

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL (FISIOLOGÍA  
VEGETAL)

ESTRÉS PER METALLS PESANTS: RESPOSTES  
FISIOLÒGIQUES INDUÏDES PER Cd I Ni EN ARRÒS (*Oryza  
sativa* L.)

ANDREU LLAMAS CHORDÀ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de Novembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. María Jesús Cornejo Martín
- D. Fernando Fornés Sebastiá
- D<sup>a</sup>. Anna María García Ortolà
- D. Aurelio Gómez Cadenas
- D<sup>a</sup>. Lola Peñarrubia Blasco

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Amparo Sanz Grau

Aquesta tesi doctoral ha rebut un ajut per a la realització de tesis doctoral en català del Servei de Política Lingüística de la Universitat de València

©Copyright: Servei de Publicacions  
Andreu Llamas Chordà

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6491-0

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

(òz) Facultat de Ciències Biològiques

**Estrés per metalls pesants: Respostes fisiològiques  
induïdes per Cd i Ni en arròs (*Oryza sativa* L).**

Memòria que presenta

**Andreu Llamas Chordà**

per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques

Departament de Biologia Vegetal. Facultat de Ciències Biològiques.

c/ Dr Moliner, 50 – 46100 Burjassot (València).

**Amparo Sanz Grau**, Professora Titular de Biologia Vegetal del Departament de Biologia Vegetal de la Universitat de València

INFORMA: que **Andreu Llamas Chordà** ha realitzat sota la seua direcció i en aquest Departament el treball que es presenta amb el títol: “Estrés per metalls pesants: Respostes fisiològiques induïdes per Cd i Ni en arròs (*Oryza sativa* L)”.

AUTORITZA: la seua presentació per optar al grau de doctor en Ciències Biològiques.

22 de Juliol, 2005

Signat: Amparo Sanz

A la meua dona i la meua filla

Als meus pares

# AGRAÏMENTS

Pràcticament onze anys ha durat el camí recorregut fins a acabar aquesta tesi. Camí que haguera estat impossible de recórrer sense l'ajuda de molta gent. A aquesta gent li vull dedicar aquestes últimes línies, que no són més que una xicoteta mostra d'agraïment per tot el que han fet per mi.

Com que és fàcil, pel meu despistament continu, que algú puga quedar-ne fora, cosa que seria imperdonable, començaré pel principi i espere no deixar-me a ningú.

Als meus pares, Andrés i Leonor, i als meus germans, Juan Francisco i Vicent, que des del primer moment recolzaren la meua decisió d'iniciar els estudis de tercer cicle i m'han permés desenvolupar la meua tasca malgrat les dificultats sorgides durant aquest temps.

Als professors del departament, que des del dia que vaig arribar han tingut un tracte exquisit amb mi. A la professora Isabel Picazo, per la seua paciència i la participació activa en alguns dels experiments realitzats; al professor Juan Bautista del Amo, per ajudar-me en el coneixement d'alguns programes informàtics i en la recerca de bibliografia; i, en aquests últims anys, a la professora M<sup>a</sup> Jesús Cornejo, per la seua simpatia i confiança en mi (més de la que jo mateix he pogut tenir) i per les revisions de l'esborrany de la tesi. Tots han tingut un paper important en aquest treball.

Als meus companys de departament. Als de la primera etapa, d'això ja fa molts anys i espere no oblidar-me'n de cap: José Luís, Nun, Sergi, Emili, Toni, Lorena, Nieves, Vicent Balançà i Vicent Arbona; i als de l'etapa més recent: Raül, Lorena i Shantanu. Gràcies per la seua ajuda a l'hora de resoldre els molts dubtes plantejats i pels moments de conversa que hem tingut. Especial atenció mereixen Miguel Sarmiento amb qui vaig compartir tasques al laboratori durant la seua estada al nostre país i em va fer conèixer el mate, i Reme i Robert perquè en aquest temps, entre moltíssimes coses, m'han oferit la cosa que més valore, la seua amistat.

Als tècnics de laboratori per facilitar-hi la meua tasca i al personal d'administració per ajudar-me amb la burocràcia i la paperassa.

A la meua cosina Encarna, per l'esforç que ha realitzat en els últims dies de redacció d'aquesta memòria, perquè en un temps rècord ha aconseguit corregir-ne totes les errades. Si n'hi apareix cap és responsabilitat meua.

Al pare de la meua dona, Salvador Soriano, pel seu afecte i estima. Ell estarà orgullós de veure acabada aquesta tesi.

A la meua dona M<sup>a</sup> Jesús pel temps que li he robat i no he pogut passar amb ella, pels mals de cap que li he fet passar i perquè, malgrat ser la que més ha hagut de patir, sempre m'ha recolzat amb paciència infinita i ànim constant. I a la meua filla Agnès que en el poc de temps que porta entre nosaltres s'ha colat en les nostres vides per aportar-nos una alegria que ens desborda.

Finalment agrair a Amparo Sanz, la directora d'aquesta tesi, tot el temps que m'ha dedicat i l'ajuda rebuda, que és moltíssima. Però més important que això és donar-li les gràcies per permetre'm treballar, aprendre, formar-me i madurar al seu costat. Ella és la pedra angular sobre la qual s'ha construït aquesta obra, un fonament extremadament sòlid. Sense ella haguera estat del tot impossible.

Moltes gràcies a tots.

---

Aquestes investigacions han sigut subvencionades pel Ministeri d'Educació i Ciència:  
DGICYT, Projectes PB95-1111, PB98-1428 i BFI2002-00664.

---



---

# ÍNDEX

---

---

# ÍNDIX

<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
1. Contaminació per metalls pesants.....	1
1.1. Orígens de la contaminació.....	1
1.2. Nivells de contaminació.....	2
2. Efectes de l'excés de Cd i Ni sobre les plantes.....	4
2.1. Efectes sobre les membranes cel·lulars.....	5
2.2. Etilé i altres fitohormones.....	6
2.3. Mecanismes adaptatius a l'estrés per metalls pesants.....	7
3. L'arròs.....	8
3.1. Àrees de cultiu.....	8
3.2. Importància agronòmica.....	11
<b>OBJECTIUS.....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>17</b>
1. Cultiu de les plantes.....	19
2. Tractaments.....	20
3. Mesura de la diferència de potencial transmembrana (Em).....	22
4. Determinació de la permeabilitat de les membranes.....	23
4.1. Mesura de l'eixida de $K^+$ al medi extern.....	23
4.2. Mesura de la concentració interna de $K^+$ .....	24
5. Mesura de la taxa respiratòria i l'intercanvi net de $CO_2$ .....	25
6. Determinació de l'alliberament d'etilé.....	26
7. Anàlisi estadística de les dades.....	28

---

---

<b>RESULTATS .....</b>	<b>29</b>
1. Efecte dels metalls sobre el creixement.....	31
1.1. Variacions en pes fresc .....	31
1.2. Variacions en el contingut hídric.....	36
1.3. Efectes diferencials en arrels i tiges.....	37
2. Efecte dels metalls sobre la funcionalitat de les membranes.....	40
2.1. Variacions de la diferència de potencial transmembrana (Em)...	40
2.2. Variacions de la permeabilitat.....	46
2.3. Variació del contingut en K <sup>+</sup> en les tiges i les arrels.....	50
3. Efecte dels metalls sobre l'intercanvi de gasos.....	53
3.1. Intercanvi net de CO <sub>2</sub> .....	53
3.2. Variacions de la taxa de respiració.....	55
4. Efecte dels metalls sobre la producció d'etilé.....	60
4.1. Modulació de l'efecte dels metalls per ABA i GA <sub>3</sub> .....	64
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>67</b>
1. Funcionalitat de les membranes: Efectes diferencials de Cd i Ni.....	69
2. Metabolisme energètic: Efectes sobre la respiració.....	72
3. Síntesi d'etilé: Reducció per Cd i Ni.....	74
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>81</b>

---

---

# **INTRODUCCIÓ**

---

# INTRODUCCIÓ

## 1. Contaminació per metalls pesants

Els metalls pesants són dels contaminants químics més tòxics que existeixen ja que, com a elements químics que són, no poden ser biodegradats i, a més a més, s'acumulen en les cadenes tròfiques. Poden, per tant, produir nombrosos efectes sobre els organismes vius.

Podem destacar per la seua especial toxicitat el Cd, el Hg i el Pb. Altres com ara Cu, Fe, Mn, Ni o Zn, malgrat que són considerats elements traça i necessaris a baixes concentracions, a concentracions elevades també poden provocar efectes perjudicials en els éssers vius (Marschner, 1995; Larcher, 2003).

El present treball se centra en els efectes produïts per dos metalls pesants, Cd i Ni, durant el desenvolupament de plantes d'arròs, ambdós importants contaminants als països industrialitzats. Els diferents aspectes que abarca la investigació realitzada es relacionen en els Objectius.

### 1.1. Orígens de la contaminació

Els metalls pesants, igual que la resta de contaminants químics poden tenir dos orígens diferents:

- Origen natural, provinent de l'activitat geològica del planeta, com poden ser les emissions de gasos volcànics i la meteorització de roques (serpentinites) que contenen elements pesants en la seua composició .

- Origen antròpic. Hi ha diferents activitats humanes altament contaminants, com per exemple:

→ algunes pràctiques agrícoles com l'ús abusiu de pesticides i fertilitzants que contenen quantitats traça de metalls pesants (Gimeno-García et al.,1996; Krishnamurti et al., 1996)

→ la crema abusiva de combustibles fòssils (centrals tèrmiques, transport, calefaccions...)

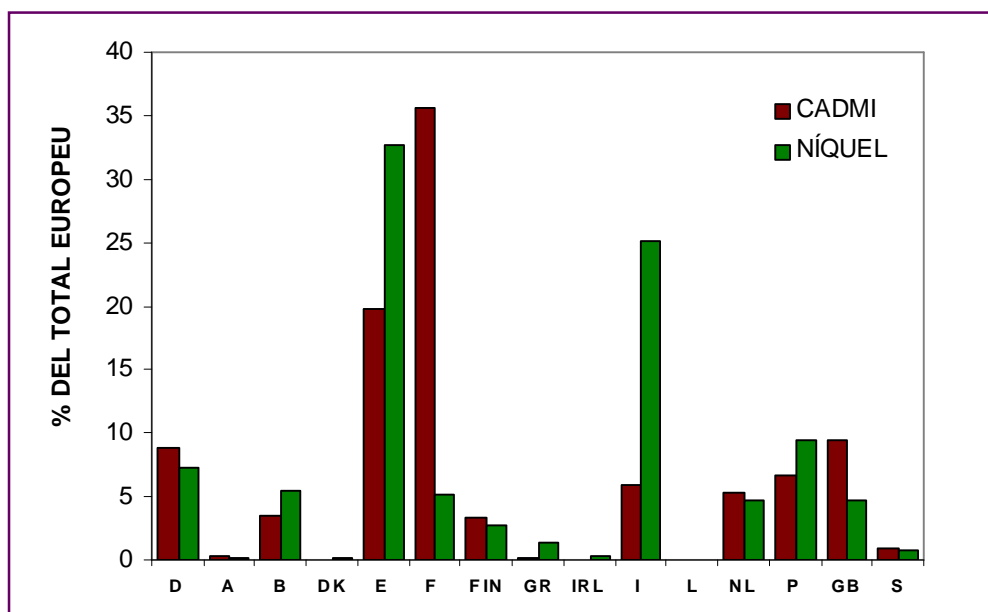
→ determinades activitats industrials: instal·lacions per a la producció de ciments, vidre, materials minerals i productes ceràmics; refineries de petroli i gas; indústries del metall i instal·lacions incineradores de minerals metàl·lics; instal·lacions per a la producció de pasta de paper; productes químics inorgànics de base i sobretot l'activitat minera.

Tot això ha fet que en els últims temps s'haja detectat un augment molt important de les concentracions d'aquests metalls en l'aire, en les aigües i en el sòl (<http://www.eper.cec.eu.int>).

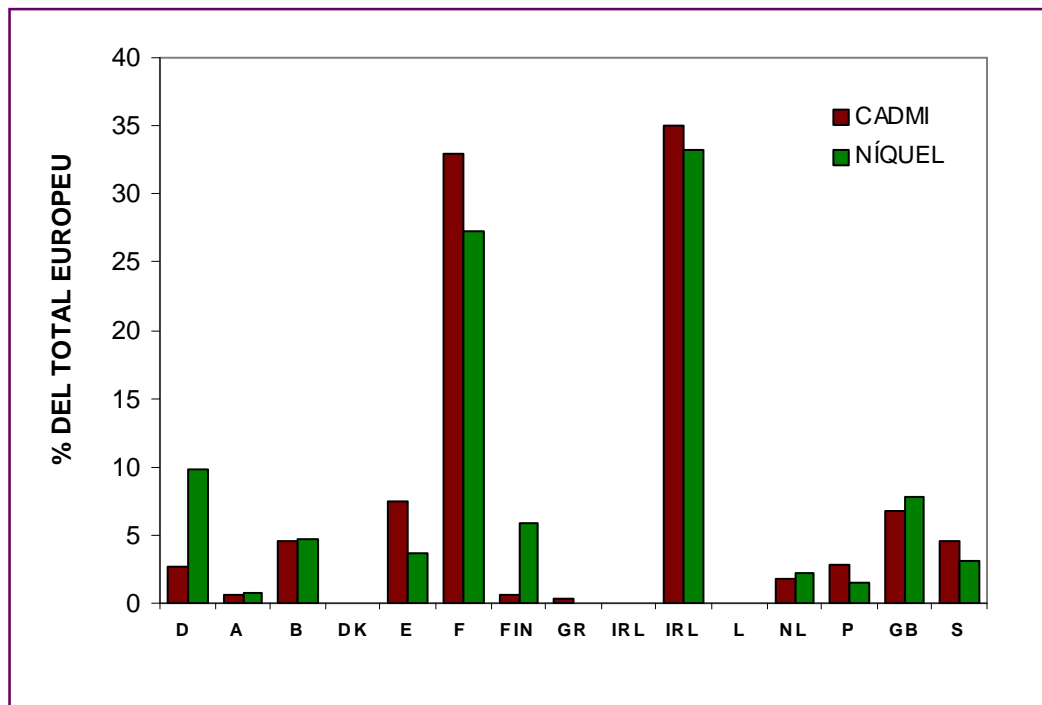
## 1.2. Nivells de contaminació

Cal assenyalar que en les últimes dècades, amb l'alt grau d'industrialització aconseguit i el fort increment de la demanda energètica, la contaminació ambiental per metalls pesants ha abastat nivells molt preocupants que obliguen a un seguiment acurat i un control molt precís per preservar els ecosistemes naturals i, per tant, la qualitat de vida.

Els gràfics següents representen les emissions dels metalls Cd i Ni a l'atmosfera (Figura 1) i a l'aigua (Figura 2), que es produeixen arreu dels països membres de la Unió Europea d'acord amb el seguiment realitzat per l'EPER (Inventari Europeu d'Emissions Contaminants) (<http://www.eper.cec.eu.int>).



**Figura 1.** Emissions de Cd i Ni a l'atmosfera per país membre de la Unió Europea.



**Figura 2.** Emissions directes de Cd i Ni a l'aigua, per país membre de la Unió Europea.

Com pot observar-se en les figures 1 i 2 encara que Espanya és el cinqué país que menys Ni vessa a les aigües directament, respecte als altres estats membres estem en el tercer lloc en emissions directes de Cd a l'aigua, en el segon en emissions de Cd a l'atmosfera i en el primer en emissions de Ni a l'atmosfera. Entre les activitats que més contribueixen a aquesta contaminació per Cd i Ni destaquen les instal·lacions de combustió, refinadores de petroli i gas, indústries del metall (calcinació, sinterització, producció de metalls...), elaboració de productes químics de base, instal·lacions amb utilització de dissolvents orgànics i instal·lacions per a la producció de ciment, materials minerals i productes ceràmics.

A més de la contaminació generalitzada de baixa intensitat que es produeix en determinades zones per les activitats mencionades, cal no oblidar que, ocasionalment, es poden donar episodis de contaminació puntual aguda, com el que va ocórrer l'any 1998 a Huelva, prop del Parc Nacional de Doñana.

## 2. Efectes de l'excés de Cd i del Ni sobre les plantes

Les plantes, al llarg del seu cicle biològic, poden veure's sotmeses a un fort estrés ambiental com a resultat de la presència de diferents contaminants en el medi natural. Entre els estressos abiòtics més importants a què poden estar sotmesos els vegetals destaca la contaminació per metalls pesants.

El Cd i el Ni són metalls pesants que es troben de forma natural a l'escorça terrestre a concentracions relativament baixes, excepte en sòls ultramàfics o serpentínics on el Ni és molt abundant (Larcher 2003). Si bé el Cd no es considera un nutrient mineral, el Ni juga un paper important en el metabolisme del nitrogen, ja que forma part de l'enzim ureasa i, per tant, és essencial perquè les plantes hidrolitzen la urea, utilitzada amb molta freqüència com a fertilitzant nitrogenat per via foliar. I, com ja ha estat indicat prèviament per alguns autors, pot estimular el creixement vegetal i la germinació de les llavors (Bollard, 1983; Gerendás et al., 1999).

Un dels problemes que presenten els metalls pesants en general i el Cd i el Ni en particular rau en el fet que, si bé a concentracions traça no són perjudicials (els vegetals tenen la capacitat de créixer i desenvolupar-se de forma òptima en un rang estret de concentració d'alguns metalls presents al medi), a concentracions per sobre del llindar de tolerància de les espècies poden produir efectes molt tòxics que incideixen de forma important en el desenvolupament de les plantes. Gran part dels símptomes de toxicitat, com ara reducció del creixement, clorosi, etc., són comuns per a diversos metalls pesants però també s'han descrit alguns més específics en diverses plantes, com necrosis foliars característiques causades per Ni (Sun i Wu, 1998) o pigmentacions purpúries en la toxicitat per Cd (Foy et al., 1978).

Diferents autors informen que un excés de Cd i Ni afecta un nombre important de processos fisiològics i bioquímics en plantes (Slivinskaya, 1991; Mattioni et al., 1997; Ahonen-Jonnarth i Finlay, 2001; Bertrand et al., 2001; Carpentier, 2001). A més, si a això afegim el fet que els vegetals són la primera baula en les xarxes tròfiques dels ecosistemes, ens trobem que aquestes substàncies poden afectar de manera importantíssima el desenvolupament dels éssers vius en general.



Entre els efectes del Cd i el Ni sobre el desenvolupament de les plantes destacarem els relacionats amb membranes i amb la síntesi d'etilé, hormona implicada en situacions d'estrés.

### **2.1. Efectes sobre les membranes cel·lulars**

La membrana plasmàtica constitueix el primer punt de control en la incorporació dels metalls pesants en l'interior cel·lular i pot jugar un paper important en la tolerància als metalls (Meharg, 1993). Però també és un lloc d'acció primari de la seua toxicitat. Canvis en els components proteics (enzims lligats a membrana) o en els lipídics, per exposició a metalls, provoquen variacions en la funcionalitat de les membranes, que poden causar alteracions en l'absorció d'elements minerals essencials i donar lloc tant a desequilibris nutricionals (Greger i Lindberg, 1987; Moran et al., 1990; Breckle i Kahle, 1992; Rubio et al., 1994; Hernández et al., 1996; Ouariti et al., 1997), com a d'altres trastorns fisiològics que afectarien de manera directa el creixement de les plantes (Moya et al., 1993).

La bibliografia sobre aquest tema és abundant i, així, treballs amb arròs han demostrat que els tractaments amb Cd i Ni indueixen variacions tant en els lípids del plasmalema com en l'activitat ATPasa, enzim fonamental en la incorporació de nutrients (Ros et al., 1992), i altres, treballant amb diferents espècies, informen d'un increment en la pèrdua de  $K^+$  i altres electròlits en teixits vegetals tractats amb Cd (Keck, 1978; De Filippis, 1979; Fuhrer, 1982). La pèrdua o la menor adquisició de nutrients essencials pot conduir a desequilibris nutricionals responsables de la simptomatologia associada a la toxicitat per metalls.

Aquests símptomes, però, també poden ser, en part, conseqüència de múltiples trastorns en processos fisiològics fonamentals, com ara el balanç hídric (Becerril et al., 1988; Poschenrieder et al., 1989), la fotosíntesi (Becerril et al., 1988; Moya et al., 1993) o la respiració (Keck, 1978; Lamoreaux i Chaney, 1978; Greger et al., 1991; Collier et al., 1993; Burzynski i Buczek, 1994; Romanowska et al., 2002).

Adicionalment, hi ha informació del fet que els cations divalents produeixen una despolarització de les membranes cel·lulars (Kennedy i Gosalves, 1987; Aidid i Okamoto, 1992) i fou suggerit que aquest efecte estaria relacionat amb la toxicitat dels metalls. D'acord amb els resultats d'Aidid i Okamoto (1992) en tiges d'*Impatiens balsamina* la component dependent de la respiració del potencial de membrana resultaria inhibida irreversiblement, mentre que la component passiva romandria sense canvis.

