasa, cantidad de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), y actividad de enzimas antioxidantes (APX, CAT, POD y SOD) y mayor contenido de MDA y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La aplicación exógena de melatonina permitió equilibrar los distintos parámetros disminuidos y reducir los indicadores de peroxidación de lípidos. En todo caso, lo interesante de este estudio es que también se mide la expresión de una familia de genes que están involucrados en la transformación del ACf a melatonina (*BnCOMT*) bajo estrés de  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ . Cuando se aplicó el tratamiento con melatonina, los genes *BnCOMT-1*, *-5* y *-8* aumentaron su expresión, mientras la de *BnCOMT-4* y *-6* cayó (Sami et al., 2020). Aunque el ACf está jugando un rol secundario en la respuesta de las plantas al estrés por MPs, no deja de ser menos importante, ya que, como precursor de moléculas fundamentales (lignina, melatonina, ácido ferúlico), es necesario que haya un reservorio de este compuesto, lo que sugiere que otros genes catalizadores de la conversión a ácido cafeico (*PAL*, etc.) también podrían estar sobreexpresados en condiciones de estrés abiótico.

**Conclusión:** Cuando se aplica el ACf se esperaría que hubiera un efecto similar a otros AOs (quelación de MP, respuesta morfológica, fisiológica, etc.), puesto que no hay estudios que indiquen el efecto directo de la aplicación de este ácido a plantas bajo estrés por MPs. Lo que lleva a diferenciar este AO de otros es el efecto secundario que se espera obtener a partir de la aplicación, esto es la capacidad de fortalecer la pared celular vegetal ya que es un precursor de la lignina y de melatonina (que cumpliría funciones similares a AOs), además que, en condiciones de contaminación por  $\text{Cd}^{2+}$ , se observó que los genes claves en la conversión de ACf a melatonina están siendo sobreexpresados. Por lo tanto, este AO estaría jugando un papel importante en la tolerancia a MPs.



**Figura 2.** Esquema que representa la respuesta de la planta por contaminación a MPs. La respuesta parte desde las raíces, estructuras que exudan AOs para aumentar o disminuir la solubilidad de los MPs. Los AOs ingresan con ayuda de bombas localizadas en la membrana celular o vía apoplasto. En el interior de la célula, los MPs forman complejos AO-MP y son secuestradas hacia la vacuola a través de transportadores ubicados en el tonoplasto o viajan vía xilema hacia las partes aéreas de la planta.

Ácido orgánico	Especie	Estrés por MP	Aplicación de AO	Expresión de genes	Respuesta fisiológica y morfológica	Referencia
Ácido Cítrico	<i>Brassica juncea</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (0.6 mM)	0.6 mM en el suelo	Regulación positiva: PSY, CHS. Regulación negativa: CHLASE.	Incremento: crecimiento, biomasa, clorofilas totales, carotenoides, antocianinas, flavonoides, parámetros de intercambio gaseoso, actividad de enzimas antioxidantes SOD, POD, CAT, GPOX. Decremento: MDA.	(Kaur et al., 2017b)
	<i>Oryza sativa</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (25 µM)	50 µM en medio nutritivo	Regulación positiva: OsNramp1, OsIRT1, OsHMA3, OsNAS1. Regulación negativa: OsSOD, OsCAT.	Incremento: Biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes. Decremento: contenido de Cd en las hojas.	(Sebastian & Prasad, 2018b)
	<i>Oryza sativa</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (0.1, 0.6, 0.9, 1.2, 2.4 mg kg <sup>-1</sup> )	5 mM por spray	Regulación positiva: OsNramp1, 2, 3, 5.	Incremento: Contenido de Glu, Phe, His, Ser y Thr, Arg; movilización de Mn, radio de Mn/Cd. Decremento: Movilización de Cd.	(Xue et al., 2021)
	<i>Salix variegata</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (50 µM)	100 µM en solución acuosa	Regulación positiva: HMA1, PCS1, HMA3, Nramp5, MTP1, MTP4, HMA3, MT1A, MT2B.	Incremento: Crecimiento, biomasa, actividad de enzimas antioxidantes SOD, POD, CAT, APX, NTP, GSH, y no-GSH NPT. Decremento: MDA.	(Zhang et al., 2020)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pb <sup>2+</sup> como Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> y As <sup>5+</sup> como Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> (10 µM)	250 µM en solución nutritiva	-	Incremento: Radio de crecimiento, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes CAT, APX, GR. Decremento: MDA, daño al ADN.	(Kumar et al., 2017)
	<i>Brassica napus</i>	Cu <sup>2+</sup> como CuSO <sub>4</sub> (50, 100 µM)	2.5, 5 mM en medio nutritivo	-	Incremento: Biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes CAT, POX, SOD.	(Zaheer et al., 2015b)

					Decremento: MDA, EL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	
<i>Brassica juncea</i>	Cr <sup>4+</sup> (100, 500 μM) en solución	2.5, 5 mM en medio nutritivo	-		Incremento: Biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, POD, CAT, APX. Decremento: ROS, MDA.	(Afshan et al., 2015b)
<i>Solanum nigrum</i>	Cd (50 mg Cd <sup>2+</sup> ) en suelo seco	20 mM en suelo seco	-		Incremento: Crecimiento biomasa, peso de la planta, actividad de enzimas antioxidantes SOD, POD. Decremento: MDA.	(Gao et al., 2010b)
<i>Zea mays</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (300 mg kg <sup>-1</sup> )	0.25, 0.5, 1, 2 g kg <sup>-1</sup> por irrigación	-		Incremento: Biomasa, longitud de raíces y tallos. Decremento: Absorción de Cd.	(Anwer et al., 2012b)
<i>Helianthus annuus</i>	Cr <sup>3+</sup> (5, 10, 20 mg kg <sup>-1</sup> ) en suelo seco	2.5, 5 mM	-		Incremento: Crecimiento, biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes. Decremento: ERO, MDA.	(Amir et al., 2020b)
<i>Calendula officinalis</i>	Suelos enriquecidos con Cd <sup>2+</sup> (50, 100 mg kg <sup>-1</sup> )	0.05, 0.1 mM en suelo	-		Incremento: Peso seco de raíces y tallos, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX. Decremento: MDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	(Saffari & Saffari, 2020b)
<i>Salix viminalis</i>	Cd <sup>2+</sup> como Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (3, 6 mg kg <sup>-1</sup> ) en spray	20 mM en solución acuosa	-		Incremento: Biomasa, absorción Cd, pigmentos fotosintéticos, intercambio gaseoso de las hojas, radio fotosintético. Decremento: Contenido de Pro.	(Arsenov et al., 2020)

	<i>Larix olgensis</i>	Pb <sup>2+</sup> como Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (100 mg kg <sup>-1</sup> )	0.2, 1, 5, 10 mM por irrigación y spray foliar	-	Incremento: Radio de supervivencia, biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, POX, contenido de Pro. Decremento: contenido de Pb, MDA.	(Song et al., 2018)
	<i>Typha latifolia</i>	Pb <sup>2+</sup> como Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> y Hg como HgSO <sub>4</sub> (0, 1, 2.5, 5 mM) en medio nutritivo	5 mM en medio nutritivo	-	Incremento: Biomasa de raíz, tallo y hoja, área y número de hojas, peso de la planta y raíz, longitud de la raíz, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, POX, CAT, APX. Decremento: MDA, EL, ERO.	(Amir et al., 2020b)
<b>Ácido málico</b>	<i>Salix variegata</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (50 µM) en solución acuosa	100 µM en solución acuosa	Regulación positiva: <i>HMA1, PCS1, HMA3, Nramp5, MTP4</i> . Regulación negativa: <i>MTP1, HMA3, MT1A</i> .	Incremento: Crecimiento, biomasa, actividad de enzimas antioxidantes SOD, POD, CAT, APX, NPT, GSH, no-GSH NPT. Decremento: MDA.	(Zhang et al., 2020)
	<i>Miscanthus Sacchariflorus</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (100 µM) en solución nutritiva	100 µM en solución nutritiva	Regulación positiva: <i>Cu/Zn-SOD, POD1, GPX1, GST1, MDHAR, DHAR</i> . Regulación negativa: <i>CAT1</i> .	Incremento: Crecimiento, longitud de tallo y raíces, capacidad antioxidante total, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT, POD, APX, GR, GPX y GST; concentración GSH y GSSG. Decremento: MDA, ERO	(Guo et al., 2017)
	<i>Oryza sativa</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (25 µM)	50 µM en solución nutritiva	Regulación positiva: <i>OsCDT1, OsNramp1, OsIRT1, HMA3</i> . Regulación negativa: <i>OsNAS1, OsSOD</i> .	Incremento: Biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes. Decremento: Contenido de Cd en las hojas.	(Sebastian & Prasad, 2018b)



	<i>Brassica juncea</i>	Ni <sup>2+</sup> como NiSO <sub>4</sub> (0.003 mM) en solución nutritiva	0.5, 1, 5 mM en solución nutritiva	-	Incremento: Concentración de Ni en las hojas. Decremento: Biomasa de las hojas, absorción de Ni en las hojas.	(Qiu et al., 2009b)
	<i>Alyssum corsicum</i>	Ni <sup>2+</sup> como NiSO <sub>4</sub> (0.3 mM) en solución nutritiva	0.5, 1, 5 mM en solución nutritiva	-	Incremento: Biomasa tallo y raíz. Decremento: Concentración de Ni en los tallos.	(Qiu et al., 2009b)
	<i>Spinacea oleracea</i>	Pb <sup>2+</sup> (2.42, 4.83 mM) en solución nutritiva	2.4 mM en solución nutritiva	-	Incremento: Biomasa, longitud del tallo, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, GPOX, CAT, APX, AsA, compuestos fenólicos totales. Decremento: MDA, ERO, contenido de flavonoides.	(Khan et al., 2016)
	<i>Zea mays</i>	Suelo contaminado con 250 mg Ni kg <sup>-1</sup>	0.1 mM en solución nutritiva	-	Incremento: Peso seco del tallo, Absorción de Ni (el suelo se encuentra sin P). Decremento: Eficiencia de absorción de Ni (el suelo se encuentra con P).	(Ghasemi-Fasaee, 2012)
	<i>Helianthus annuus</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (5 µM) en solución nutritiva	250, 500 µM en solución nutritiva	-	Incremento: Crecimiento, biomasa, longitud de tallo y raíz, pigmentos fotosintéticos, Contenido de AO, actividad de deshidrogenasas de la raíz. Decremento: ERO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	(Hawrylak-Nowak et al., 2015)
<b>Ácido oxálico</b>	<i>Brassica juncea</i>	Cd y Zn resultado de las emisiones de residuos de fundición	Sistema de riego por goteo (5 mM)	-	Incremento: Biomasa, peso seco de raíz y brotes, movilización de Zn y Cd, actividad de enzimas antioxidantes PAL, PPO y CAT.	(Guo et al., 2019b)

	<i>Sedum alfredii</i>	Cd <sup>2+</sup> (10.71 mg kg <sup>-1</sup> ) y Pb (438.4 mg kg <sup>-1</sup> ) en suelos contaminados	2.5 mM por spray foliar	-	Incremento: Biomasa, crecimiento de la planta, movilización de Cd y Pb, pigmentos fotosintéticos, contenido de K. Decremento: MDA.	(Liang et al., 2021b)
	<i>Cicer arietinum</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (200 µM) por imbibición de las semillas	100 µM en solución acuosa	-	Incremento: Crecimiento de raíz y tallo, actividad de enzimas antioxidantes GPX, GR, estado redox del glutatiión, radio NADP <sup>+</sup> /NAD <sup>+</sup> , radio NADH <sup>+</sup> NADPH. Decremento: MDA, ERO, contenido de los grupos carbonilos.	(Sakouhi et al., 2021b)
<b>Ácido lipoico</b>	<i>Triticum aestivum</i>	Pb <sup>2+</sup> como Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (1.5 mM) por imbibición de las semillas	2 µM por imbibición de las semillas	-	Incremento: Actividad enzimática de la amilasa, radio SOD, GSH, GSH/GSSH. Decremento: O <sup>2-</sup> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	(Turk et al., 2018b)
<b>Ácido jasmónico</b>	<i>Oryza sativa</i>	Pb <sup>2+</sup> como Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (150, 300 µM) en solución hidropónica	0.5, 1 µM en solución hidropónica	Regulación positiva: <i>HMA3, HMA4, PCS1, PCS2, ABCC1</i> . Regulación negativa: <i>HMA2</i> .	Incremento: Crecimiento, pigmentos fotosintéticos, Pro. Decremento: MDA, ERO.	(Salavati et al., 2021)
	<i>Oryza sativa</i>	As <sup>3+</sup> (0, 25, 50 µM) en solución hidropónica	0.5, 1 µM MJ en solución hidropónica	Regulación positiva: <i>IRO6, FRDL1, YSL2</i> . Regulación negativa: <i>Lsil, Lsi2, Lsi6, Nramp1, Nramp5</i> .	Incremento: Altura, biomasa, pigmentos fotosintéticos, contenido endógeno de AJ, actividad de enzimas antioxidantes CAT, SOD, APX, POD. Decremento: MDA, ERO, concentración de As en hojas y raíces.	(Mousavi et al., 2020)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pb <sup>2+</sup> (0, 0.25, 0.50, 0.75 mM) en papel filtro	100 nM por imbibición de las semillas	Regulación positiva: <i>succinil CoA ligasa, succinato deshidrogenasa, fumarato hidratasa, CHS, PAL</i> . Regulación negativa: <i>CHLASE, CS, malato sintasa</i> .	Incremento: RWC, pigmentos fotosintéticos, moléculas antioxidantes. Decremento: Concentración de Pb.	(Bali et al., 2019)

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (50 µM) en solución nutritiva	0.01, 0.025 µM MJ en solución nutritiva	Regulación negativa: <i>AtIRT1</i> , <i>ATHMA2</i> , <i>ATHMA4</i> .	Incremento: Contenido de Cd en la pared celular. Decremento: Clorosis, contenido de Cd en la savia de las células de brotes y raíces.	(Lei et al., 2020)
	<i>Brassica parachinensis</i>	Cr <sup>6+</sup> como K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (150, 300 µM) en solución	5, 10, 20 µM por spray foliar	-	Incremento: Crecimiento, biomasa, altura de las plantas, número y área de las hojas, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, APX, CAT, GPX, GST, GR, MDHAR, DHAR, contenido de AsA y GSH. Decremento: MDA, ERO, absorción de Cr.	(Kamran et al., 2021)
	<i>Triticum aestivum</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (100 µM) en solución	10 µM MJ por spray foliar	-	Incremento: Crecimiento, biomasa, RWC, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes CAT, SOD. Decremento: MDA, ERO, clorosis.	(Kaya et al., 2021)
	<i>Phaseolus coccineus</i>	Cu <sup>2+</sup> como CuSO <sub>4</sub> (50 µM) en solución hidropónica	10 mM MJ preincubación en solución hidropónica	-	Incremento: Actividad de enzimas antioxidantes CAT, APX, POX. Decremento: MDA, ERO.	(Hanaka et al., 2016)
	<i>Medicago sativa</i>	Cu <sup>2+</sup> como CuSO <sub>4</sub> (100 µM) en medio nutritivo	1, 5, 10 nM MJ en medio nutritivo	-	Incremento: Biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes CAT, SOD, POD, APX GR. Decremento: MDA, ERO, concentración de Cu en raíz y hoja.	(Dai et al., 2020)
<b>Ácido salicílico</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (200 µM)	600 µM por spray foliar	Regulación positiva: <i>StSABP2</i> , <i>StSOD</i> , <i>StAPX</i> .	Incremento: RWC, pigmentos fotosintéticos, contenido de Pro y AS. Decremento: MDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sup>2</sup> .	(Li et al., 2019)

<i>Melissa officinalis</i>	Hg <sup>2+</sup> como HgCl <sub>2</sub> (50 µM) en solución nutritiva	50 µM en solución nutritiva	Regulación positiva: <i>CHLG, PAL</i>	Incremento: Crecimiento, biomasa, RWC, pigmentos fotosintéticos, fenoles totales, actividad antioxidante, contenido de Pro. Decremento: MDA, ERO.	(Safari et al., 2019)
<i>Hordeum vulgare</i>	Cd <sup>2+</sup> (25 µM) en cultivo hidropónico	500 µM priming de cariósides secas	Regulación positiva: <i>GS</i>	Incremento: Crecimiento, peso húmedo y seco de raíces y brotes, actividad de enzimas antioxidantes CAT, APX, GPX Decremento: MDA.	(Metwally et al., 2003)
<i>Zea mays</i>	Pb <sup>2+</sup> como Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2.5 mM)	0.5 mM semillas pretratadas	Regulación positiva: <i>ZmACS6, ZmSAMD.</i>	Incremento: Contenido de glicina betaína y óxido nítrico. Decremento: Contenido de Met, Arg, Pro.	(Zanganeh et al., 2018)
<i>Brassica juncea</i>	Pb <sup>2+</sup> (0.25, 0.50, 0.75 mM) en solución	1 mM por imbibición de las semillas	Regulación positiva: <i>PSY, CAT, POD, DHAR, GST, GR.</i> Regulación negativa: <i>CHLASE.</i>	Incremento: Crecimiento, altura de raíz y brote, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes POD, APOX, GR, DHAR, MDHAR, GST, y GR, glutatión, ácido ascórbico, tocopherol. Decremento: ERO.	(Soltani Maivan et al., 2017)
<i>Artemisia annua</i>	As <sup>5+</sup> como Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> (100, 150 µM)	100 µM en solución nutritiva	Regulación positiva: <i>ADS, CYP71AV1, DBR2, ALDH1.</i>	Incremento: Crecimiento, biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX, GR, artemisinina and dihidroartemisinina. Decremento: ERO.	(Kumari et al., 2018)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Cd <sup>2+</sup> (10 µM) en pretratamiento y cultivo hidropónico	25, 50, 100, 200 µM en pretratamiento y por spray foliar	Regulación positiva: <i>TAP2, LAC, CesA1, CesA6.</i> Regulación negativa: <i>PME1, PME2.</i>	Incremento: Síntesis de pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y callosa en pared celular de hoja y raíz. Decremento: Acumulación de Cd en pared celular,	(Jia et al., 2021)

					citoplasma, organelos.	
	<i>Lemna minor</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> en medio nutritivo	50 µM en medio nutritivo	-	Incremento: Fe, Mg, Ca, Mo, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes SOD, GPX, CAT, APX, GR, actividad de AS y PAL endógenos. Decremento: Clorosis, MDA, ERO, ascorbato, Pro.	(Lu et al., 2018)
	<i>Melissa officinalis</i>	Ni <sup>2+</sup> como NiCl <sub>2</sub> (500 µM) en solución nutritiva	1 mM por spray foliar	-		(Soltani et al., 2017)
	<i>Sorghum bicolor</i>	Cr <sup>6+</sup> como dicromato de potasio (1.0, 2.0, 4.0 mg kg <sup>-1</sup> en suelo)	0.5 nM pretratamiento y por spray foliar	-	Incremento: Crecimiento, número de hojas, actividad de enzimas antioxidantes POX, APX. Decremento: MDA, ERO.	(Sihag et al., 2019)
<b>Ácido gálico</b>	<i>Helianthus annuus</i>	Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (5, 10, 15, 20, 50, 100 µM) en solución nutritiva	75 µM por imbibición de las semillas	-	Incremento: Crecimiento, biomasa, pigmentos fotosintéticos, actividad de enzimas antioxidantes CAT, APX, SOD, GR, composición de ácidos grasos y lípidos de las hojas. Decremento: MDA, ERO, EL, concentración de Cd en raíz y hoja.	(Saidi et al., 2021)
	<i>Zea mays</i>	Cu <sup>2+</sup> como CuSO <sub>4</sub> (1 mM) por imbibición de las semillas	1.5 mM por imbibición de las semillas	-	Incremento: Pigmentos fotosintéticos, contenido de Cu, Pro, actividad de enzimas antioxidantes GPX, CAT, SOD, APX. Decremento: MDA, ERO.	(Yetişsin et al., 2020)
	<i>Triticum aestivum</i>	Cd <sup>2+</sup> (100, 200, 300 µM) en solución nutritiva	25, 75 µM, 1 mM en solución nutritiva	-	Incremento: Crecimiento, contenido de Pro, actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT, POX, APX, Gr,	(Ozfidan Konakci & Kabakci, 2020)

---

				NOX, MDHAR, DHAR, GSH, GSSG, AsA. Decremento: MDA.		
<b>Ácido cafeico</b>	<i>Medicago sativa</i>	Cu <sup>2+</sup> como CuSO <sub>4</sub> (250 μM) y Cd <sup>2+</sup> como CdCl <sub>2</sub> (250 μM) en solución	-	Regulación positiva: COMT bajo estrés por Cd.	-	(Lee et al., 2015)

---

**Tabla II.** Tabla resumen de los distintos efectos morfológicos, fisiológicos y expresión de genes de los ácidos orgánicos sobre plantas al ser sometidas a MPs.

