



RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *LUNULARIA CRUCIATA* (PHYLUM MARCHANTIOPHYTA) A LA PRESENCIA DEL HIDROCARBURO AROMÁTICO POLICÍCLICO ANTRACENO

PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF *LUNULARIA CRUCIATA* (PHYLUM MARCHANTIOPHYTA) TO THE PRESENCE OF ANTHRACENE POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON

Romina Storb^{1*}, Nahuel Spinedi¹, Elisabet Aranda², Sebastián Fracchia³
y José Martín Scervino¹

SUMMARY

1. Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), CONICET-UNCo, Quintral 1250, San Carlos de Bariloche 8400, Río Negro, Argentina.

2. Departamento de Microbiología, Instituto de investigación de agua, Universidad de Granada, Ramón y Cajal, Bldg. Fray Luis 4, Granada 18071, España.

3. Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica, CRILAR-CONICET, Entre Ríos y Mendoza, Anillaco 5301, La Rioja, Argentina.

*storbromina@gmail.com

Citar este artículo

STORB, R., N. SPINEDI, E. ARANDA, S. FRACCHIA & J. M. SCERVINO. 2021. Respuesta fisiológica de *Lunularia cruciata* (phylum Marchantiophyta) a la presencia del hidrocarburo aromático policíclico antraceno. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 56: 479-487.

DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v56.n4.34219>

Recibido: 28 Jul 2021

Aceptado: 9 Nov 2021

Publicado impreso: 20 Dic 2021

Editor: Federico G. O. Mollard

ISSN versión impresa 0373-580X
ISSN versión on-line 1851-2372

Background and aims: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous, persistent, toxic and bioaccumulative pollutants, generated from the incomplete combustion of organic matter. In vascular plants, PAHs cause a decrease in biomass, alter the phenotype and inhibit photosynthesis. There is currently little information about their effect on bryophytes (*sensu lato*). Within this group, *Lunularia cruciata* (phylum Marchantiophyta) can colonize environments with anthropic impact and could be used as a bioindicator for potentially toxic constituents. The objective of this work was to study the morphological and physiological changes of *L. cruciata* exposed to anthracene, to determine its possible role as an indicator organism.

M&M: The plant was exposed to different concentrations of anthracene and germination percentage of gemma was evaluated, along with growth, bioaccumulation and chlorophyll content determined in thallus.

Results & Conclusions: Anthracene did not affect gemma germination, although it caused a "rosette" morphology and decreased thallus growth. On the other hand, it was observed that *L. cruciata* accumulated anthracene in cell walls. Anthracene did not affect the total chlorophyll content, although the ratio of chlorophylls *a* and *b* varied, with chlorophyll *a* decreasing and chlorophyll *b* increasing. This could cause a decrease in photosynthetic yield, leading to reduced plant growth. The results demonstrated that this species is tolerant to anthracene and could be used as bioindicator of PAHs.

KEY WORDS

Antraceno, bioacumulación, bioindicadora, *Lunularia cruciata*, toxicidad.

RESUMEN

Introducción y objetivos: Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes ubicuos, persistentes, tóxicos y bioacumulables, generados de la combustión incompleta de la materia orgánica. En plantas vasculares los HAPs causan disminución de la biomasa, alteran el fenotipo e inhiben la fotosíntesis. Actualmente hay poca información acerca de su efecto en las briofitas (*sensu lato*). Dentro de este grupo, la especie *Lunularia cruciata* (phylum Marchantiophyta) puede colonizar ambientes con impacto antrópico y es utilizada como bioindicadora de metales pesados. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios morfológicos y fisiológicos de *L. cruciata* expuesta al antraceno, para determinar su posible rol como organismo indicador del contaminante.

M&M: Se expuso a esta especie a diferentes concentraciones de antraceno y se evaluó el porcentaje de germinación de las gemas. Además, se determinó en el talo la morfología, crecimiento, bioacumulación y contenido de clorofila.

Resultados & Conclusiones: Se encontró que el antraceno no afectó la germinación de gemas, sin embargo, provocó una morfología "arrosada" y una disminución del crecimiento en el talo. Por otra parte, se observó que esta especie es capaz de acumular antraceno en la pared celular. El contaminante no afectó el contenido total de clorofila, aunque la relación de clorofilas *a* y *b* varió, con una disminución de la clorofila *a* y un aumento de la clorofila *b*. Esto podría causar una disminución del rendimiento fotosintético, provocando la reducción del crecimiento de las plantas. Los resultados demuestran que esta especie es tolerante al antraceno y podría ser bioindicadora de HAPs.

PALABRAS CLAVE

Antraceno, bioacumulación, bioindicadora, *Lunularia cruciata*, toxicidad.