## **2.2. Etilé i altres hormones**

Un altre aspecte d'interés en l'estudi dels efectes dels metalls pesants és la possible acció sobre la producció d'etilé, la considerada hormona de l'estrés, concepte encunyat per Abeles (1973) per referir-se a la biosíntesi accelerada d'aquest gas associada amb l'estrés biològic o ambiental experimentat per plantes. Així, existeixen nombroses evidències que, sota condicions d'estrés biològic, químic o físic, augmenta la producció d'etilé (Hyodo, 1991; Arshad i Frankenberger, 2002). Tanmateix, altres estudis mostren una reducció en l'alliberament d'etilé produïda per metalls pesants (Bhattacharjee, 1997-1998; Vassilev et al., 2004).

Aquesta hormona és un potent promotor de la senescència i s'ha associat l'augment de la seua producció amb canvis en les membranes que condueixen a la pèrdua de la funcionalitat d'aquestes. És més, l'ús d'inhibidors de la síntesi d'etilé reverteix el seu efecte sobre la integritat de les membranes (Mann et al., 2002) i l'aplicació d'inhibidors del receptor de l'hormona augmenta la tolerància a l'estrés (Ella et al., 2003).

La interacció entre els diferents sistemes de senyal (*cross-talk*) sembla ser comú en les plantes i, potser, general. Com a resultat, les hormones vegetals pràcticament mai no semblen actuar com a controladors únics d'un procés. Pel contrari, els diferents processos semblen estar sota el control d'una xarxa de factors que interactuen, alguns dels quals poden ser redundants i altres antagònics.

Una d'aquestes interaccions és la relació etilé-gibberel·lines (GAs)-àcid abscísic (ABA) que té una importància rellevant en el creixement de l'arròs,

per les especials característiques que presenta com a planta semiaquàtica. En un nombre important de plantes semiaquàtiques s'ha descrit que un augment en els nivells d'etilé promou el creixement (Jackson, 1985; Kaneta et al., 1997), paper oposat al que realitza en la major part de plantes terrestres en les quals l'inhibeix (Abeles, 1992). El fet que els teixits estiguen submergits provoca un augment dels nivells d'etilé, que redueix els d'ABA, i incrementa la sensibilitat a GAs. Tot això es tradueix en un augment del creixement (Hoffmann-Benning i Kende, 1992; Kende et al., 1998; Grichko i Glick, 2001; Voeselek et al., 2003).

Per altra banda, una interacció de signe contrari s'ha descrit entre ABA i etilé en el control del creixement de plantes sota estrés hídric, on l'ABA actua com a promotor del creixement, en inhibir la síntesi d'etilé (Sharp et al., 2000; Sharp i LeNoble, 2002).

### **2.3. Mecanismes adaptatius a l'estrés per metalls pesants**

Les plantes davant la presència de concentracions molt elevades de metalls pesants al medi adopten estratègies diferents per a minimitzar els efectes tòxics que aquests els poden produir sobre els processos fisiològics a nivell cel·lular. Es poden identificar diferents tipus de mecanismes destoxificadors en plantes superiors (Baker, 1987; Jackson et al., 1990; Verkleij i Schat, 1990; Ernst et al., 1992; Meharg, 1994; Hall, 2002).

En condicions d'estrés per metalls pesants, com és el cas del Cd i el Ni, les plantes desenvolupen mecanismes adaptatius a l'exposició a aquests metalls. En alguns casos es presenten mecanismes d'evitació, com la reducció del transport a través de membrana, amb disminució de l'absorció per les cèl·lules radiculars, la disminució del transport dins la planta i la compartimentació al vacúol (Davies et al., 1991; Brune et al., 1994; Brune et al., 1995; Verkleij et al., 1998; Blaudez et al., 2000), on juga un paper important la inducció de l'enzim fitoquelatina sintasa (Zenk, 1996; Cobbett, 1999).

Altres plantes desenvolupen mecanismes bioquímics i fisiològics no ben coneguts que els permeten tolerar l'excés de metalls. Un cas extrem és el de les plantes hiperacumuladores, com són algunes espècies de la família Brassicaceae (gèneres *Alyssum* y *Thlaspi*) i Fabaceae, que tenen la capacitat

d'emmagatzemar quantitats elevades de metalls pesants. En l'actualitat, com a conseqüència de l'augment dels nivells de metalls pesants en el medi, aquestes plantes han adquirit una gran importància, ja que es presenten com una tecnologia innovadora per a la recuperació de sòls i aigües contaminats per metalls pesants (bioremediació). Les aplicacions més comunes de la bioremediació són: la bioextracció (absorció i acumulació del metalls en la planta) i la bioestabilització (transformació del metalls en espècies poc o gens tòxiques) (Gleba et al., 1999; Lombi et al., 2001; Prasad i Freitas, 2003; Pilon-Smits, 2005).

### 3. L'arròs

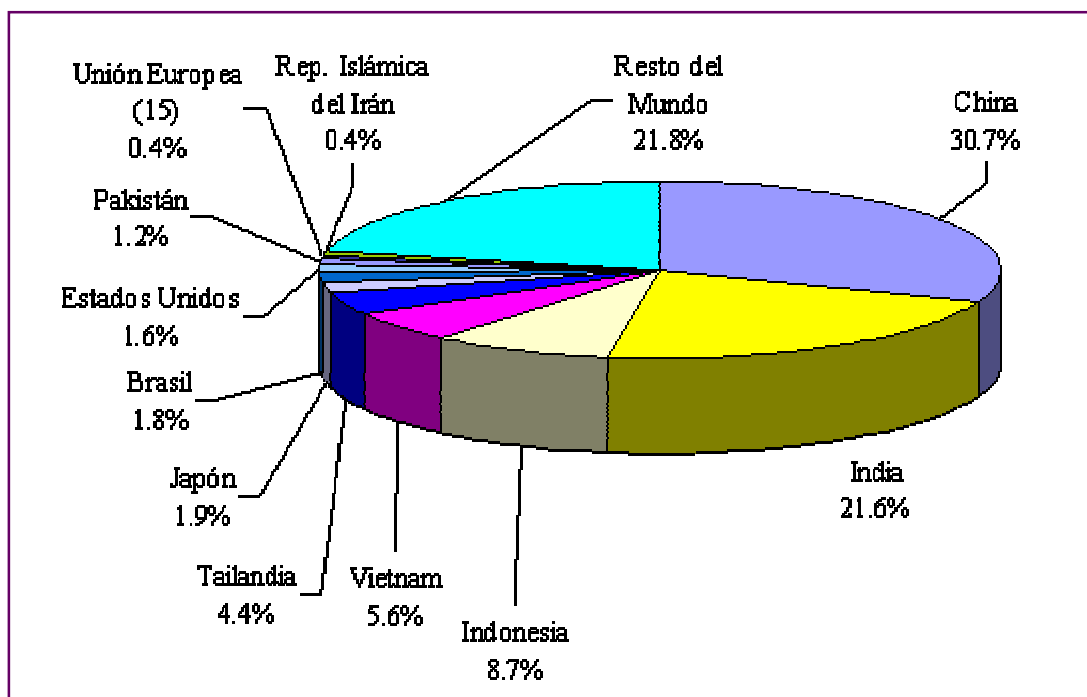
L'arròs és una monocotiledònia que pertany a la família Poaceae. Actualment les varietats que es cultiven en la major part de països són del gènere *Oryza*. De les moltes espècies que trobem només dues presenten interès agrícola per al conreu: *Oryza sativa* (origen asiàtic) i *Oryza glaberrima* (originària d'Àfrica occidental). L'espècie *O. sativa* és la més conreada arreu del món i ha derivat en tres subespècies:

- índica: de gra llarg i cristal·lí
- javànica: de gra llarg i ample
- japònica: de gra curt, redó i perlat.

#### 3.1. Àrees de cultiu

L'arròs es cultiva principalment al continent asiàtic, on es produeix més del 80 % de la producció mundial (Figura 3). Països com la Xina i l'Índia conreen més de la meitat de l'arròs mundial, però altres països asiàtics com Indonèsia, Vietnam i Tailàndia són capdavanters en la seua producció. Brasil és el primer productor mundial no asiàtic, mentre que dins de la Unió Europea és Itàlia qui ocupa aquest lloc.

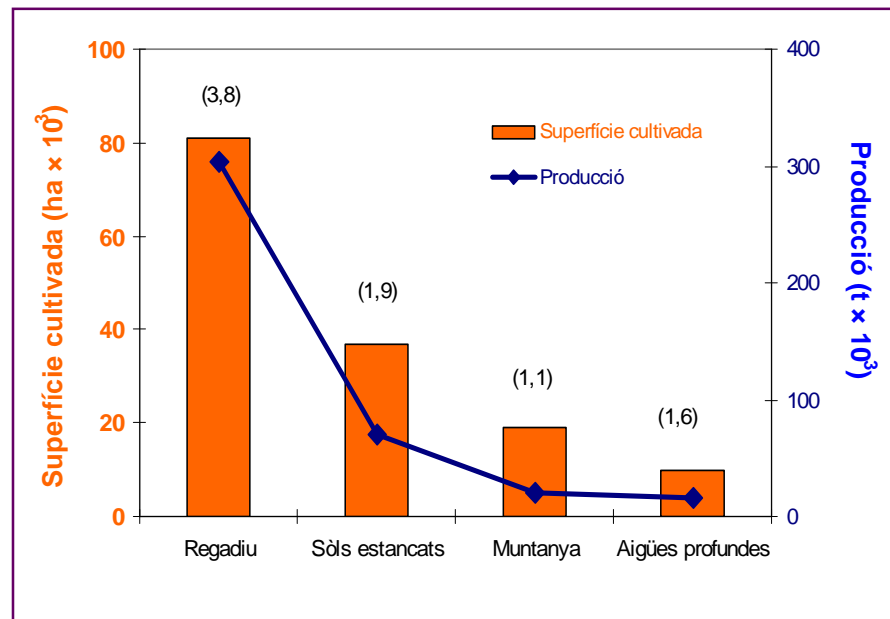
(<http://r0.unctad.org/infocomm/espagnol/arroz/descripc.htm>) .



**Figura 3.** Producció mundial d'arròs (mitjana de 1999 a 2003) Font: UNCTAD segons dades estadístiques de L'Organizació de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació.

El conreu de l'arròs es realitza bàsicament en quatre ecosistemes:

- Zones baixes en sòls estancats: amb el 25% de la superfície conreada i el 17% de la producció mundial, aquest tipus d'arròs ocupa el segon lloc després de l'arròs irrigat.
- Zones de muntanya o meseta: representa aproximadament el 13% de la superfície en tot el món i el 4% de la producció mundial d'arròs.
- Zones de regadiu: representa el 55% de la superfície en tot el món i el 75% de la producció mundial d'arròs.
- Zones d'aigües profundes: la superfície de conreu representa un 7% del total i la producció mundial se situa en el 4%.



**Figura 4.** Superfície cultivada i producció total d'arròs a les diferents zones agroecològiques. També es mostren els rendiments corresponents a cada ecosistema (en t/Ha, entre parèntesis). (<http://www.fao.org>).

A Espanya, com a tot Europa, el cultiu és de regadiu, que és el més productiu (Figura 4). El nostre país ocupa el segon lloc de producció dins de la Unió Europea, i la Comunitat Valenciana, amb una superfície de 14.350 hectàrees, és una de les zones principals de conreu.

En aquest treball hem utilitzat la varietat Bahia, del tipus *japònica*, que té una bona adaptació a les diferents zones arrosseres del nostre país. És una varietat de gra curt, redó i amb un elevat grau de perlat, que mostra una certa tendència a l'encamat. Aquesta és una de les tres varietats emparades sota la denominació d'origen *Arròs de València*, juntament amb les varietats Bomba i Sènia.

### 3.2. Importància agronòmica

L'arròs és l'aliment més important per a més de la meitat de la població mundial i el cereal el cultiu del qual està més estès, possiblement a causa de la seua capacitat de creixement en condicions edàfiques i climàtiques molt dispars.

A més de la seua importància alimentària, l'arròs és una font econòmica importantíssima ja que proporciona feina a una gran part de la població rural de la major part d'Àsia (és el cereal típic d'Àsia meridional i oriental), i és àmpliament conreat a Àfrica, a Amèrica i a Europa meridional, sobretot a les regions mediterrànies. A escala mundial abasta els 150 milions d'hectàrees, extensió equivalent a l'11% de la terra conreada del planeta. La zona del mediterrani produeix una mica més de 9 milions de tones anuals. Per assegurar les necessitats d'una població mundial creixent, a la qual l'arròs proveeix actualment el 21 % del total de calories consumides, la producció s'hauria de duplicar en els propers 20-30 anys (Informes de CIRAD, SIA I FAO).

El fet que l'arròs siga un dels conreus de primer ordre, des del punt de vista nutricional i econòmic, han fet d'ell una planta de màxim interès dins del camp de la investigació i es considere un model d'estudi de molts dels processos fisiològics i metabòlics en plantes. Per altra banda, que el genoma de l'arròs siga el de menor tamany dins dels cereals i s'haja seqüenciat recentment fa que l'arròs siga la base de nombroses investigacions biotecnològiques i es considere aquesta planta un sistema model en monocotiledònies (Bajaj i Mohanty, 2005).

Una altra indicació de la seua importància dins del camp de la investigació és l'existència de l'Institut Internacional d'Investigacions de l'Arròs (IRRI) dedicat a tot tipus d'estudis científics relacionats amb aquesta planta.

Per tots aquests motius i altres, com l'augment de la fam al món, la desnutrició i la pobresa, les Nacions Unides declararen l'any 2004 Any Internacional de l'Arròs (AIA), una declaració que no té precedents en la història d'aquesta organització.

---

**OBJECTIUS**

---



## OBJECTIUS

Investigacions prèvies han mostrat que l'arròs absorbeix eficaçment i pot acumular quantitats elevades de Cd i Ni i constitueix, per tant, un sistema experimental molt adequat per a estudiar els efectes de la contaminació per aquests metalls en cereals. L'objectiu global de la Tesi Doctoral que es presenta és determinar els efectes fisiològics causats pel Cd i el Ni en plantes d'arròs en desenvolupament.

Les investigacions realitzades se centren en els següents **objectius concrets**:

- Caracterització de l'efecte del Cd i del Ni sobre les membranes cel·lulars, primer punt d'interacció de la planta amb els metalls i que no sols pot constituir un punt de control de la seua entrada, sinó també una diana de l'acció tòxica dels metalls.

Aquest objectiu s'aborda des de dos vessants diferents que reflecteixen la funcionalitat de les membranes:

- ❖ Estudi de les variacions de la diferència de potencial transmembrana ( $E_m$ ), que constitueix el millor marcador del funcionament *in vivo* de les ATPases de membrana.
- ❖ Determinació dels canvis de la permeabilitat a què poden conduir les alteracions de la integritat de les membranes.
- Estudi de l'acció del Cd i del Ni sobre l'activitat respiratòria de les plantes, en relació amb les variacions del creixement que es poden donar a conseqüència de l'estrés causat pels metalls i que, a més, constitueix el sistema d'energització del transport a través de membrana a les arrels.
- Estudi comparatiu de les variacions dels nivells d'etilé, hormona relacionada amb canvis de permeabilitat durant la senescència, en les plantes sotmeses a estrés pels metalls i la modulació per àcid abscísic i àcid gibberèl·lic.

En cadascun dels tres objectius abordats s'ha estudiat paral·lelament si els efectes produïts pels metalls poden ser revertits per la seua eliminació del medi.

---

# **MATERIALS I MÈTODES**

---

## MATERIALS I MÈTODES

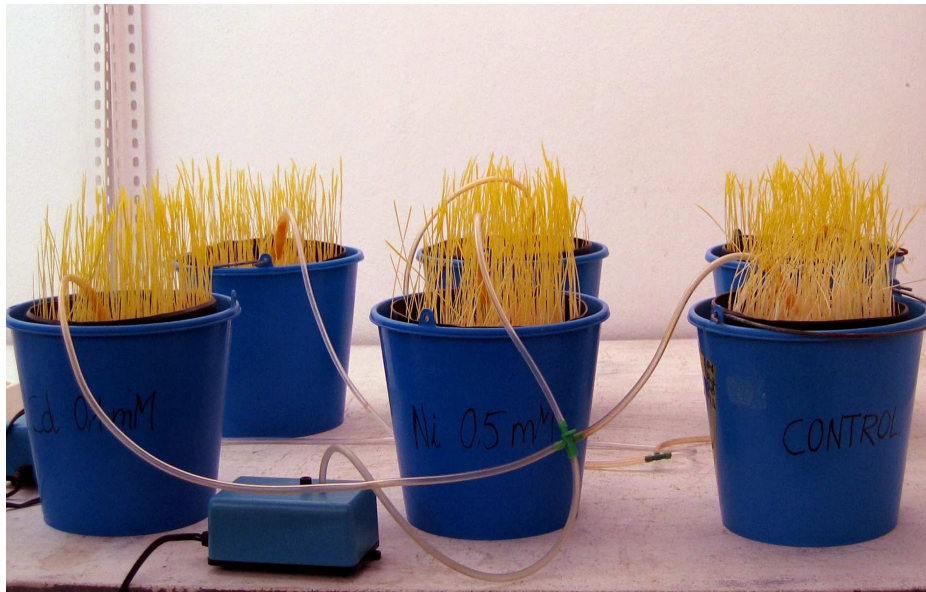
### 1. Cultiu de les plantes

Les plantes d'arròs (*Oryza sativa* L. cv. Bahia) foren cultivades en medi hidropònic en cambra de creixement. Les llavors s'esterilitzaren durant 20 min en una solució de NaClO (lleixiu comercial, diluït al 10 %), es rentaren exhaustivament amb aigua destil·lada i es feren germinar, en la foscor, sobre reixetes de plàstic suspeses en aigua destil·lada dins de contenidors de plàstic. Als dos dies s'afegiren els nutrients indicats i a les concentracions finals que es mostren en la Taula 1:

**Taula 1.-** Composició de la solució nutritiva utilitzada per al cultiu de les plantes.

<b>Macroelements</b> <b>(concentració final)</b>		<b>Oligoelements</b> <b>(concentració final)</b>	
KNO <sub>3</sub>	3 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	15 µM
KCl	1 mM	MnCl <sub>2</sub>	5,9 µM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 mM	CuSO <sub>4</sub>	0,5 µM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	ZnSO <sub>4</sub>	0,28 µM
MgSO <sub>4</sub>	0,75 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>4</sub>	1 µM
Fe-EDTA	3 mg × L <sup>-1</sup>		

Als sis dies de la sembra es van traure els plançons de la foscor i es va iniciar l'aireació del medi, amb un suau borboleig creat per un difusor connectat a una bomba de peixera. Les plantes es mantingueren al llarg del cultiu a 60-75 % d'humitat relativa i sota un règim fotoperiòdic de 8 h de foscor a 25 °C i 16 h de llum a 30 °C, amb 80-100 µmol fotons × m<sup>-2</sup> × s<sup>-1</sup> de radiació fotosintètica-ment activa (PAR).



**Figura 5.** Plantes d'arròs de 6 dies d'edat, dia en què s'inicia la il·luminació, l'aireació del medi i es fan els tractaments a llarg termini (D0).

## 2. Tractaments

Les plàntules d'arròs van ser sotmeses a tractaments d'estrés de curta (hores) o de llarga (dies) durada.

L'estudi dels efectes a curt termini es va dur a terme utilitzant plantes de 6 a 16 dies d'edat, crescudes en el medi nutritiu descrit en l'apartat anterior. Les plantes van ser introduïdes en recipients amb solucions de  $\text{CdCl}_2$  o  $\text{NiCl}_2$ , a concentracions finals entre 0,01 i 1 mM i les respostes fisiològiques al xoc causat per la presència dels metalls al medi varen ser seguides de 2 a 24 hores, segons l'experiment.

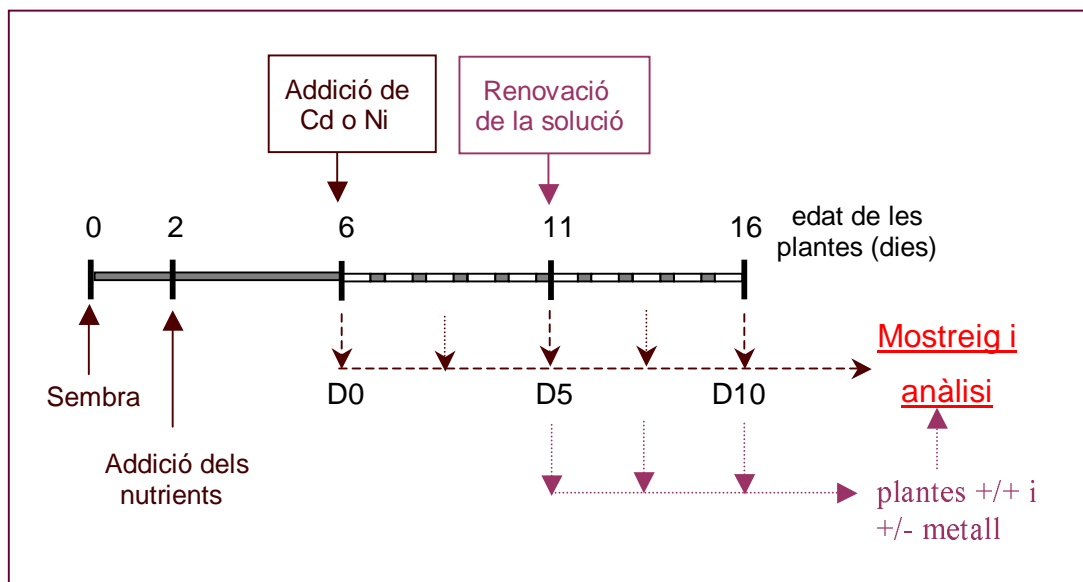
La modulació hormonal de les respostes als metalls es va investigar amb plantes crescudes en la mateixa solució nutritiva, complementada amb àcid abscísic (ABA) o àcid gibberèl·lic ( $\text{GA}_3$ ). Les hormones van ser dissoltes en un petit volum d'etanol i després diluïdes amb aigua destil·lada abans de vessar-les al medi, per donar una concentració final de 5 ppm (equivalent a  $1,9 \times 10^{-5}$

M en el cas de l'ABA i a  $1,4 \times 10^{-5}$  M en el del  $\text{GA}_3$ ). Als cultius control se'ls va afegir la mateixa quantitat d'etanol.