## **2.4 Algunas consideraciones sobre la aplicación exógena de ácidos orgánicos**

En el último tiempo, junto con el estudio del papel de secreción de AOs endógenos para mejorar la tolerancia a los MPs, se ha prestado mucha atención al estudio del efecto de los AOs añadidos exógenamente sobre las plantas, precisamente para poder estudiar el efecto de la fitorremediación de estos. Sin embargo, los resultados son ambiguos en términos de absorción y quelación. Por un lado, se ha observado que la aplicación exógena de ciertos AOs puede aumentar o disminuir las concentraciones de MP en el interior de las plantas, efecto que depende en gran medida del tipo de AO que se esté usando. Por ejemplo, el AC, AM y AOx aumentan la movilidad del  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  en el suelo, mientras que, para el  $Pb^{2+}$ , casi no tienen influencia en la movilidad de este catión (Osmolovskaya et al., 2018). También se debe considerar la concentración a la cual se aplica el AO, ya que normalmente, se utiliza una concentración mayor a la que la planta secreta endógenamente y puede generar efectos fitotóxicos (Turgut et al., 2004). La aplicación exógena de AO se lleva a cabo directamente en forma de ácidos, mientras que la secreción de ácidos de la raíz está en forma de aniones y puede acompañarse de secreción de  $K^+$ , por lo que no hay una fuerte acidificación de los medios (Ryan et al., 2001).

## **2.5 Aplicaciones biotecnológicas**

### **2.5.1 Genes que codifican para la biosíntesis de ácidos orgánicos**

Una posible estrategia de fitorremediación es la sobreexpresión de genes involucrados en la biosíntesis de AOs. Un ejemplo exitoso es la sobreexpresión de la enzima citrato sintasa que puede aumentar los niveles de AC y, por ende, aumentar la tolerancia a la contaminación por MPs. En un trabajo realizado donde se generaron líneas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) sobreexpresoras del gen citrato sintasa *OsCS1* y *CjCS* de arroz y yuzu (*Citrus junos*), respectivamente, se demostró su gran resistencia a contaminación por  $Al^{3+}$  (40 mg/l, en solución nutritiva; 200  $\mu$ M en solución) y mayor flujo de citrato (Deng et al., 2009<sup>a</sup>; Han et al., 2009). En otro ensayo similar, utilizando el gen del citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* se transformaron tabaco y papaya (*Carica*

papaya). Las transformantes poseen mayor cantidad de AC endógeno (10 veces de cambio), mayor tolerancia a contaminación por  $\text{Al}^{3+}$  (0.1 a 1 mM en solución nutritiva), y mayor cantidad de raíces y pelos, que estaban correlacionados con las cantidades de AC endógeno (Deng et al., 2009b). En otro caso, la sobreexpresión de malato deshidrogenasa en plantas de alfalfa otorga tolerancia a contaminación de  $\text{Al}^{3+}$ . Se reportó un aumento de 1,6 veces en la actividad específica de la enzima en las puntas de las raíces de alfalfa transgénica que condujo a un aumento de 4,2 veces en la concentración en la raíz, así como a un aumento de 7,1 veces en la exudación de la raíz de AC, AOx, AM, succinato y acetato en comparación con plantas de alfalfa, control no transformadas (Tsfaye et al., 2001).

### **2.5.2 Sobreexpresión de otros genes involucrados en la resistencia/tolerancia a los metales pesados**

Adicionalmente, las plantas tienen otros genes involucrados en la tolerancia, como son los transportadores, generalmente representados por grandes familias de genes. Las mejoras genéticas implican la mejora de la acumulación de metal en las raíces para la fitoestabilización, o en los brotes para la fitoextracción. La transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*, álamo (*Populus alba*) o mostaza también puede estar dirigida a inhibir la absorción y acumulación de MP, por ejemplo, vía los transportadores ABC (ubicados en el tonoplasto), relacionados con la absorción y detoxificación del  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Pb}^{2+}$ . Otros candidatos son CDF (que codifican para MTP), ya que plantas de tabaco que sobreexpresan genes CDF, producen cantidades elevadas de compuestos tiólicos y, por lo tanto, son capaces de secuestrar eficientemente MPs en las vacuolas quelándolos (Das et al., 2016). En plantas de cebada, *A. thaliana* y taburete azul o madera (*Noccaea cearulesc*), juegan un rol clave los transportadores ZIP (relacionados con el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ; la mayoría de las proteínas ZIP forman canales iónicos transmembrana con sitios de unión a metales ricos en histidil) (Kozmińska et al., 2018).

Otra estrategia usada ha sido la sobreexpresión de genes que codifican transportadores de citrato, como los que pertenecen a la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE). En las plantas de cebada



transformadas, los iones de  $\text{Al}^{3+}$  se quelan de manera efectiva en el sistema radicular, donde se libera citrato, y, por lo tanto, los MPs permanecen estabilizados en la rizosfera (Zhou et al., 2014).

### 3. Discusión

Los metales pesados  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  están dentro del "top diez" de los químicos más nocivos (WHO 2020). Por ejemplo, el As es un químico muy tóxico, y constituye un grave problema medio ambiental, de salud animal y humana, y afecta la agricultura (caídas en la productividad vegetal). Sus concentraciones no han hecho más que aumentar durante el último tiempo, debido a la utilización de pesticidas, pinturas, minería, etc. El efecto dañino de los MPs se visualiza en la interrupción de la actividad enzimática, ya sea, por similitudes estructurales como, por ejemplo, el arsenito es transportado por transportadores de fosfato (con alta afinidad), inhibiendo la actividad enzimática y proteínas producto de las interacciones tiólicas, además de interrumpir el flujo de energía a través del reemplazo de fosfato en las moléculas de ATP (Kumar et al., 2015). También, la unión de MPs con los sitios activos de proteínas o interacción con los sitios -SH, -COOH, - $\text{NH}_2$  de proteínas, altera su actividad. Adicionalmente, los MPs indirectamente generan ERO, que causan daños inespecíficos a moléculas (ADN, ARN, lípidos, proteínas, etc.) u organelos (mitocondrias, cloroplastos, membrana plasmática, membrana nuclear). En el último tiempo, la aplicación exógena de AOs surge como una solución viable en términos económicos y eco-amigables para mediar la fitorremediación de los suelos y de las plantas, dado que estos AOs son metabolitos primarios o secundarios de las plantas. En términos generales, las respuestas de las plantas que están bajo estrés por MPs en conjunto con la aplicación de AOs son I) aumentar los parámetros morfológicos como crecimiento, biomasa, peso seco y húmedo, área foliar y longitud de las raíces, II) incrementar las cantidades totales de clorofila *a* y *b*, además de otros pigmentos fotosintéticos, III) potenciar la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, POD, APX, GR, CAT, DHAR, MDHAR, PAL, PPO, etc. IV) potenciar la actividad de componentes antioxidantes no enzimáticos como AsA, tocoferol, glutatión, GSH, etc. V) disminuir ERO, EL, TBARS, y VI) actuar como quelantes de MPs. Por otra parte, los AO pueden afectar la expresión de determinados grupos de genes incluyendo I) los

relacionados con la biosíntesis de AO, II) los de resistencia a los MP (fitoquelatinas y metalotioneínas), III) los de transportadores específicos de MPs, y IV) los de enzimas antioxidantes.

Importante es mencionar que existen muchos compuestos adicionales que tienen actividad quelante. Por ejemplo las proteínas (fitoquelatinas y metalotioneínas), otros ácidos como malonato, acónito y tartrato (Osmolovskaya et al., 2018; Sharma et al., 2020; Tao et al., 2020), otros misceláneos como silicio y óxido nítrico (NO) (Gaur et al., 2021), IAA (Fässler et al., 2010), quercetina, catequinas, ácido clorogénico, ácido vanílico, e incluso algunos aminoácidos (histidina, cisteína, asparagina, glutamato, prolina), poseen actividad quelante para distintos MPs (Kutrowska & Szelag, 2014). Se debe indicar que la cantidad de literatura que existe en algunos casos (AC, AS, AJ) es muy grande, ya sea porque son moléculas importantes señalizadoras o fitohormonas, mientras que, en otros casos, la información es mucho menor. Tal es el caso del AL, aunque su efectividad como quelador de MP ha sido probada *in vitro* (Navari-Izzo et al., 2002).

Al momento de utilizar AOs en cultivos de consumo animal o humano, hay que considerar lo siguiente. Primero, la afinidad del AO con los respectivos iones metálicos, ya que no todos los AOs tienen la misma afinidad por un tipo de MP (Tahjib-Ul-Arif et al., 2021). En base a esto mismo, se debe tener claro cuál es el efecto que se espera obtener. Es decir, al aumentar la solubilidad de los iones metálicos, los MP ingresarán con mayor facilidad, pero al inhibir la solubilidad, quedarán inmovilizados en la rizosfera. Esto puede ser muy importante cuando se escoge un AO a la hora de resolver un problema de deficiencia de nutrientes (existen MP que son esenciales) o bajo contaminación por MP (que no son esenciales). Finalmente, se debe considerar que los AOs endógenos tienen un determinado pH, pero cuando se secretan hacia la rizosfera se liberan en conjunto con K para evitar caídas bruscas de pH. Sin embargo, cuando se aplican de manera exógena, están en forma ácida, modificando bruscamente el pH del suelo (Osmolovskaya et al., 2018).

La ingeniería genética es una herramienta que permite mejorar ciertos tipos de plantas para incrementar la tolerancia/resistencia a los MP, y también para remover MPs desde el suelo (fitorremediación). Para mejorar las características de la fitorremediación, la estrategia más prevalente es introducir y sobreexpresar los genes implicados en la captación y secuestro de MPs (biosíntesis

de AO, fitoquelatinas, metalotioneínas etc.) o para su translocación (transportadores ZIP, ABC, etc.). Por lo tanto, potencialmente, al modificar alguna ruta metabólica se puede aumentar la capacidad de fitorremediación, el secuestro de MPs a través de la formación de ligandos, y su deposición en las vacuolas mediante transportadores (Kozmińska et al., 2018).

#### 4. Conclusiones

Los AOs mencionados tienen la capacidad de quelar los MPs, a través de la formación de ligandos con los metales con sus respectivos grupos carboxílicos (-COOH) o sus grupos sulfhídricos (-SH, AL), secuestrando los iones metálicos o complejos MP-AO al interior de las vacuolas. Esto permite a las plantas mejorar parámetros morfológicos, fisiológicos y moleculares, disminuidos por la contaminación por MPs.

#### 5. Bibliografía

10 chemicals of public health concern. (WHO). Retrieved June 26, 2022, from <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern>

Abbas, G., Murtaza, B., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N. K., Khan, M. I., Amjad, M., Hussain, M., & Natasha. (2018). Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: Physiological, biochemical, and molecular aspects. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 15, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010059>

Afshan, S., Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Abbas, F., Ibrahim, M., Mehmood, M. A., & Abbasi, G. H. (2015a). Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth, and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11679–11689. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4396-8>

Afshan, S., Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Abbas, F., Ibrahim, M., Mehmood, M. A., & Abbasi, G. H. (2015b). Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth, and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11679–11689. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4396-8>

Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang,

- M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. In *Toxics* (Vol. 9, Issue 3, pp. 1-34). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Amir, W., Farid, M., Ishaq, H. K., Farid, S., Zubair, M., Alharby, H. F., Bamagoos, A. A., Rizwan, M., Raza, N., Hakeem, K. R., & Ali, S. (2020a). Accumulation potential and tolerance response of *Typha latifolia* L. under citric acid assisted phytoextraction of lead and mercury. *Chemosphere*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127247>
- Amir, W., Farid, M., Ishaq, H. K., Farid, S., Zubair, M., Alharby, H. F., Bamagoos, A. A., Rizwan, M., Raza, N., Hakeem, K. R., & Ali, S. (2020b). Accumulation potential and tolerance response of *Typha latifolia* L. under citric acid assisted phytoextraction of lead and mercury. *Chemosphere*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127247>
- Anwer, S., Yasin Ashraf, M., Hussain, M., Ashraf, M., & Jamil, A. (2012a). CITRIC ACID MEDIATED PHYTOEXTRACTION OF CADMIUM BY MAIZE (*ZEA MAYS* L.). In *Pak. J. Bot* (Vol. 44, Issue 6).
- Anwer, S., Yasin Ashraf, M., Hussain, M., Ashraf, M., & Jamil, A. (2012b). CITRIC ACID MEDIATED PHYTOEXTRACTION OF CADMIUM BY MAIZE (*ZEA MAYS* L.). In *Pak. J. Bot* (Vol. 44, Issue 6).
- Arsenov, D., Župunski, M., Borišev, M., Nikolić, N., Pilipovic, A., Orlovic, S., Kebert, M., & Pajevic, S. (2020). Citric acid as soil amendment in cadmium removal by *Salix viminalis* L., alterations on biometric attributes and photosynthesis. *International Journal of Phytoremediation*, 22(1), 29-39. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1633999>
- Aslam, M., Aslam, A., Sheraz, M., Ali, B., Ulhassan, Z., Najeeb, U., Zhou, W., & Gill, R. A. (2021). Lead Toxicity in Cereals: Mechanistic Insight Into Toxicity, Mode of Action, and Management. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.587785>
- Bali, S., Jamwal, V. L., Kohli, S. K., Kaur, P., Tejpal, R., Bhalla, V., Ohri, P., Gandhi, S. G., Bhardwaj, R., Al-Huqail, A. A., Siddiqui, M. H., Ali, H. M., & Ahmad, P. (2019). Jasmonic acid application triggers detoxification of lead (Pb) toxicity in tomato through the modifications of secondary metabolites and gene expression. *Chemosphere*, 235, 734-748. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.188>

- Bilal Shakoor, M., Ali, S., Hameed, A., Farid, M., Hussain, S., Yasmeen, T., Najeeb, U., Aslam Bharwana, S., & Hasan Abbasi, G. (2014). Citric acid improves lead (pb) phytoextraction in brassica napus L. by mitigating pb-induced morphological and biochemical damages. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *109*, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.033>
- Bontpart, T., Marlin, T., Vialet, S., Guiraud, J. L., Pinasseau, L., Meudec, E., Sommerer, N., Cheynier, V., & Terrier, N. (2016). Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, *67*(11), 3537-3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw184>
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J. F., Mari, S., & Curie, C. (2010). High-affinity manganese uptake by the metal transporter nramp1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions. *Plant Cell*, *22*(3), 904-917. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073023>
- Chen, H. C., Zhang, S. L., Wu, K. J., Li, R., He, X. R., He, D. N., Huang, C., & Wei, H. (2020). The effects of exogenous organic acids on the growth, photosynthesis and cellular ultrastructure of *Salix variegata* Franch. Under Cd stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *187*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109790>
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 174-181). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- Daglia, M., Lorenzo, A., Nabavi, S., Talas, Z., & Nabavi, S. (2014). Polyphenols: Well Beyond The Antioxidant Capacity: Gallic Acid and Related Compounds as Neuroprotective Agents: You are What You Eat! *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *15*(4), 362-372. <https://doi.org/10.2174/138920101504140825120737>
- Dai, H., Wei, S., Pogrzeba, M., Rusinowski, S., Krzyżak, J., & Jia, G. (2020). Exogenous jasmonic acid decreased Cu accumulation by alfalfa and improved its photosynthetic pigments and antioxidant system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *190*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110176>
- DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G., & Furini, A. (2019). Heavy metal pollutions: State of the art and innovation in phytoremediation. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143412>
- Das, N., Bhattacharya, S., & Maiti, M. K. (2016). Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco overexpressing rice metal tolerance protein gene OsMTP1 is

- promising for phytoremediation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 297-309.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.049>
- Deng, W., Luo, K., Li, Z., Yang, Y., Hu, N., & Wu, Y. (2009a). Overexpression of Citrus junos mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. *Planta*, 230(2), 355-365.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-0945-z>
- Deng, W., Luo, K., Li, Z., Yang, Y., Hu, N., & Wu, Y. (2009b). Overexpression of Citrus junos mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. *Planta*, 230(2), 355-365.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-0945-z>
- Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F., & Merino, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. In *Plant Science* (Vol. 161). [www.elsevier.com/locate/plantsci](http://www.elsevier.com/locate/plantsci)
- do Prado, N. B., de Abreu, C. B., Pinho, C. S., Junior, M. M. de N., Silva, M. D., Espino, M., Silva, M. F., & Dias, F. de S. (2022). Application of multivariate analysis to assess stress by Cd, Pb and Al in basil (*Ocimum basilicum* L.) using caffeic acid, rosmarinic acid, total phenolics, total flavonoids and total dry mass in response. *Food Chemistry*, 367.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130682>
- Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Shakoor, M. B., & Rizwan, M. (2014). Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.007>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. In *Scientific World Journal* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation.  
<https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Fässler, E., Evangelou, M. W., Robinson, B. H., & Schulin, R. (2010). Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS). *Chemosphere*, 80(8), 901-907. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.077>
- Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). Calcium oxalate in plants: Formation and function. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 56, pp. 41-71).  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>
- Fryzova, R., Pohanka, M., Martinkova, P., Cihlarova, H., Brtnicky, M., Hladky, J., & Kynicky, J. (2018). Oxidative