INTRODUCCIÓN

Los HAPs, son contaminantes orgánicos persistentes (COPs), que se originan en la combustión incompleta de la materia orgánica causada por acontecimientos naturales (e.g. actividades volcánicas, incendios forestales) o actividades antrópicas (e.g. combustión de combustibles fósiles, incineración de desechos sólidos y derrame de petróleo), afectando la salud humana y el medio ambiente (Spagnuolo *et al.*, 2016; Jajoo, 2017). La mayoría de los HAPs son volátiles y se adhieren a partículas en la atmósfera, transportándose y depositándose a grandes distancias, lo que genera problemas a escala mundial (Vives *et al.*, 2001). En el ambiente, el antraceno puede encontrarse en concentraciones que varían desde 0,011 μM , en suelos que no se consideran contaminados, hasta 561 μM en suelos altamente alterados como el del alquitrán de hulla (Nadal *et al.*, 2004; García-Sánchez *et al.*, 2018).

Las plantas juegan un papel importante en el ciclo y destino de los HAPs, debido a que tienen la capacidad de absorberlos del ambiente, translocarlos, transformarlos y bioacumularlos (Tao *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2013). Los HAPs afectan tanto la fisiología como la morfología de plantas vasculares produciendo necrosis, clorosis y disminución de la biomasa, entre otros (Liu *et al.*, 2009; Oguntimehin *et al.*, 2010). Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre el efecto de estos contaminantes en la fisiología de las plantas avasculares.

Las briofitas (*sensu lato*) son un grupo de plantas que incluye tres phyla: Anthocerotophyta (antocerotes), Marchantiophyta (hepáticas) y Bryophyta (musgos, *sensu stricto*), y están representadas por 14.000 a 15.000 especies a nivel mundial (Chandra *et al.*, 2017). Dado que el gametofito carece de un sistema radicular y vascular, reacciona de manera rápida y directa a los cambios ambientales, por lo que la tolerancia a condiciones adversas es necesaria para la aclimatación de dichos organismos a diferentes ambientes (Bates, 1992). Con respecto a la contaminación por HAPs, se ha documentado que algunas especies pueden incorporarlos en forma gaseosa y en partículas sólidas, acumulándose principalmente en la pared celular (Keyte *et al.*, 2009; Spagnuolo *et al.*, 2016).

Algunas especies de hepáticas (phylum

Marchantiophyta) son capaces de colonizar sitios con alto impacto antrópico (Alam & Sharma, 2012). Una de ellas es *Lunularia cruciata* (Linn.) Dumort., (familia Lunulariaceae, orden Lunulariales), una especie considerada bioindicadora de metales pesados (Carginale *et al.*, 2004). Resulta fundamental estudiar el efecto de los contaminantes en los sistemas biológicos para establecer bioindicadores de toxicidad fiables (Huang *et al.*, 1997). Dado que *L. cruciata* es tolerante a los ambientes disturbados por actividades antrópicas, es un organismo ideal para el estudio *in vitro* de toxicidad por HAPs. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios morfológicos y fisiológicos de *L. cruciata* expuesta al antraceno, para evaluar su posible rol como organismo indicador de este contaminante. Además, se estudió si esta especie podría cumplir algún rol como organismo secuestrador del contaminante mediante su bioacumulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Los ejemplares de *L. cruciata* se obtuvieron en Argentina, Prov. Rio Negro, San Carlos de Bariloche (41° 08' 32,0" S, 71° 18' 36,7" O). Las plantas fueron identificadas según caracteres morfológicos siguiendo la bibliografía de Hässel de Menéndez (1959).

Cultivos *in vitro*

Para los cultivos *in vitro* se colectaron gemas de los conceptáculos y se esterilizaron siguiendo el protocolo de Silvani *et al.* (2012). Luego se sembraron en placas de Petri de vidrio (90 mm de diámetro) con medio de cultivo mínimo (Bécard & Fortin, 1988), a pH 6,2-6,3. Se mantuvieron en cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16/8 h de luz y oscuridad (42 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Las condiciones de temperatura y humedad fueron 22,1°C y 48,1 % respectivamente.

Germinación de gemas

El antraceno se agregó al medio de cultivo según la metodología de Aranda *et al.* (2013). Se preparó una solución stock de antraceno en acetona, que se dosificó a los medios de cultivo para obtener las concentraciones 100 y 280 $\mu\text{M/l}$ (dos tratamientos) más un tratamiento control que consistió en medio

de cultivo mínimo sin antraceno con igual dosis de acetona. Se sembraron 100 gemas estériles por tratamiento, en un mínimo de cuatro réplicas (Spinedi *et al.*, 2019). A los tres días se cuantificó el porcentaje total de germinación para cada tratamiento, utilizándose la emergencia de rizoides como indicador de germinación (Valió & Schwabe, 1969).

Desarrollo de las plantas

Las gemas germinadas se pasaron a placas de Petri con medio de cultivo en las mismas concentraciones antes descritas (seis réplicas por tratamiento) y los experimentos se repitieron tres veces. Transcurridos 60 días se registró la morfología y el crecimiento mediante superficie del talo y biomasa total (Spinedi *et al.*, 2019). Para la medición de la superficie, la planta se fragmentó y se escaneó con un escáner (HP Scanjet G2410). Las imágenes se analizaron con el programa imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>). Para la medición de la biomasa se secaron las plantas en estufa a 70 °C durante 48 horas, registrándose el peso en una balanza analítica (OHAUS AP250D).