En els tractaments de llarga durada es van fer créixer les plantes en presència dels metalls en el medi nutritiu. Així, sis dies després de la sembra es van afegir volums adients de solucions estoc de  $\text{CdCl}_2$  o  $\text{NiCl}_2$  al medi nutritiu, per donar unes concentracions finals de 0,1 mM de Cd i de 0,5 mM de Ni, excepte quan s'indiqueu una altra concentració. Les plantes es mostrejaren periòdicament fins a 10 dies després de l'addició dels metalls (D10) i es dugueren a terme les anàlisis corresponents.

Per tal d'estudiar la capacitat de les plantes a l'hora de recuperar-se de l'estrés per metalls, en una sèrie d'experiments es va renovar el medi nutritiu als 5 dies de tractament (D5), tant de les plantes controls com de les sotmeses a estrés, per solució nutritiva nova amb (plantes +/+) o sense (plantes +/-) Cd o Ni i es realitzaren mostrejos fins a 5 dies després (D10).

En la Figura 6 es mostra un esquema temporal del sistema de cultiu emprat, on s'indiquen els moments de tractament i de mostreig.

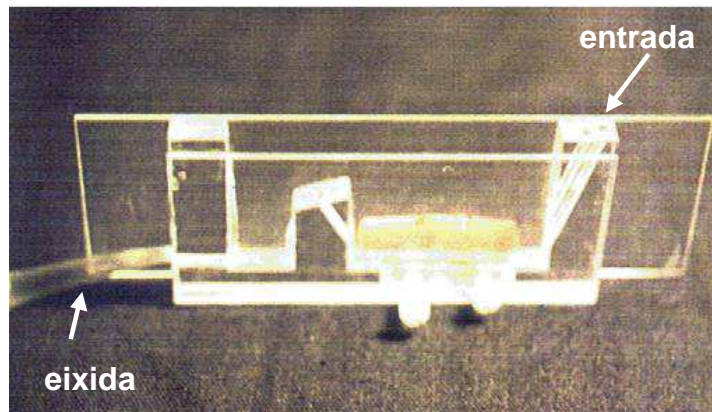


**Figura 6.-** Esquema temporal del sistema de cultiu emprat, on es mostren els moments d'aplicació i eliminació dels metalls en els tractaments de llarga durada i els moments de mostreig de les plantes. A D0 s'inicia l'aireació del medi i la il·luminació fotoperiòdica de les plantes.

### 3. Mesura de la diferència de potencial transmembrana ( $E_m$ )

La mesura de la diferència de potencial transmembrana es va dur a terme segons el mètode descrit per Martínez-Cortina et al. (1992), amb lleugeres modificacions.

Plantes de 6 a 16 dies d'edat es col·locaren amb les arrels dins d'una cambra de plexiglàs, com la de la Figura 7, per la qual es va fer circular una solució de perfusió consistent en KCl 0,2 mM i  $\text{CaSO}_4$  0,2 mM, ajustada a pH 6,5 amb NaOH i a un flux de  $0,42 \text{ L h}^{-1}$ .



**Figura 7.** Cambra de plexiglàs on s'introdueixen les arrels i s'hi fa circular la solució de perfusió, a la qual s'afegeixen els metalls en els moments adients.

La diferència de potencial transmembrana ( $E_m$ ) de les cèl·lules del còrtex de l'arrel es mesurà amb microelèctrodes de vidre emplenats de KCl 3 M i ponts salins de referència que contenien KCl 3 M en agar al 2 % (p/v), tots dos connectats via elèctrodes de Ag/AgCl a un amplificador amperomètric (List, LM-1) i a un enregistrator de paper. L'elèctrode de referència es mantingué submergit en la cambra de perfusió, prop de l'arrel, i el microelèctrode de mesura s'inserí mitjançant un micromanipulador en una cèl·lula del còrtex de l'arrel, en la regió on comencen a desenvolupar-se els pèls radiculars (10-30 mm de l'àpex).

Els tractaments amb metalls es dugueren a terme després que les cèl·lules arribaren a un potencial d'equilibri (*resting potential*). Per tal d'evitar l'efecte del contraió durant el canvi de solució, en la major part dels experiments l'efecte del Cd i del Ni es mesurà per intercanvi amb una solució equimolecular de  $\text{CaCl}_2$ , de forma que es mantingué així constant la concentració de  $\text{Cl}^-$ .

Després de l'addició de Cd o Ni a la solució de perfusió es van seguir els canvis d'Em. Durant temps de mesura prolongats el creixement de les arrels desplaça l'elèctrode i trenca la connexió elèctrica amb la cèl·lula, per la qual cosa l'efecte dels metalls sobre Em més enllà d'1 o 2 hores es va estudiar determinant el potencial d'equilibri de plantes tractades fins a 10 h amb els metalls abans de realitzar les mesures.

#### **4. Determinació de la permeabilitat de les membranes**

L'efecte dels metalls sobre la integritat de les membranes cel·lulars va ser determinat mitjançant les variacions causades en la permeabilitat. Dels diferents marcadors de permeabilitat utilitzats comunament, en aquest treball hem elegit el potassi que, com a ió més mòbil, és un dels marcadors més freqüents en els estudis dels efectes sobre les membranes de diversos tipus d'estrés (De Filippis, 1979; Aurisano et al., 1995; Tetteroo et al., 1996; Murphy et al., 1999; Bharali i Bates, 2004).

##### **4.1. Mesura de l'eixida de $\text{K}^+$ al medi extern**

Mostres duplicades de 5 a 25 plantes van ser utilitzades per a mesurar els canvis de permeabilitat produïts pels tractaments. Les arrels de les plantes mostrejades van ser rentades exhaustivament amb  $\text{CaSO}_4$  1 mM fred per tal d'eliminar la solució nutritiva de l'apoplast, i després s'eixugaren ràpidament sobre paper de filtre suau i amb molta cura, per evitar possibles danys mecànics sobre les arrels que pogueren alterar els resultats produïts per l'efecte dels metalls. Cada mostra va ser introduïda en un vas de precipitats amb 25 mL de  $\text{CaSO}_4$  0,2 mM que contenia  $\text{CdCl}_2$  0,1 o 1 mM o bé  $\text{NiCl}_2$  0,5 o 1 mM, i s'incubaren durant 2 h en un bany

(Selecta, Unitronic 320 OR) a 25 °C i amb agitació (50 U/min). A intervals de 30 min i fins a 2 h des de l'inici del tractament es van prendre alíquotes de la solució i es va mesurar el contingut en  $K^+$  per fotometria de flama (Jenway, PFP7) o amb elèctrodes selectius per a  $K^+$  (Crison, GLP22). Mesures de plantes control, sense metalls afegits, van ser dutes a terme simultàniament per a cada concentració.

L'efecte de la major concentració de metall utilitzada (1 mM) va ser també seguida fins a 8 h. En aquest cas, mostres de 8 a 15 plantes van ser incubades en 25 mL de  $CaSO_4$  0,2 mM amb  $CdCl_2$  o  $NiCl_2$  1 mM i es va determinar l'alliberament de  $K^+$  al medi a 2, 4, 6 i 8 h d'incubació. Es van utilitzar mostres independents per a cada temps de mesura per tal d'analitzar el contingut intern romanent en les arrels al final de cada incubació.

Per a l'estudi de l'efecte dels metalls a llarg termini, es van utilitzar tant fulles com arrels de plantes crescudes fins a 10 dies en medi nutritiu amb metalls ( $Cd$  0,1 mM o  $Ni$  0,5 mM). Segments de fulles o arrels senceres (100 mg de pes fresc) van ser incubades durant 1 h com s'ha indicat abans.

#### **4.2. Mesura de la concentració interna de $K^+$**

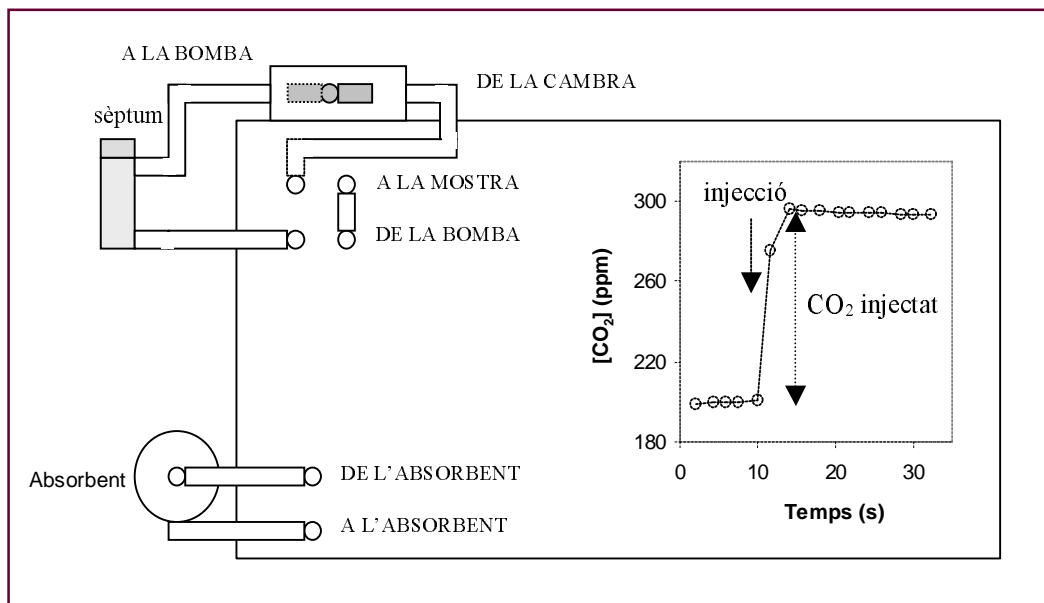
El material vegetal (arrels i fulles), prèviament congelat, va ser triturat amb un homogeneïtzador (IKA-Werk, Ultra-turrax T25) en un tub de centrífuga amb 5 mL d'aigua destil·lada. L'homogeneïtzat va ser diluït amb aigua destil·lada, mantingut durant 30 min al bany a 100 °C i després es va centrifugar 10 min a 9.500 g, a 25 °C (Beckman, J2-21M). El sobrenadant obtingut, després de decantar i, en cas necessari, de filtrar a través de tela de mussolina, s'aforà a 25 o 50 mL amb aigua destil·lada i s'utilitzà per mesurar el contingut en  $K^+$  per fotometria de flama o amb elèctrodes selectius per al  $K^+$ .



## 5. Mesura de la taxa respiratòria i l'intercanvi net de CO<sub>2</sub>

Mostres duplicades de 5 a 25 plantes, o bé mostres de 200 mg de pes fresc d'arrels o de segments de fulles s'introdueixen en recipients de vidre amb 25 mL de CaSO<sub>4</sub> 1 mM, es tancaren hermèticament amb taps provistos d'un sèptum d'injecció i es mantingueren en la foscor. Els canvis de la concentració de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera interna del recipient es determinaren per extracció d'alíquotes a  $t = 0$  i  $t = 60$  min i quantificació mitjançant un analitzador de gasos a l'infraroig, IRGA (Li-Cor, LI-6250).

L'analitzador, dissenyat per a mesurar l'activitat fotosintètica de fulles incloses en una cambra unida al detector de CO<sub>2</sub>, va ser adaptat convenientment per substitució de la cambra de mostres per un circuit tancat provist d'un sèptum d'injecció, tal com es mostra en la Figura 8. La validesa de la calibració de l'analitzador amb aquesta configuració va ser comprovada per injecció de diferents concentracions de CO<sub>2</sub> estàndard.



**Figura 8.** Esquema de la configuració del circuit de circulació de gasos a l'IRGA per a les mesures de la concentració de CO<sub>2</sub> de mostres injectades a través del sèptum (part superior esquerra). La gràfica inserida mostra el canvi de concentració de CO<sub>2</sub> al circuit a conseqüència de la injecció.

El canvi de concentració de CO<sub>2</sub> al circuit de l'IRGA abans i després de la injecció, a 25 °C, de l'alíquota permeté quantificar el CO<sub>2</sub> injectat a cada

temps de mesura (veure gràfica inserida en la Figura 8). La diferència de CO<sub>2</sub> injectat entre t = 0 i t = 60 (ΔCO<sub>2</sub>) permeté calcular la taxa respiratòria del material vegetal, d'acord amb la fórmula:

$$\mu\text{mols CO}_2 \times \text{g}^{-1} \text{ PF} \times \text{h}^{-1} = \frac{\Delta\text{CO}_2 \text{ (ppm)} \times V_{\text{IRGA}} \text{ (L)} \times V_{\text{RECIPIENT}} \text{ (mL)}}{24,47 \times V_{\text{INJECTAT}} \text{ (mL)} \times \text{PF} \text{ (g)} \times t \text{ (h)}}$$

En alguns experiments, després de prendre l'alíquota a t = 60 min els recipients van ser transferits a la cambra de creixement i mantinguts sota el règim de temperatura i fotoperíode indicats en l'apartat 1. A les 24 h es va determinar novament la concentració de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera del recipient per tal de conèixer l'intercanvi net diari de gasos.

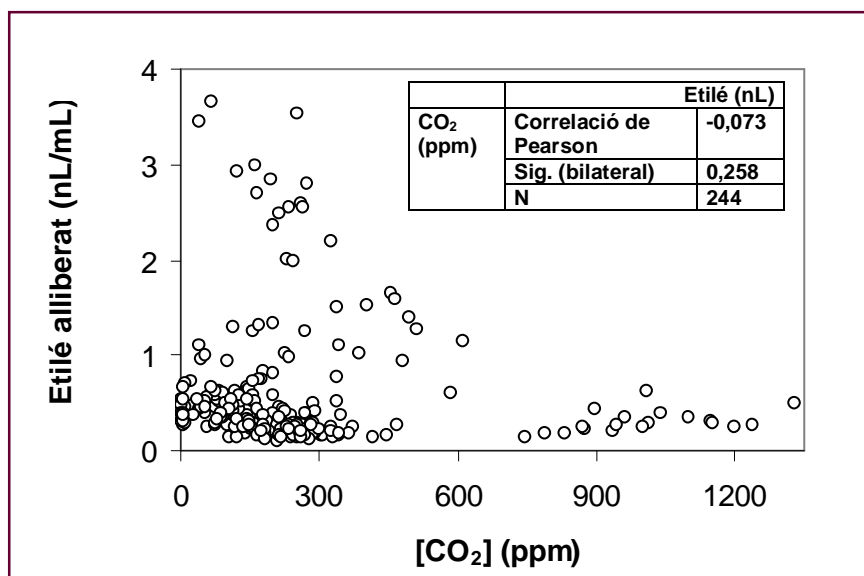
L'efecte immediat dels metalls sobre la respiració es va mesurar manomètricament amb un aparell Warburg (Braun, VL66), a 25 °C. Mostres de 100 mg de pes fresc d'arrels provinents de plantes crescudes en solució nutritiva control van ser introduïdes en els matrassos Warburg. Quantitats adequades de CdCl<sub>2</sub> 100 mM o NiCl<sub>2</sub> 500 mM van ser dipositades en el braç lateral, de forma que en unir-se amb la resta de la solució del matràs donara les concentracions finals de 0,1, 0,5 o 1 mM. El CO<sub>2</sub> produït va ser absorbit per KOH al 10 % (p/v) (0,25 mL) afegit al pouet central del matràs i el descens de la pressió gasosa es mesurà a intervals de 10 min. La taxa respiratòria va ser seguida durant 1 h abans de mesclar la solució de metall amb la resta i durant 4 h posteriorment.

## 6. Determinació de l'alliberament d'etilé

Mostres duplicades de 5 a 25 plantes senceres de 6 a 16 dies d'edat s'introduïren en recipients de vidre tancats hermèticament amb taps provistos d'un sèptum de cautxú, que contenia 25 mL de solució nutritiva. A temps que variaven entre les 1 i les 24 hores, es van extraure amb una xeringa alíquotes d'1 mL de l'atmosfera del recipient a partir de les quals es determinaren els nivells d'etilé produïts per les plantes.

La quantificació de l'etilé en l'alíquota es dugué a terme amb un cromatògraf de gasos (Shimadzu, GC-14B), utilitzant una columna empaquetada de sílice i un detector d'ionització de flama (FID). Es van utilitzar diverses concentracions d'etilé estàndard com a patró extern.

Al llarg del manteniment de les plantes en els recipients hermètics, fins a 24 h, es pot produir una important variació de l'atmosfera del recipient, principalment un enriquiment en CO<sub>2</sub> com a conseqüència de l'activitat respiratòria de les plantes. Com que s'ha descrit que elevades concentracions de CO<sub>2</sub> poden afectar la producció d'etilé, tant negativament (Rothan i Nicholas, 1994), com positiva (Philosoph-Hadas et al., 1986; Mathooko et al., 1998), es va validar la metodologia utilitzada (mètode estàtic, Saltveit i Yang, 1987) analitzant la possible correlació entre nivells de CO<sub>2</sub> i producció d'etilé sota les nostres condicions experimentals. Com s'observa en la figura 9, no es pot demostrar estadísticament l'existència de cap correlació significativa, ni positiva ni negativa, entre els dos paràmetres.



**Figura 9.** Relació entre l'etilé alliberat durant 24 h en recipients hermètics amb diferents concentracions de CO<sub>2</sub>. La taula inserida mostra el coeficient de correlació entre els dos paràmetres i el grau de significació (n.s.)

## 7. Anàlisi estadística de les dades

La significació estadística dels resultats es determinarà sotmetent els valors obtinguts a una anàlisi de la variància (ANOVA) (programa SPSS, versió 11.0.1).

L'existència de diferències significatives entre les mitjanes s'analitzarà mitjançant un test de Tukey a un nivell de significació de  $P < 0,05$ . En cas que les dades no compliren la condició d'homoscedascitat després de la transformació inversa o arrel quadrada, s'utilitzarà el test T2 de Tamhane, per a variàncies no homogènies, al mateix nivell de significació.

Les dades presentades en percentatges van ser analitzades amb el test t-Student, igualment a  $P < 0,05$ .

En les figures es mostren els valors mitjans amb l'error estàndard corresponent, en forma de barres verticals, així com el nombre de repeticions realitzades en cada cas.