- stress and heavy metals in plants. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 245, pp. 129-156). Springer New York LLC.  
[https://doi.org/10.1007/398\\_2017\\_7](https://doi.org/10.1007/398_2017_7)
- Gao, Y., Miao, C., Mao, L., Zhou, P., Jin, Z., & Shi, W. (2010a). Improvement of phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. under cadmium stress by application of cadmium-resistant strain and citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1-3), 771-777.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.080>
- Gao, Y., Miao, C., Mao, L., Zhou, P., Jin, Z., & Shi, W. (2010b). Improvement of phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. under cadmium stress by application of cadmium-resistant strain and citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1-3), 771-777.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.080>
- Gaur, S., Kumar, J., Prasad, S. M., Sharma, S., Bhat, J. A., Sahi, S., Singh, V. P., Tripathi, D. K., & Chauhan, D. K. (2021). Silicon and nitric oxide interplay alleviates copper induced toxicity in mung bean seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 713-722.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.011>
- Ghasemi-Fasaei, R. (2012). Malic acid and Phosphorus Influences on Nickel Phytoremediation Efficiency and Metal Nutrients Relationships in a Ni-Polluted Calcareous Soil. In *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* (Vol. 3, Issue S). [www.irjabs.com](http://www.irjabs.com)
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.011>
- Guo, D., Ali, A., Ren, C., Du, J., Li, R., Lahori, A. H., Xiao, R., Zhang, Z., & Zhang, Z. (2019a). EDTA and organic acids assisted phytoextraction of Cd and Zn from a smelter contaminated soil by potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss) and evaluation of its bioindicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 396-403.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.038>
- Guo, D., Ali, A., Ren, C., Du, J., Li, R., Lahori, A. H., Xiao, R., Zhang, Z., & Zhang, Z. (2019b). EDTA and organic acids assisted phytoextraction of Cd and Zn from a smelter contaminated soil by potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss) and evaluation of its bioindicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 396-403.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.038>
- Guo, H., Chen, H., Hong, C., Jiang, D., & Zheng, B. (2017). Exogenous malic acid alleviates cadmium toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through enhancing photosynthetic

- capacity and restraining ROS accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 119-128.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.018>
- Haddad, A., & Mohiuddin, S. S. (2021). Biochemistry, Citric Acid Cycle. *StatPearls*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541072/>
- Han, Y., Zhang, W., Zhang, B., Zhang, S., Wang, W., & Ming, F. (2009). One novel mitochondrial citrate synthase from *Oryza sativa* L. can enhance aluminum tolerance in transgenic tobacco. *Molecular Biotechnology*, 42(3), 299-305. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9162-z>
- Hanaka, A., Wójcik, M., Dresler, S., Mroczek-Zdyrska, M., & Maksymiec, W. (2016). Does methyl jasmonate modify the oxidative stress response in *Phaseolus coccineus* treated with Cu? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 480-488. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.024>
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., & Matraszek, R. (2015). Exogenous malic and acetic acids reduce cadmium phytotoxicity and enhance cadmium accumulation in roots of sunflower plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 225-234. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.012>
- Huang, T. L., Nguyen, Q. T. T., Fu, S. F., Lin, C. Y., Chen, Y. C., & Huang, H. J. (2012). Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots. *Plant Molecular Biology*, 80(6), 587-608.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-012-9969-z>
- Imperato, Filippo. (2006). *Phytochemistry: advances in research, 2006*. Research Signpost.
- Jia, H. L., Wang, X. H., Wei, T., Wang, M., Liu, X., Hua, L., Ren, X. H., Guo, J. K., & Li, J. (2021). Exogenous salicylic acid regulates cell wall polysaccharides synthesis and pectin methylation to reduce Cd accumulation of tomato. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111550>
- Kamran, M., Wang, D., Alhaithloul, H. A. S., Alghanem, S. M., Aftab, T., Xie, K., Lu, Y., Shi, C., Sun, J., Gu, W., Xu, P., & Soliman, M. H. (2021). Jasmonic acid-mediated enhanced regulation of oxidative, glyoxalase defense system and reduced chromium uptake contributes to alleviation of chromium (VI) toxicity in choysum (*Brassica parachinensis* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111758>
- Kaur, R., Yadav, P., Sharma, A., Kumar Thukral, A., Kumar, V., Kaur Kohli, S., & Bhardwaj, R. (2017a). Castasterone and citric acid treatment restores photosynthetic attributes in *Brassica juncea* L. under Cd(II) toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 466-475.



- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.067>
- Kaur, R., Yadav, P., Sharma, A., Kumar Thukral, A., Kumar, V., Kaur Kohli, S., & Bhardwaj, R. (2017b). Castasterone and citric acid treatment restores photosynthetic attributes in Brassica juncea L. under Cd(II) toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 466-475. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.067>
- Kaya, C., Ugurlar, F., Ashraf, M., Noureldeen, A., Darwish, H., & Ahmad, P. (2021). Methyl Jasmonate and Sodium Nitroprusside Jointly Alleviate Cadmium Toxicity in Wheat (Triticum aestivum L.) Plants by Modifying Nitrogen Metabolism, Cadmium Detoxification, and AsA-GSH Cycle. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.654780>
- Khan, I., Iqbal, M., Ashraf, M. Y., Ashraf, M. A., & Ali, S. (2016). Organic chelants-mediated enhanced lead (Pb) uptake and accumulation is associated with higher activity of enzymatic antioxidants in spinach (Spinacea oleracea L.). *Journal of Hazardous Materials*, 317, 352-361. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.007>
- Kohli, S. K., Handa, N., Gautam, V., Bali, S., Sharma, A., Khanna, K., Arora, S., Thukral, A. K., Ohri, P., Karpets, Y. V., Kolupaev, Y. E., & Bhardwaj, R. (2017). ROS signaling in plants under heavy metal stress. In *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress* (pp. 185-214). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_8)
- Kohli, S. K., Handa, N., Sharma, A., Gautam, V., Arora, S., Bhardwaj, R., Wijaya, L., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2018). Interaction of 24-epibrassinolide and salicylic acid regulates pigment contents, antioxidative defense responses, and gene expression in Brassica juncea L. seedlings under Pb stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 15159-15173. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1742-7>
- Koźmińska, A., Wiszniewska, A., Hanus-Fajerska, E., & Muszyńska, E. (2018). Recent strategies of increasing metal tolerance and phytoremediation potential using genetic transformation of plants. In *Plant Biotechnology Reports* (Vol. 12, Issue 1). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s11816-017-0467-2>
- Kumar, A., Pal, L., & Agrawal, V. (2017). Glutathione and citric acid modulates lead- and arsenic-induced phytotoxicity and genotoxicity responses in two cultivars of Solanum lycopersicum L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(7). <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2448-z>
- Kumar, S., Dubey, R. S., Tripathi, R. D., Chakrabarty, D., &

- Trivedi, P. K. (2015). Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: Current updates and prospective. In *Environment International* (Vol. 74, pp. 221-230). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.019>
- Kumari, A., Pandey, N., & Pandey-Rai, S. (2018). Exogenous salicylic acid-mediated modulation of arsenic stress tolerance with enhanced accumulation of secondary metabolites and improved size of glandular trichomes in *Artemisia annua* L. *Protoplasma*, 255(1), 139-152.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-017-1136-6>
- Kutrowska, A., & Szelag, M. (2014). Low-molecular weight organic acids and peptides involved in the long-distance transport of trace metals. In *Acta Physiologiae Plantarum* (Vol. 36, Issue 8, pp. 1957-1968). Polish Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1576-y>
- Lee, K., Choi, G. H., & Back, K. (2017). Cadmium-induced melatonin synthesis in rice requires light, hydrogen peroxide, and nitric oxide: Key regulatory roles for tryptophan decarboxylase and caffeic acid O-methyltransferase. *Journal of Pineal Research*, 63(4).  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12441>
- Lee, K.-W., Rahman, Md. A., Zada, M., Lee, D.-G., Kim, K.-Y., Hwang, T. Y., Ji, H. J., & Lee, S.-H. (2015). Identification of Copper and Cadmium Induced Genes in Alfalfa Leaves through Annealing Control Primer Based Approach. *Journal of The Korean Society of Grassland and Forage Science*, 35(3), 264-268.  
<https://doi.org/10.5333/KGFS.2015.35.3.264>
- Lei, G. J., Sun, L., Sun, Y., Zhu, X. F., Li, G. X., & Zheng, S. J. (2020). Jasmonic acid alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis* via suppression of cadmium uptake and translocation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(2), 218-227. <https://doi.org/10.1111/jipb.12801>
- Li, H., Liu, Y., Zeng, G., Zhou, L., Wang, X., Wang, Y., Wang, C., Hu, X., & Xu, W. (2014). Enhanced efficiency of cadmium removal by *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. in the presence of exogenous citric and oxalic acids. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 26(12), 2508-2516.  
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.05.031>
- Li, Q., Wang, G., Wang, Y., Dan Yang, Guan, C., & Ji, J. (2019). Foliar application of salicylic acid alleviate the cadmium toxicity by modulation the reactive oxygen species in potato. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 317-325. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.078>
- Liang, Y., Xiao, X., Guo, Z., Peng, C., Zeng, P., & Wang, X. (2021a). Co-application of indole-3-acetic

- acid/gibberellin and oxalic acid for phytoextraction of cadmium and lead with *Sedum alfredii* Hance from contaminated soil. *Chemosphere*, 285.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131420>
- Liang, Y., Xiao, X., Guo, Z., Peng, C., Zeng, P., & Wang, X. (2021b). Co-application of indole-3-acetic acid/gibberellin and oxalic acid for phytoextraction of cadmium and lead with *Sedum alfredii* Hance from contaminated soil. *Chemosphere*, 285.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131420>
- Lin, C. Y., Trinh, N. N., Fu, S. F., Hsiung, Y. C., Chia, L. C., Lin, C. W., & Huang, H. J. (2013). Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Molecular Biology*, 81(4-5), 507-522.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-013-0020-9>
- Ló Pez-Bucio, J., Nieto-Jacobo, F., Ramírez-Rodríguez, V., & Herrera-Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. In *Plant Science* (Vol. 160). [www.elsevier.com/locate/plantsci](http://www.elsevier.com/locate/plantsci)
- Lu, Q., Zhang, T., Zhang, W., Su, C., Yang, Y., Hu, D., & Xu, Q. (2018). Alleviation of cadmium toxicity in *Lemna minor* by exogenous salicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 500-508.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.015>
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., & Dietz, K. J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology*, 132(1), 272-281.  
<https://doi.org/10.1104/pp.102.018457>
- Mohammadi, S., Pourakbar, L., Siavash Moghaddam, S., & Popović-Djordjević, J. (2021). The effect of EDTA and citric acid on biochemical processes and changes in phenolic compounds profile of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under mercury stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111607>
- Mooney, B. P., Miernyk, J. A., & Randall, D. D. (2002). The complex fate of  $\alpha$ -ketoacids. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 53, pp. 357-375).  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135251>
- Mousavi, S. R., Niknejad, Y., Fallah, H., & Tari, D. B. (2020). Methyl jasmonate alleviates arsenic toxicity in rice. *Plant Cell Reports*, 39(8), 1041-1060.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-020-02547-7>
- Moustafa-Farag, M., Mohamed, H. I., Mahmoud, A., Elkelish, A., Misra, A. N., Guy, K. M., Kamran, M., Ai, S., & Zhang, M. (2020). Salicylic acid stimulates antioxidant defense and osmolyte metabolism to alleviate oxidative stress in

- watermelons under excess boron. *Plants*, 9(6), 1-18.  
<https://doi.org/10.3390/plants9060724>
- Nakata, P. A. (2003). Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. In *Plant Science* (Vol. 164, Issue 6, pp. 901-909). Elsevier Ireland Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00120-1)
- Narnoliya, L. K., Sangwan, N., Jadaun, J. S., Bansal, S., & Sangwan, R. S. (2021). Defining the role of a caffeic acid 3-O-methyltransferase from *Azadirachta indica* fruits in the biosynthesis of ferulic acid through heterologous over-expression in *Ocimum* species and *Withania somnifera*. *Planta*, 253(1). <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03514-y>
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., & Sgherri, C. (2002). *Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species*. [www.elsevier.com/locate/plaphy](http://www.elsevier.com/locate/plaphy)
- Osmolovskaya, N., Dung, V. V., & Kuchaeva, L. (2018). The role of organic acids in heavy metal tolerance in plants. In *Biological Communications* (Vol. 63, Issue 1, pp. 9-16). Saint-Petersburg State University.  
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2018.103>
- Perham, R. N. (2000). *SWINGING ARMS AND SWINGING DOMAINS IN MULTIFUNCTIONAL ENZYMES: Catalytic Machines for Multistep Reactions*. [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Qiu, R., Liu, W., Zeng, X., Tang, Y., Brewer, E., & Fang, X. (2009a). Effects of exogenous citric acid and malic acid addition on nickel uptake and translocation in leaf mustard (*Brassica juncea* var. *foliosa* Bailey) and *Alyssum corsicum*. In *Int. J. Environment and Pollution* (Vol. 38, Issue 2).
- Qiu, R., Liu, W., Zeng, X., Tang, Y., Brewer, E., & Fang, X. (2009b). Effects of exogenous citric acid and malic acid addition on nickel uptake and translocation in leaf mustard (*Brassica juncea* var. *foliosa* Bailey) and *Alyssum corsicum*. In *Int. J. Environment and Pollution* (Vol. 38, Issue 2).
- Raza, A., Charagh, S., Zahid, Z., Mubarik, M. S., Javed, R., Siddiqui, M. H., & Hasanuzzaman, M. (2021). Jasmonic acid: a key frontier in conferring abiotic stress tolerance in plants. In *Plant Cell Reports* (Vol. 40, Issue 8, pp. 1513-1541). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02614-z>
- Riaz, U., Kharal, M. A., Murtaza, G., Zaman, Q. uz, Javaid, S., Malik, H. A., Aziz, H., & Abbas, Z. (2018). Prospective Roles and Mechanisms of Caffeic Acid in Counter Plant Stress: A Mini Review. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 32(1).

- <https://doi.org/10.17582/journal.pjar/2019/32.1.8.19>  
Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W., & Gupta, R. (2022). A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 1). MDPI.  
<https://doi.org/10.3390/biom12010043>
- Ryan, P. R., Delhaize, E., & Jones, D. L. (2001). FUNCTION AND MECHANISM OF ORGANIC ANION EXUDATION FROM PLANT ROOTS. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 52).  
[www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Safari, F., Akramian, M., Salehi-Arjmand, H., & Khadivi, A. (2019). Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109542>
- Saffari, V. R., & Saffari, M. (2020a). Effects of EDTA, citric acid, and tartaric acid application on growth, phytoremediation potential, and antioxidant response of *Calendula officinalis* L. in a cadmium-spiked calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation*, 22(11), 1204-1214. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1754758>
- Saffari, V. R., & Saffari, M. (2020b). Effects of EDTA, citric acid, and tartaric acid application on growth, phytoremediation potential, and antioxidant response of *Calendula officinalis* L. in a cadmium-spiked calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation*, 22(11), 1204-1214. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1754758>
- Saidi, I., Guesmi, F., Kharbech, O., Hfaiedh, N., & Djebali, W. (2021). Gallic acid improves the antioxidant ability against cadmium toxicity: Impact on leaf lipid composition of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111906>
- Sakouhi, L., Kharbech, O., Massoud, M. ben, Munemasa, S., Murata, Y., & Chaoui, A. (2021a). Oxalic Acid Mitigates Cadmium Toxicity in *Cicer arietinum* L. Germinating Seeds by Maintaining the Cellular Redox Homeostasis. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10334-1>
- Sakouhi, L., Kharbech, O., Massoud, M. ben, Munemasa, S., Murata, Y., & Chaoui, A. (2021b). Oxalic Acid Mitigates Cadmium Toxicity in *Cicer arietinum* L. Germinating Seeds by Maintaining the Cellular Redox Homeostasis. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10334-1>
- Salavati, J., Fallah, H., Niknejad, Y., & Barari Tari, D. (2021). Methyl jasmonate ameliorates lead toxicity in

- Oryza sativa* by modulating chlorophyll metabolism, antioxidative capacity and metal translocation. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(5), 1089-1104. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00993-5>
- Sami, A., Shah, F. A., Abdullah, M., Zhou, X., Yan, Y., Zhu, Z., & Zhou, K. (2020). Melatonin mitigates cadmium and aluminium toxicity through modulation of antioxidant potential in *Brassica napus* L. *Plant Biology*, 22(4), 679-690. <https://doi.org/10.1111/plb.13093>
- Sebastian, A., & Prasad, M. N. V. (2018a). Exogenous citrate and malate alleviate cadmium stress in *Oryza sativa* L.: Probing role of cadmium localization and iron nutrition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.084>
- Sebastian, A., & Prasad, M. N. V. (2018b). Exogenous citrate and malate alleviate cadmium stress in *Oryza sativa* L.: Probing role of cadmium localization and iron nutrition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.084>
- Sgherri, C., Quartacci, M. F., Izzo, R., & Navari-Izzo, F. (2002a). Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. [www.elsevier.com/locate/plaphy](http://www.elsevier.com/locate/plaphy)
- Sgherri, C., Quartacci, M. F., Izzo, R., & Navari-Izzo, F. (2002b). Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. [www.elsevier.com/locate/plaphy](http://www.elsevier.com/locate/plaphy)
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., & Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: Phytotoxicity and physicochemical changes in plants. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 232, pp. 1-44). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9_1)
- Sharma, A., Sidhu, G. P. S., Araniti, F., Bali, A. S., Shahzad, B., Tripathi, D. K., Brestic, M., Skalicky, M., & Landi, M. (2020). The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25030540>
- Sharma, M., Kumar, V., Bhardwaj, R., & Thukral, A. K. (2020). Tartaric Acid Mediated Cr Hyperaccumulation and Biochemical alterations in seedlings of *Hordeum vulgare* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1). <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09959-0>
- Sihag, S., Brar, B., & Joshi, U. N. (2019). Salicylic acid induces amelioration of chromium toxicity and affects antioxidant enzyme activity in *Sorghum bicolor* L. *International Journal of Phytoremediation*, 21(4), 293-304.

- <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1524827>
- Singh, A., Gupta, R., & Pandey, R. (2017). Exogenous application of rutin and gallic acid regulate antioxidants and alleviate reactive oxygen generation in *Oryza sativa* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), 301-309. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0430-2>
- Soltani Maivan, E., Radjabian, T., Abrishamchi, P., & Talei, D. (2017). Physiological and biochemical responses of *Melissa officinalis* L. to nickel stress and the protective role of salicylic acid. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(3), 330-343. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1207241>
- Song, J. F., Markewitz, D., Wu, S., Sang, Y., Duan, C., & Cui, X. Y. (2018). Exogenous oxalic acid and citric acid improve Lead (Pb) tolerance of *Larix olgensis* A. Henry seedlings. *Forests*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/f9090510>
- Tahjib-Ul-Arif, M., Zahan, M. I., Karim, M. M., Imran, S., Hunter, C. T., Islam, M. S., Mia, M. A., Hannan, M. A., Rhaman, M. S., Hossain, M. A., Brestic, M., Skalicky, M., & Murata, Y. (2021). Citric Acid-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 22, Issue 13). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms22137235>
- Tao, Q., Zhao, J., Li, J., Liu, Y., Luo, J., Yuan, S., Li, B., Li, Q., Xu, Q., Yu, X., Huang, H., Li, T., & Wang, C. (2020). Unique root exudate tartaric acid enhanced cadmium mobilization and uptake in Cd-hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Hazardous Materials*, 383. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121177>
- Tavsan, Z., & Kayali, H. (2018). Phenylpropanoid Pathway Response to Cadmium and Lead Stress in *Phaseolus vulgaris* Roots and Leaves. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 3(4), 1-11. <https://doi.org/10.9734/ajb2t/2018/40759>
- Tesfaye, M., Temple, S. J., Allan, D. L., Vance, C. P., & Samac, D. A. (2001). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiology*, 127(4), 1836-1844. <https://doi.org/10.1104/pp.010376>
- Thakur, M., Praveen, S., Divte, P. R., Mitra, R., Kumar, M., Gupta, C. K., Kalidindi, U., Bansal, R., Roy, S., Anand, A., & Singh, B. (2022). Metal tolerance in plants: Molecular and physicochemical interface determines the "not so heavy effect" of heavy metals. In *Chemosphere* (Vol. 287). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131957>

- Turgut, C., Katie Pepe, M., & Cutright, T. J. (2004). The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution*, 131(1), 147-154.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.017>
- Turk, H., Erdal, S., Karayel, U., & Dumlupinar, R. (2018a). Attenuation of lead toxicity by promotion of tolerance mechanism in wheat roots by lipoic acid. *Cereal Research Communications*, 46(3), 424-435.  
<https://doi.org/10.1556/0806.46.2018.020>
- Turk, H., Erdal, S., Karayel, U., & Dumlupinar, R. (2018b). Attenuation of lead toxicity by promotion of tolerance mechanism in wheat roots by lipoic acid. *Cereal Research Communications*, 46(3), 424-435.  
<https://doi.org/10.1556/0806.46.2018.020>
- Xue, W., Wang, P., Tang, L., Zhang, C., Wang, C., Huang, Y., Zhang, X., Li, Y., Zhao, B., & Liu, Z. (2021). Citric acid inhibits Cd uptake by improving the preferential transport of Mn and triggering the defense response of amino acids in grains. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111921>
- Yetişsin, F., & Kurt, F. (2020). Gallic acid (GA) alleviating copper (Cu) toxicity in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *International Journal of Phytoremediation*, 22(4), 420-426.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1667953>
- Zaheer, I. E., Ali, S., Rizwan, M., Farid, M., Shakoor, M. B., Gill, R. A., Najeeb, U., Iqbal, N., & Ahmad, R. (2015a). Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 310-317.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.020>
- Zaheer, I. E., Ali, S., Rizwan, M., Farid, M., Shakoor, M. B., Gill, R. A., Najeeb, U., Iqbal, N., & Ahmad, R. (2015b). Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 310-317.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.020>
- Zanganeh, R., Jamei, R., & Rahmani, F. (2018). Impacts of seed priming with salicylic acid and sodium hydrosulfide on possible metabolic pathway of two amino acids in maize plant under lead stress. *Molecular Biology Research Communications*, 7(2), 83-88.  
<https://doi.org/10.22099/mbrc.2018.29089.1317>
- Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., Tomaro, M. L., & Benavides, M. P. (2007). Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 173(2), 190-197.