Bioacumulación de antraceno

La presencia de antraceno en el interior de las plantas se analizó mediante microscopia de fluorescencia siguiendo los protocolos descritos por Spinedi *et al.* (2019). En un microscopio de fluorescencia Olympus Bx51 (Olympus Optical Co., Tokio, Japón), se irradiaron las plantas con longitudes de onda de 330 y 375 nm, midiéndose la emisión a 420 nm. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>) obteniéndose la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias UA) en 20 paredes celulares por tratamiento. La concentración de antraceno en las plantas se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Agilent 1100) siguiendo los protocolos descritos por Aranda *et al.* (2013). Las separaciones de los analitos se llevaron a cabo en una columna de fase reversa Sinergy Fusión RP 80A C18 (4 µm, 3,9 x 150 mm), usando acetonitrilo y un buffer de fosfatos como fases móviles y se midió en una longitud de onda entre 210 a 280 nm con un detector de diodos de array. Los resultados se expresaron en µmoles mg⁻¹ y se calculó el porcentaje de absorción de antraceno en los diferentes tratamientos.

Contenido de clorofila

El contenido de clorofila *a* y *b* se analizó según el protocolo de Sims & Gamon (2002). Se registró el peso fresco de tres talos por tratamiento y se homogenizaron con 1 ml de acetona/Tris buffer (80:20 V: V, pH 7,8). Se llevó a volumen final de 3 ml y se centrifugó (2500 rpm, 10 minutos). Se midieron las longitudes de onda: 537, 647 y 663 nm, con un espectrofotómetro (UV-1800, Shimadzu UV). Los contenidos de clorofila *a* y *b* se calcularon en valores relativos con respecto al total de clorofila, lo cual nos brinda información sobre la variación porcentual de cada pigmento. Además, se calculó la relación entre los contenidos de clorofilas *a* y *b*.

Análisis de datos

Los datos se analizaron con el programa STATISTICA. Para comparar los tratamientos se aplicaron las pruebas estadísticas de comparaciones múltiples ANOVA de una vía y se contrastaron con el test de Tukey y de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher ($p < 0,05$). Las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia se analizaron con el programa Fiji (ImageJ).

RESULTADOS

Germinación de gemas

Con respecto al porcentaje de germinación de las gemas de *L. cruciata* no se encontraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de antraceno y el control ($p > 0,05$) (Fig.1). Por otra parte, el comportamiento entre el porcentaje de germinación y el posterior desarrollo de las plantas (Fig. 2) fue diferente entre las distintas concentraciones de antraceno.

Desarrollo de las plantas

Se observó que las plantas expuestas al antraceno presentaron morfología de apariencia “arrosetada”. Por otra parte, en ausencia del contaminante el crecimiento fue dicotómico y aplanado sobre el sustrato (Fig. 2A). Con respecto al crecimiento, se encontró una disminución de la superficie total del talo en los tratamientos con antraceno con respecto a las plantas control, siendo las diferencias significativas ($p < 0,05$) (Fig. 2B). Además, la biomasa de las plantas

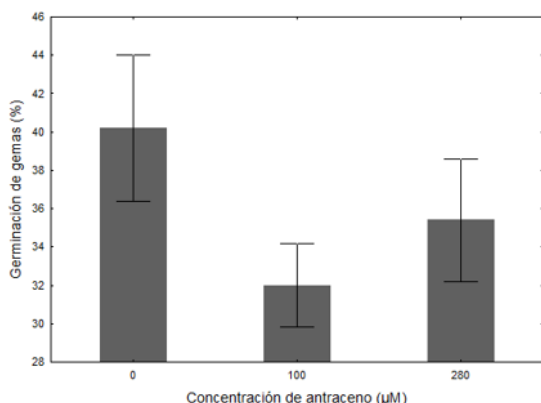


Fig. 1. Porcentaje de germinación de gemas de *L. cruciata* en los distintos tratamientos. Las barras indican media \pm ES (n= 100; ANOVA de una vía, prueba de Tukey post-hoc, $p > 0,05$).

disminuyó progresivamente al incrementarse la concentración de antraceno, siendo las diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$) (Fig. 2C).

Bioacumulación de antraceno

Las plantas desarrolladas en presencia de antraceno presentaron un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia entre 450-495 nm (34682 ± 2441 y 40731 ± 2945 UA respectivamente) siendo significativamente diferentes al control (28448 ± 2072 U.A; $p < 0,05$) (Fig. 3). Por otra parte, el porcentaje de absorción de antraceno por las plantas fue diferente entre los distintos tratamientos. El mayor porcentaje promedio de absorción correspondió a las plantas sometidas a 100 µM de antraceno (24,2 %), mientras que las