---

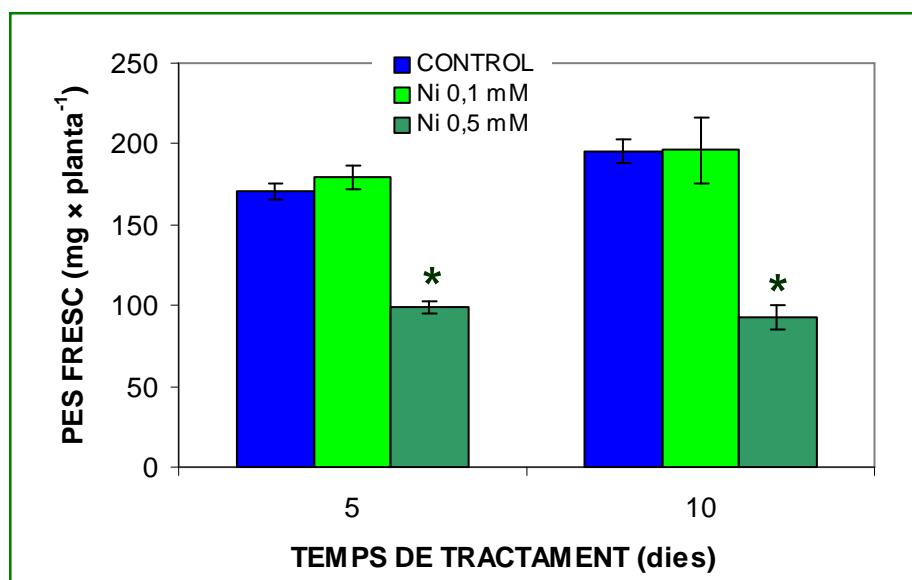
## **RESULTATS**

---

## 1. EFECTE DELS METALLS SOBRE EL CREIXEMENT

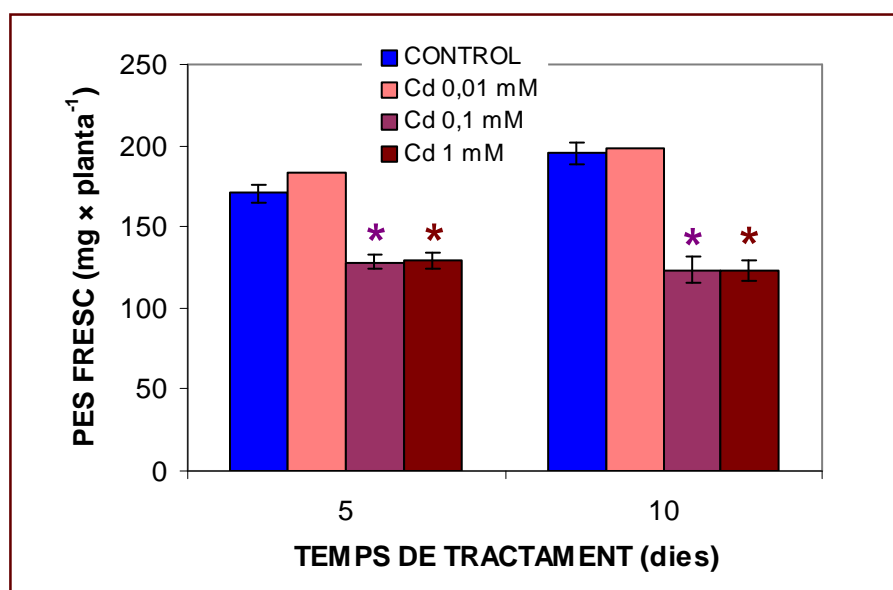
### 1.1. Variacions en pes fresc

Les respostes de creixement de les plantes d'arròs a l'estrès causat pels metalls Cd i Ni són diferents en funció del metall afegit al medi de cultiu i de la concentració aplicada, com es pot observar en les figures 10 i 11. Les plantes cultivades en medi amb Ni 0,1 mM presenten un pes fresc semblant al de les plantes control, tant després de 5 com de 10 dies d'iniciats els tractaments. Entre els dies 5 i 10 s'evidencia un lleuger creixement en ambdós casos, a l'entorn del 10-15 %. Ara bé, amb una concentració de Ni 0,5 mM, el creixement pateix una caiguda molt important, de forma que el pes fresc de les plantes tractades es troba al voltant del 50% del dels controls, tant als 5 com als 10 dies de tractament. És interessant ressaltar que amb aquesta concentració de Ni s'enregistren valors negatius dels índex de creixement. Així, l'índex de creixement relatiu (RGR) es manté al voltant de  $-0,02 \text{ dia}^{-1}$  durant tot el període experimental i està originat per una pèrdua en el pes fresc de les plantes, que entre els dies 5 i 10 de tractament se situa en el 6 %.



**Figura 10.** Pes fresc de plantes d'arròs cultivades durant 5 o 10 dies en medi nutritiu suplementat amb diferents concentracions de Ni. Els asteriscs indiquen diferències significatives amb els corresponents controls (n = 3-30).

Pel que fa a les plantes tractades amb Cd es pot dir que la concentració menor utilitzada (0,01 mM), igual que la de 0,1 mM de Ni, no provoca efectes apreciables sobre el creixement (Figura 11). No ocorre el mateix amb les concentracions majors. Les plantes tractades amb Cd 0,1 i 1 mM presenten una grandària, en termes de pes fresc, un 25 % menor que els controls als 5 dies de tractament i s'apropa al 40 % als 10 dies, ja que les plantes control continuen creixent durant aquest període i les tractades no ho fan.

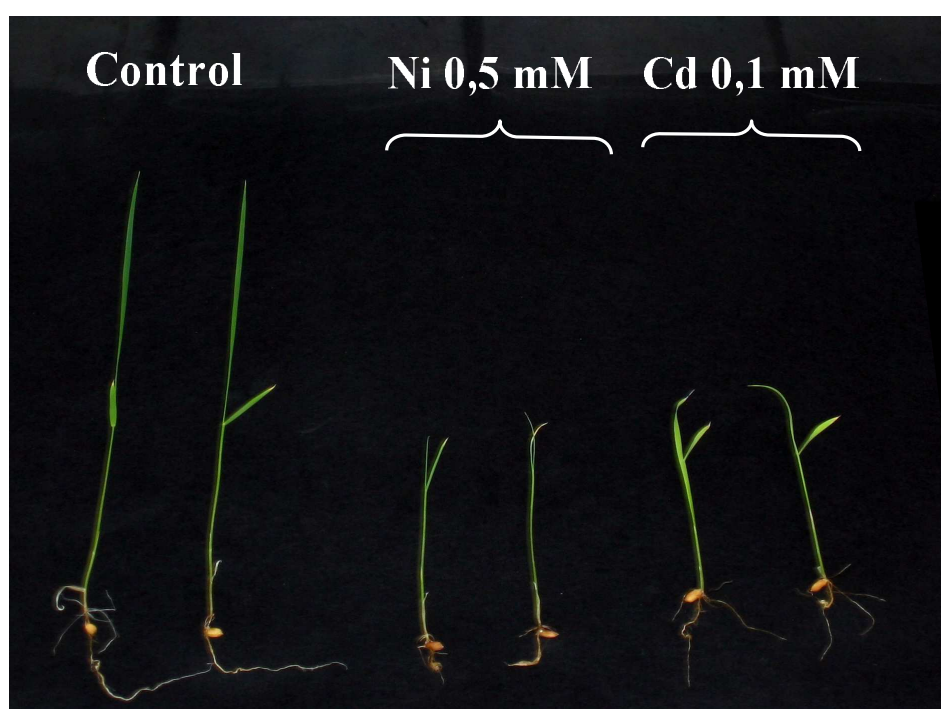


**Figura 11.** Pes fresc de plantes d'arròs cultivades durant 5 o 10 dies en medi nutritiu suplementat amb diferents concentracions de Cd. Els asteriscs indiquen diferències significatives amb els corresponents controls ( $n = 1-45$ ).

És evident, per tant, que la presència dels metalls en el medi de cultiu a concentracions igual o majors a 0,1 mM en el cas del Cd i de 0,5 mM en el del Ni, provoquen no sols una detenció del creixement, sinó també una reducció del pes de les plantes. El deteriorament de les plantes després de 5 dies de tractament es manifesta visiblement (Figura 12). A més a més de disminuir la grandària (Figura 13), l'aspecte que presenten és cloròtic, particularment les tractades amb Cd. En el cas del Ni, s'aprecia un dessecament de la part aèria que no es dona en les plantes sota estrès per Cd (Figura 14).

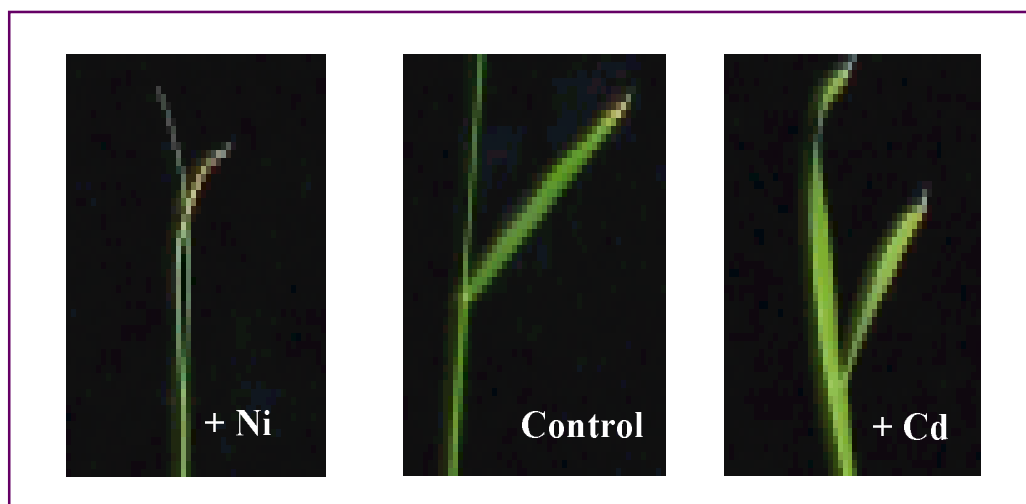


**Figura 12.** Aspecte general que presenten els cultius als 5 dies de tractament amb Cd 0,1 mM (esquerra) o Ni 0,5 mM (centre), en relació als controls de la mateixa edat (dreta)



**Figura 13.** Detall de l'aspecte que presenten les plantes als 5 dies de cultiu en presència de Ni 0,5 mM o Cd 0,1 mM, en relació amb els corresponents controls.



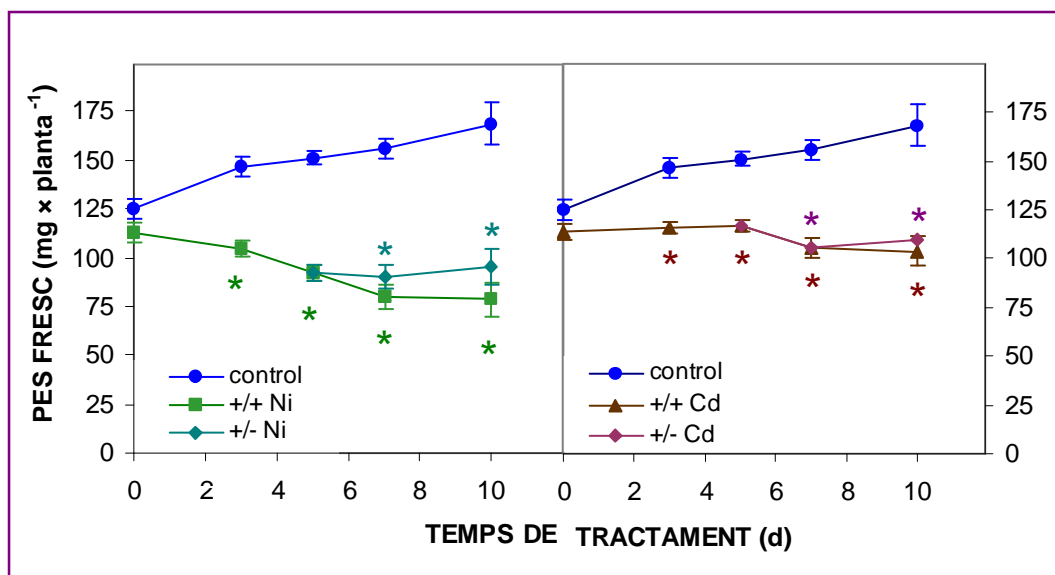


**Figura 14.** Detall de la primera fulla i de la zona d'inserció en la tija, de plantes tractades durant 5 dies amb Ni 0,5 mM o Cd 0,1 mM, en comparació amb els controls. Es pot apreciar, com a principals característiques diferencials, el dessecament causat per Ni i la clorosi produïda per Cd.

Dins del rang de concentracions utilitzades, es va elegir per a cada metall la concentració menor que produeix efectes apreciables sobre el creixement (0,1 mM de Cd i 0,5 mM de Ni) per fer un seguiment més detallat al llarg del cultiu i, adicionalment, per estudiar si el deteriorament causat és irreversible o bé les plantes poden recuperar-se de l'estrés per eliminació del metall del medi. Per tant, es van cultivar les plantes durant 10 dies en presència dels metalls (plantes +/+ metall) o durant tan sols 5 dies i després s'eliminà el metall del medi (plantes +/- metall).

Els resultats obtinguts d'aquesta sèrie d'experiments es mostra en la Figura 15. Com pot observar-se, en les plantes control s'aprecia un increment sostingut del pes fresc, i es constata un augment del 35 % als 10 dies de cultiu, respecte del valor a l'inici de l'experiment. En el cas de les plantes tractades amb Ni es produeix una disminució progressiva del pes al llarg del tractament de manera que pot apreciar-se una pèrdua important, del 30 % en pes fresc als 10 dies (plantes +/+ Ni), mentre que quan s'elimina el metall del medi (plantes +/- Ni) manifesten una recuperació del 15 %.

Pel que fa a les plantes tractades amb Cd es pot evidenciar que la pèrdua de pes no és tan important, ja que se situa al voltant del 10 %, però també la recuperació és menor (al voltant del 6% respecte de les plantes +/+ Cd). En ambdós casos s'observa que els metalls afecten de manera clara el creixement si es compara amb els controls.



**Figura 15.** Canvis en el pes fresc de plantes senceres creixudes en presència dels metalls Ni 0,5 mM i Cd 0,1 mM durant 10 dies (plantes +/+) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall en el medi (plantes +/-). Els asteriscs indiquen les diferències significatives amb els controls corresponents (n = 14).

Cal destacar que des del tercer dia de tractament les diferències entre el control i els diferents tractaments són estadísticament significatives. Als cultius als que s'eliminen els metalls a partir de 5 dies de tractament (plantes +/- metall), es dona una menor pèrdua de pes a conseqüència de l'alleugeriment de l'estrés. Aquesta recuperació de les plantes és més evident en el cas del Ni, tot i que les diferències que comencen a establir-se amb les plantes mantingudes sota estrés (plantes +/+ Ni) no arriben a nivells de significació estadística en els 5 dies que es va fer el seguiment de la recuperació.

## 1.2. Variacions en el contingut hídic

Com ja s'ha mencionat adés, una característica dins la simptomatologia de l'estrés per Ni és la dessecació evident de les tiges que es presenta clarament ja als 5 dies de tractament. Aquest símptoma es correspon amb una forta disminució del contingut hídic, calculat en relació al pes fresc ( $CH_{PF}$ ), de les plantes tractades (Taula 2). En contrast amb els controls, que augmenten al principi del cultiu i s'estabilitzen al voltant de 5 dies després d'iniciat l'experiment, en les plantes tractades amb Ni el  $CH_{PF}$  disminueix significativament de forma continuada i quasi lineal fins a l'últim mostreig realitzat. Així, als 10 dies de tractament la diferència en contingut hídic entre plantes tractades amb Ni i els controls és proper al 12 %.

**Taula 2.** Variació del contingut hídic de plantes cultivades en presència dels metalls Ni 0,5 mM i Cd 0,1 mM durant 10 dies (plantes +/+) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall (+/-). Els asteriscs indiquen les diferències significatives amb els controls corresponents (n = 14).

<b>Dies de tractament</b>	<b>Control</b>	<b>Cadmi 0,1 mM</b>		<b>Níquel 0,5 mM</b>	
		<b>+/+</b>	<b>+/-</b>	<b>+/+</b>	<b>+/-</b>
<b>0</b>	77,3 ± 1,0	78,2 ± 0,6		77,9 ± 0,7	
<b>3</b>	82,3 ± 0,6	79,4* ± 0,5		76,8* ± 0,9	
<b>5</b>	84,0 ± 0,5	81,0* ± 0,6		74,4* ± 1,7	
<b>7</b>	84,5 ± 0,4	80,9* ± 0,8	81,4 ± 0,9	73,9* ± 2,3	78,2* ± 0,9
<b>10</b>	83,9 ± 0,5	80,0* ± 1,2	81,9 ± 0,8	72,1* ± 2,8	79,7* ± 0,8

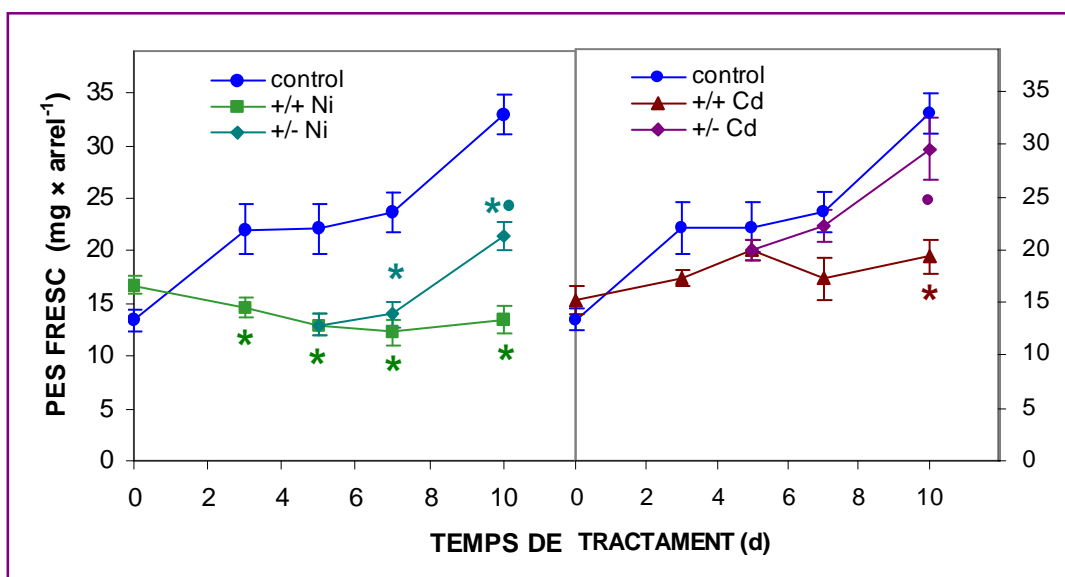
La mitigació de l'estrés per eliminació del metall als 5 dies (plantes +/-) indueix una recuperació del 8% en el  $CH_{PF}$  respecte de les plantes mantingudes en solució amb Ni fins 10 dies (plantes +/+), abastant valors superiors als mesurats abans de l'inici del tractament, però sense arribar al nivell de les plantes control de la mateixa edat.

També apareixen diferències significatives entre les plantes tractades amb Cd i els controls de la mateixa edat, però aquestes són

menors que en el cas del Ni, degut a que el  $CH_{PF}$  de les plantes crescudes amb Cd a penes varia al llarg del cultiu. Així, en les plantes tractades 10 dies amb Cd 0,1 Mm és produeix un augment mínim del  $CH_{PF}$  sobre els valors inicials, vora un 4 % menor que en els controls, i quan s'elimina el metall del medi (plantes +/- Cd) es dona una lleugera recuperació respecte de les plantes no recuperades (+/+ Cd). Com abans, aquesta recuperació no és suficient per a abastar els nivells de les plantes control.

### 1.3. Efectes diferencials en arrels i tiges

Per a determinar un possible efecte diferencial dels metalls sobre diferents òrgans de la planta, fou estudiat el creixement en arrels i tiges per separat. Els resultats es presenten en les Figures 16 i 17.



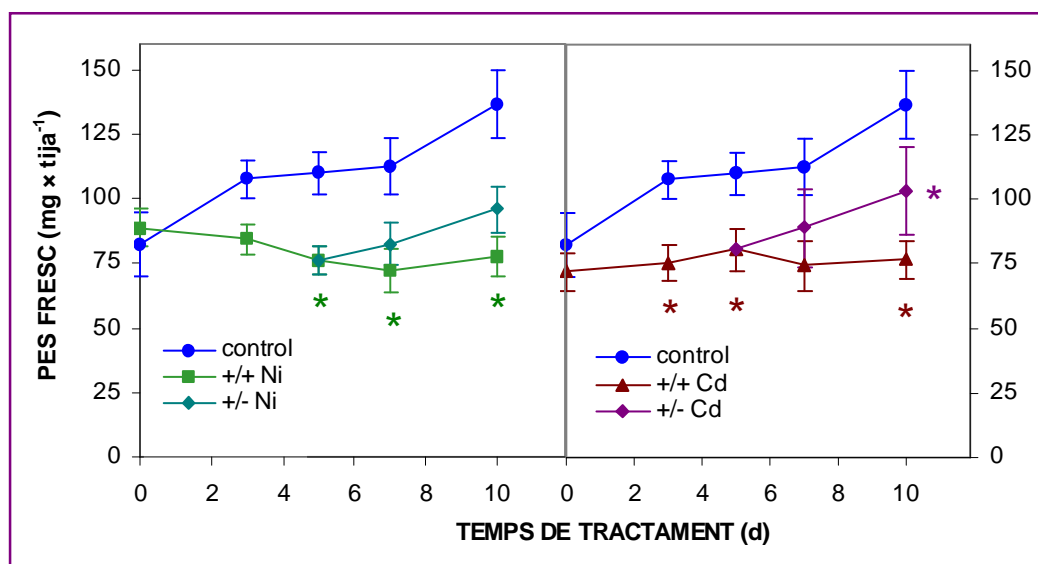
**Figura 16.** Canvis en el pes fresc d'arrels de plantes crescudes en presència dels metalls Ni 0,5 mM i Cd 0,1 mM durant 10 dies (+/+ Cd o Ni) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall en el medi (+/- Cd o Ni). Els asteriscs indiquen diferències significatives amb els controls i els cercles, les diferències entre plantes +/+ i +/- metalls (n = 7-22).

En les plantes control, les arrels presenten un augment de pes del 150 % en 10 dies de cultiu. El tractament amb Ni afecta de manera clara el creixement de les arrels, ja que provoca una disminució del 20% respecte del valor inicial en el mateix període. No obstant, quan el metall

és eliminat del medi de creixement, les arrels de les plantes (+/- Ni) també mostren una forta recuperació del 50% respecte de les plantes no recuperades (+/+ Ni).