- <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.05.004>
- Zhang, S., Chen, H., He, D., He, X., Yan, Y., Wu, K., & Wei, H. (2020). Effects of Exogenous Organic Acids on Cd Tolerance Mechanism of *Salix variegata* Franch. Under Cd Stress. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594352>
- Zhou, G., Pereira, J. F., Delhaize, E., Zhou, M., Magalhaes, J. v., & Ryan, P. R. (2014). Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes *SbMATE*. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2381–2390. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru121>

## **6. Anexos**



Review

# Increasing Heavy Metal Tolerance by the Exogenous Application of Organic Acids

Andrea Vega, Ninoska Delgado and Michael Handford \*

Centro de Biología Molecular Vegetal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Santiago 7800024, Chile; andreavega.du@gmail.com (A.V.); ninoskadelgado@gmail.com (N.D.)

\* Correspondence: mhandfor@uchile.cl; Tel.: +56-2-2978-7263

**Abstract:** Several metals belong to a group of non-biodegradable inorganic constituents that, at low concentrations, play fundamental roles as essential micronutrients for the growth and development of plants. However, in high concentrations they can have toxic and/or mutagenic effects, which can be counteracted by natural chemical compounds called chelators. Chelators have a diversity of chemical structures; many are organic acids, including carboxylic acids and cyclic phenolic acids. The exogenous application of such compounds is a non-genetic approach, which is proving to be a successful strategy to reduce damage caused by heavy metal toxicity. In this review, we will present the latest literature on the exogenous addition of both carboxylic acids, including the Krebs's Cycle intermediates citric and malic acid, as well as oxalic acid, lipoic acid, and phenolic acids (gallic and caffeic acid). The use of two non-traditional organic acids, the phytohormones jasmonic and salicylic acids, is also discussed. We place particular emphasis on physiological and molecular responses, and their impact in increasing heavy metal tolerance, especially in crop species.

**Keywords:** carboxylic acid; chelator; heavy metal; phenolic acid



**Citation:** Vega, A.; Delgado, N.; Handford, M. Increasing Heavy Metal Tolerance by the Exogenous Application of Organic Acids. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5438. <https://doi.org/10.3390/ijms23105438>

Academic Editor: Tibor Janda

Received: 28 February 2022

Accepted: 7 May 2022

Published: 13 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Heavy metals (HMs) are a group of metals and metalloids that exist naturally on the Earth's surface. A common definition of an HM is one that has a density greater than 5 g/cm<sup>3</sup> or 20 g/mol [1]; as such, 53 elements are found within this category [2]. These elements are found in rock formations or within the Earth's surface itself and have been introduced naturally into superficial layers by geological activity such as volcanoes and sea movements over billions of years. Importantly, some of these elements fulfill critical biological functions, such as copper (Cu), chromium (Cr), iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), molybdenum (Mo), and nickel (Ni). At very low concentrations, they are thus considered essential for the correct functioning of enzymes as cofactors, receptor sites, hormonal functions, and protein transport [3]. Another group of HMs do not have a biological role, and are thus deemed non-essential, such as arsenic (As), cadmium (Cd), cobalt (Co), lead (Pb), mercury (Hg), and vanadium (Vn) [4]. All HMs constitute a potential (and sometimes hidden) threat to organisms within the ecosystem, since they can cause damage even in low concentrations, and as they are not biodegradable, HMs bioaccumulate in the food chain. The potential harm caused by HMs has increased markedly since the Industrial Revolution, as anthropogenic activity in the environment, mainly due to combustion, iron, and steel industries, exploitation of mineral resources, and the use and disposal of agrochemicals, paints, and coatings is associated with the incorporation of ever-higher levels of this group of metals [5].

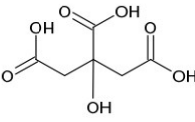
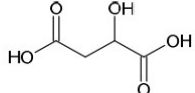
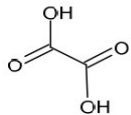
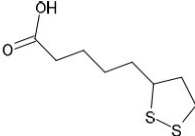
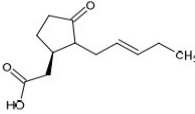
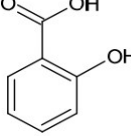
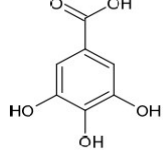
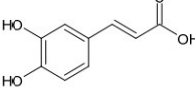
Plants, being sessile organisms, are not exempt from suffering the negative effects of HM contamination. In general, it has been shown that HMs can interrupt the catalytic activity of enzymes, in addition to generating an imbalance of reactive oxygen species (ROS),

thus triggering oxidative stress in plants, lipid peroxidation, and damage to photosynthetic pigments and proteins [6]. For example, it has been observed that a higher concentration of Pb in the soil reduces productivity, causing plants to have a darker green color, lower seed germination rate, accelerated fall of senescent leaves, reduced foliage, and brown roots [7]. In the case of Mn, excess concentrations lead to the appearance of chlorosis in young leaves, and necrotic spots and wrinkled mature leaves, ultimately inhibiting plant growth [8], whilst soils contaminated predominantly with Cd and Zn affect chlorophyll fluorescence parameters, growth, and development of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings, although a compensatory redirection of photosynthates towards mechanisms alleviating the toxic effects of the HMs may be responsible for the absence of reductions in plant biomass [9]. In general, it can be summarized that HMs act as pollutants that reduce the germination of seeds, the rate of photosynthesis, respiration, transpiration, and growth, and therefore, the quality and productivity of crops [10].

However, plants have developed internal and external mechanisms to remedy HM contamination. These organisms can concentrate pollutants in their airborne tissues and exclude HMs by biodegradation, or biotransformation into inert forms in their tissues. In addition, roots can capture these elements through the action of specific compounds with chelating activity, and consequently HMs can be neutralized, translocated, and stored [10]. Tolerance to these contaminants is given by the chelating activity of a set of Low Molecular Weight Chemical Molecules (LMWCMs), in a process in which ions/molecules of a ligand bind to atoms/ions of the central metal through a coordination bond in a cyclic or ring structure [11]. Some of these LMWCMs are amino acids, such as proline and histidine, or proteins like Phytochelatins (PCs) and Metallothioneins (MTs). However, there is a substantial group of Natural Low Molecular Weight Organic Acids (NLMWOA) such as citric acid, oxalic acid, malic acid, salicylic acid, phytic acid, lipoic acid, and phenolic acids, including the flavonoids catechin, rutin, gallic acid, and caffeic acid that also play a critical natural role in the response to HM contamination. In some cases, root exudates contain NLMWOA which lower the pH of the rhizosphere, modifying the bioavailability of nutrients, and may actually increase the solubility of essential HMs such as Zn and Fe. On the other hand, organic acids (OAs) have the ability to chelate HM cations through their carboxyl groups (-COOH) forming a complex, meaning that the effective external concentration of these toxic elements is lowered [12]. The release of OAs into the external environment can also be induced in response to HMs. On entry of the HM, the cation may activate (directly or indirectly) OA efflux channels or interact with a receptor protein, inducing the genes involved in OA biosynthesis. In some instances, OA-HM complexes formed on the root surface can enter the interior of the cell by passive diffusion or via active transport involving specific ligand/transporter channels such as NRAMP and ABC, and may be subsequently sequestered in intracellular compartments, including the vacuole [12].

Therefore, the aim of this review is to present a recapitulation of the latest advances concerning the exogenous application of selected naturally occurring organic acids (OAs) to crops, the chemical structures of which are shown in Table 1. The OAs selected are representative of those with a variety of structures (linear (citric, malic, oxalic acid); phenolic/cyclic (jasmonic, salicylic, gallic, caffeic acid); sulfur-containing (lipoic)), and include those with roles in other aspects of plant development (salicylic, jasmonic acid). In each case, their effects at morphological, physiological, and molecular levels, and how different strategies for their exogenous supplementation have been used to mitigate the effects of excess HM levels, are discussed, using recent examples from crop species of economic importance in different parts of the world.

**Table 1.** The chemical structures of organic acids presented in this review.

Organic Acid	Structure	IUPAC Name
Citric acid		2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid
Malic acid		2-hydroxybutanedioic acid
Oxalic acid		1,2-ethanedioic acid
Lipoic acid		5-[(3 <i>R</i> )-dithiolan-3-yl]pentanoic acid
Jasmonic acid		2-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-3-oxo-2-[( <i>Z</i> )-pent-2-enyl]cyclopentyl]acetic acid
Salicylic acid		2-hydroxybenzoic acid
Gallic acid		3,4,5-trihydroxybenzoic acid
Caffeic acid		( <i>E</i> )-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid

## 2. Application of Organic Acids to Alleviate HM Stress

### 2.1. Carboxylic Acids

#### 2.1.1. Citric Acid

Citric acid (CA) is a key compound of primary metabolism, synthesized by the condensation of acetyl-CoA (2 carbons) and oxaloacetate (4 carbons) to form citrate with the intervention of the enzyme citrate synthase (CS), thus initiating the Krebs Cycle [13]. This molecule has an antioxidant function, but it has also been shown to have chelating activity for HMs such as Cu, Cd, Cr, Pb, Ni, Al, Hg, and As [7,14–20]. In general, CA and other

OAs have one or several carboxyl groups which act as a ligand for HMs, thus chelating and reducing the toxicity of the HM. Once the CA-chelated complex is formed, it can be transported via the xylem to aerial parts of the plant. On translocation into the cytosol, if the concentrations of HMs reach toxic levels, they can be stored inside the vacuole and maintained in a non-toxic state by the influx of additional OAs, such as CA [21].

The exogenous application of CA in different crops improves the growth rate, a product of higher chlorophyll content and photosynthetic activity, and increases efficiency in the use of water, a greater activity of antioxidant enzymes and enhanced reduction of ROS (Table 2) [22]. In one study, tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) were grown in soils provided with 10  $\mu\text{M}$  Pb and 10  $\mu\text{M}$  As. The exogenous supply of CA (250  $\mu\text{M}$ ) increased morphological parameters and  $\alpha$  and  $\beta$  chlorophyll content, the performance of antioxidant molecules such as anthocyanins and  $\alpha$ -tocopherol, and the efficiency of enzymes with antioxidant capacity such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR). Simultaneously, other parameters decreased, such as DNA damage and lipid peroxidation (amount of malonaldehyde, MDA, an indicator of lipid peroxidation) [18]. In oilseed rape (*Brassica napus*) grown under greenhouse conditions with Cu (50–100  $\mu\text{M}$ ), Cd (0.6 mM), Pb and As (10  $\mu\text{M}$ ), or Cr (100–500  $\mu\text{M}$ ), where a dose of 2.5 and 5.0 mM of CA was applied in a nutrient medium, it was observed that HM toxicity was mitigated [14–16]. In different crop species, such as mustard (*Brassica juncea*), nightshade (*Solanum nigrum*), maize (*Zea mays*), sunflower (*Helianthus annuus*), rice (*Oryza sativa*), and alfalfa (*Medicago sativa*), the efficiency of CA (2.5 mM, 5 mM, 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) as a chelator of Cd (0.6 mM, 300  $\text{mg kg}^{-1}$ , 50 mg, 25.0  $\mu\text{M}$ ), Pb, and Hg (1, 2.5, 5 mM) has also been demonstrated [19,23–28]. In calendula (*Calendula officinalis*) grown in calcareous soils enriched with Cd (50–100  $\text{mg kg}^{-1}$ ), plants treated with exogenous CA in doses of 0.05 and 0.1 mM did not show any physiological symptoms related to Cd toxicity. In the same study, CA was shown to be a more efficient agent for phytoremediation compared to other chelators such as tartaric acid and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) [29]. CA-mediated tolerance to HM toxicity has also been tested in forestry settings. For example, the supply of 20 mM CA in soils that were exposed to Cd (3–6  $\text{mg kg}^{-1}$ ) improved parameters of basket willow (*Salix viminalis*), such as bioavailability, mobility, and distribution of Cd in the plant, as well as the amount of chlorophyll, the photosynthetic rate, and gas exchange [30]. Furthermore, in soils containing Pb (100  $\text{mg kg}^{-1}$ ), foliar application and irrigation with exogenous CA (5–10 mM) of larch (*Larix olgensis*) decreased the toxic effects of Pb, raised the activities and efficiencies of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), the amount of chlorophyll, proline, and carotenoids, and decreased lipid damage [31].

**Table 2.** The molecular and physiological effects of exogenous organic acid applications to crop species subjected to heavy metal stress.

Organic Acid	Species	HM Stress	OA Application	Gene Expression Responses *	Physiological and Morphological Outcomes	Reference
Citric acid	<i>Brassica juncea</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (0.6 mM)	0.6 mM in soil	Up-regulation: <i>PSY</i> , <i>CHS</i> . Down-regulation: <i>CHLASE</i> .	Increased: Growth, biomass, total chlorophyll, carotenoids, anthocyanins, flavonoids, gaseous exchange parameters, activities of antioxidant enzymes SOD, POD, CAT, GPOX. Decreased: MDA.	[23]
	<i>Oryza sativa</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (25 μM)	50 μM in nutritive medium	Up-regulation: <i>OsNramp1</i> , <i>OsIRT1</i> , <i>OsHMA3</i> , <i>OsNAS1</i> . Down-regulation: <i>OsSOD</i> , <i>OsCAT</i> .	Increased: Biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes. Decreased: Cd content in leaves	[26]
	<i>Oryza sativa</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (0.1, 0.6, 0.9, 1.2, 2.4 mg kg <sup>-1</sup> )	5 mM by spraying	Up-regulation of <i>OsNramp1</i> , 2, 3, 5.	Increased: Content of Glu, Phe, His, Ser and Thr, Arg, Mn mobilization, Mn/Cd ratio. Decreased: Cd mobilization.	[32]
	<i>Salix variegata</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (50 μM)	100 μM in aqueous solution	Up-regulation: <i>HMA1</i> , <i>PCS1</i> , <i>HMA3</i> , <i>Nramp5</i> , <i>MTPI</i> , <i>MTP4</i> , <i>HMA3</i> , <i>MT1A</i> , <i>MT2B</i> .	Increased: Growth, biomass, activities of antioxidant enzymes SOD, POD, CAT, APX; Non-Protein Sulfhydryl compounds (NPT), GSH, and non-GSH NPT. Decreased: MDA.	[33]
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pb as Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> or As as Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> (10 μM)	250 μM in nutritive solution	-	Increased: Growth rate, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes CAT, APX, GR. Decreased: MDA, DNA damage.	[18]
	<i>Brassica napus</i>	Cu as CuSO <sub>4</sub> (50, 100 μM)	2.5, 5 mM in nutritive medium	-	Increased: Biomass, photosynthetic pigment, activities of antioxidant enzymes CAT, POX, SOD. Decreased: MDA, EL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	[14]
	<i>Brassica juncea</i>	Cr (100, 500 μM) in solution	2.5, 5 mM in nutritive medium	-	Increased: Biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, POD, CAT, APX. Decreased: ROS, MDA.	[16]
<i>Solanum nigrum</i>	Cd (50 mg Cd <sup>2+</sup> ) in dry soil	20 mM in dry soil	-	Increased: Growth, biomass, plant weight, activities of antioxidant enzymes SOD, POD. Decreased: MDA.	[24]	

**Table 2. Cont.**

Organic Acid	Species	HM Stress	OA Application	Gene Expression Responses *	Physiological and Morphological Outcomes	Reference
Citric acid	<i>Zea mays</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (300 mg kg <sup>-1</sup> )	0.25, 0.5, 1, 2 g kg <sup>-1</sup> by irrigation	-	Increased: Biomass, shoot and root length. Decreased: Cd uptake.	[25]
	<i>Helianthus annuus</i>	Cr (5, 10, 20 mg kg <sup>-1</sup> ) in dry soil	2.5, 5 mM	-	Increased: Growth, biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes. Decreased: ROS, MDA.	[19]
	<i>Calendula officinalis</i>	Cd-spiked soils (50, 100 mg kg <sup>-1</sup> )	0.05, 0.1 mM in soil	-	Increased: Root and shoot dry weight, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, CAT, APX. Decreased: MDA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	[29]
	<i>Salix viminalis</i>	Cd as Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (β, 6 mg kg <sup>-1</sup> ) in spray	20 mM in aqueous solution	-	Increased: Biomass, Cd plant uptake, photosynthetic pigments, leaf gas exchange, photosynthetic rate. Decreased: Pro content.	[30]
	<i>Larix olgensis</i>	Pb as Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (100 mg kg <sup>-1</sup> )	0.2, 1, 5, 10 mM by irrigation and leaf spray	-	Increased: Survival rate, biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, POX, Pro content. Decreased: Pb content, MDA.	[31]
<i>Typha latifolia</i>	Pb as Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> and Hg as HgSO <sub>4</sub> (0, 1, 2.5, 5 mM) in nutritive medium	5 mM in nutritive medium	-	Increased: root, stem and leaf biomass, leaf number and areas, plant height, root length, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, POX, CAT, APX. Decreased: MDA, EL, ROS.	[19]	
Malic acid	<i>Salix variegata</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (50 μM) in aqueous solution	100 μM in aqueous solution	Up-regulation: <i>HMA1</i> , <i>PCS1</i> , <i>HMA3</i> , <i>Nramp5</i> , <i>MTP4</i> . Down-regulation: <i>MTPI</i> , <i>HMA3</i> , <i>MT1A</i> .	Increased: Growth, biomass, activities of antioxidant enzymes SOD, POD, CAT, APX; non-protein sulfhydryl compounds (NPT), GSH, non-GSH NPT. Decreased: MDA.	[33]

Table 2. Cont.