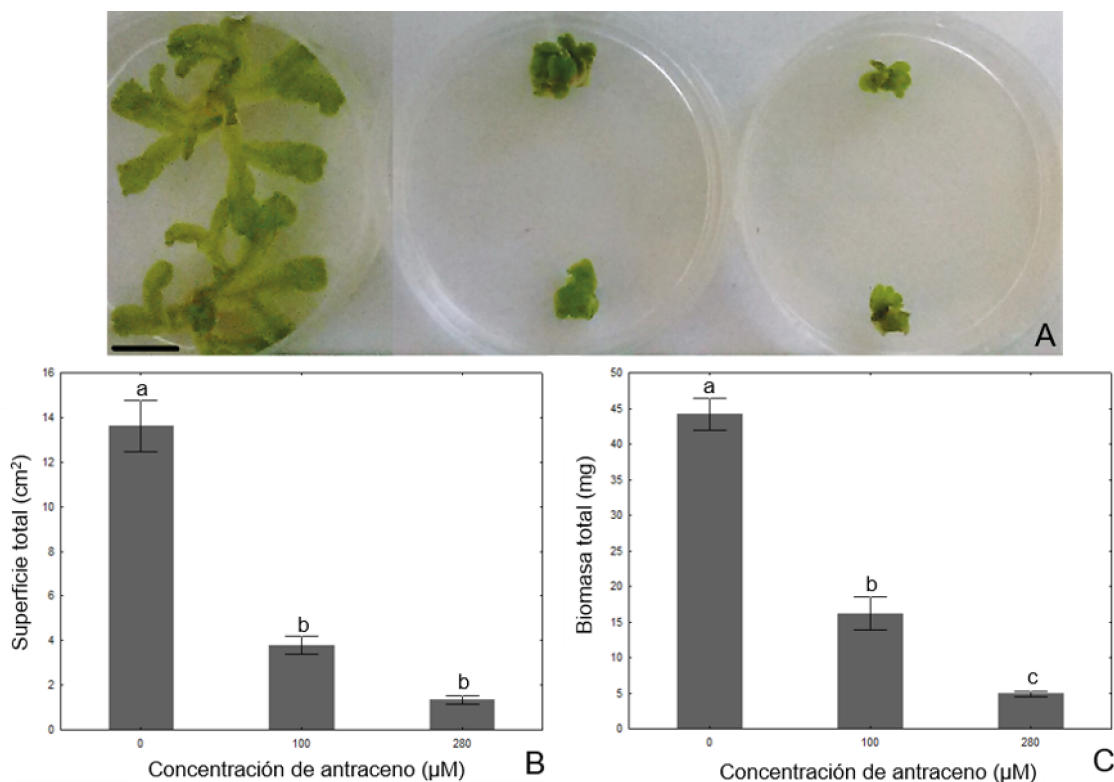


Fig. 2. Cultivo *in vitro* de *L. cruciata*, de izquierda a derecha: control, 100 y 280 µM (A). Se observó una morfología de apariencia “arrositada” en las plantas expuestas al contaminante. Escala= 1 cm. Superficie (B) y biomasa (C) total de *L. cruciata* desarrollada en los distintos tratamientos. Las barras indican la media \pm ES. Letras diferentes indican diferencias significativas (n= 3; ANOVA de una vía, prueba de Tukey post-hoc, $p < 0,05$).

plantas desarrolladas en 280 μM presentaron un porcentaje de 9,4 %.

Contenido de clorofila

Se encontró que el contenido total de clorofila (mg/g) no difirió entre las plantas control y aquellas desarrolladas en las diferentes concentraciones de antraceno ($p > 0,05$) (Fig. 4A). Sin embargo, las plantas control presentaron mayor porcentaje de clorofila *a* ($70,1 \pm 0,8$ %) con respecto a los

tratamientos 100 μM ($66,9 \pm 0,8$ %) y 280 μM antraceno ($67,7 \pm 0,5$ %) ($p < 0,05$; Fig. 4B). Por otro lado, las plantas desarrolladas en presencia de antraceno presentaron un mayor porcentaje de clorofila *b* que el control, siendo los valores para 100 μM = $33 \pm 0,8$ %; 280 μM = $32 \pm 0,5$ %; control = $29,8 \pm 0,8$ % ($p < 0,05$) (Fig. 4C). Por último, la relación de clorofila *a* y *b* disminuyó en las plantas expuestas al antraceno con respecto al control ($p < 0,05$) (Fig. 4D).