Les arrels tractades amb Cd també es veuen afectades de manera important però no tant com amb Ni. Encara que no es produeix una pèrdua de pes, com en el cas anterior, l'augment que experimenten està molt allunyat del del que mostra el control (30% i 150 %, respectivament). Pel que fa a les arrels a les quals se'ls elimina el metall del medi als 5 dies (+/- Cd), presenten una tendència semblant als controls i s'observa un important augment en pes, de quasi el 70 % respecte de les arrels no recuperades (+/+ Cd). Després de 5 dies de recuperació de l'estrés, no es diferencien significativament dels controls.

En les tiges les respostes als dos metalls són semblants (Figura 17), amb la diferència que el Ni provoca una lleugera disminució del pes fresc i amb Cd es manté constant al llarg del cultiu. En els controls, mentrestant, s'observa un creixement en pes fresc de més del 60 %, amb una taxa mitjana de creixement absolut (AGR)  $5,4 \text{ mg} \times \text{dia}^{-1}$ .



**Figura 17.** Canvis en el pes fresc de tiges de plantes crescudes en presència dels metalls Ni 0,5 mM i Cd 0,1 mM durant 10 dies (+/+ Cd o Ni) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall en el medi (+/- Cd o Ni). Els asteriscs indiquen diferències significatives amb els controls ( $n = 7-22$ )

Quan els metalls són eliminats del medi, en ambdós casos es constata un augment en pes que representa al voltant del 20 % més que el corresponent al de les plantes mantingudes en presència del metall (+/+ Cd o Ni).

L'efecte dels metalls sobre el contingut hídic de les plantes es manifesta tant a nivell de l'arrel com, de forma més intensa, sobre les tiges (Taula 3). Les plantes tractades amb Ni mostren una disminució significativa del  $CH_{PF}$  des del principi del tractament, que es manté mentre les plantes estan sotmeses a estrès. L'eliminació del metall del medi indueix un augment del contingut hídic, de forma que les plantes +/- Ni no es diferencien estadísticament dels controls de la mateixa edat.

**Taula 3.** Variació del contingut hídic de les tiges i les arrels de plantes cultivades en presència dels metalls Ni 0,5 mM i Cd 0,1 mM durant 10 dies (plantes +/+) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall (+/-). Els asteriscs indiquen les diferències significatives amb els controls corresponents (n = 3-6).

<i>Dies de tractament</i>		<i>Control</i>	<i>Cd 0,1 mM</i>	<i>Ni 0,5 mM</i>
<b>TIGES</b>				
<b>0</b>		87 ± 0,5	88,3 ± 0,5	87,3 ± 0,6
<b>5</b>		87,6 ± 0,4	82,8 ± 0,9	79,0* ± 2,2
<b>10</b>	<b>+/+</b>	87,4 ± 0,2	83,5 ± 0,9	78,8* ± 0,8
	<b>+/-</b>		83,6* ± 0,5	81,4 ± 0,5
<b>ARRELS</b>				
<b>0</b>		82,5 ± 1,7	83,9 ± 2,9	80,8 ± 2,4
<b>5</b>		88,6 ± 0,5	81,5* ± 2,3	80,6* ± 1,8
<b>10</b>	<b>+/+</b>	89,6 ± 0,5	83,7 ± 1,1	84,8* ± 0,5
	<b>+/-</b>		85,5* ± 0,4	84,6 ± 1,6

## 2. EFECTE DELS METALLS SOBRE LA FUNCIONALITAT DE LES MEMBRANES

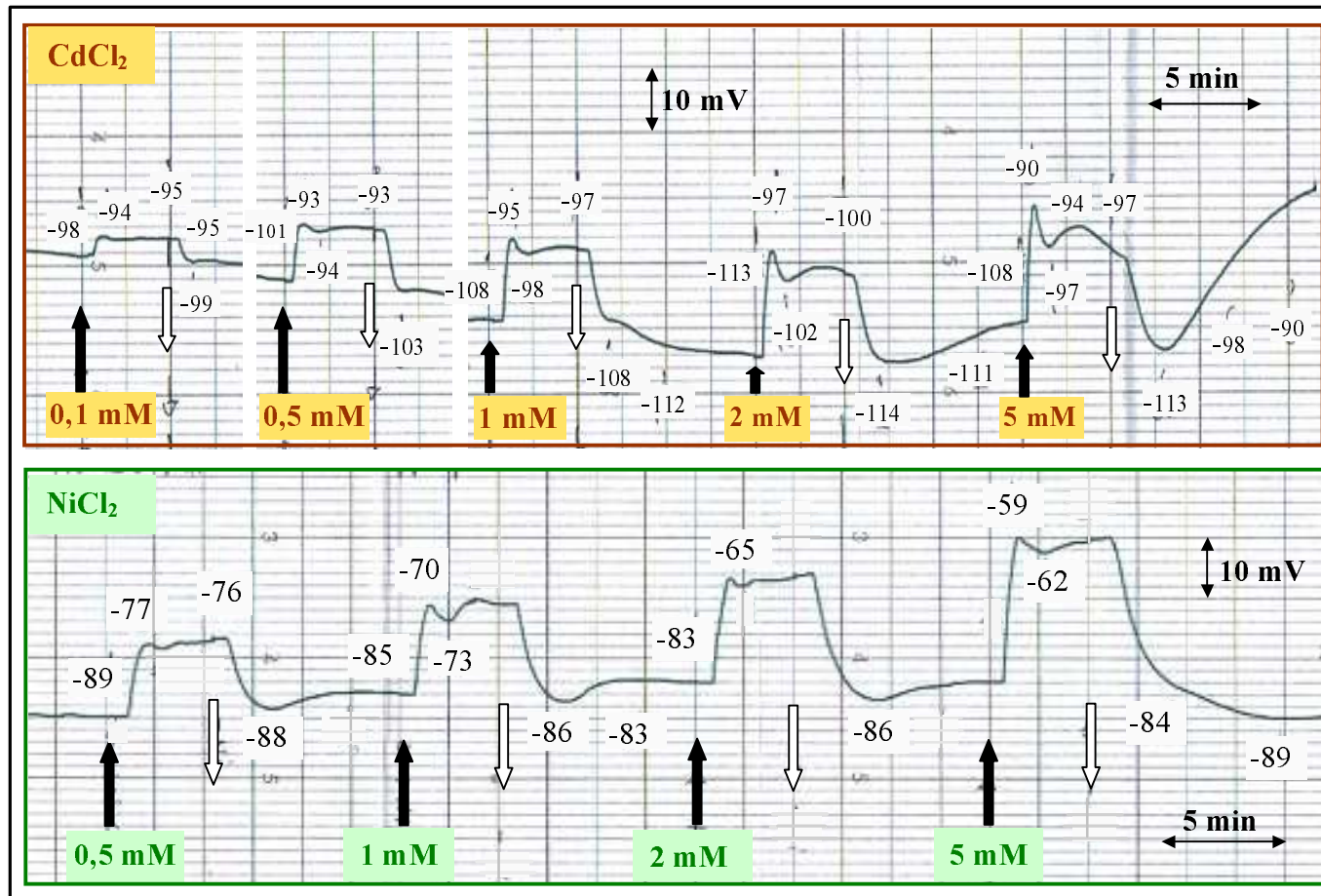
Els efectes dels metalls sobre les membranes s'han estudiat abordant dos vessants diferents de la seua funcionalitat. Per una banda, les variacions de la diferència de potencial transmembrana ( $E_m$ ), que reflecteixen el funcionament *in vivo* de les ATPases de membrana. I per altra, els canvis de la permeabilitat a que poden conduir les alteracions de la seua integritat.

### 2.1. Variacions de la diferència de potencial transmembrana ( $E_m$ )

En aquest apartat es presenten gràfiques representatives dels enregistraments obtinguts en el seguiment de l'efecte immediat dels metalls sobre l' $E_m$ . En les figures es mostren alguns dels valors numèrics mesurats, en mV. Les mesures es realitzen en cèl·lules corticals de les arrels, en les quals s'insereix l'elèctrode gràcies a un micromanipulador i amb l'ajuda d'un microscopi muntat horitzontalment.

L'addició de Cd o Ni a la solució de perfusió en la qual es troba submergida l'arrel provoca una ràpida despolarització de la membrana de les cèl·lules, la magnitud de la qual presenta una relació directa amb la concentració aplicada (Figura 18). Després de la despolarització inicial s'observa, en ocasions, una lleugera repolarització però no es torna a recuperar el potencial d'equilibri previ a l'addició del substrat. Tan sols després de l'eliminació del Cd o del Ni es produeix la repolarització de la membrana i s'arriben a mesurar els valors inicials. En el cas del Ni, freqüentment es dona una hiperpolarització transitòria quan es retira de la solució de perfusió.

Contràriament al que succeeix amb Ni, el tractament amb Cd a elevada concentració té un efecte més permanent sobre la membrana cel·lular ja que, fins i tot després de la seua eliminació del medi i d'una repolarització que no dura més de 2-3 min, continua el descens de l' $E_m$

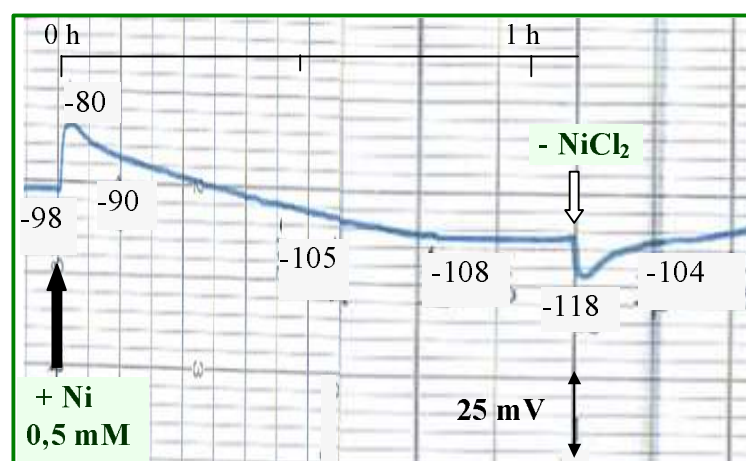


**Figura 18.** Respostes elèctriques de les cèl·lules corticals de l'arrel d'arròs a l'addició de diferents concentracions de CdCl<sub>2</sub> o NiCl<sub>2</sub>. Les fletxes negres indiquen el moment d'addició i les blanques el d'eliminació dels substrats de la solució de perfusió (0,2 mM CaSO<sub>4</sub> + 0,2 mM KCl, pH 6,5).



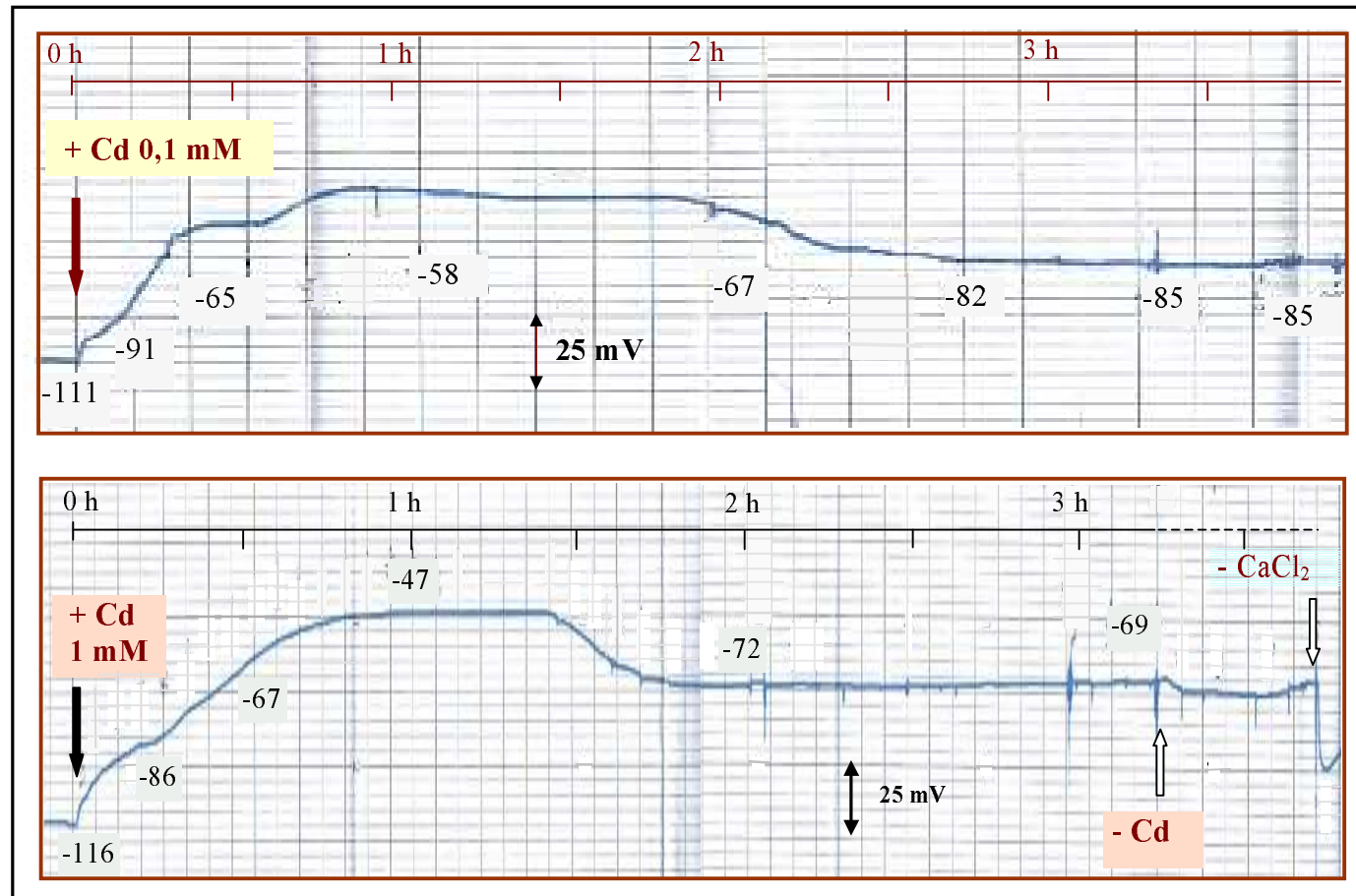
(Figura 18, Cd 5 mM). El seguiment de les variacions d'Em induïdes per Cd i Ni durant temps més llargs permet detectar aquest efecte diferencial dels dos metalls també a baixes concentracions (Figures 19 i 20).

Els canvis induïts per Ni van ser seguits en la mateixa cèl·lula durant 1 h (Figura 19), al llarg de la qual s'observa que l'addició de Ni 0,5 mM, provoca una despolarització inicial que manté un valor menor d'Em durant uns 4-5 min. Aquesta despolarització és seguida d'una repolarització lenta però sostinguda, que permet arribar al potencial inicial en aproximadament 10-15 min i fins i tot a valors majors del potencial d'equilibri assolit prèviament a l'addició de Ni, amb la mateixa concentració de CaCl<sub>2</sub>. La retirada del NiCl<sub>2</sub> de la solució de perfusió induïx una típica hiperpolarització transitòria.



**Figura 19.** Respostes elèctriques de les cèl·lules corticals de les arrels d'arròs al Ni 0,5 mM. El Ni, en forma de clorur, va ser afegit en substitució de CaCl<sub>2</sub>, present en la solució de perfusió a la mateixa concentració.

En el cas del Cd, l'addició del metall a la solució de perfusió, tant a la concentració de 0,1 com d'1 mM, induïx també una ràpida despolarització inicial (Figura 20). Aquesta despolarització, però, és seguida per una altra fase de despolarització major, fins arribar a valors d'Em al voltant de -50 mV, valor que es manté durant unes 2 hores

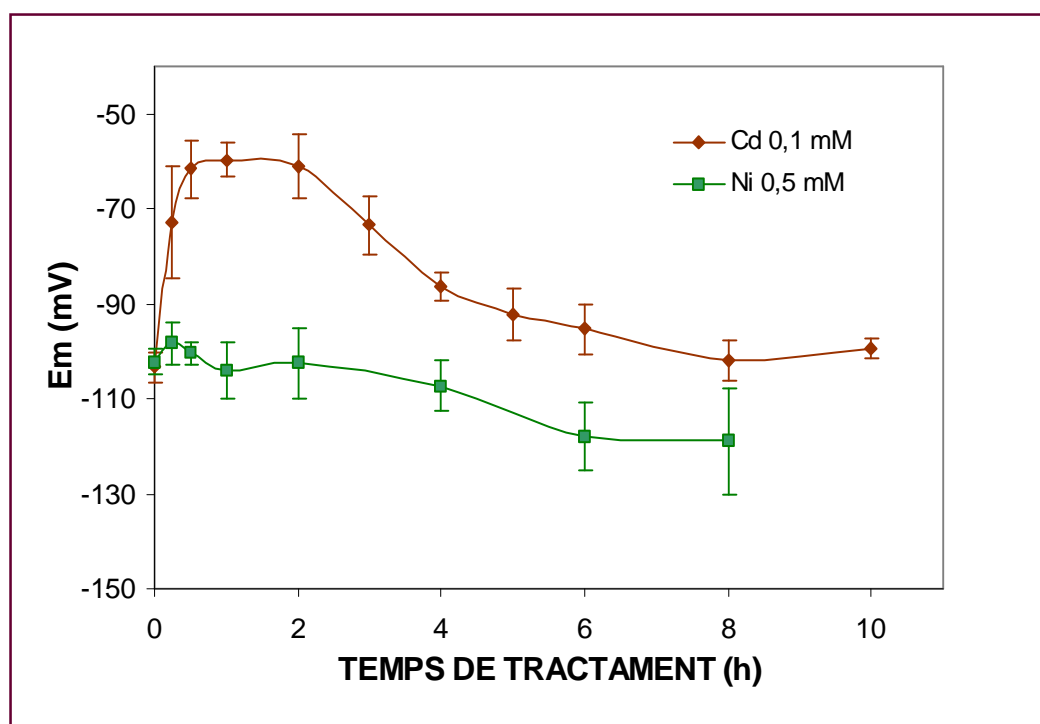


**Figura 20.** Respostes elèctriques de les cèl·lules corticals de les arrels d'arròs al Cd, 0,1 i 1 mM. El Cd, en forma de clorur, va ser afegit en substitució de CaCl<sub>2</sub>, present en la solució de perfusió a les mateixes concentracions.

després de les quals s'observa, en ocasions, una tendència a la repolarització.

Com que les mesures tenen lloc en una zona en creixement actiu, no es pot mantenir l'elèctrode inserit en una mateixa cèl·lula durant més temps i la tendència a la repolarització observada no pot ser confirmada mitjançant el seguiment continu de les variacions d'Em des del moment de l'addició del metall.

Per tal de confirmar la tendència a la repolarització, les plantes van ser mantingudes en solució amb els metalls (0,1 mM de Cd i 0,5 mM de Ni) fins a 10 hores, i durant diferents intervals de temps es va mesurar l'Em de les plantes tractades. Els resultats es presenten en la Figura 21.

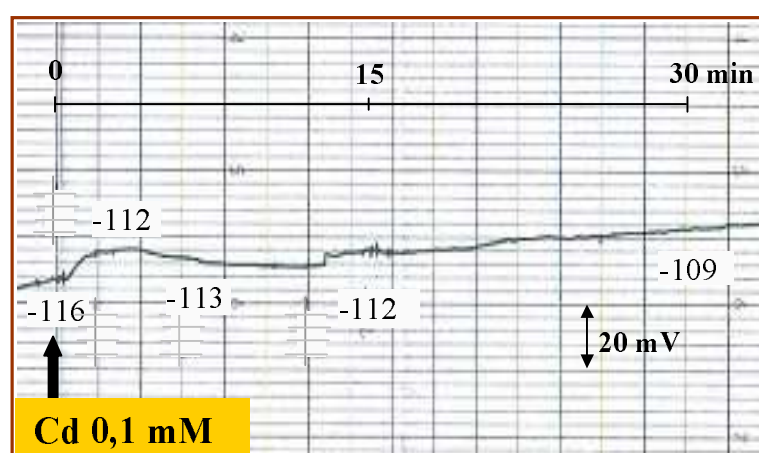


**Figura 21.** Valors mitjans de la diferència de potencial transmembrana (Em) mesurada en arrels de plantes tractades amb Cd 0.1 mM o Ni 0,5 mM fins a 10 h (n = 2 – 11).

Amb aquest mètode de mesura es confirma que la despolarització inicial causada pel Ni és ràpidament seguida per una repolarització en la

seua presència que manté el potencial de membrana en valors que no difereixen dels mesurats abans del tractament.

En el cas de les plantes mantingudes en solució amb Cd (0,1 mM), la forta despolarització observada durant les primeres 2 h no es manté al llarg del temps. La tendència a la repolarització observada en les mesures contínues (Figura 20) es confirma d'aquesta manera. Com s'observa en la Figura 21, la membrana de les cèl·lules del còrtex radicular mostra valors clarament més negatius ja a les 3 hores d'iniciat el tractament, i s'assoleix el potencial inicial en unes 6 – 8 h.