Organic Acid	Species	HM Stress	OA Application	Gene Expression Responses *	Physiological and Morphological Outcomes	Reference
Malic acid	<i>Miscanthus Sacchariflorus</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (100 µM) in nutritive solution	100 µM in nutritive solution	Up-regulation: <i>Cu/Zn-SOD</i> , <i>PODI</i> , <i>GPX1</i> , <i>GST1</i> , <i>MDHAR</i> , <i>DHAR</i> . Down-regulation: <i>CAT1</i> .	Increased: Growth, root and shoot length, photosynthetic pigments, total antioxidant capacity, activities of antioxidant enzymes SOD, CAT, POD, APX, GR, GPX, and GST; concentration GSH and GSSG. Decreased: MDA, ROS	[34]
	<i>Oryza sativa</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (25 µM)	50 µM in nutritive solution	Up-regulation: <i>OsCDT1</i> , <i>OsNramp1</i> , <i>OsIRT1</i> , <i>HMA3</i> . Down-regulation: <i>OsNAS1</i> , <i>OsSOD</i> .	Increased: Biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes. Decreased: Cd content in leaves.	[26]
	<i>Brassica juncea</i>	Ni as NiSO <sub>4</sub> (0.003 mM) in nutritive solution	0.5, 1, 5 mM in nutritive solution	-	Increased: Ni leaf concentration. Decreased: Leaf biomass, Ni root uptake.	[17]
	<i>Alyssum corsicum</i>	Ni as NiSO <sub>4</sub> (0.3 mM) in nutritive solution	0.5, 1, 5 mM in nutritive solution	-	Increased: Shoot and root biomass. Decreased: Ni shoot concentration.	[17]
	<i>Spinacea oleracea</i>	Pb (2.42, 4.83 mM) in nutritive solution	2.4 mM in nutritive solution	-	Increased: Biomass, shoot length, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, GPOX, CAT, APX, AsA contents, total phenolics. Decreased: MDA, ROS, flavonoid content.	[35]
	<i>Zea mays</i>	Soil polluted with 250 mg Ni kg <sup>-1</sup>	0.1 mM in nutritive solution	-	Increased: Shoot dry weight, Ni uptake efficiency (without soil P). Decreased: Ni uptake efficiency (with soil P).	[36]
	<i>Helianthus annuus</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (5 µM) in nutritive solution	250, 500 µM in nutritive solution	-	Increased: Growth, biomass, shoot and root length, photosynthetic pigments, OA content, activities of root dehydrogenases. Decreased: ROS, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	[37]
Oxalic acid	<i>Brassica juncea</i>	Cd and Zn resulted from smelting waste emissions	Drip irrigation system (5 mM)	-	Increased: Biomass, root and shoot dry weight, Zn and Cd mobilization, activities of antioxidant enzymes of PAL, PPO, and CAT.	[38]

Table 2. Cont.

Organic Acid	Species	HM Stress	OA Application	Gene Expression Responses *	Physiological and Morphological Outcomes	Reference
Oxalic acid	<i>Sedum alfredii</i>	Cd (10.71 mg kg <sup>-1</sup> ) and Pb (438.4 mg kg <sup>-1</sup> ) in contaminated soil	2.5 mM by leaf spray	-	Increased: Biomass, plant growth, Cd and Pb mobilization, photosynthetic pigments, K content. Decreased: MDA.	[39]
	<i>Cicer arietinum</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (200 µM) by seed imbibition	100 µM in aqueous solution	-	Increased: root and shoot growth, activities of antioxidant enzymes GPX, GR, glutathione redox state, NADP+/NAD+ ratio, NADH+ NADPH ratio. Decreased: MDA, ROS, carbonyl group contents.	[40]
Lipoic acid	<i>Triticum aestivum</i>	Pb as Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (1.5 mM) by seed imbibition	2 µM by seed imbibition	-	Increased: Enzymatic activity amylase, SOD, GSH, GSH/GSSH ratio. Decreased: O <sup>2-</sup> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	[41]
Jasmonic acid	<i>Oryza sativa</i>	Pb as Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (150, 300 µM) in hydroponic solution	0.5, 1 µM in hydroponic solution	Up-regulation: <i>HMA3</i> , <i>HMA4</i> , <i>PCS1</i> , <i>PCS2</i> , <i>ABCC1</i> . Down-regulation: <i>HMA2</i> .	Increased: Growth, photosynthetic pigments, Pro. Decreased: MDA, ROS.	[42]
	<i>Oryza sativa</i>	As (0, 25, 50 µM) in hydroponic solution	0.5, 1 µM MJ in hydroponic solution	Up-regulation: <i>IRO6</i> , <i>FRDL1</i> , <i>YSL2</i> . Down-regulation: <i>Lsi1</i> , <i>Lsi2</i> , <i>Lsi6</i> , <i>Nramp1</i> , <i>Nramp5</i> .	Increased: Height, biomass, photosynthetic pigments, endogenous JA content, activities of antioxidant enzymes CAT, SOD, APX, POD. Decreased: MDA, ROS, As concentration in roots and leaves.	[43]
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pb (0, 0.25, 0.50, 0.75 mM) on filter paper	100 nM by seed imbibition	Up-regulation: <i>succinyl CoA ligase</i> , <i>succinate dehydrogenase</i> , <i>fumarate hydratase</i> , <i>CHS</i> , <i>PAL</i> . Down-regulation: <i>CHLASE</i> , <i>C5</i> , <i>malate synthase</i> .	Increased: RWC, photosynthetic pigments, antioxidant molecules. Decreased: Pb concentration.	[44]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (50 µM) in nutrient solution	0.01, 0.025 µM MJ in nutrient solution	Down-regulation: <i>AiIRT1</i> , <i>AiHMA2</i> , <i>AiHMA4</i> .	Increased: Cd content in root cell wall. Decreased: chlorosis, Cd content in shoot and root cell sap.	[45]

Table 2. Cont.

Organic Acid	Species	HM Stress	OA Application	Gene Expression Responses *	Physiological and Morphological Outcomes	Reference
Jasmonic acid	<i>Brassica parachinensis</i>	Cr as $K_2Cr_2O_7$ (150, 300 $\mu$ M) in solution	5, 10, 20 $\mu$ M by leaf spray	-	Increased: Growth, biomass, plant height, leaf area and number, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, APX, CAT, GPX, GST, GR, MDHAR, DHAR, AsA, and GSH contents. Decreased: MDA, ROS, Cr uptake.	[46]
	<i>Triticum aestivum</i>	Cd as $CdCl_2$ (100 $\mu$ M) in solution	10 $\mu$ M MJ by leaf spray	-	Increased: Growth, biomass, RWC, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes CAT, SOD. Decreased: MDA, ROS, chlorosis.	[47]
	<i>Phaseolus coccineus</i>	Cu as $CuSO_4$ (50 $\mu$ M) in hydroponic solution	10 mM MJ preincubation in hydroponic solution	-	Increased: Activities of antioxidant enzymes CAT, APX, POX. Decreased: MDA, ROS.	[48]
	<i>Medicago sativa</i>	Cu as $CuSO_4$ (100 $\mu$ M) in nutritive medium	1, 5, 10 nM MJ in nutritive medium	-	Increased: Biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes CAT, SOD, POD, APX GR. Decreased: MDA, ROS, Cu concentration in roots and leaves.	[49]
Salicylic acid	<i>Solanum tuberosum</i>	Cd as $CdCl_2$ (200 $\mu$ M)	600 $\mu$ M by leaf spray	Up-regulation: <i>SISABP2</i> , <i>SISOD</i> , <i>SIAPX</i> .	Increased: RWC, photosynthetic pigments, Pro and SA content. Decreased: MDA, $H_2O_2$ , $O_2^-$ .	[50]
	<i>Melissa officinalis</i>	Hg as $HgCl_2$ (50 $\mu$ M) in nutritive solution	50 $\mu$ M in nutritive solution	Up-regulation: <i>CHLG</i> , <i>PAL</i>	Increased: Growth, biomass, RWC, photosynthetic pigments, total phenolics, antioxidant activities, Pro content. Decreased: MDA, ROS.	[51]
	<i>Hordeum vulgare</i>	Cd (25 $\mu$ M) in hydroponic culture	500 $\mu$ M priming of dry caryopses	Up-regulation: <i>GS</i>	Increased: Growth, fresh and dry weight of roots and shoots, antioxidant activities CAT, APX, GPX Decreased: MDA.	[52]
	<i>Zea mays</i>	Pb as $Pb(NO_3)_2$ (2.5 mM)	0.5 mM pretreated seed	Up-regulation: <i>ZmACS6</i> , <i>ZmSAMD</i> .	Increased: Glycine betaine and nitric oxide contents Decreased: Met, Arg, Pro contents.	[51]

Table 2. Cont.

Organic Acid	Species	HM Stress	OA Application	Gene Expression Responses *	Physiological and Morphological Outcomes	Reference
Salicylic acid	<i>Brassica juncea</i>	Pb (0.25, 0.50, 0.75 mM) in solution	1 mM by seed imbibition	Up-regulation: <i>PSY</i> , <i>CAT</i> , <i>POD</i> , <i>DHAR</i> , <i>GST</i> , <i>GR</i> . Down regulation: <i>CHLASE</i> .	Increased: Growth, root and shoot length, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes POD, APOX, GR, DHAR, MDHAR, GST, and GR, activities non-enzymatic antioxidants glutathione, ascorbic acid tocopherol. Decreased: ROS.	[53]
	<i>Artemisia annua</i>	As as $Na_2HAsO_4$ (100, 150 $\mu$ M)	100 $\mu$ M in nutritive solution	Up-regulation: <i>ADS</i> , <i>CYP71AV1</i> , <i>DBR2</i> , <i>ALDH1</i> .	Increased: Growth, biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, CAT, APX, GR, artemisinin and dihydroartemisinin. Decreased: ROS.	[54]
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cd (10 $\mu$ M) in pretreatment and hydroponic culture	25, 50, 100, 200 $\mu$ M in pretreatment and leaf spray	Up-regulation: <i>TAP2</i> , <i>LAC</i> , <i>CesA1</i> , <i>CesA6</i> . Down-regulation: <i>PME1</i> , <i>PME2</i> .	Increased: Pectin, cellulose, hemicellulose, lignin and callose synthesis in root and leaf cell wall. Decreased: Cd accumulation in cell wall, cytoplasm, organelles.	[55]
	<i>Lemma minor</i>	Cd as (10 $\mu$ M $Cd^{2+}$ ) in nutritive medium	50 $\mu$ M in nutritive medium	-	Increased: Fe, Mg, Ca, Mo, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes SOD, GPX, CAT, APX, GR, endogenous SA, and PAL activity. Decreased: Chlorosis, MDA, ROS, ascorbate, Pro.	[56]
	<i>Melissa officinalis</i>	Ni as $NiCl_2$ (500 $\mu$ M) in nutritive solution	1 mM by leaf spray	-	Increased: Growth, shoot and root fresh and dry weights, photosynthetic pigments, root Pro content. Decreased: leaf Pro content, MDA, $H_2O_2$ , EL.	[57]
	<i>Sorghum bicolor</i>	Cr as potassium dichromate (1.0, 2.0, 4.0 $mg\ kg^{-1}$ soil)	0.5 nM pretreatment and leaf spray	-	Increased: Growth, number of leaves, activities of antioxidant enzymes POX, APX Decreased: MDA, ROS.	[58]



Table 2. Cont.

Organic Acid	Species	HM Stress	OA Application	Gene Expression Responses *	Physiological and Morphological Outcomes	Reference
	<i>Helianthus annuus</i>	Cd as CdCl <sub>2</sub> (5, 10, 15, 20, 50, 100 µM) in nutritive solution	75 µM by seed imbibition	-	Increased: Growth, biomass, photosynthetic pigments, activities of antioxidant enzymes CAT, APX, SOD, GR; leaf lipid and fatty acid composition. Decreased: MDA, ROS, EL, Cd concentration in roots and leaves.	[59]
Gallic acid	<i>Zea mays</i>	Cu as CuSO <sub>4</sub> (1 mM) by seed imbibition	1.5 mM by seed imbibition	-	Increased: photosynthetic pigments, Cu content, Pro, activities of antioxidant enzymes GPX, CAT, SOD, APX. Decreased: MDA, ROS.	[60]
	<i>Triticum aestivum</i>	Cd (100, 200, 300 µM) in nutritive solution	25, 75 µM, 1 mM in nutritive solution	-	Increased: Growth, Pro, activities of antioxidant enzymes SOD, CAT, POX, APX, Gr, NOX, MDHAR, DHAR, activities non-enzymatic antioxidants GSH, GSSG, AsA. Decreased: MDA.	[61]
Caffeic acid	<i>Medicago sativa</i>	Cu as CuSO <sub>4</sub> (250 µM) and Cd as CdCl <sub>2</sub> (250 µM) in solution	-	Up-regulation: COMT in Cd stress	-	[62]

\* (-) means no changes in gene expression were measured.

At the molecular level, effects of CA applications on gene expression can be divided into three large groups of genes, leading in unison to enhanced HM tolerance. The first group are the genes required for CA biosynthesis itself, the second set are specific transporters of HMs or metalloids, whilst the third and largest group are those responsible for responses to HM stress and which may serve as stress markers. The work of Kaur et al. [23] analyzed members of this latter group, discovering that the expression of three genes in mustard seeds—chlorophyllase (*CHLASE*), phytoene synthase (*PSY*), and chalcone synthase (*CHS*) genes—all of which are linked to photosynthetic activity and are indicative of stress by HM, changed markedly when exogenous CA (100 nM) was applied directly to soil contaminated with Cd (0.6 mM CdCl<sub>2</sub>). Other genes involved in HM or metalloid transport are those of the NRAMP family (Natural Resistance Associated Macrophage Protein Family), whose corresponding proteins are found in the plasma membrane and have the ability to mediate the uptake of Mn and Cd. Expression of most *OsNramp* genes is increasingly inhibited by greater Cd stress (as CdCl<sub>2</sub>) in rice plants [32]. Foliar application of CA (5.0 mM) onto Cd-treated plants significantly increased the expression of this gene family, especially that of *OsNramp2* and *5* by up to 125%, and reduced or even eliminated the inhibition of Cd in their expression [32]. The expression of other genes, including transporters, has also been studied in the shrub *Salix variegata* exposed to Cd (50 µM in hydroponic medium). Specifically, the expression of *HMA1* (P-type metal ATPase protein 1), *PCS1* (PC synthase 1), *HMA3* (P-type metal ATPase protein 3), *Nramp5*, *MTP1* (metal tolerance protein 1), *MTP4* (metal tolerance protein 4), and *MT1A* and *MT2B* (MT 1A and 2B) in leaves was reduced by Cd-stress, a feature that was reversed (by 1.7–7.0-fold) on addition of CA (100 µM) [33].

CA has a long-known chelation effect on other metals which are not considered to be HM, such as aluminum (Al). Indeed, genetic approaches (rather than exogenous applications) have been employed with significant success to combat the effects of Al-toxicity on diverse species. For instance, the overexpression of CS from rice or yuzu (*Citrus junos*) in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) increased internal citrate levels and enhanced tolerance to contamination by Al (40 mg/L, in nutrient solution [63]; 200 µM in solution [64]).

### 2.1.2. Malic Acid

Malic acid (MA, malate, 2-hydroxybutanedioic acid), a naturally occurring four-carbon dicarboxylic acid and an intermediate in the Krebs's Cycle, is formed from fumaric acid and oxidized to oxoacetic acid. MA can also be metabolized to pyruvic acid. Like other OAs, MA forms strong bonds with HM ions via the carboxyl groups, harboring the function of donor oxygen in the metal-ligand [65], and is the predominant OA in many fruit species, including apples, stone fruits, and berries [66,67]. As a potent HM-chelator, exogenous application has been used to combat HM stress (Table 2). Indeed, in a comparative study, where *S. variegata* seedlings were exposed to contamination by Cd (50 µM as CdCl<sub>2</sub>), of three different OAs (MA, CA, and tartaric acid; 100 µM), the plants treated with MA had a more pronounced increase in root, stem, and total biomass, and a greater decrease in the content of MDA compared to CA- or tartaric acid-treated lines [33]. Root and leaf POD activities were also raised by addition of MA in Cd-contaminated plants [33]. Highlighting the role of MA in nurturing the recovery of physiological parameters decreased by HMs, other examples of plants treated with MA include *Miscanthus sacchariflorus* (100 µM CdCl<sub>2</sub>), mustard (NiSO<sub>4</sub> 0.003 mM), *Alyssum corsicum* (NiSO<sub>4</sub> 0.3 mM), spinach (*Spinacea oleracea*; <4.83 mM Pb), and rice (25 µM CdCl<sub>2</sub>) [17,26,34,35]. Other crops of commercial interest, such as maize and sunflower, have been exposed to MA (0.1 mmol kg<sup>-1</sup> and <500 µM, respectively) as a means to withstand Ni (250 mg Ni kg<sup>-1</sup>, maize) and Cd (5 µM CdCl<sub>2</sub>, sunflower) [36,37]. In both cases, addition of MA increased the total biomass and the growth rate, improved the antioxidant capacity (by increasing the activity of antioxidant enzymes POD, SOD, APX, GR, etc.), and enhanced the content of photosynthetic pigments such as chlorophylls, and also anthocyanins. In addition, the expression of genes associated with HM tolerance or as indicators of HM stress (chlorophyll synthase, *CHLG*, key to the

formation of chlorophyll, *OsNramp1*, *SOD*, *POD*, etc.) was higher, leading to decreased ROS levels and electron leakage (EL) in both maize and sunflower [36,37].

The effect of different OAs (CA, MA, tartaric acid) on the expression levels of genes involved in HM transport and detoxification in roots and leaves of *S. variegata* under stress by Cd (100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>) was investigated [33]. In roots, application of MA (100  $\mu$ M) significantly increased the expression levels of *HMA1* and *HMA3*. In leaves, MA boosted the expression of *Nramp5* and *PCS1* to levels that were substantially higher than with the other OAs tested, whilst that of *MTP1*, *HMA3*, *HMA5*, *MT1A*, and *MT2B* fell by 37–78% compared to the Cd treatment group [33].

MA has also been shown to have the ability to increase the expression of genes encoding antioxidant enzymes. For example, in *M. sacchariflorus* subjected to stress by Cd (100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>), both the treatments by Cd alone or MA alone (100  $\mu$ M) increased the expression of *Cu/Zn-SOD*, *POD1*, *glutathione peroxidase (GPX1)*, *glutathione S-transferase (GST1)*, *monodehydroascorbate reductase (MDHAR)*, and *dehydroascorbate reductase (DHAR)*. When MA and Cd were applied simultaneously, the expression of *Cu/Zn-SOD*, *POD1*, *GRI*, *GPX1*, and *GST1*, all vital for protection against oxidative stress, was induced even further, reaching up to 4.7-fold higher compared to Cd-control plants [34]. In rice *OsNramp1*, *OsIRT1* (iron regulated transporter), *OsHMA3*, and *OsNAS1* (nicotianamine synthase) had lower expression in response to stress by Cd (25  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>), an effect that was reversed on the concomitant addition of MA (or CA, 50  $\mu$ M), aiding in the neutralization of HM stress [26]. However, a universal increment in the expression of all antioxidant genes was not observed; for example, that of *SOD* fell on addition of MA, indicating a certain degree of specificity, probably via different pathways controlled at the transcriptional level [26].