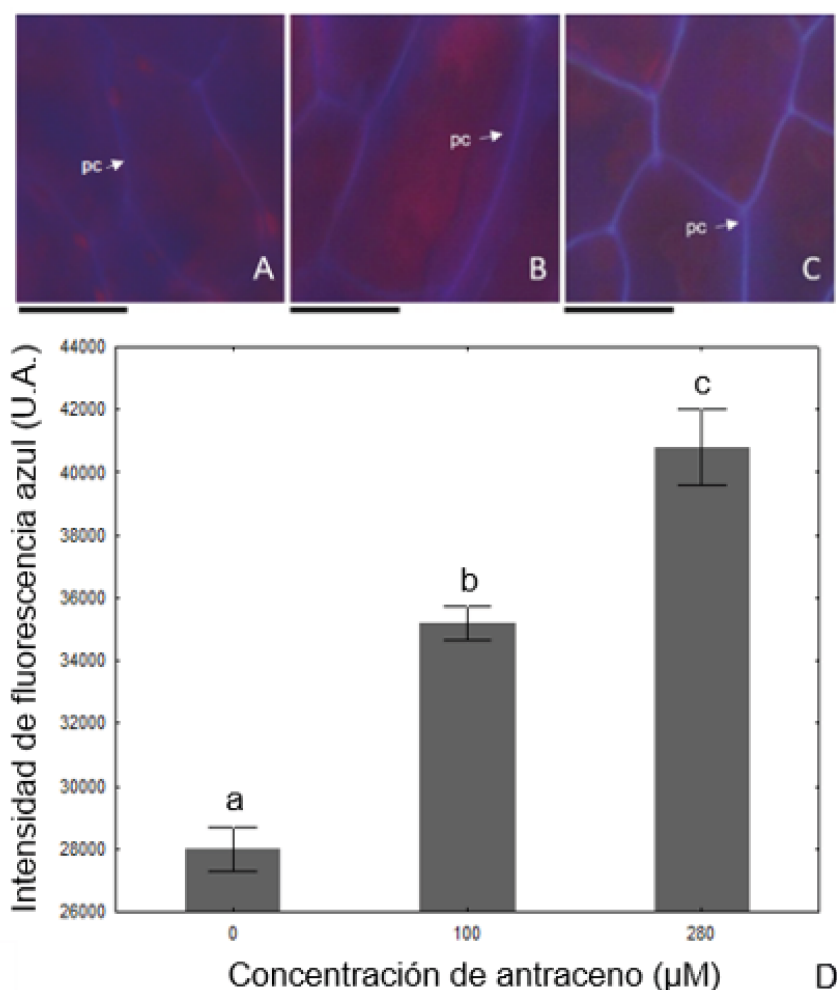
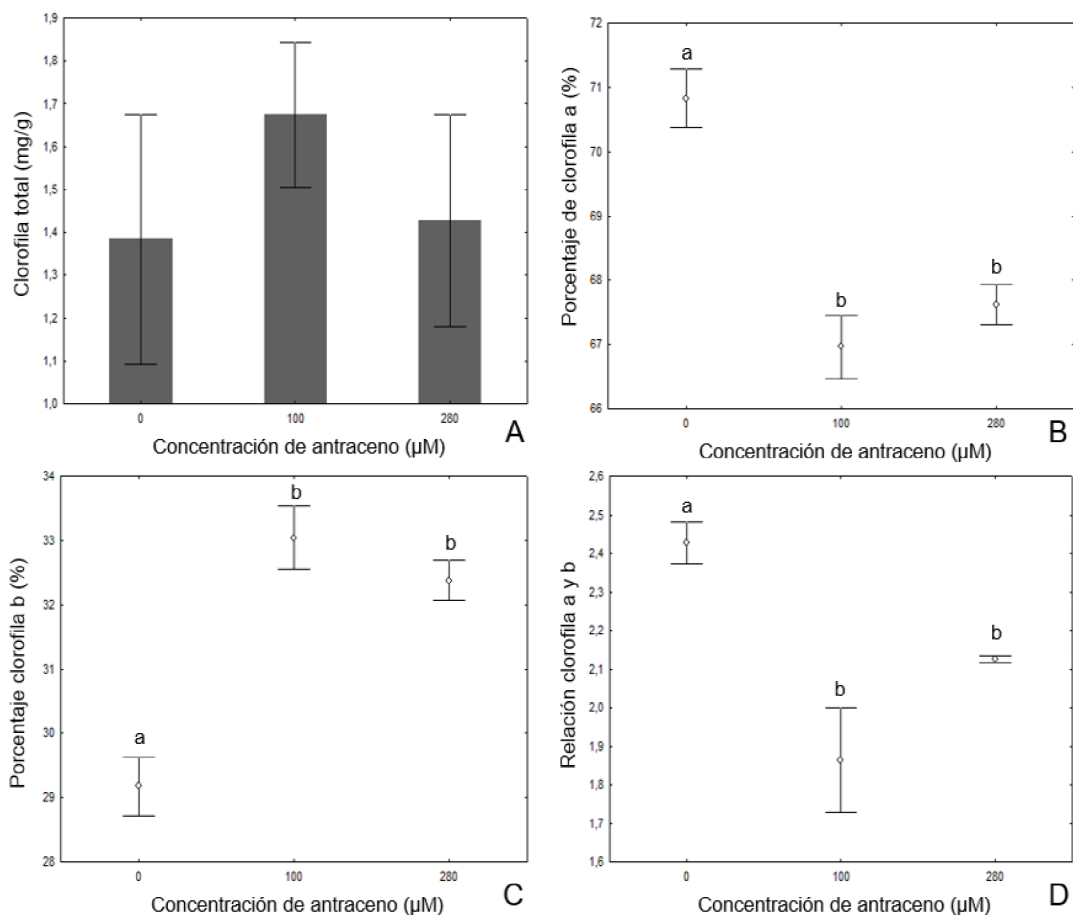


Fig. 3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de plantas de *L. cruciata* desarrolladas en los tratamientos control (A), 100 μM (B) y 280 μM (C). Las flechas indican la pared celular (pc), observándose la mayor intensidad de fluorescencia azul en los tratamientos con antraceno. Escala= 20 μm . Intensidad de fluorescencia azul (UA) en paredes celulares correspondiente a los tratamientos control, 100 y 280 μM de antraceno (D). Las barras indican la media \pm ES. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($n = 3$; ANOVA de una vía, prueba de Tukey post hoc, $p < 0,05$).