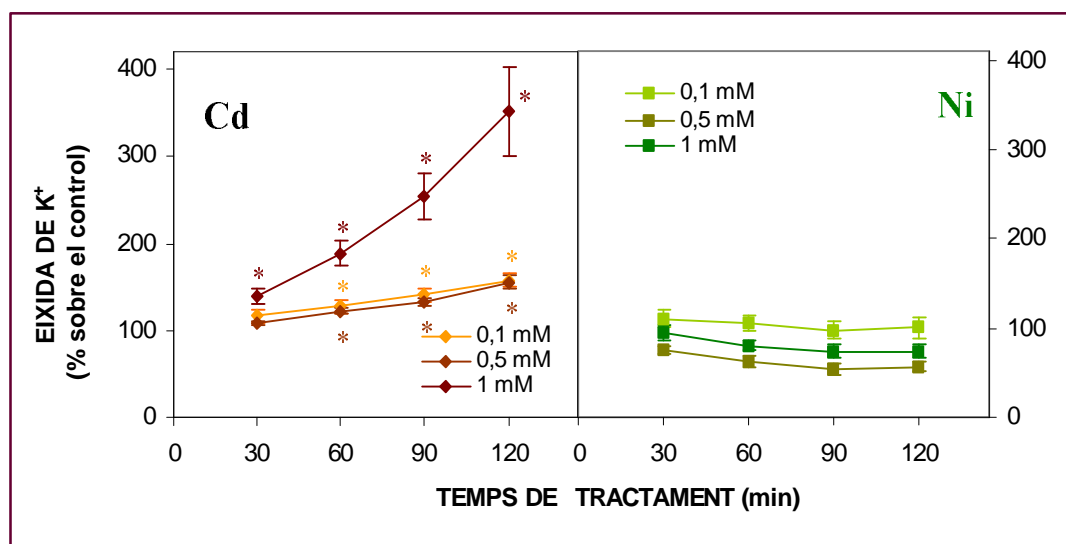


**Figura 22.** Variacions de l'Em mesurades en una cèl·lula del còrtex radicular d'una planta d'arròs creixuda en presència de Cd 0,1 mM durant 10 dies. El  $\text{CaCl}_2$  (0,1 mM) de la solució de perfusió va ser substituït per Cd a la mateixa concentració en el moment assenyalat per la fletxa.

A més llarg termini, les plantes creixudes fins a 10 dies en medi nutritiu suplementat amb Cd 0,1 mM mantenen un potencial de membrana semblant al de les plantes control quan es mesuren en solució de perfusió amb Ca a la mateixa concentració (Figura 22). La substitució del Ca per Cd 0,1 mM indueix una lleugera despolarització transitòria, que no és seguida per la forta despolarització observada en les plantes cultivades en medi sense metall (Figura 20).

## 2.2 Variacions de la permeabilitat

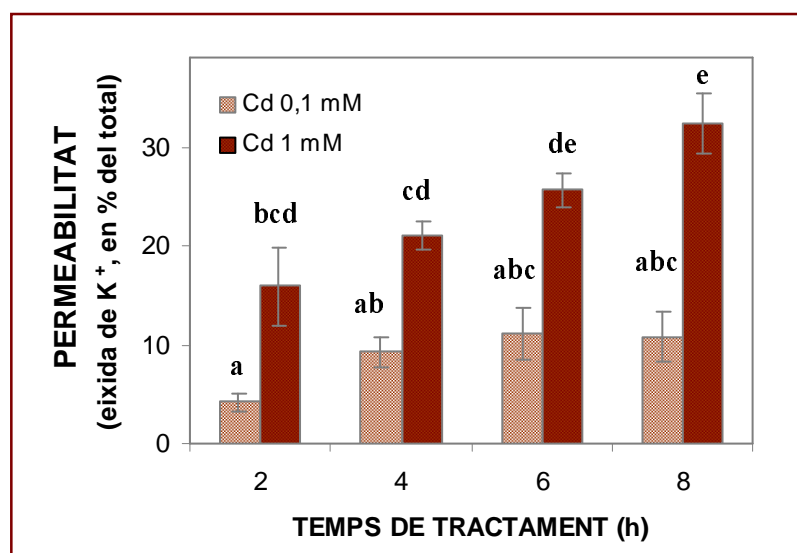
La presència de Cd en la solució experimental indueix un increment en l'eixida de  $K^+$  de les cèl·lules de l'arrel. Així, 1 h després de l'addició de Cd, l'eixida de  $K^+$  de les arrels de les plantes tractades amb una concentració d'1 mM és aproximadament el doble de la dels controls, mentre que amb 0,1 o 0,5 mM l'increment mesurat en l'eixida de  $K^+$  és d'un 20 – 30 % major. Quan es comparen les dades expressades en percentatges sobre els corresponents controls per a cada temps (Figura 23), els valors obtinguts per a les plantes tractades amb 1 mM de Cd són significativament majors ja des de la primera mesura, feta als 30 min de tractament, i a les concentracions menors es troba un efecte significatiu a partir d'1 h d'incubació en presència del metall.



**Figura 23.** Canvis en l'eixida de  $K^+$  en arrels induïts per la presència de Cd o Ni a diferents concentracions. Els resultats s'expressen com a percentatge sobre el corresponent control al mateix temps. Els asteriscs marquen els augments significatius respecte als controls al mateix temps (n = 6-14).

Per la seua part, l'efecte immediat del Ni sobre les membranes de les cèl·lules de l'arrel contrasta amb el descrit per al Cd, ja que durant les 2 h que es va fer el seguiment de l'eixida de  $K^+$  no va detectar-se cap increment de la permeabilitat i, fins i tot, a les concentracions majors utilitzades, el  $K^+$  extruït va ser lleugerament menor que en els corresponents controls.

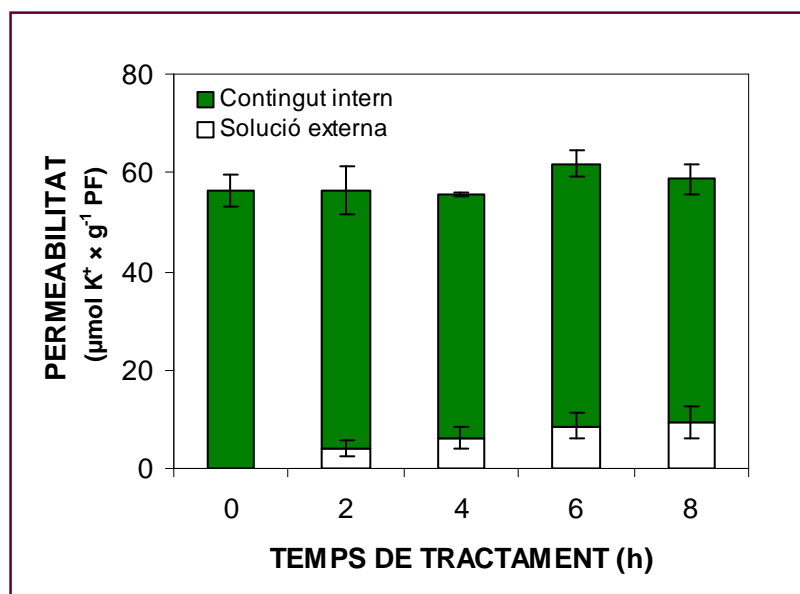
Atés el clar efecte immediat del Cd sobre la permeabilitat, es va seguir l'evolució dels canvis produïts durant 8 h, en relació a la quantitat total de  $K^+$  continguda en les arrels (Figura 24). Així, en les arrels sotmeses a tractament amb Cd 0,1 mM es va mesurar una eixida del 4 % del contingut en  $K^+$  en 2 h, que va duplicar-se a les 4 h. Però aquesta eixida quasi linial durant les primeres hores va estabilitzar-se posteriorment i la quantitat de  $K^+$  extruït a les 6 o 8 h no es diferencia de les mesures anteriors. Amb els tractaments amb Cd 1 mM es va donar una pèrdua de prop del 15 % del contingut en  $K^+$  a les 2 h d'incubació i va continuar augmentant fins almenys 8 h després d'iniciat el tractament, amb més d'un 30 % de pèrdua de  $K^+$ . Per a tots els moments de mesura, es dona un efecte significatiu de la concentració de metall aplicada.



**Figura 24.** Efecte del Cd 0,1 i 1 mM sobre la permeabilitat de les membranes de les cèl·lules de l'arrel, expressada com a percentatge d'eixida de  $K^+$  en relació al contingut total en l'arrel. Lletres diferents mostren l'existència de diferències significatives ( $n = 4-5$  per a Cd 1 i 0,1 mM, respectivament)

Corroborant els resultats obtinguts amb Ni a curt termini, els tractaments amb aquest metall fins a 8 h amb la concentració major utilitzada (1 mM, Figura 25) no van resultar en una pèrdua important del

contingut intern de  $K^+$ , i els valors mesurats no es diferencien significativament dels d'arrels controls ( $1,1 \pm 0,2 \mu\text{mol } K^+ \times g^{-1} \text{ PF} \times h^{-1}$ )



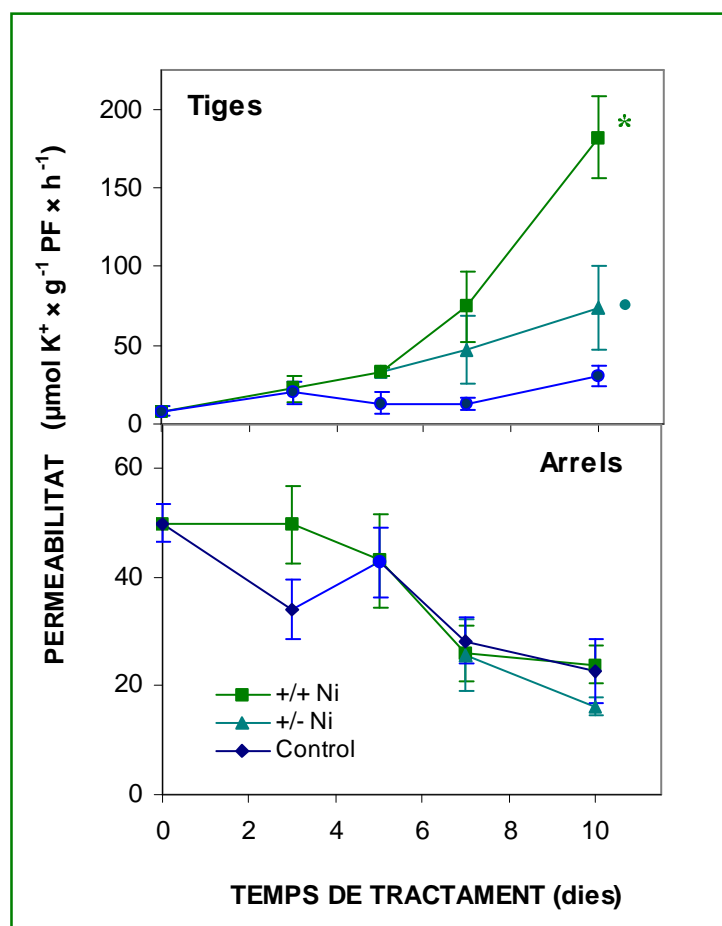
**Figura 25.** Eixida de  $K^+$  a la solució externa i contingut intern de  $K^+$  que roman en l'interior de les cèl·lules de l'arrel, per tractaments amb Ni 1 mM fins a 8 h ( $n = 3$ ).

Una possible acció a més llarg termini d'aquest metall va ser estudiada utilitzant plantes crescudes fins a 10 dies en medi nutritiu suplementat amb Ni 0,5 mM. En aquests experiments es va determinar addicionalment l'efecte sobre la permeabilitat de les membranes cel·lulars de les tiges.

Els resultats obtinguts (Figura 26, pannel inferior) mostren que la permeabilitat de les arrels disminueix a mesura que augmenta l'edat de les plantes, de manera que es dona una reducció de vora el 50 % en l'eixida de  $K^+$  en les plantes control al llarg dels 10 dies de l'experiment. Aquesta pauta de variació no es veu modificada de forma significativa per la presència de Ni en el medi de cultiu i, igualment, l'eliminació del metall del medi no provoca cap modificació.

Per contra, en les tiges es produeix un clar deteriorament de les propietats de permeabilitat de les membranes, tot donant-se una elevada pèrdua de  $K^+$  des dels primers dies de tractament i augmentant la pèrdua amb els dies de tractament (Figura 26, pannel superior). La mitigació de

l'estrés per eliminació del metall del medi va tenir un efecte també immediat i els resultats es revertiren en pocs dies. Així, en les plantes en procés de recuperació de l'estrés (plantes +/- Ni) la pèrdua de  $K^+$  va diferir significativament de les que es mantingueren en presència del metall (plantes ++ Ni) i aquestes, de la dels controls.

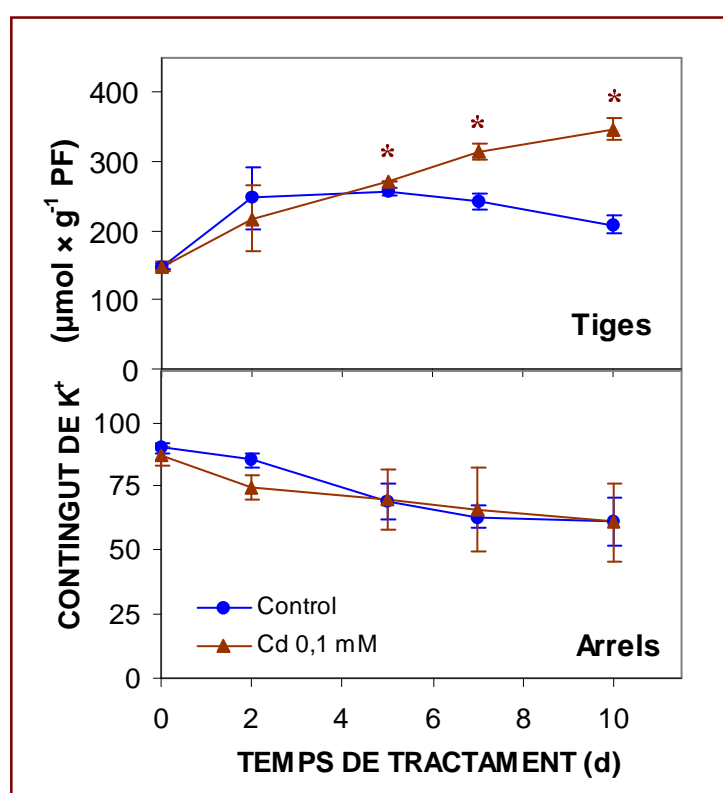


**Figura 26.** Eixida de  $K^+$  a la solució externa en tiges i arrels de plantes crescudes fins a 10 dies en medi suplementat amb Ni 0,5 mM. Els asteriscs indiquen les diferències significatives amb els controls i els cercles, les diferències entre plantes ++ i +/- Ni (n = 2-5).



### 2.3. Variació del contingut en $K^+$ en les tiges i les arrels

La variació al llarg del temps de cultiu dels nivells de  $K^+$  en les tiges i les arrels presenta característiques pròpies en cada cas. En les plantes control, el contingut en les arrels mostra una clara tendència a minvar (Figures 27 i 28, panells inferiors), amb un descens de prop del 25 % durant els 10 dies de l'experiment, mentre que en les tiges la concentració de  $K^+$  augmenta inicialment i s'estabilitza després (Figures 27 i 28, panells superiors), de manera que es produeix una acumulació sobre els valors inicials.

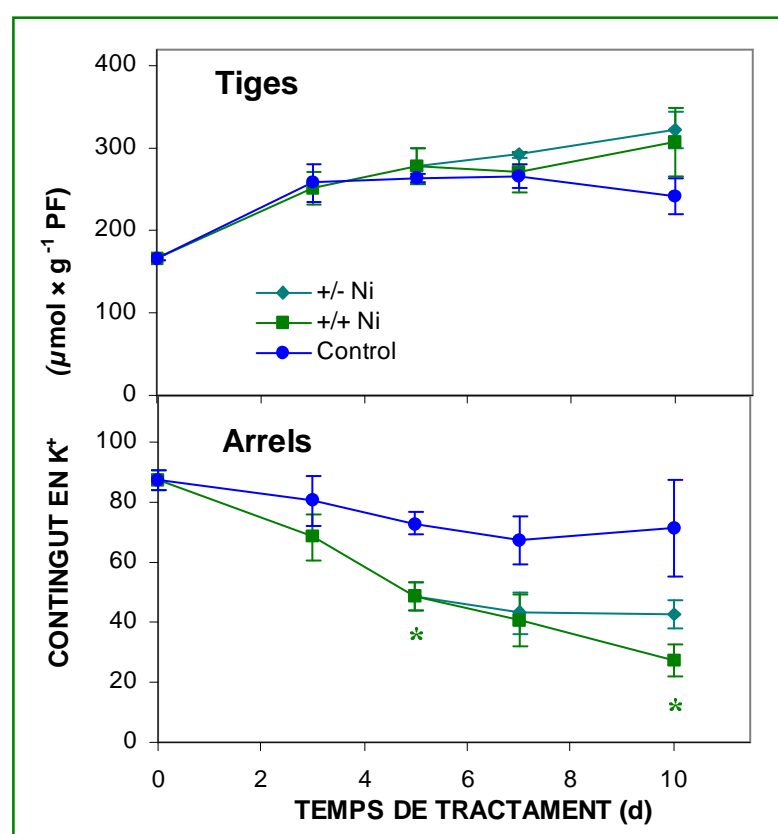


**Figura 27.** Variació del contingut en  $K^+$  dels òrgans de plantes tractades amb Cd 0,1 mM al llarg de 10 dies de cultiu. Els asteriscs indiquen les diferències significatives respecte als controls de la mateixa edat ( $n = 3$ ).

La pauta descrita per a les plantes control varia de forma important en funció del tractament aplicat. Pel que fa a les arrels, en el cas de les plantes tractades amb Cd 0,1 mM no es detecta cap variació significativa respecte als controls. Tanmateix, en les tiges es dona una acumulació

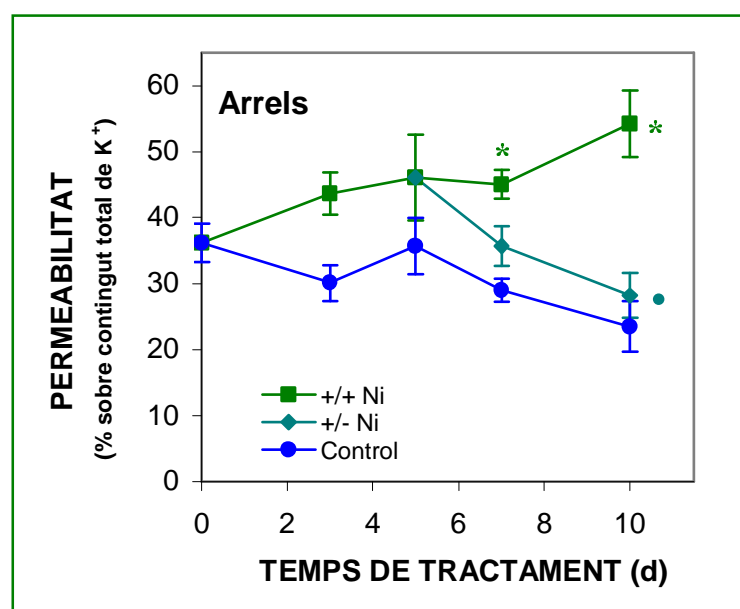
major, que es manté al llarg del temps i continua donant-se per damunt dels nivells de significació estadística després de 10 dies de tractament amb el metall (Figura 27).

El Ni, per contra (Figura 28), no modifica la pauta d'acumulació de  $K^+$  en les tiges descrita per als controls. Aquest metall, però, produeix un clar efecte a nivell de les arrels. Així, 5 dies després de l'inici de l'estrés el contingut en  $K^+$  en les arrels de les plantes tractades és significativament menor que el de les controls i de forma concomitant amb la mitigació de l'estrés, es detecta un augment de la concentració de  $K^+$ , fins arribar als 5 dies de recuperació a valors que no es diferencien significativament dels de les plantes control.



**Figura 28.** Variació del contingut en  $K^+$  dels òrgans de plantes tractades amb Ni 0,5 mM al llarg de 10 dies de cultiu (plantes +/+ Ni) o 5 dies, seguits de 5 dies sense metall en el medi (plantes +/- Ni). Els asteriscs indiquen les diferències significatives respecte als controls de la mateixa edat (n = 4-6).

D'acord amb els resultats de l'apartat anterior, si bé la permeabilitat de les tiges augmenta amb els tractaments amb Ni, les arrels mostren una eixida de  $K^+$  semblant a la dels controls (Figura 26). Cal considerar, però, que els continguts de  $K^+$  en les arrels és molt menor que en els controls, de forma que si la permeabilitat es calcula en funció del contingut en l'arrel, els valors d'eixida, en percentatge del contingut total en  $K^+$ , són significativament majors en les arrels tractades amb Ni (Figura 29). L'eliminació del metall del medi (plantes +/- Ni) disminueix la permeabilitat de forma significativa respecte a la de les arrels de plantes +/+ Ni, i arriben a valors que no es diferencien dels controls.