As in the case of CA, transgenic techniques have also been explored to raise MA synthesis as a means of increasing a plant's tolerance to HM contamination. Such is the case of transgenic tobacco overexpressing cytosolic malate dehydrogenase (*MDH*) from *Arabidopsis thaliana* and the *MDH* gene from *Escherichia coli (emdH)* [68]. The results demonstrate that genes from both origins raise *MDH* activity (by up to 120–130%), including greater malate concentrations in root exudates compared to non-transformed controls, when tobacco is grown under Al stress (300  $\mu$ M). Such effects enhanced Al-tolerance in the transformed lines, an effect that was proportional to MA exudation [68]. Likewise, as a proof-of-concept for potential transfer to crop species, it has been demonstrated that overexpression of *MDH1* from *Stylosanthes guianensis* participates in Mn (5–800  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub>) detoxification by improving malate synthesis and exudation in *Arabidopsis* roots, thus lowering plant Mn concentrations in plants exposed to Mn stress [69]. Additionally, in the same plant model, cytosolic *MDH (CMDH4)* is required for Pb tolerance, enhancing the transcription of *PDR12* required for Pb efflux [70].

### 2.1.3. Oxalic Acid

Oxalic acid (OxA) and its conjugate base oxalate can form salts with K, Cu, Mg, and Ca, the most prevalent being calcium oxalate (CaOx) [71]. OxA plays an important role in the regulation of not only Ca but also of other divalent ions and HMs (Cd, Zn, Pb, Mn), due to accumulation within the vacuoles of specialized cells called idioblasts [72]. The secretion and accumulation of oxalate by plant roots prevents the absorption of HMs, as oxalate forms complexes with different metal ions such as Pb (practically insoluble) or Cd (partially soluble), thus decreasing the bioavailability of such HMs in the soil [73]. This effect is usually attributed to a lowering in the number of ionized bioavailable forms of HMs in the rhizosphere, coupled with higher competition of protons and metal ions for the adsorption sites on root cell walls, as well as the formation of less bioavailable chelating complexes [73]. A case in mustard highlights such responses (Table 2) [38]. Specifically, anthropogenic contamination of soils with Cd and Zn led to a fall in the activity of antioxidant enzymes such as phenylalanine ammonium lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO), and CAT in seeds. Application of 5 mM EDTA, despite being a very effective chelator, caused negative consequences on PPO activity, plant growth, development, and shoot and root biomass.

However, treatment with 5 mM OxA did not have such an effect; on the contrary, it significantly improved parameters such as the antioxidant activity of PAL, PPO, and CAT, and the dry and fresh shoot and root weights [38]. In another study, the foliar application of 2.5 mM OxA (together with indole-3 acetic acid) on *Sedum alfredii*, a perennial herb used for phytoremediation, resulted in a greater total biomass and a slight increase in the Cd or Pb content compared to the control, and improved the absorption of nutrients such as K by 38% [39]. Similarly, chickpea (*Cicer arietinum*) seeds have been bathed in an aqueous solution of 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , and then washed in 100  $\mu\text{M}$  OxA. The stress by Cd alone considerably increased the amount of MDA and the content of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in both chickpea roots and shoots. The exogenous application of OxA significantly alleviated these molecular symptoms, returning MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  parameters back to non-Cd-stressed control values. A similar palliative effect was seen in the reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio in roots and shoots, and in GPX and GR activities, enzymes responsible for recycling antioxidant enzymes. Additionally, the balance of nicotinamides (NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>) and their reduced forms (NADH/NADPH) in shoots was 37% higher in chickpea seeds grown in Cd media, and the addition of OxA counteracted this adverse effect, thus restoring the balance between oxidized and reduced forms [40].

#### 2.1.4. Lipoic Acid

Lipoic acid (6,8-dithiooctanoic acid, LA) is an 8-carbon molecule, a fundamental co-factor for the activity of five enzyme complexes that are part of the central metabolism:  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase (KGDH), pyruvate dehydrogenase (PDH), glycine decarboxylase (GDC), branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenases (BCDH), and acetoin dehydrogenase (AoDH) [74,75]. LA and its reduced form, dihydrolipoic acid (DHLA) [41,76], have antioxidant activity and can chelate HMs; LA can chelate metals such as Mn, Cu, Zn, and Pb, while DHLA chelates  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , Co, Ni, Cu, Zn, Pb, and Hg. Although it is well documented that LA has the ability to chelate metal ions in addition to antioxidant properties, the chelation ability of DHLA and LA, due to the presence in the molecules of both vicinal sulfur atoms and of a carboxylic group is important in biological systems since, in the presence of excess free HMs, they can participate in chain reactions, leading ultimately to  $\text{O}_2$  reduction by catalyzing electron transfer from one oxygen species to another in a Fenton-like reaction [76]. Although most research in plants has focused on how internal LA and DHLA levels change in response to HM stress (e.g., in durum wheat, *Triticum durum*, treated with Cu [77]), one relevant study highlights its utility as an exogenous agent (Table 2). In Turk et al. [41], the physiological and biochemical effects related to the application of LA in wheat (*Triticum aestivum*) were demonstrated. Seeds were soaked with 1.5 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  with or without 2  $\mu\text{M}$  LA to determine whether the latter is able to mitigate the effects produced by HM contamination. The treatment with Pb significantly increased the amounts of  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  by 42% and 58% respectively, increments which were buffered on addition of external LA (by 19% and 20%, respectively). Similar effects were seen in lipid peroxidation (determined as MDA) and SOD, although not for other enzymes with known antioxidant capacities like GPX, GR, and APX [41].

#### 2.1.5. Jasmonic Acid

Jasmonic acid (JA) and its derivatives, jasmonates, are carboxylic acids and lipid phytohormones belonging to the group of oxylipins [78]. Discovered in 1962, this phytohormone is part of processes such as adaptation to stress, reproductive growth of plants, movement, etc. [78]. Physiologically, the application of JA (and its derivatives) has been implemented to alleviate the symptoms produced by contamination by HMs, including Cr, As, Ni, Cd, Pb, and Cu (Table 2) [79]. For instance, the application of Cr (150 and 300  $\mu\text{M}$ ) in Choy sum (*Brassica parachinensis*) generates a drop in morphological (root length, plant height, and biomass, etc.) and biochemical (total chlorophyll and carotenoid content, etc.) parameters, and altered the activity of antioxidant enzymes (including SOD, CAT, APX, GR, GST, MDHAR, and DHAR) [46]. However, the foliar application of JA (5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) neutralized the

toxic effects of Cr, particularly at the highest dose. The recovery was shown by the reversal in the falls in morphological parameters, photosynthetic pigment levels, and gas exchange, a reduction in the absorption of Cr by roots and restored mineral homeostasis (K, Ca, Mn, Fe, Zn). Exogenous JA also increased activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT, APX, GR, GST, MDHAR, and DHAR in Cr-treated plants, mirrored by falls in MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels [46]. Similar protective effects have been observed in wheat (100 µM Cd plus methyl jasmonate (MJ), 10 µM spray) [47]), runner beans (*Phaseolus coccineus*; 50 µM Cu plus 10 µM MJ [48]), and alfalfa (100 µM Cu plus 1–10 nM JA [49]).

In rice exposed hydroponically to Pb (150–300 µM) and MJ (0.5–1 µM), in addition to improving the physiological parameters decreased by Pb, a study also demonstrated that MJ can modulate the expression of certain genes, including *HMA*s, *PCS1* and 2, and *ABCC1* (Cd transporter into the vacuole) [42]. The toxicity of Pb increased expression of *HMA2* (involved in the transport of Cd into shoots), *HMA3* and *HMA4* (transporters of Cd into vacuoles), *PCS1* and 2, and *ABCC1*. When exogenous MJ was applied, the expression of *HMA2* and others decreased in roots, effectively trapping Pb underground and limiting translocation to aerial parts of the Pb-treated rice [42]. Similar protection was observed when MJ (0.5–1 µM) was added to rice supplemented with As (25–50 µM), in that MJ reduced the absorption of As into rice roots and leaves and significantly lowered the amount of MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (as reflected in increased APX, SOD, and CAT activities and levels of ascorbic acid (AsA), dehydroascorbate (DHA), and GSH), thus restoring overall morphological and physiological fitness [43]. At the transcriptional level, when As was applied, the expression of As transporters (*Lsi1*, *Lsi2*, and *Lsi6*) increased significantly (by up to 6.4-fold, depending on the rice variety), effects that were reversed substantially by the exogenous supplementation of the growth medium with MJ, effectively reducing As influx into the rice plant [43].

Furthermore, when tomato seeds were soaked in solution with JA (100 nM) for 4 h to neutralize the harmful effects of Pb (0.25–0.75 mM), the results indicate that exogenous JA triggered increases in relative water content (RWC) and levels of total photosynthetic pigments, antioxidant secondary metabolites (flavonoids, anthocyanins, etc.), and OAs, including CA, MA, and other Krebs' Cycle intermediates, compared to the controls exposed only to Pb [44]. Such alterations were accompanied by concordant changes in the levels of gene expression of *CS*, *PAL*, *CHLASE*, and *CHS*, amongst others [44].

Even in non-crop species, adding JA or its derivatives can be used to rescue phenotypes brought about by deficiencies in the biosynthesis of this phytohormone. Such is the case for the AtAOS mutants of Arabidopsis, deficient in allene oxide synthase, a key protein required for JA manufacture, whereby it was shown that in the presence of 50 mM CdCl<sub>2</sub>, mutants had higher expression of *AtIRT1* (Cd uptake), and *AtHMA2* and 4 (Cd translocation) reflected the exhibition of much more pronounced symptoms on exposure to Cd (chlorosis and shorter roots), and more Cd in shoots and roots [45]. Nevertheless, the molecular and morphological phenotypes could be alleviated if MJ (0.01, 0.025 mM) was simultaneously added to the growth medium of the AtAOS mutants [45]. Similar transcriptomic analyses have been performed in rice, whereby Cu (100 µM) increases the expression of genes encoding enzymes related to JA biosynthesis, including AOS [80], as does the exposure to As (5–200 µM) [81].

## 2.2. Phenolic Acids

### 2.2.1. Salicylic Acid

Salicylic acid (SA, ortho-hydroxybenzoic acid) is a phenolic phytohormone present to a large extent in the plant kingdom and is a key regulator of processes such as thermogenesis, plant signaling, regulating plant morphology, development, flowering, and closure of the stomata, as well as participating as a mediator of the defense responses against pathogens and to abiotic stresses [82]. There are two pathways involved in SA biosynthesis—the shikimate pathway found in the cytoplasm, and the isochorismate route localized in the chloroplast [83]. One of the many abiotic stresses which SA is involved in

is the contamination by HMs [82]. In general, under Cd exposure, pre-treating with SA increases the ROS-quenching capacity of contaminated plants, like maize and tomato, by stimulating the activity of antioxidant enzymes, boosting levels of non-enzymatic antioxidant compounds with HM-chelating capacities (PCs, GSH, etc.), and strengthening cell walls to limit Cd accumulation (Table 2) [55,84,85]. In more detail, the foliar application of SA (600  $\mu\text{M}$ ) to potato explants (*Solanum tuberosum*) treated with Cd (200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ) improved parameters reduced by stress with Cd, such as the relative water content (RWC), chlorophyll and proline levels, along with decreasing MDA and ROS [50]. In lemon balm (*Melissa officinalis*), in the presence of Ni (0–500  $\mu\text{M}$ ) in nutrient solution, the application of SA (1.0 mM) by manual spraying was successfully used to counteract the symptoms of Ni contamination [57]. As a genetic strategy, overexpression of bacterial salicylate hydroxylase (*NahG*), an enzyme critical in the shikimate pathway, enabled transgenic Arabidopsis to withstand the negative effects induced by watering with  $\text{CdCl}_2$  (0.5 mM) [86].

At the molecular level, contamination of lemon balm by Hg (50  $\mu\text{M}$ ) lead to a significant reduction in the expression of *CHLG* and an increase in that of *PAL*, important for the formation of phenylpropanoids and acclimatization to abiotic stress. The application of SA (50  $\mu\text{M}$ ) to Hg-treated lines enhanced the expression of *CHLG* and reduced that of *PAL*, suggesting that SA could play a role in the regulation of genes related to the biosynthesis of phenolic compounds [51]. In another study, where maize seeds were exposed to stress by Pb (2.5 mM), the selected genes were *ZmACS6* and *ZmSAM* (involved in the metabolism of the ethylene precursor methionine, and in polyamine biosynthesis, respectively). Under Pb stress, these genes had raised expression levels in roots and significantly lower transcript contents in shoots. Treatment with SA (0.5 mM) reversed these trends in both aerial and underground parts of the maize plants, implicating SA in the synthesis of ethylene and in tolerance to Pb stress [87]. The importance of exogenous SA is also demonstrated in the regulation of growth, pigment content, antioxidant defense responses, and gene expression in mustard seedlings exposed to different concentrations of Pb (0.25–0.75 mM). In an analysis of *POD*, *DHAR*, *GST*, and *GR*, it turned out that contamination decreased the expression of these genes, whereas soaking seeds with 1 mM SA led to dramatic improvements (by up to 5-fold) in the transcript levels of all the genes involved in oxidative stress responses [53].

Not all genes regulated by SA are related to oxidative stress. In an interesting recent development, researchers demonstrated that cell wall components also play a key role. Specifically, pretreatment of tomato leaves by spraying with SA (100  $\mu\text{M}$ ) had significant priming effects prior to exposure to Cd (100  $\mu\text{M}$  for 3 days, then 10  $\mu\text{M}$  in hydroponic medium). SA pretreatment followed by Cd addition reduced the activity of pectin methyltransferase (PME), an enzyme that catalyzes the demethylation of pectin, thereby exposing a large area of free carboxyl groups to bind metal ions by approximately a third in both roots and leaves, changes reflected in the transcript levels of *PME1* and 2 [55]. In both organs, SA-pretreated Cd plants also had greater cell wall peroxidase and laccase capacity, and expression of *TAP2* (peroxidase) and *LAC* (laccase) compared to tomato exposed solely to Cd. Possibly reflecting greater changes in cell wall structure, genes required for cellulose synthesis were also upregulated in tomato pretreated with SA, revealing concerted responses to reduce potential loading of Cd into the plant symplast [55].

### 2.2.2. Gallic Acid

Gallic acid (GA; 3,4,5-trihydroxybenzoic acid) is a widely distributed phenolic acid in many different families of plants and is present in different parts of these, such as roots, leaves, seeds, stem, woody tissues, and especially fruits like raspberries, blueberries, and strawberries [88]. The protective effect of GA (and phenolic acids in general) is correlated with their antioxidant and free radical scavenging power, their potential ability to interact with transduction signal pathway components, and their HM chelating activity [89]. GA is a secondary metabolite of plants and arises mainly from the shikimate route, from 3-dehydroshikimic acid, 3-DHS [90]. Subsequently, dehydroquinase dehydratase (DQD)/shikimate dehydrogenase (SDH) oxidizes 3-DHS to shikimate acid (DQD activity)

or reduces the same substrate to GA via the SDH domain [91]. Indeed, overexpression of SDH from walnut (*Juglans regia*), a species that produces very high concentrations of GA, in tobacco (*N. tabacum*), lead to transformants accumulating >500% more GA than the controls [91]. In addition, GA itself can act as a natural fertilizer (without contamination by HM), especially because it is an excellent neutralizer of ROS (both directly, and by enhancing antioxidant activity), with positive impacts on morphological parameters like germination rate, plant biomass, and yield. For instance, adding GA ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) to rice increased the expression of genes related to antioxidant activity, such as *PAL* and *CHS*, more than 4-fold [92].

Evidence pointing to a role of GA in HM responses shows that diverse metals in the growth substrate can trigger short-term increases in this phenolic acid (Table 2). For instance, exposure of bean sprout roots (*Phaseolus vulgaris*) to Pb and Cd (1–10  $\mu\text{M}$ ) had an initial positive impact on SDH activity in roots and leaves for three days before inhibitive effects (either of the HM itself, or from accumulated ROS) caused SDH activity to fall back [93].

Regarding the contamination by HMs, GA can alleviate the physiological symptoms produced by Cd stress in sunflower seeds. In these recent experiments, irrigation with 20  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> caused increases in endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, lipid peroxidation, EL, and SOD activity, whilst simultaneously total thiols and chlorophyll content fell, as did neutral lipids, phospholipids, and galactolipids, among other biochemical and molecular parameters [59]. However, pretreatment of the seeds with GA (75  $\mu\text{M}$ ) improved and/or reverted all these symptoms. Higher chlorophyll, total thiol, neutral lipids, phospholipids, and galactolipids contents were recorded, whilst H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, EL, and SOD levels all dropped [93].

Similar results were obtained in maize shoots grown in Cu (1 mM). The application of GA (1.5 mM) reverted the symptoms caused by this HM, such as a reduction of RWC, and SOD, CAT, and APX activities, whilst proline and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were higher [60]. Likewise, exogenous application of 25  $\mu\text{M}$  GA to wheat (*T. aestivum*) cultivated in Cd (100–200  $\mu\text{M}$ ) and redressed the misbalance of the ascorbate-GSH cycle, showing the effectiveness of this phenolic acid in maintaining antioxidant capacity [61].

### 2.2.3. Caffeic Acid

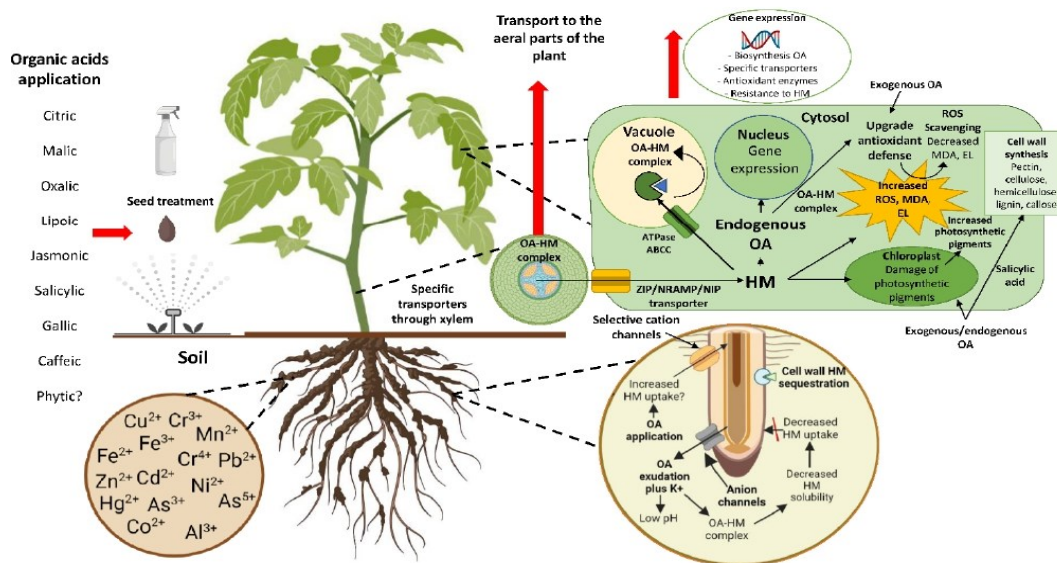
Caffeic acid (CfA; 3,4-dihydroxycinnamic acid) is a cinnamic acid and a phenylpropanoid present in all plants known to be involved in lignin synthesis, but also plays roles in cell expansion (and therefore growth), turgor, and phototropism. CfA and its derivatives are known for their antioxidant power and their role in tolerance to biotic and abiotic stresses, the latter including temperature, osmotic, and HM challenge [94]. CfA is an intermediate of the phenylpropanoid pathway synthesized from p-coumarate from phenylalanine or L-tyrosine, by PAL/cinnamate 4-hydroxylase, or tyrosine ammonia-lyase, respectively. Subsequently, p-coumarate is hydroxylated to CfA [95]. It has been proposed that the protective capabilities of CfA in HM stress are due to the generation of changes in the cell wall increasing its durability (probably via the production and accumulation of more lignin) and/or the direct neutralization of ROS, thus preventing damage to cellular macromolecules [96,97].