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se estudiaron los cambios morfológicos y fisiológicos de *L. cruciata* en respuesta a la presencia de antraceno, para determinar su rol como organismo indicador de contaminación por HAPs. Dado que la principal forma de dispersión de *L. cruciata* es mediante la producción de gemas, la germinación de los mismos se utilizó para evaluar el efecto de la contaminación por antraceno. Se encontró que este contaminante no afecta el proceso de germinación, por lo tanto, no tendría un efecto tóxico sobre las gemas. También, Spinedi *et al.* (2019) demostraron que el antraceno no afecta la germinación de las gemas de *Marchantia polymorpha*. Por lo tanto, para la especie de estudio, la germinación de gemas no sería un indicador factible para medir estrés por toxicidad mediados por HAPs.

Las plantas de *L. cruciata* fueron capaces de sobrevivir y desarrollarse en las diferentes concentraciones de antraceno. Se ha documentado que esta especie es tolerante a la contaminación por metales pesados (Carginale *et al.*, 2004; Alam & Sharma, 2012). Aunque *L. cruciata* demostró ser resistente a la contaminación por antraceno, presentó una disminución del crecimiento y una morfología de apariencia “arrosutada”, muy diferente a su desarrollo natural. Resultados similares se han encontrado en *M. polymorpha*, cuyo crecimiento y morfología se vieron alteradas en presencia de antraceno (Spinedi *et al.*, 2019). En plantas vasculares, el antraceno causa disminución de biomasa, junto con alteraciones en el crecimiento y el fenotipo (Wieczorek & Wieczorek, 2007; Jajoo *et al.*, 2014). Las alteraciones en la fisiología y morfología en respuesta a la contaminación ambiental son útiles para establecer organismos bioindicadores (Garrec & Van Haluwyn, 2002). Por lo

tanto, el cambio en la morfología y la disminución del crecimiento de *L. cruciata* en presencia de antraceno sitúa a esta especie como un promisorio bioindicador de contaminación por HAPs.

Se ha demostrado que varias especies de briofitas pueden absorber HAPs en forma gaseosa y en partículas sólidas, acumulándose principalmente en la pared celular (Keyte *et al.*, 2009; Spagnuolo *et al.*, 2016). En este trabajo, las plantas expuestas al antraceno presentaron mayor fluorescencia azul en las paredes celulares, indicando la localización de este contaminante en dicha estructura. Dada la naturaleza hidrofóbica del antraceno, se asocia a varios componentes de la pared celular, tales como pectinas, lignina, hemicelulosa y celulosa (Harms, 1996). Se ha documentado que el transporte de nutrientes y contaminantes es apoplásico en las briofitas (Giordano *et al.*, 1989; Carginale *et al.*, 2004), esto explicaría por qué el antraceno quedó retenido entre las paredes celulares. Por otra parte, se registró que *L. cruciata* satura su capacidad de acumulación de antraceno a concentraciones iguales o mayores a 100 μM . Si bien en plantas vasculares, la tasa de absorción de HAPs del suelo está correlacionada con la concentración del contaminante (Abdel-Shafy & Mansour, 2016), los resultados demuestran una rápida saturación de bioacumulación de antraceno a concentraciones por encima de 100 μM . El hecho de que *L. cruciata* haya bioacumulado antraceno es un claro indicio de que esta planta dispuso el HAP del medio.

Mediante el estudio del contenido de clorofila y la relación clorofila *a/b* se puede medir la actividad fotosintética en plantas expuestas a HAPs (Marwood *et al.*, 2001). Aunque el contenido total de clorofila no difirió estadísticamente en las plantas de *L. cruciata* desarrolladas en presencia y ausencia de antraceno, el contenido relativo de clorofila *a* disminuyó en presencia del contaminante. Se ha documentado en plantas vasculares expuestas al antraceno una disminución del contenido de clorofila (Huang *et al.*, 1997; Jajoo *et al.*, 2014). Esto se puede deber a la interacción de los HAPs con la molécula del pigmento o por la inhibición de su síntesis (Kummerová *et al.*, 2006; Oguntimhin *et al.*, 2010). Ciertas especies de briofitas expuestas a hidrocarburos presentaron una disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos y de la eficiencia de la fotosíntesis (Nydahl *et al.*, 2015). El antraceno, al ser un compuesto hidrofóbico puede incorporarse en las membranas de los tilacoides y generar un disturbio en el transporte de electrones