**Figura 29.** Eixida de  $K^+$  a la solució externa, expressada com a percentatge del contingut total en arrels de plantes crescudes fins a 10 dies en medi suplementat amb Ni 0,5 mM. Els asteriscs indiquen les diferències significatives amb els controls i els cercles, les diferències entre plantes +/+ i +/- Ni (n = 4-10).

### 3. EFECTE DELS METALLS SOBRE L'INTERCANVI DE GASOS

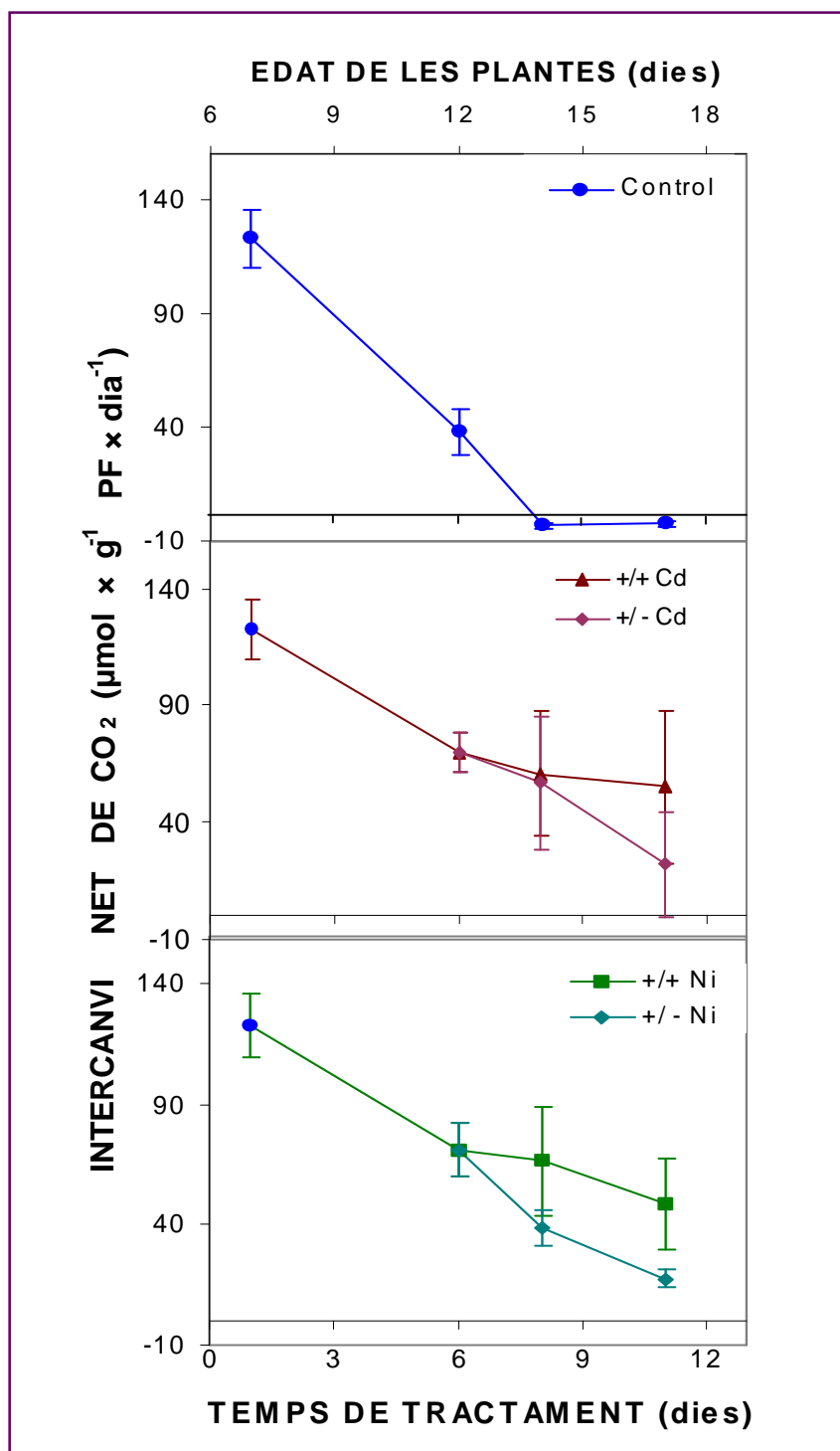
#### 3.1. Intercanvi net de CO<sub>2</sub>

En el nostre sistema de cultiu, la il·luminació de les plantes s'inicia als sis dies d'edat i, per tant, el creixement que es dona fins aqueix moment depén exclusivament de la utilització de les reserves nutritives emmagatzemades en la llavor.

Així, la mesura de l'intercanvi net diari de CO<sub>2</sub> mostra un balanç clarament positiu de la producció davant del consum de CO<sub>2</sub> a les 24 h de l'inici del règim fotoperiòdic (Figura 30). El balanç es manté positiu fins que les plantes arriben al voltant de 13 dies d'edat, uns set dies després de l'inici de la il·luminació. A partir d'aqueix moment se sobrepassa el punt de compensació de CO<sub>2</sub> i s'obté un balanç negatiu, és a dir, es dona un major consum de CO<sub>2</sub> per fotosíntesi que el que s'allibera per respiració.

L'addició tant de Cd 0,1 mM com de Ni 0,5 mM al medi de cultiu (Figura 30, panells central i inferior, respectivament) provoca una important disminució de l'activitat fotosintètica de les plantes, i dona lloc a balanços en l'intercanvi de CO<sub>2</sub> positius al llarg de tot el temps de tractament.

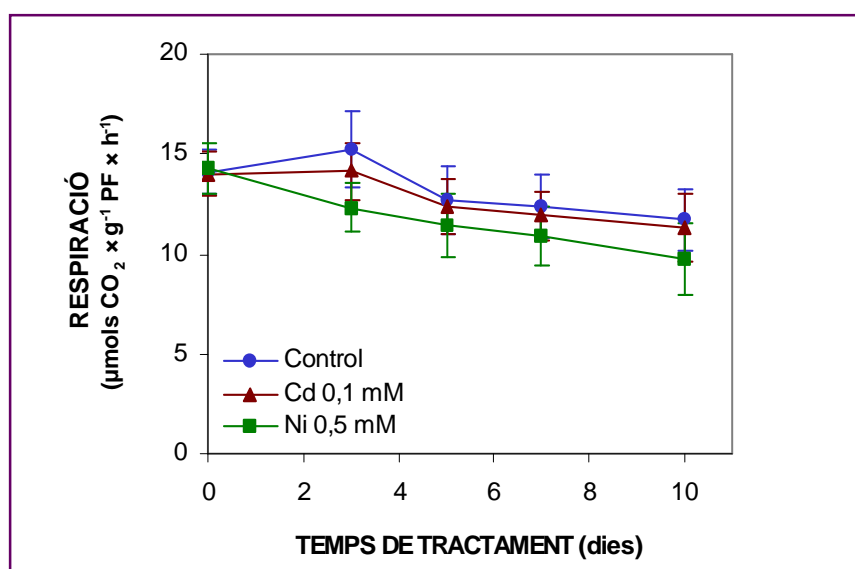
L'eliminació dels metalls del medi indueix una recuperació de les plantes estressades durant 5 dies, que es reflecteix en una tendència del balanç de CO<sub>2</sub> a decreixer cap a valors propers al punt de compensació, tot i que no es va assolir un balanç net de zero en els 5 dies del període experimental en què es van recuperar les plantes (plantes +/- metall).



**Figura 30.** Evolució de l'intercanvi diari net de CO<sub>2</sub> al llarg del cultiu en les plantes control i en plantes cultivades en presència de Cd 0,1 mM o Ni 0,5 mM durant 10 dies (+/+ Cd o Ni) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall (+/- Cd o Ni) (n=3).

### 3.2. Variacions de la taxa de respiració

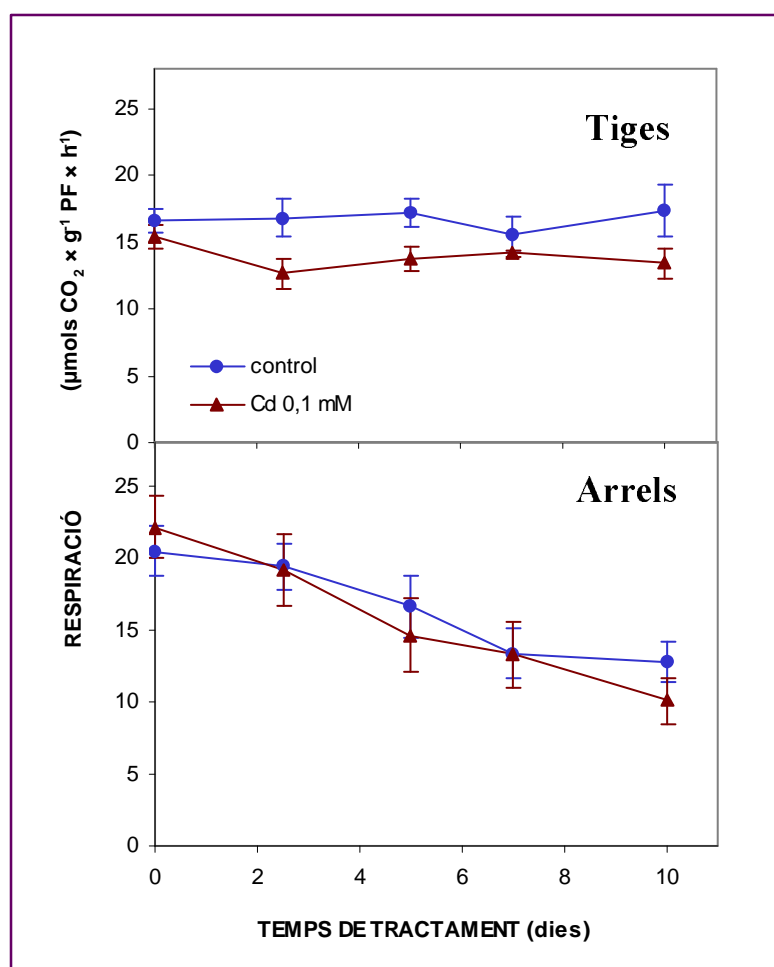
La taxa respiratòria de les plantes control va ser màxima durant els primers tres dies i després va decreixer lentament i progressiva (Figura 31). Tant la magnitud com el model d'evolució dels canvis respiratoris mesurats en les plantes crescudes fins a 10 dies en presència de Ni 0,5 mM o Cd 0,1 mM van ser iguals als de les plantes control, sense que es pogueren detectar diferències estadísticament significatives entre les plantes sotmeses a estrès per qualsevol dels dos metalls i les plantes no estressades.



**Figura 31.** Variació temporal de la taxa de respiració de plantes cultivades en presència de Ni 0,5 mM o de Cd 0,1 mM durant 10 dies (n = 4-14 ).

Per tal de comprovar la possible existència d'un efecte diferencial dels metalls sobre els diferents òrgans, es van estudiar separatament les arrels i les tiges.

Com es pot observar en la Figura 32, la tendència a disminuir la respiració amb l'edat de les plantes rau fonamentalment en les variacions que tenen lloc en les arrels, ja que en les tiges els valors mesurats es mantenen constants al llarg de l'experiment.

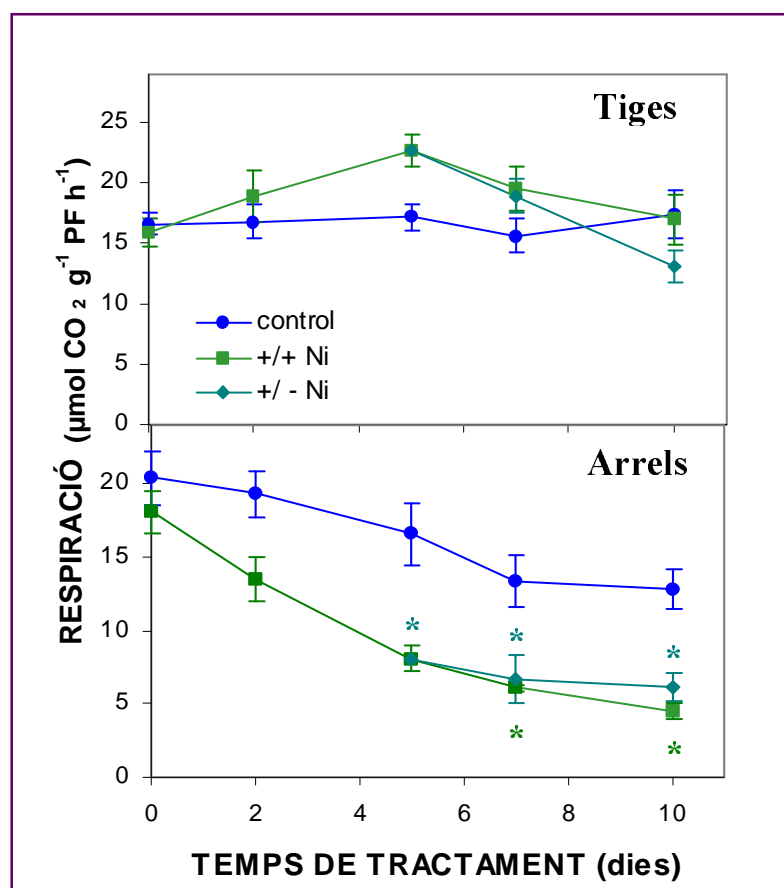


**Figura 32.** Variació temporal de la taxa de respiració d'arrels i tiges de plantes cultivades durant 10 dies en presència de Cd 0,1 mM, en comparació amb els controls, no tractats (n = 4-9).

La presència de Cd 0,1 mM en el medi no va produir variacions significatives en l'activitat respiratòria de les arrels respecte als controls i, si bé en les tiges els valors mesurats van ser lleugerament menors, la respiració es mantingué constant fins als 10 dies de tractament.

Al contrari, la presència de Ni 0,5 mM en la solució de cultiu induí un augment transitori de la respiració de les tiges durant els 5 primers dies de tractament i després va minvar progressivament fins arribar als valors dels controls després de 10 dies d'estrés (Figura 33). En conjunt, la taxa respiratòria mitjana de les tiges durant els 10 dies de l'experiment

va ser major en les plantes tractades amb Ni que en les controls ( $18,8 \pm 1,2$  i  $16,7 \pm 0,3 \mu\text{mol CO}_2 \times \text{g}^{-1} \text{PF} \times \text{h}^{-1}$  respectivament), encara que no es van detectar diferències estadísticament significatives. En contrast amb la resposta de les tiges, en les arrels es produí una clara inhibició de la respiració, que arribà a nivells significatius després de 5 dies d'estrés i fins als 10 dies de tractament.



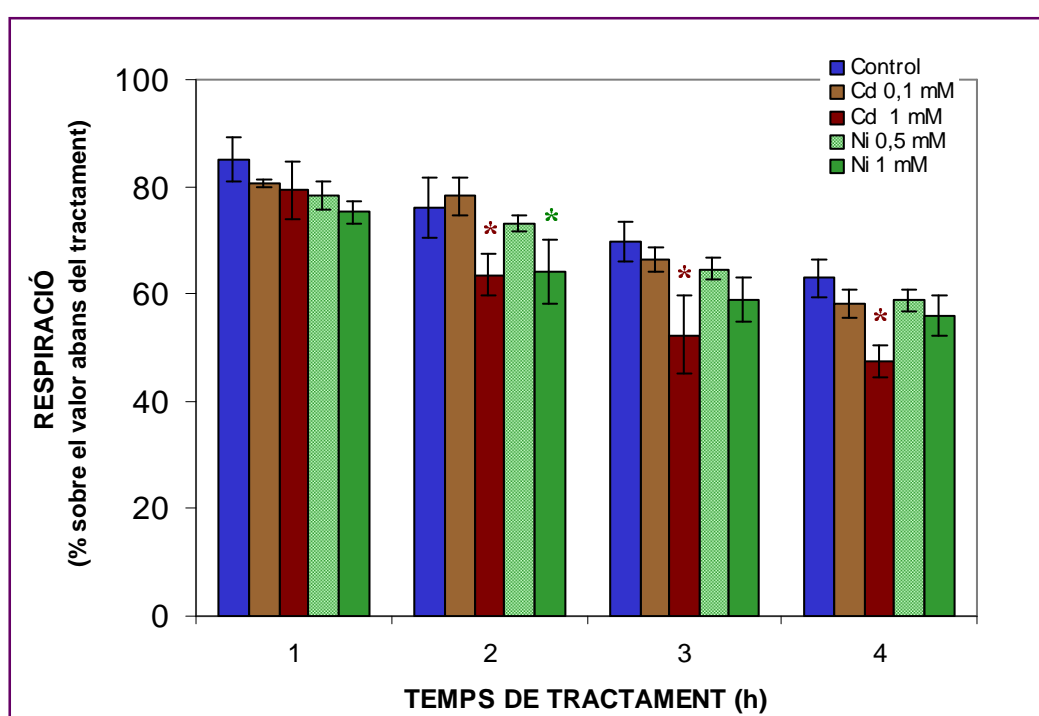
**Figura 33.** Variació temporal de la taxa de respiració d'arrels i tiges de plantes cultivades en presència de Ni 0,5 mM durant 10 dies (+/+ Ni) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall (+/- Ni). Els asteriscs indiquen les diferències significatives amb els controls de la mateixa edat ( $n = 3$  a  $13$ ).

Les tiges i les arrels de les plantes tractades amb Ni també van mostrar una resposta diferent a l'eliminació del metall de la solució de cultiu. Quan les plantes sotmeses a estrés durant 5 dies van ser canviades a nova solució nutritiva, sense metall, per tal d'estudiar la



possibilitat de recuperació de l'estrés, es donà una disminució major de la respiració de les tiges que l'observada en les plantes control durant aqueix període (Figura 33, pannel superior). Per contra, en les arrels es produí un lleuger augment de la taxa respiratòria en relació amb la de les plantes encara mantingudes en solució amb Ni (Figura 33, pannel inferior).

Els efectes dels metalls sobre la respiració de les arrels van ser estudiats addicionalment mitjançant el seguiment de l'acció a curt termini de diverses concentracions dels metalls.



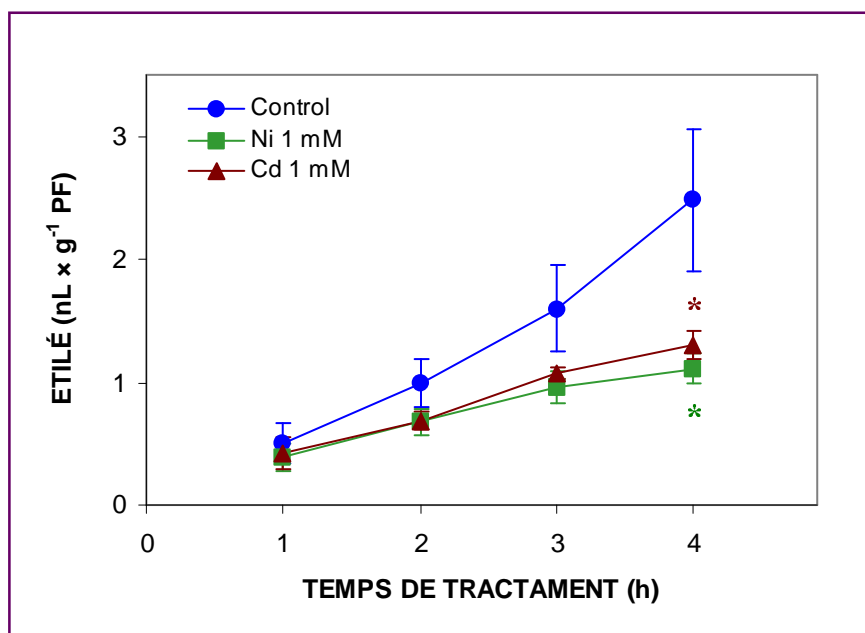
**Figura 34.** Canvis en la taxa de respiració de les arrels, expressada com a percentatge respecte als valors abans del tractament ( $\bar{x} = 17,6 \pm 0,7 \text{ mmol O}_2 \times \text{g}^{-1} \text{ PF} \times \text{h}^{-1}$ ), induïts per l'addició de diferents concentracions de Cd o Ni en el medi. Els asteriscs mostren les diferències significatives amb el control al mateix temps ( $n = 3$ ).

En tots els casos, el consum d' $\text{O}_2$  mesurat disminueix al llarg del temps de mesura, per la qual cosa les dades s'expressen com a percentatge sobre el valor de respiració abans de començar el tractament. Aquests valors es comparen amb els corresponents controls

a diferents intervals de temps fins a 4 h de tractament. Els resultats obtinguts (Figura 34) mostren l'absència d'efecte dels metalls a curt termini i tan sols el Cd a la concentració major utilitzada (1 mM) inhibeix significativament de forma sostinguda la respiració de les arrels, acció que es detecta després de 2 h de tractament.