However, several studies have focused on the exogenous application of CfA on plant responses to HM stress due to their presence in root exudates (Table 2) [98]. Regarding a primary response of crops subjected to HM stress, it is known that HMs in the growth medium can drive production of CfA and its ester, rosmarinic acid (caffeic acid ester), in a manner that is directly proportional to the intensity of the stress, as shown using Cd (0.2–1.8 mmol L<sup>-1</sup>), Pb, and Al (0.04–0.16 mmol L<sup>-1</sup>) [99]. It is also important to note that CfA is a critical precursor of other chemical compounds that have fundamental roles in tolerance to stress by HM, such as ferulic acid and melatonin [100,101]. Indeed, a key enzyme for the conversion to both derivatives is caffeic acid O-methyltransferase (*COMT*). Gene expression of *COMT* is significantly increased in alfalfa seeds grown under stress

by Cu and Cd (250  $\mu$ M) [62], as is that of several members (*BnCOMT-1*, *-5* and *-8*) of the COMT gene family in canola sprouts (*Brassica napus*) cultivated in Al and Cd (25  $\mu$ M) [102].

### 3. Conclusions and Future Perspectives

Considering that the World Health Organization (WHO) establishes that several HMs constitute a major public health concern (As, Cd, Hg, and Pb) [103], the problems affecting plant, human, and animal health have tended to increase due to greater soil and bedrock disturbance, pesticide use, chemical disposal, etc., especially in the last 200 years. Although biotechnological advances, including transgenic strategies, have undoubtedly led to great strides in improving the resilience of crop plants to HM stress (e.g., [104–109]), the exogenous application of OAs serves as a viable solution in both economic and eco-friendly terms as a means of using a nature-based solution to contamination caused both naturally and anthropogenically. As primary or secondary metabolites, the responses of plants that are under stress by HMs are alleviated by OAs (Figure 1), as visualized by (I) an increase in morphological parameters such as growth, biomass, leaf area, and root length, leading ultimately to greater crop productivity, (II) an increment of the total amounts of chlorophyll and other photosynthetic pigments, (III) a boost in the activity of antioxidant enzymes SOD, POD, APX, GR, CAT, DHAR, MDHAR, PAL, PPO, etc., (IV) an enhancement in the activity of non-enzymatic antioxidant components including AsA, tocopherol, GSH, etc., (V) a fall in ROS, lipid damage, and EL, and (VI) HM chelation. In parallel, OAs can affect the expression of certain groups of genes, such as those (I) directly-required for OA biosynthesis (e.g., *CS*, *malate synthase*, etc.), (II) needed for the synthesis of protein-based HM-chelators (PCs, MTs, etc.), (III) involved in specific HM transport across the plasma membrane or tonoplast (IRT-like proteins, NRAMPs, HMAs, MTPs, etc.), and (IV) encoding antioxidant enzymes [104].



**Figure 1.** Potential molecular and physiological mechanisms triggered by the exogenous application of organic acids that increase the tolerance of plants to heavy metal stress.

Taken together, in plants, fungi, and microorganisms, more than 200,000 primary and secondary metabolites are synthesized [110], of which a substantial proportion correspond to carboxylic and phenolic acids. Studying the individual influences of each OA thus poses a clear challenge to scientists. Such a challenge is compounded by the fact that some effects



on alleviating HM contamination are shared by several crop species studied, whereas the intensity of responses can even depend on the genotype used in the research (e.g., rice in [43]). However, without doubt, many of the differences observed in experimental outcomes using the same OA can be attributed to experimental design. As shown in Table 2, the intensity of stress (HM concentration), the site and method of OA application (foliar or growth medium, spray, or irrigation), the concentration of OA used, and the timing of its addition (seed imbibition, treatments prior to and/or concurrently with HM stress) play a role in determining the findings, and thus the conclusions drawn for the potential translatability of the research to field settings.

A further development is the application of combinations of plant OAs. For example, the effects of the presence of both CA and MA (50  $\mu\text{M}$  in nutrient medium) have been evaluated in the rice treated with Cd (25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , in nutritive medium). In the presence of OAs (without Cd), the expression of *OsNramp1*, *OsIRT1*, *OsHMA3*, and *OsNAS1* decline, including those for vacuolar Cd transport. However, the addition of both OAs neutralized the adverse effects of Cd on the expression of these host genes, improving sequestration of Cd in the root vacuole, boosting antioxidant levels and overall photosynthetic efficacy, leading to a general increase in biomass [26].

Finally, interdisciplinary research is bringing together researchers from different areas, thus providing additional strategies to alleviate common agricultural problems. For example, the OA phytic acid (myo-inositol) plays a fundamental role as a reservoir of phosphate since it has six phosphate groups, yet it also participates as a divalent cation chelator given its strong negative charge [111]. However, as phytic acid can play a role as a chelator of HMs in *in vitro* tests [112], a novel application includes the design of electrospun polyurethane/phytic acid nanofibrous membranes for adsorbing Pb [113]. These results demonstrate that this plant-derived OA can indeed remove Pb from an aqueous solution. Further collaborative research and the possible sequestering of this and other HMs in field situations are thus eagerly-awaited developments.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.V., N.D. and M.H.; writing—original draft preparation, A.V.; writing—review and editing, A.V., N.D. and M.H.; supervision, N.D., M.H.; project administration, M.H.; funding acquisition, M.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by CONICYT PIA ACT192073 (MH), CONICYT PIA ACT210025 (MH) and Fondecyt 1181198 (MH).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank all members of the Centro de Biología Molecular Vegetal for helpful and constructive discussions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kim, J.J.; Kim, Y.S.; Kumar, V. Heavy Metal Toxicity: An Update of Chelating Therapeutic Strategies. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2019**, *54*, 226–231. [[CrossRef](#)]
2. Rahman, Z.; Singh, V.P. The Relative Impact of Toxic Heavy Metals (THMs) (Arsenic (As), Cadmium (Cd), Chromium (Cr)(VI), Mercury (Hg), and Lead (Pb)) on the Total Environment: An Overview. *Environ. Monit. Assess.* **2019**, *191*, 419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Muszyńska, E.; Labudda, M. Dual Role of Metallic Trace Elements in Stress Biology—from Negative to Beneficial Impact on Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fryzova, R.; Pohanka, M.; Martinkova, P.; Cihlarova, H.; Brtnicky, M.; Hladky, J.; Kynicky, J. Oxidative Stress and Heavy Metals in Plants. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; Springer LLC: New York, NY, USA, 2018; Volume 245, pp. 129–156.
5. Suvarapu, L.N.; Baek, S.O. Determination of Heavy Metals in the Ambient Atmosphere: A Review. *Toxicol. Ind. Health* **2017**, *33*, 79–96. [[CrossRef](#)]

6. Liu, P.; Huang, R.; Hu, X.; Jia, Y.; Li, J.; Luo, J.; Liu, Q.; Luo, L.; Liu, G.; Chen, Z. Physiological Responses and Proteomic Changes Reveal Insights into *Stylosanthes* Response to Manganese Toxicity. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 212. [CrossRef] [PubMed]
7. Aslam, M.; Aslam, A.; Sheraz, M.; Ali, B.; Ulhassan, Z.; Najeeb, U.; Zhou, W.; Gill, R.A. Lead Toxicity in Cereals: Mechanistic Insight into Toxicity, Mode of Action, and Management. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, 587785. [CrossRef]
8. Li, J.; Jia, Y.; Dong, R.; Huang, R.; Liu, P.; Li, X.; Wang, Z.; Liu, G.; Chen, Z. Advances in the Mechanisms of Plant Tolerance to Manganese Toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5096. [CrossRef]
9. Bączek-Kwinta, R.; Antonkiewicz, J.; Łopata-Stasiak, A.; Kepka, W. Smoke Compounds Aggravate Stress Inflicted on *Brassica* Seedlings by Unfavourable Soil Conditions. *Photosynthetica* **2019**, *57*, 1–8. [CrossRef]
10. Manzoor, J.; Sharma, M.; Wani, K.A. Heavy Metals in Vegetables and Their Impact on the Nutrient Quality of Vegetables: A Review. *J. Plant Nutr.* **2018**, *41*, 1744–1763. [CrossRef]
11. Kim, R.Y.; Yoon, J.K.; Kim, T.S.; Yang, J.E.; Owens, G.; Kim, K.R. Bioavailability of Heavy Metals in Soils: Definitions and Practical Implementation—A Critical Review. *Environ. Geochem. Health* **2015**, *37*, 1041–1061. [CrossRef]
12. Thakur, M.; Praveen, S.; Divte, P.R.; Mitra, R.; Kumar, M.; Gupta, C.K.; Kalidindi, U.; Bansal, R.; Roy, S.; Anand, A.; et al. Metal Tolerance in Plants: Molecular and Physicochemical Interface Determines the “Not so Heavy Effect” of Heavy Metals. *Chemosphere* **2022**, *287*, 131957. [CrossRef] [PubMed]
13. Haddad, A.; Mohiuddin, S.S. *Biochemistry, Citric Acid Cycle*; StatPearls: Treasure Island, FL, USA, 2021.
14. Zaheer, I.E.; Ali, S.; Rizwan, M.; Farid, M.; Shakoor, M.B.; Gill, R.A.; Najeeb, U.; Iqbal, N.; Ahmad, R. Citric Acid Assisted Phytoremediation of Copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *120*, 310–317. [CrossRef] [PubMed]
15. Ehsan, S.; Ali, S.; Noureen, S.; Mahmood, K.; Farid, M.; Ishaque, W.; Shakoor, M.B.; Rizwan, M. Citric Acid Assisted Phytoremediation of Cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *106*, 164–172. [CrossRef]
16. Afshan, S.; Ali, S.; Bharwana, S.A.; Rizwan, M.; Farid, M.; Abbas, F.; Ibrahim, M.; Mehmood, M.A.; Abbasi, G.H. Citric Acid Enhances the Phytoextraction of Chromium, Plant Growth, and Photosynthesis by Alleviating the Oxidative Damages in *Brassica napus* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 11679–11689. [CrossRef] [PubMed]
17. Qiu, R.; Liu, W.; Zeng, X.; Tang, Y.; Brewer, E.; Fang, X. Effects of Exogenous Citric Acid and Malic Acid Addition on Nickel Uptake and Translocation in Leaf Mustard (*Brassica juncea* Var. *Foliosa* Bailey) and *Alyssum corsicum*. *Int. J. Environ. Pollut.* **2009**, *38*, 26639. [CrossRef]
18. Kumar, A.; Pal, L.; Agrawal, V. Glutathione and Citric Acid Modulates Lead- and Arsenic-Induced Phytotoxicity and Genotoxicity Responses in Two Cultivars of *Solanum lycopersicum* L. *Acta Physiol. Plant.* **2017**, *39*, 151. [CrossRef]
19. Amir, W.; Farid, M.; Ishaq, H.K.; Farid, S.; Zubair, M.; Alharby, H.F.; Bamagoos, A.A.; Rizwan, M.; Raza, N.; Hakeem, K.R.; et al. Accumulation Potential and Tolerance Response of *Typha latifolia* L. under Citric Acid Assisted Phytoextraction of Lead and Mercury. *Chemosphere* **2020**, *257*, 127247. [CrossRef]
20. Mohammadi, S.; Pourakbar, L.; Siavash Moghaddam, S.; Popović-Djordjević, J. The Effect of EDTA and Citric Acid on Biochemical Processes and Changes in Phenolic Compounds Profile of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under Mercury Stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *208*, 111607. [CrossRef]
21. Tahjib-Ul-Arif, M.; Zahan, M.I.; Karim, M.M.; Imran, S.; Hunter, C.T.; Islam, M.S.; Mia, M.A.; Hannan, M.A.; Rhaman, M.S.; Hossain, M.A.; et al. Citric Acid-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7235. [CrossRef]
22. Chen, H.C.; Zhang, S.L.; Wu, K.J.; Li, R.; He, X.R.; He, D.N.; Huang, C.; Wei, H. The Effects of Exogenous Organic Acids on the Growth, Photosynthesis and Cellular Ultrastructure of *Salix variegata* Franch. Under Cd Stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *187*, 109790. [CrossRef]
23. Kaur, R.; Yadav, P.; Sharma, A.; Kumar Thukral, A.; Kumar, V.; Kaur Kohli, S.; Bhardwaj, R. Castasterone and Citric Acid Treatment Restores Photosynthetic Attributes in *Brassica juncea* L. under Cd(II) Toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2017**, *145*, 466–475. [CrossRef] [PubMed]
24. Gao, Y.; Miao, C.; Mao, L.; Zhou, P.; Jin, Z.; Shi, W. Improvement of Phytoextraction and Antioxidative Defense in *Solanum nigrum* L. under Cadmium Stress by Application of Cadmium-Resistant Strain and Citric Acid. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *181*, 771–777. [CrossRef] [PubMed]
25. Anwer, S.; Yasin Ashraf, M.; Hussain, M.; Ashraf, M.; Jamil, A. Citric Acid Mediated Phytoextraction of Cadmium By Maize (*Zea mays* L.). *Pak. J. Bot.* **2012**, *44*, 1831–1836.
26. Sebastian, A.; Prasad, M.N.V. Exogenous Citrate and Malate Alleviate Cadmium Stress in *Oryza sativa* L.: Probing Role of Cadmium Localization and Iron Nutrition. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *166*, 215–222. [CrossRef]
27. Li, H.; Liu, Y.; Zeng, G.; Zhou, L.; Wang, X.; Wang, Y.; Wang, C.; Hu, X.; Xu, W. Enhanced Efficiency of Cadmium Removal by *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. in the Presence of Exogenous Citric and Oxalic Acids. *J. Environ. Sci.* **2014**, *26*, 2508–2516. [CrossRef]
28. Bilal Shakoor, M.; Ali, S.; Hameed, A.; Farid, M.; Hussain, S.; Yasmeen, T.; Najeeb, U.; Aslam Bharwana, S.; Hasan Abbasi, G. Citric Acid Improves Lead (Pb) Phytoextraction in *Brassica napus* L. by Mitigating Pb-Induced Morphological and Biochemical Damages. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *109*, 38–47. [CrossRef]
29. Saffari, V.R.; Saffari, M. Effects of EDTA, Citric Acid, and Tartaric Acid Application on Growth, Phytoremediation Potential, and Antioxidant Response of *Calendula officinalis* L. in a Cadmium-Spiked Calcareous Soil. *Int. J. Phytoremed.* **2020**, *22*, 1204–1214. [CrossRef]

30. Arsenov, D.; Župunski, M.; Borišev, M.; Nikolić, N.; Pilipovic, A.; Orlovic, S.; Kebert, M.; Pajevic, S. Citric Acid as Soil Amendment in Cadmium Removal by *Salix viminalis* L., Alterations on Biometric Attributes and Photosynthesis. *Int. J. Phytoremed.* **2020**, *22*, 29–39. [\[CrossRef\]](#)
31. Song, J.F.; Markewitz, D.; Wu, S.; Sang, Y.; Duan, C.; Cui, X.Y. Exogenous Oxalic Acid and Citric Acid Improve Lead (Pb) Tolerance of *Larix olgensis* A. Henry Seedlings. *Forests* **2018**, *9*, 510. [\[CrossRef\]](#)
32. Xue, W.; Wang, P.; Tang, L.; Zhang, C.; Wang, C.; Huang, Y.; Zhang, X.; Li, Y.; Zhao, B.; Liu, Z. Citric Acid Inhibits Cd Uptake by Improving the Preferential Transport of Mn and Triggering the Defense Response of Amino Acids in Grains. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *211*, 111921. [\[CrossRef\]](#)
33. Zhang, S.; Chen, H.; He, D.; He, X.; Yan, Y.; Wu, K.; Wei, H. Effects of Exogenous Organic Acids on Cd Tolerance Mechanism of *Salix variegata* Franch. Under Cd Stress. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 594352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Guo, H.; Chen, H.; Hong, C.; Jiang, D.; Zheng, B. Exogenous Malic Acid Alleviates Cadmium Toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through Enhancing Photosynthetic Capacity and Restraining ROS Accumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2017**, *141*, 119–128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Khan, I.; Iqbal, M.; Ashraf, M.Y.; Ashraf, M.A.; Ali, S. Organic Chelants-Mediated Enhanced Lead (Pb) Uptake and Accumulation Is Associated with Higher Activity of Enzymatic Antioxidants in Spinach (*Spinacea oleracea* L.). *J. Hazard. Mater.* **2016**, *317*, 352–361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Ghasemi-Fasaee, R. Malic Acid and Phosphorus Influences on Nickel Phytoremediation Efficiency and Metal Nutrients Relationships in a Ni-Polluted Calcareous Soil. *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.* **2012**, *3*, 2805–2808.
37. Hawrylak-Nowak, B.; Dresler, S.; Matraszek, R. Exogenous Malic and Acetic Acids Reduce Cadmium Phytotoxicity and Enhance Cadmium Accumulation in Roots of Sunflower Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *94*, 225–234. [\[CrossRef\]](#)
38. Guo, D.; Ali, A.; Ren, C.; Du, J.; Li, R.; Lahori, A.H.; Xiao, R.; Zhang, Z.; Zhang, Z. EDTA and Organic Acids Assisted Phytoextraction of Cd and Zn from a Smelter Contaminated Soil by Potherb Mustard (*Brassica juncea*, Coss) and Evaluation of Its Bioindicators. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *167*, 396–403. [\[CrossRef\]](#)
39. Liang, Y.; Xiao, X.; Guo, Z.; Peng, C.; Zeng, P.; Wang, X. Co-Application of Indole-3-Acetic Acid/Gibberellin and Oxalic Acid for Phytoextraction of Cadmium and Lead with *Sedum alfredii* Hance from Contaminated Soil. *Chemosphere* **2021**, *285*, 131420. [\[CrossRef\]](#)
40. Sakouhi, L.; Kharbech, O.; Massoud, M.B.; Munemasa, S.; Murata, Y.; Chaoui, A. Oxalic Acid Mitigates Cadmium Toxicity in *Cicer arietinum* L. Germinating Seeds by Maintaining the Cellular Redox Homeostasis. *J. Plant Growth Regul.* **2022**, *41*, 697–709. [\[CrossRef\]](#)
41. Turk, H.; Erdal, S.; Karayel, U.; Dumlupinar, R. Attenuation of Lead Toxicity by Promotion of Tolerance Mechanism in Wheat Roots by Lipoic Acid. *Cereal Res. Commun.* **2018**, *46*, 424–435. [\[CrossRef\]](#)
42. Salavati, J.; Fallah, H.; Niknejad, Y.; Barari Tari, D. Methyl Jasmonate Ameliorates Lead Toxicity in *Oryza sativa* by Modulating Chlorophyll Metabolism, Antioxidative Capacity and Metal Translocation. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2021**, *27*, 1089–1104. [\[CrossRef\]](#)
43. Mousavi, S.R.; Niknejad, Y.; Fallah, H.; Tari, D.B. Methyl Jasmonate Alleviates Arsenic Toxicity in Rice. *Plant Cell Rep.* **2020**, *39*, 1041–1060. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Bali, S.; Jamwal, V.L.; Kohli, S.K.; Kaur, P.; Tejpal, R.; Bhalla, V.; Ohri, P.; Gandhi, S.G.; Bhardwaj, R.; Al-Huqail, A.A.; et al. Jasmonic Acid Application Triggers Detoxification of Lead (Pb) Toxicity in Tomato through the Modifications of Secondary Metabolites and Gene Expression. *Chemosphere* **2019**, *235*, 734–748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Lei, G.J.; Sun, L.; Sun, Y.; Zhu, X.F.; Li, G.X.; Zheng, S.J. Jasmonic Acid Alleviates Cadmium Toxicity in Arabidopsis via Suppression of Cadmium Uptake and Translocation. *J. Integr. Plant Biol.* **2020**, *62*, 218–227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Kamran, M.; Wang, D.; Alhaithloul, H.A.S.; Alghanem, S.M.; Aftab, T.; Xie, K.; Lu, Y.; Shi, C.; Sun, J.; Gu, W.; et al. Jasmonic Acid-Mediated Enhanced Regulation of Oxidative, Glyoxalase Defense System and Reduced Chromium Uptake Contributes to Alleviation of Chromium (VI) Toxicity in Choysum (*Brassica parachinensis* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *208*, 111758. [\[CrossRef\]](#)
47. Kaya, C.; Ugurlar, F.; Ashraf, M.; Noureldeen, A.; Darwish, H.; Ahmad, P. Methyl Jasmonate and Sodium Nitroprusside Jointly Alleviate Cadmium Toxicity in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Plants by Modifying Nitrogen Metabolism, Cadmium Detoxification, and AsA–GSH Cycle. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 654780. [\[CrossRef\]](#)
48. Hanaka, A.; Wójcik, M.; Dresler, S.; Mroczek-Zdyrska, M.; Maksymiec, W. Does Methyl Jasmonate Modify the Oxidative Stress Response in *Phaseolus coccineus* Treated with Cu? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *124*, 480–488. [\[CrossRef\]](#)
49. Dai, H.; Wei, S.; Pogrzeba, M.; Rusinowski, S.; Krzyżak, J.; Jia, G. Exogenous Jasmonic Acid Decreased Cu Accumulation by Alfalfa and Improved Its Photosynthetic Pigments and Antioxidant System. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *190*, 110176. [\[CrossRef\]](#)
50. Li, Q.; Wang, G.; Wang, Y.; Yang, D.; Guan, C.; Ji, J. Foliar Application of Salicylic Acid Alleviate the Cadmium Toxicity by Modulation the Reactive Oxygen Species in Potato. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *172*, 317–325. [\[CrossRef\]](#)
51. Safari, F.; Akramian, M.; Salehi-Arjmand, H.; Khadivi, A. Physiological and Molecular Mechanisms Underlying Salicylic Acid-Mitigated Mercury Toxicity in Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *183*, 109542. [\[CrossRef\]](#)
52. Metwally, A.; Finkemeier, I.; Georgi, M.; Dietz, K.J. Salicylic Acid Alleviates the Cadmium Toxicity in Barley Seedlings. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 272–281. [\[CrossRef\]](#)
53. Kohli, S.K.; Handa, N.; Sharma, A.; Gautam, V.; Arora, S.; Bhardwaj, R.; Wijaya, L.; Alyemeni, M.N.; Ahmad, P. Interaction of 24-Epibrassinolide and Salicylic Acid Regulates Pigment Contents, Antioxidative Defense Responses, and Gene Expression in *Brassica juncea* L. Seedlings under Pb Stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 15159–15173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