deteriorando los fotosistemas (PSII y PSI) (Mallakin *et al.*, 2002; Aksmann & Tukaj, 2004). En trabajos recientes, se ha encontrado que el antraceno afecta principalmente al PSI dado el bloqueo del transporte de electrones provenientes del PSII (Huang *et al.*, 1997; Jajoo, 2017). Dado que la clorofila *a* es el pigmento más abundante en el PSI (Taiz & Zeiger, 2006), su disminución en *L. cruciata* estaría indicando que el antraceno podría estar afectando principalmente al PSI. Además, dado que la clorofila *b* es más abundante en el PSII, su aumento en plantas de *L. cruciata* expuestas al antraceno indicaría que el PSII no estaría siendo afectado por el contaminante. Por lo tanto, el cambio en el contenido de pigmentos fotosintéticos podría inducir cambios en el proceso de la fotosíntesis, afectando al crecimiento y la producción de biomasa en las plantas (Jajoo, 2017).

En conclusión, el antraceno no afectó estadísticamente la germinación de gemas de *L. cruciata*, por lo que dicho parámetro no sería un buen indicador de estrés por toxicidad causada por el HAP. Sin embargo, el cambio en la morfología junto con la disminución del crecimiento en plantas expuestas al antraceno, podrían ser parámetros útiles como bioindicadores. Por otro lado, esta especie fue capaz de absorber y bioacumular el contaminante principalmente en la pared celular. Aunque *L. cruciata* podría ser útil como organismo secuestrador del contaminante, su capacidad de acumulación saturó a concentraciones iguales o mayores a 100 μM . Por otra parte, el contenido total de clorofila no se vio afectado estadísticamente en plantas expuestas al antraceno, sin embargo, se registró una disminución del contenido relativo de clorofila *a* y un aumento de la clorofila *b*. Esto podría indicar que el antraceno estaría afectando el proceso de fotosíntesis, causando una disminución del crecimiento en las plantas.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

SR y SN realizaron los experimentos y los análisis de datos. AE llevo a cabo el análisis de antraceno mediante HPLC. SF se encargó del aislamiento *in vitro* de *L. cruciata*. SJM realizó el diseño experimental del manuscrito, estuvo a cargo de la dirección y planificación general, así como también concibió la idea original del estudio. Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al financiamiento de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019-00073) y de la Universidad Nacional del Comahue (PIN I-04 / B216), los cuales fueron obtenidos por SJM. La colaboración de la Dra. Aranda para la obtención de datos a través del contrato Ramón y Cajal (RYC-2013-12481) del Ministerio de Economía y Competitividad y fondos FEDER.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-SHAIFY, H. I. & M. S. MANSOUR. 2016. A review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25: 107-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- AKSMANN, A. & Z. TUKAJ. 2004. The effect of anthracene and phenanthrene on the growth, photosynthesis, and SOD activity of the green alga *Scenedesmus armatus* depends on the PAR irradiance and CO₂ level. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 177-184. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-2297-9>
- ALAM, A. & V. SHARMA. 2012. Seasonal variation in accumulation of heavy metals in *Lunularia cruciata* (Linn.) Dum. at Nilgiri hills, Western Ghats. *International Journal of Biological Science and Engineering* 3: 91-99.
- ARANDA, E., J. M. SCERVINO, P. GODOY, R. REINA, J. A. OCAMPO, R. M. WITTICH & I. GARCÍA-ROMERA. 2013. Role of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus custos* in the dissipation of PAHs under root-organ culture conditions. *Environ. Pollut.* 181: 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.034>
- BATES, J.W. 1992. Mineral nutrient acquisition and retention by bryophytes. *J. Bryolog.* 17: 223-240. <https://doi.org/10.1179/jbr.1992.17.2.223>
- BÉCARD, G. & J.A. FORTIN. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x>
- CARGINALE, V., S. SORBO, C. CAPASSO, F. TRINCHELLA, G. CAFIERO & A. BASILE. 2004. Accumulation, localization, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma.* 223: 53-61. <https://doi.org/10.1007/s00709-003-0028-0>
- CHANDRA, S., D. CHANDRA, A. BARH, R.K. PANDEY & I.P. SHARMA. 2017. Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7: 94-98. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.01.007>
- GAO, Y., Y. ZHANG, J. LIU & H. KONG. 2013. Metabolism and subcellular distribution of anthracene in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and soil* 365: 171-182. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1386-1>
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M., Z. KOŠNÁŘ, F. MERCL, E. ARANDA & P. TLUSTOŠ. 2018. A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147: 165-174.
- GARREC, J. P. & C. VAN HALUWYN. 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l' air. In: Tec & Doc (eds.), pp. 117. Paris.
- GIORDANO, S., R. CASTALDO COBIANCHI, A. BASILE & V. SPAGNUOLO. 1989. The structure and role of hyaline parenchyma in the liverwort *Lunularia cruciata* (L.) Dum. *Giornale botanico italiano* 123: 169-176. <https://doi.org/10.1080/11263508909430255>
- HARMS, H.H. 1996. Bioaccumulation and metabolic fate of sewage sludge derived organic xenobiotics in plants. *Sci. Total Environ.* 185: 83-92. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05044-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05044-9)
- HÄSSEL DE MENÉNDEZ, G. G. 1959. *Estudio de las Anthocerotales y Marchantiales de la Argentina* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- HUANG, X.D., B.J. MCCONKEY, T.S. BABU & B.M. GREENBERG. 1997. Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed). *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 1707-1715. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160819>
- JAJOO, A., N.R. MEKALA, R.S. TOMAR, M. GRIECO, M. TIKKANEN & E.M. ARO. 2014. Inhibitory effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on photosynthetic performance are not related to their aromaticity. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 137: 151-155. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.03.011>
- JAJOO, A. 2017. Effects of environmental pollutants Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) on photosynthetic processes. *Photosynthesis:*