54. Kumari, A.; Pandey, N.; Pandey-Rai, S. Exogenous Salicylic Acid-Mediated Modulation of Arsenic Stress Tolerance with Enhanced Accumulation of Secondary Metabolites and Improved Size of Glandular Trichomes in *Artemisia annua* L. *Protoplasma* **2018**, *255*, 139–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jia, H.L.; Wang, X.H.; Wei, T.; Wang, M.; Liu, X.; Hua, L.; Ren, X.H.; Guo, J.K.; Li, J. Exogenous Salicylic Acid Regulates Cell Wall Polysaccharides Synthesis and Pectin Methylation to Reduce Cd Accumulation of Tomato. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *207*, 111550. [[CrossRef](#)]
56. Lu, Q.; Zhang, T.; Zhang, W.; Su, C.; Yang, Y.; Hu, D.; Xu, Q. Alleviation of Cadmium Toxicity in *Lemma minor* by Exogenous Salicylic Acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *147*, 500–508. [[CrossRef](#)]
57. Soltani Maivan, E.; Radjabian, T.; Abrishamchi, P.; Talei, D. Physiological and Biochemical Responses of *Melissa officinalis* L. to Nickel Stress and the Protective Role of Salicylic Acid. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2017**, *63*, 330–343. [[CrossRef](#)]
58. Sihag, S.; Brar, B.; Joshi, U.N. Salicylic Acid Induces Amelioration of Chromium Toxicity and Affects Antioxidant Enzyme Activity in *Sorghum bicolor* L. *Int. J. Phytoremed.* **2019**, *21*, 293–304. [[CrossRef](#)]
59. Saidi, I.; Guesmi, F.; Kharbech, O.; Hfaiedh, N.; Djebali, W. Gallic Acid Improves the Antioxidant Ability against Cadmium Toxicity: Impact on Leaf Lipid Composition of Sunflower (*Helianthus annuus*) Seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *210*, 111906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Yetişsin, F.; Kurt, F. Gallic Acid (GA) Alleviating Copper (Cu) Toxicity in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings. *Int. J. Phytoremed.* **2020**, *22*, 420–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Ozfidan-Konakci, C.; Kabakci, M. The Impacts of Gallic Acid on Redox State of Antioxidants Related to Ascorbate–Glutathione Cycle in Wheat (*Triticum aestivum*) Grown Under Cadmium Toxicity. *Agric. Res.* **2020**, *9*, 543–553. [[CrossRef](#)]
62. Lee, K.W.; Rahman, A.; Zada, M.; Lee, D.G.; Kim, K.Y.; Hwang, T.Y.; Ji, H.J.; Lee, S.H. Identification of Copper and Cadmium Induced Genes in Alfalfa Leaves through Annealing Control Primer Based Approach. *J. Korean Soc. Grassl. Forage Sci.* **2015**, *35*, 264–268. [[CrossRef](#)]
63. Han, Y.; Zhang, W.; Zhang, B.; Zhang, S.; Wang, W.; Ming, F. One Novel Mitochondrial Citrate Synthase from *Oryza sativa* L. Can Enhance Aluminum Tolerance in Transgenic Tobacco. *Mol. Biotechnol.* **2009**, *42*, 299–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Deng, W.; Luo, K.; Li, Z.; Yang, Y.; Hu, N.; Wu, Y. Overexpression of Citrus Junos Mitochondrial Citrate Synthase Gene in *Nicotiana benthamiana* Confers Aluminum Tolerance. *Planta* **2009**, *230*, 355–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Anjum, N.A.; Hasanuzzaman, M.; Hossain, M.A.; Thangavel, P.; Roychoudhury, A.; Gill, S.S.; Merlos Rodrigo, M.A.; Adam, V.; Fujita, M.; Kizak, R.; et al. Jacks of Metal/Metalloid Chelation Trade in Plants—An Overview. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lee, J.W.; Han, M.S.; Choi, S.; Yi, J.; Lee, T.W.; Lee, S.Y. Organic Acids: Succinic and Malic Acids. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2011; Volume 3, pp. 149–161.
67. Gurtler, J.B.; Mai, T.L. Preservatives: Traditional Preservatives—Organic Acids. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 119–130.
68. Wang, Q.F.; Zhao, Y.; Yi, Q.; Li, K.Z.; Yu, Y.X.; Chen, L.M. Overexpression of Malate Dehydrogenase in Transgenic Tobacco Leaves: Enhanced Malate Synthesis and Augmented Al-Resistance. *Acta Physiol. Plant.* **2010**, *32*, 1209–1220. [[CrossRef](#)]
69. Chen, Z.; Sun, L.; Liu, P.; Liu, G.; Tian, J.; Liao, H. Malate Synthesis and Secretion Mediated by a Manganese-Enhanced Malate Dehydrogenase Confers Superior Manganese Tolerance in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 176–188. [[CrossRef](#)]
70. Yang, L.; Fan, T.; Guan, L.; Ren, Y.; Han, Y.; Liu, Q.; Liu, Y.; Cao, S. CMDH4 Encodes a Protein That Is Required for Lead Tolerance in Arabidopsis. *Plant Soil* **2017**, *412*, 317–330. [[CrossRef](#)]
71. Franceschi, V.R.; Nakata, P.A. Calcium Oxalate in Plants: Formation and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 41–71. [[CrossRef](#)]
72. Nakata, P.A. Advances in Our Understanding of Calcium Oxalate Crystal Formation and Function in Plants. *Plant Sci.* **2003**, *164*, 901–909. [[CrossRef](#)]
73. Osmolovskaya, N.; Dung, V.V.; Kuchaeva, L. The Role of Organic Acids in Heavy Metal Tolerance in Plants. *Biol. Commun.* **2018**, *63*, 9–16.
74. Araya-Flores, J.; Miranda, S.; Covarrubias, M.P.; Stange, C.; Handford, M. *Solanum lycopersicum* (tomato) possesses mitochondrial and plastidial lipoyl synthases capable of increasing lipoylation levels when expressed in bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *151*, 264–270. [[CrossRef](#)]
75. Godoy, F.; Olivos-Hernández, K.; Stange, C.; Handford, M. Abiotic Stress in Crop Species: Improving Tolerance by Applying Plant Metabolites. *Plants* **2021**, *10*, 186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Navari-Izzo, F.; Quartacci, M.F.; Sgherri, C. Lipoic Acid: A Unique Antioxidant in the Detoxification of Activated Oxygen Species. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 463–470. [[CrossRef](#)]
77. Sgherri, C.; Quartacci, M.F.; Izzo, R.; Navari-Izzo, F. Relation between Lipoic Acid and Cell Redox Status in Wheat Grown in Excess Copper. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 591–597. [[CrossRef](#)]
78. Raza, A.; Charagh, S.; Zahid, Z.; Mubarik, M.S.; Javed, R.; Siddiqui, M.H.; Hasanuzzaman, M. Jasmonic Acid: A Key Frontier in Conferring Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Plant Cell Rep.* **2021**, *40*, 1513–1541. [[CrossRef](#)]
79. Chen, X.; Jiang, W.; Tong, T.; Chen, G.; Zeng, F.; Jang, S.; Gao, W.; Li, Z.; Mak, M.; Deng, F.; et al. Molecular Interaction and Evolution of Jasmonate Signaling with Transport and Detoxification of Heavy Metals and Metalloids in Plants. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 665842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. Lin, C.Y.; Trinh, N.N.; Fu, S.F.; Hsiung, Y.C.; Chia, L.C.; Lin, C.W.; Huang, H.J. Comparison of Early Transcriptome Responses to Copper and Cadmium in Rice Roots. *Plant Mol. Biol.* **2013**, *81*, 507–522. [[CrossRef](#)]
81. Huang, T.L.; Nguyen, Q.T.T.; Fu, S.F.; Lin, C.Y.; Chen, Y.C.; Huang, H.J. Transcriptomic Changes and Signalling Pathways Induced by Arsenic Stress in Rice Roots. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *80*, 587–608. [[CrossRef](#)]
82. Sharma, A.; Sidhu, G.P.S.; Araniti, F.; Bali, A.S.; Shahzad, B.; Tripathi, D.K.; Brestic, M.; Skalicky, M.; Landi, M. The Role of Salicylic Acid in Plants Exposed to Heavy Metals. *Molecules* **2020**, *25*, 540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zhang, Y.; Li, X. Salicylic Acid: Biosynthesis, Perception, and Contributions to Plant Immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2019**, *50*, 29–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Guo, B.; Liu, C.; Liang, Y.; Li, N.; Fu, Q. Salicylic Acid Signals Plant Defence against Cadmium Toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2960. [[CrossRef](#)]
85. Szalai, G.; Krantev, A.; Yordanova, R.; Popova, L.P.; Janda, T. Influence of Salicylic Acid on Phytochelatin Synthesis in *Zea mays* during Cd Stress. *Turk. J. Bot.* **2013**, *37*, 708–714.
86. Zawoznik, M.S.; Groppa, M.D.; Tomaro, M.L.; Benavides, M.P. Endogenous Salicylic Acid Potentiates Cadmium-Induced Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **2007**, *173*, 190–197. [[CrossRef](#)]
87. Zanganeh, R.; Jamei, R.; Rahmani, F. Impacts of Seed Priming with Salicylic Acid and Sodium Hydrosulfide on Possible Metabolic Pathway of Two Amino Acids in Maize Plant under Lead Stress. *Mol. Biol. Res. Commun.* **2018**, *7*, 83–88. [[PubMed](#)]
88. Daglia, M.; Lorenzo, A.; Nabavi, S.; Talas, Z.; Nabavi, S. Polyphenols: Well Beyond the Antioxidant Capacity: Gallic Acid and Related Compounds as Neuroprotective Agents: You Are What You Eat! *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2014**, *15*, 362–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Daglia, M. Polyphenols as Antimicrobial Agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 174–181. [[CrossRef](#)]
90. Bontpart, T.; Marlin, T.; Vialet, S.; Guiraud, J.L.; Pinasseau, L.; Meudec, E.; Sommerer, N.; Cheynier, V.; Terrier, N. Two Shikimate Dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, Are Involved in Gallic Acid Biosynthesis in Grapevine. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 3537–3550. [[CrossRef](#)]
91. Muir, R.M.; Ibáñez, A.M.; Uratsu, S.L.; Ingham, E.S.; Leslie, C.A.; McGranahan, G.H.; Batra, N.; Goyal, S.; Joseph, J.; Jemmis, E.D.; et al. Mechanism of Gallic Acid Biosynthesis in Bacteria (*Escherichia coli*) and Walnut (*Juglans regia*). *Plant Mol. Biol.* **2011**, *75*, 555–565. [[CrossRef](#)]
92. Singh, A.; Gupta, R.; Pandey, R. Exogenous Application of Rutin and Gallic Acid Regulate Antioxidants and Alleviate Reactive Oxygen Generation in *Oryza sativa* L. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2017**, *23*, 301–309. [[CrossRef](#)]
93. Tavsan, Z.; Kayali, H. Phenylpropanoid Pathway Response to Cadmium and Lead Stress in *Phaseolus vulgaris* Roots and Leaves. *Asian J. Biotechnol. Bioresour. Technol.* **2018**, *3*, 301–309. [[CrossRef](#)]
94. Imperato, F. *Phytochemistry: Advances in Research: 2006*; Research Signpost: Trivandrum, Kerala, India, 2006.
95. Riaz, U.; Kharal, M.A.; Murtaza, G.; Zaman, Q.U.; Javaid, S.; Malik, H.A.; Aziz, H.; Abbas, Z. Prospective Roles and Mechanisms of Caffeic Acid in Counter Plant Stress: A Mini Review. *Pak. J. Agric. Res.* **2018**, *32*, 8–19. [[CrossRef](#)]
96. Díaz, J.; Bernal, A.; Pomar, F.; Merino, F. Induction of Shikimate Dehydrogenase and Peroxidase in Pepper (*Capsicum Annuum* L.) Seedlings in Response to Copper Stress and Its Relation to Lignification. *Plant Sci.* **2001**, *161*, 179–188.
97. Gülçin, I. Antioxidant Activity of Caffeic Acid (3,4-Dihydroxycinnamic Acid). *Toxicology* **2006**, *217*, 213–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Badri, D.V.; Vivanco, J.M. Regulation and Function of Root Exudates. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 666–681. [[PubMed](#)]
99. do Prado, N.B.; de Abreu, C.B.; Pinho, C.S.; de Junior, M.M.N.; Silva, M.D.; Espino, M.; Silva, M.F.; de Dias, F.S. Application of Multivariate Analysis to Assess Stress by Cd, Pb and Al in Basil (*Ocimum basilicum* L.) Using Caffeic Acid, Rosmarinic Acid, Total Phenolics, Total Flavonoids and Total Dry Mass in Response. *Food Chem.* **2022**, *367*, 130682. [[PubMed](#)]
100. Lee, K.; Choi, G.H.; Back, K. Cadmium-Induced Melatonin Synthesis in Rice Requires Light, Hydrogen Peroxide, and Nitric Oxide: Key Regulatory Roles for Tryptophan Decarboxylase and Caffeic Acid O-Methyltransferase. *J. Pineal Res.* **2017**, *63*, e12441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Narnoliya, L.K.; Sangwan, N.; Jadaun, J.S.; Bansal, S.; Sangwan, R.S. Defining the Role of a Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase from *Azadirachta Indica* Fruits in the Biosynthesis of Ferulic Acid through Heterologous over-Expression in *Ocimum* Species and *Withania somnifera*. *Planta* **2021**, *253*, 20.
102. Sami, A.; Shah, F.A.; Abdullah, M.; Zhou, X.; Yan, Y.; Zhu, Z.; Zhou, K. Melatonin Mitigates Cadmium and Aluminium Toxicity through Modulation of Antioxidant Potential in *Brassica napus* L. *Plant Biol.* **2020**, *22*, 679–690. [[CrossRef](#)]
103. 10 Chemicals of Public Health Concern. Available online: <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern> (accessed on 29 April 2022).
104. Kumar, S.; Dubey, R.S.; Tripathi, R.D.; Chakrabarty, D.; Trivedi, P.K. Omics and Biotechnology of Arsenic Stress and Detoxification in Plants: Current Updates and Prospective. *Environ. Int.* **2015**, *74*, 221–230.
105. de la Fuente, J.M.; Ramirez-Rodriguez, V.; Cabrera-Ponce, J.L.; Herrera-Estrella, L. Aluminum Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. *Science* **1997**, *276*, 1566–1568. [[CrossRef](#)]
106. Tesfaye, M.; Dufault, N.S.; Dornbusch, M.R.; Allan, D.L.; Vance, C.P.; Samac, D.A. Influence of Enhanced Malate Dehydrogenase Expression by Alfalfa on Diversity of Rhizobacteria and Soil Nutrient Availability. *Soil Biol. Biochem.* **2003**, *35*, 1103–1113. [[CrossRef](#)]

107. Rono, J.K.; le Wang, L.; Wu, X.C.; Cao, H.W.; Zhao, Y.N.; Khan, I.U.; Yang, Z.M. Identification of a New Function of Metallothionein-like Gene OsMT1e for Cadmium Detoxification and Potential Phytoremediation. *Chemosphere* **2021**, *265*, 129136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Zhu, S.; Shi, W.; Jie, Y. Overexpression of BnPCS1, a Novel Phytochelatin Synthase Gene from Ramie (*Boehmeria Nivea*), Enhanced Cd Tolerance, Accumulation, and Translocation in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 639189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Sebastian, A.; Shukla, P.; Nangia, A.K.; Prasad, M.N.V. Transgenics in Phytoremediation of Metals and Metalloids: From Laboratory to Field. From Laboratory to Field. In *Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 3–22.
110. Geilfus, C.M. *Controlled Environment Horticulture: Improving Quality of Vegetables and Medicinal Plants*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019.
111. Kumar, A.; Singh, B.; Raigond, P.; Sahu, C.; Mishra, U.N.; Sharma, S.; Lal, M.K. Phytic Acid: Blessing in Disguise, a Prime Compound Required for Both Plant and Human Nutrition. *Food Res. Int.* **2021**, *142*, 110193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Wang, R.; Guo, S. Phytic Acid and Its Interactions: Contributions to Protein Functionality, Food Processing, and Safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 2081–2105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Fang, Y.; Liu, X.; Wu, X.; Tao, X.; Fei, W. Electrospun Polyurethane/Phytic Acid Nanofibrous Membrane for High Efficient Removal of Heavy Metal Ions. *Environ. Technol.* **2021**, *42*, 1053–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]