- Structures, Mechanisms, and Applications*. Springer, Cham., pp. 249-259.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8_11
- KEYTE, I., E. WILD, J. DENT & K.C. JONES. 2009. Investigating the foliar uptake and within-leaf migration of phenanthrene by moss (*Hypnum cupressiforme*) using two-photon excitation microscopy with autofluorescence. *Environ. Sci. Technol.* 43: 5755-5761.
<https://doi.org/10.1021/es900305c>
- KUMMEROVÁ, M., M. BARTÁK, J. DUBOVÁ, J. TRÍSKA, E. ZUBROVÁ & S. ZEZULKA. 2006. Inhibitory effect of fluoranthene on photosynthetic processes in lichens detected by chlorophyll fluorescence. *Ecotoxicol.* 15: 121-131.
<https://doi.org/10.1007/s10646-005-0037-1>
- LIU, H., D. WEISMAN, Y.B. YE, B. CUI, Y.H. HUANG, A. COLON-CARMONA & Z.H. WANG. 2009. An oxidative stress response to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 176: 375-382.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.12.002>
- MALLAKIN, A., T. S. BABU, D. G. DIXON & B. M. GREENBERG. 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: Inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (Duckweed). *Environ. Toxicol.* 17: 462-471. <https://doi.org/10.1002/tox.10080>
- MARWOOD, C.A., K.R. SOLOMON & B. W. GREENBERG. 2001. Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of PAHs. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 890-898.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620200425>
- NADAL, M., M. SCHUHMACHER & J. L. DOMINGO. 2004. Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona County, Spain. *Environ. Pollut.* 132: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.003>
- NYDAHL, A.C., C.K. KING, J. WASLEY, D. F. JOLLEY & S. A. ROBINSON. 2015. Toxicity of fuel-contaminated soil to Antarctic moss and terrestrial algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 2004-2012. <https://doi.org/10.1002/etc.3021>
- OGUNTIMEHIN, I., F. EISSA & H. SAKUGAWA. 2010. Negative effects of fluoranthene on the ecophysiology of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill): Fluoranthene mists negatively affected tomato plants. *Chemosphere* 78: 877-884.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.030>
- SILVANI, V.A., C. P. ROTHEN, M. A. RODRÍGUEZ, A. GODEAS & S. FRACCHIA. 2012. The thalloid liverwort *Plagiochasma rupestre* supports arbuscular mycorrhiza-like symbiosis *in vitro*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 3393-3397.
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1146-7>
- SIMS, D.A. & J.A. GAMON. 2002 Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Rem. Sens. Environ.* 81: 337-354. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00010-X)
- SPAGNUOLO, V., F. FIGLIOLI, F. DE NICOLA, F. CAPOZZI & S. GIORDANO. 2016. Tracking the route of phenanthrene uptake in mosses: an experimental trial. *Sci. Total Environ.* 575: 1066-1073.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.174>
- SPINEDI, N., ROJAS, N., STORB, R., CABRERA, J., ARANDA, E., SALIERNO, M., ... & SCERVINO, J. M. 2019. Exploring the response of *Marchantia polymorpha*: Growth, morphology and chlorophyll content in the presence of anthracene. *Plant Physiol. Biochem.* 135: 570-574.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.001>
- TAIZ, L., & E. ZEIGER. 2006. *Plant physiology*. 4th. Sinauer Associate, Sunderland, Mass., EUA.
- TAO, S., Y.H. CUI, F. XU, B. G. LI, J. CAO, W. LIU, G. SCHMITT, X. J. WANG, W. SHEN, B. P. QING & R. SUN. 2004. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *Sci. Total Environ.* 320: 11-24.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00453-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00453-4)
- VALIÓ, I.F.M. & W. W. SCHWABE. 1969. Growth and dormancy in *Lunularia cruciata* (L.) Dum.: IV. Light and temperature control of rhizoid formation in gemmae. *J. Exp. Bot.* 20: 615-628.
<https://doi.org/10.1093/jxb/20.3.615>
- VIVES, I., J.O. GRIMALT & R. GUITART. 2001. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y la salud humana. *Apunt. Cienc. Tecnol.* 3: 45-51.
- WIECZOREK, J.K. & Z. J. WIECZOREK. 2007. Phytotoxicity and accumulation of anthracene applied to the foliage and sandy substrate in lettuce and radish plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66: 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.002>