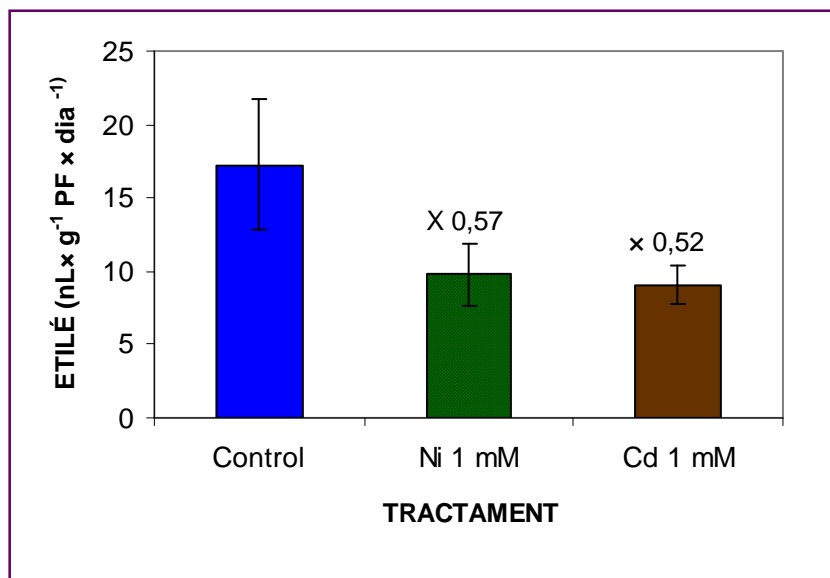
#### 4. EFECTE DEL METALL SOBRE LA PRODUCCIÓ D'ETILÉ

El sotmetiment de les plantes a un xoc per metalls a la concentració d'1 mM condueix a una clara inhibició de l'alliberament d'etilé, considerada l'hormona de l'estrés. Ja des de les primeres hores de tractament (Figura 35) s'evidencia la menor producció que té lloc en les plantes sotmeses a estrés, tant per Cd com per Ni. A mesura que transcorre el temps, aquestes diferències entre les plantes control i les tractades amb qualsevol dels dos metalls van augmentant de manera clara i arriben a nivells significatius a les 4 hores de tractament.



**Figura 35.** Alliberament d'etilé en plantes d'arròs de 16 dies d'edat, durant les 4 primeres hores de tractament amb  $\text{CdCl}_2$  o  $\text{NiCl}_2$  1 mM. Els asteriscs indiquen les diferències significatives amb els controls del mateix temps ( $n = 4 - 5$ ).

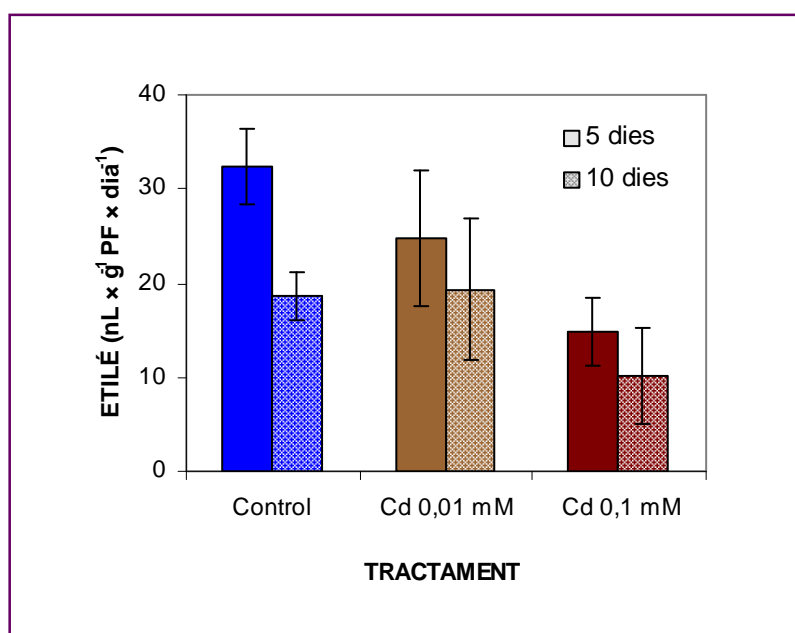
L'efecte inhibitori dels metalls es manté al llarg del temps sense a penes variacions i, a les 24 hores de l'inici del tractament, la producció d'hormona en les plantes control duplica la de les tractades (Figura 36).



**Figura 36.** Alliberament d'etilé en plantes d'arròs de 16 dies d'edat, 24 hores després del tractament amb Cd o Ni. Es mostren els factors de variació respecte al control (n = 5).

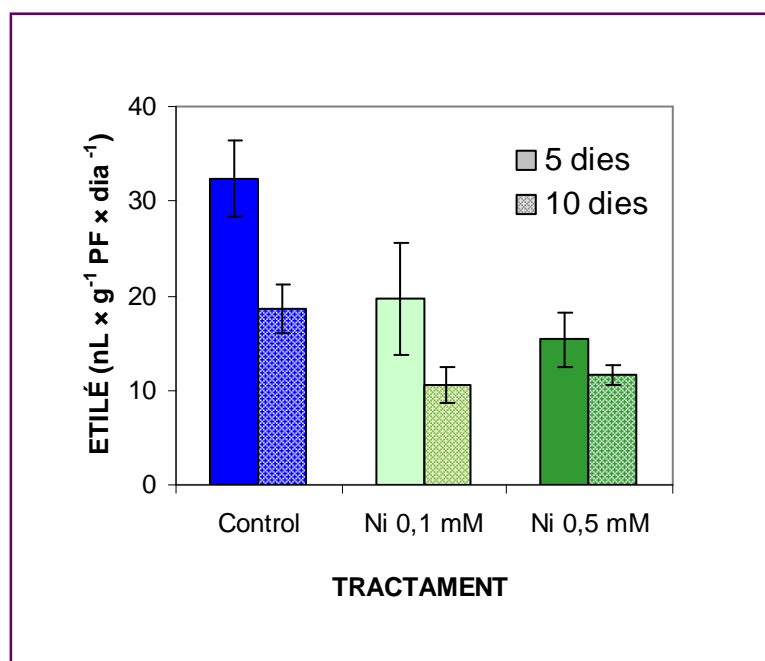
L'acció del Cd i el Ni sobre la producció d'etilé es va estudiar també a més llarg termini en plantes cultivades fins a 10 dies en presència de menors concentracions dels metalls. En les plantes control la producció d'etilé és major en les plantes més joves. Els valors obtinguts són al voltant d'un 40 % majors als 5 que als 10 dies d'iniciat l'experiment (plantes d'11 i 16 dies d'edat, respectivament) (Figura 37). Aquesta caiguda en la producció d'etilé en plantes control és una constant generalitzada també per als tractaments amb els metalls, encara que en aquests els descensos no són tan importants.

Pel que fa als tractaments amb Cd (Figura 37), les plantes van ser sotmeses a dues concentracions de Cd, 0,01 i 0,1 mM. Amb Cd 0,01 mM es dona una reducció del 25 % en l'alliberament d'etilé als 5 dies de tractament, percentatge que gairebé es duplica en el cas de les plantes tractades amb Cd 0,1 mM. Als 10 dies el tractament amb Cd 0,01 mM no presenta pràcticament cap diferència respecte de les plantes control. Aquest fet estaria relacionat amb el fort descens del 40 % que experimenten les plantes control. Malgrat això, la concentració major de Cd sí que provoca una inhibició propera al 50 % si es compara amb plantes control i tractades amb Cd 0,01 mM.



**Figura 37.** Efecte de diferents concentracions de Cd sobre la síntesi d'etilé en plantes d'arròs després de 5 i 10 dies de tractament (n = 3-14).

Igualment, dues concentracions van ser usades per determinar els efectes del Ni sobre la síntesi d'etilé, 0,1 i 0,5 mM (Figura 38). Als 5 dies de tractament la concentració de 0,1 mM, provoca una inhibició d'aproximadament el 40 %, mentre que la concentració més elevada ocasiona una caiguda superior, propera al 50 %, en comparació als controls. Als 10 dies de tractament es pot observar un descens en la producció d'etilé respecte als 5 dies, però de menor magnitud que la que es dona en els controls en el mateix temps, per la qual cosa els valors obtinguts en les plantes tractades amb aquesta concentració de Ni no es diferencien dels de les plantes control. Amb 0,5 mM el descens en la producció de l'hormona és molt acusat inicialment i no tant posteriorment, de manera que donen valors semblants als de la concentració menor als 10 dies de tractament.



**Figura 38.** Efecte de diferents concentracions de Ni sobre la síntesi d'etilé en plantes d'arròs després de 5 i 10 dies de tractament (n = 4-14).

Amb el propòsit de determinar la possible reversió dels efectes observats, es va repetir l'experiment amb les concentracions majors utilitzades per a Cd i per a Ni, i s'eliminaren els metalls del medi 5 dies després de començat el tractament.

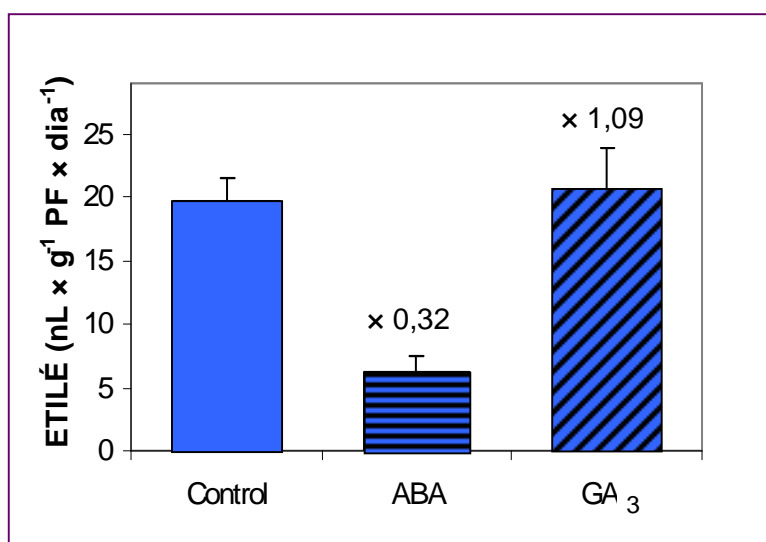
Les dades obtingudes (Taula 4) confirmen les dels experiments anteriors respecte a l'efecte inhibitor dels metalls sobre la producció d'etilé en plantes d'arròs. A més, mostraren que l'alleugeriment de les condicions d'estrés per eliminació dels metalls de la solució nutritiva, dona com a resultat una ràpida recuperació del nivells de producció d'etilé, que augmenta en 5 dies quasi un 30 % en el cas del Ni i més del 50 % en el del Cd respecte de les plantes encara mantingudes en solució amb metalls.

**Taula 4.** Variació de la producció d'etilé en plantes d'arròs cultivades en presència dels metalls Cd 0,1 mM i Ni 0,5 mM durant 10 (plante +/+) o durant 5 dies seguits de 5 dies sense metall (+/-). Els valors es donen en  $\text{nL} \times \text{g}^{-1} \text{PF} \times \text{dia}^{-1}$  ( $n = 2-20$ ). Es presenten també els % sobre el control per al dia 10.

<i>Dies de tractament</i>	<i>Control</i>	<i>Cd 0,1 mM</i>		<i>Ni 0,5 mM</i>	
		<i>+/+</i>	<i>+/-</i>	<i>+/+</i>	<i>+/-</i>
<b>0</b>	20,72 ± 3,51	21,06 ± 3,08		18,44 ± 1,73	
<b>5</b>	29,43 ± 3,32	16,21 ± 1,68		12,53 ± 1,69	
<b>10</b>	18,90 ± 2,07	11,79 ± 2,59	22,24 ± 9,43	11,77 ± 0,98	16,87 ± 9,9
<b>% sobre control</b>	100	62,4	117,7	62,3	89,3

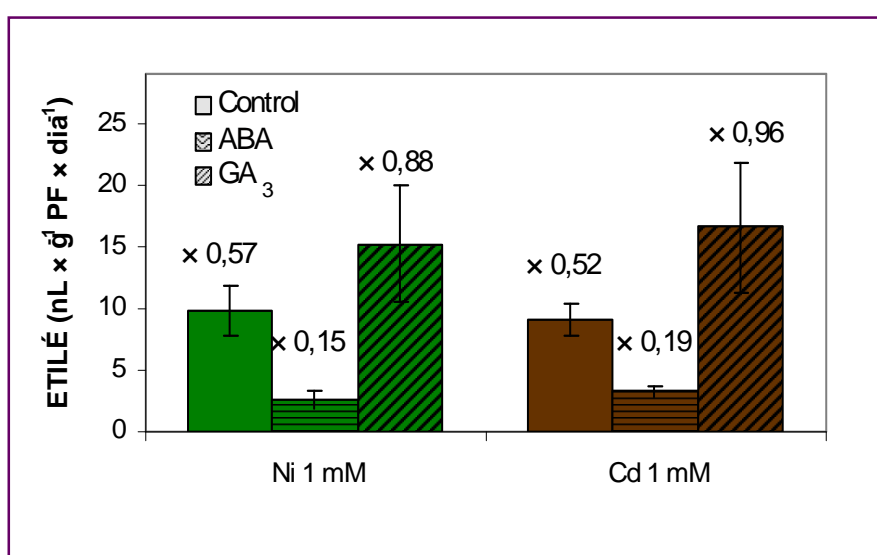
#### 4.1. Modulació de l'efecte dels metalls per ABA i GA<sub>3</sub>.

La presència d'àcid abscísic (ABA) a una concentració de 5 ppm en el medi de cultiu disminueix la producció d'etilé de les plantes d'arròs en aproximadament un 70 %. Per la seua part, la mateixa concentració d'àcid gibberèlic (GA<sub>3</sub>) no provoca cap efecte significatiu (Figura 39).



**Figura 39.** Producció d'etilé per les plantes d'arròs cultivades durant 10 dies en medi nutritiu suplementat amb ABA o GA<sub>3</sub> 5 ppm. Es mostren els factors de variació respecte als controls ( $n = 4$ ).

Adicionalment al seu efecte directe sobre la producció d'etilé, aquestes fitohormones exerceixen una acció moduladora de la dels metalls pesants. Així (Figura 40), quan les plantes tractades hormonalment durant 10 dies són sotmeses a un xoc d'estrés a curt termini amb Cd o Ni a elevada concentració (1 mM), l'efecte de l'ABA és additiu amb el dels metalls, i es dona una reducció en la producció d'etilé de més del 80 %. Contràriament, el GA<sub>3</sub> sembla contrarestar l'efecte dels metalls, i l'alliberament d'etilé en estes plantes no es diferencia significativament del mesurat en les controls.



**Figura 40.** Producció d'etilé per les plantes d'arròs cultivades durant 10 dies en medi nutritiu suplementat amb ABA o GA<sub>3</sub> 5 ppm i sotmeses a un xoc d'estrés per Cd o Ni. Es mostren els factors de variació respecte als controls no subjectes a estrés (n = 3).



---

## **DISCUSSIÓ**

---

## DISCUSSIÓ

### 1. FUNCIONALITAT DE LES MEMBRANES: EFECTES DIFERENCIALS DE Cd I Ni

Els dos metalls investigats, Cd i Ni, semblen exercir un efecte diferent sobre la funcionalitat de les membranes de les cèl·lules d'arròs. Les variacions mesurades en els dos paràmetres estudiats pel que fa al cas, la diferència de potencial transmembrana ( $E_m$ ) i la permeabilitat, mostren característiques diferencials en funció del metall. Així, mentre l'addició de Ni 0,5 mM a la solució de perfusió produeix una despolarització de la membrana de les cèl·lules corticals de les arrels que és ràpidament seguida per una repolarització fins arribar als valors inicials en pocs minuts (Figures 19 i 21), la induïda per Cd, tant a 0,1 com 1 mM provoca una despolarització més intensa i mantinguda (Figures 20 i 21). Durant les 2 – 3 primeres hores de tractament amb Cd s'obtenen uns valors d' $E_m$  propers a  $-50$  mV, del mateix ordre que els mesurats en presència de desacobladors metabòlics, com ara CCCP o  $\text{NaN}_3$ , i que representen, per tant, el potencial de difusió per a la solució de perfusió utilitzada. Valors semblants als obtinguts en aquest treball han sigut mesurats per altres autors en cèl·lules radiculars d'arròs amb solució de perfusió de la mateixa concentració de  $\text{K}^+$  (Wang et al., 1994).

Els resultats obtinguts amb els tractaments amb Cd estan d'acord amb els de Aidid i Okamoto (1992) per a tiges d'*Impatiens*. Segons els resultats d'aquests autors el Cd a una concentració d'1 mM despolaritza la component del potencial dependent de la respiració en les cèl·lules de la interfície xilema/simplast, mentre que no té efecte sobre la permeabilitat passiva de la membrana. A menor concentració (0,5 mM), però, el potencial de membrana no es veu afectat. És possible que les arrels siguin més sensibles al Cd que les tiges ja que, com en el cas de l'arròs, també Kennedy i Gonsalves (1978) han observat una forta despolarització causada per Cd 0,1 mM en les arrels de dacsà. Per altra banda, Aidid i Okamoto (1992) indiquen que sota les seues condicions experimentals l'efecte inhibitor del Cd és irreversible, fins i tot

després d'eliminar el metall de la solució de perfusió. Açò contrasta amb els resultats obtinguts en les arrels d'arròs (Figures 20 i 21) en les quals es dona una repolarització espontània en presència de Cd.

Els resultats obtinguts en aquest treball es poden interpretar assumint que el Cd inhibeix la component activa del potencial de membrana, però la possible existència de mecanismes de destoxicació podrien revertir l'efecte. Es coneixen diversos mecanismes de destoxicació de metalls pesants en plantes superiors (Jackson et al., 1990; Ernst et al., 1992; Meharg, 1994; Hall 2002), incloent-hi mecanismes induïbles, com ara la inducció per Cd de la fitoquelatina sintasa (Zenk, 1996; Cobbett, 1999). En aquest context, és interessant notar que treballs anteriors amb arròs han mostrat que la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmàtica de les cèl·lules radiculars és inhibida per Cd quan s'aplica *in vitro* però no després de 5 o 10 dies de l'aplicació *in vivo* (Ros et al., 1992). Altres autors també han indicat que l'ATPasa de les arrels d'arròs és molt sensible a la inhibició per Cd *in vitro*, la qual cosa no es correlaciona amb la tolerància que mostren les plantes intactes (Obata et al., 1996). Aquest fet pot implicar que inicialment el Cd pot afectar la component activa del potencial de membrana, a través d'una inhibició directa de la P-ATPasa, i no indirectament per inhibició de la respiració. Un efecte directe del Cd sobre l'activitat enzimàtica de l'ATPasa també ha sigut observat en arrels de diverses espècies (Keck, 1978; Lindberg i Wingstrand, 1985; Fodor et al., 1995). Aquests últims autors indiquen que l'acció del Cd està relacionada probablement amb la capacitat d'aquest metall per a formar complexos amb l'ATP, amb el consegüent descens de la concentració del substrat de l'ATPasa, el Mg-ATP.

Per tant, s'han d'assumir altres efectes del Cd sobre la component activa d'Em, diferents a la inhibició de la respiració. De fet, tot i que la major concentració de Cd utilitzada (1 mM) causa un descens de la respiració a curt termini (Figura 34), les variacions d'Em i de la respiració observades no coincideixen en el temps. Així, el potencial de membrana comença a incrementar-se unes 3 hores després de l'addició de Cd 0,1 o 1 mM, mentre que la respiració es mantenia en aqueixos moments per davall de la dels controls en les mostres tractades amb Cd 1 mM. A més a més, les dues concentracions estudiades afecten l'Em de forma semblant, mentre que el consum d'O<sub>2</sub> no és modificat significativament per Cd 0,1 mM (Figures 20 i 34).

Addicionalment a l'efecte inicial sobre la component activa de l'Em, no es pot descartar una possible acció del Cd sobre la component passiva. L'augment de la permeabilitat de la membrana observada en presència del metall (Figures 23 i 24), que també ha sigut observada per altres autors en altres espècies (De Filippis, 1979; Fuhrer, 1982), recolzarien aquesta hipòtesi.

El Ni, per altra part, sembla tenir un mecanisme d'acció diferent al del Cd. El tractament amb Ni 0,5 mM provoca una forta inhibició del creixement de les plantes i, igualment que el Cd 0,1 mM, tampoc no mostra cap efecte sobre la respiració durant les primeres hores de tractament (Figura 34) malgrat que el seu efecte a llarg termini és més important que el de Cd (veure Secció 2 d'aquesta Discussió). A diferència del que succeeix amb Cd, no es dona una despolarització sostinguda en presència del metall i, fins i tot, algunes plantes tractades amb Ni presenten valors d'Em majors que els controls. Aquest efecte podria deure's a l'estimulació de l'extrusió de  $H^+$ , demostrada per al Ni i altres cations divalents amb arrels de dacsa (Cocucci i Morgutti, 1986). D'acord amb aquests autors, l'entrada del Ni en les cèl·lules es dona a favor de gradient electroquímic per un mecanisme d'uniport, la qual cosa indueix l'extrusió de  $H^+$  per compensar les càrregues elèctriques.

Però la compensació de càrregues també dona lloc a l'eixida de  $K^+$  que, en absència de mecanismes destoxificadors, comporta a llarg termini una pèrdua important de  $K^+$ . De fet, en aquest treball hem pogut mesurar un descens progressiu dels nivells de  $K^+$  en les arrels al llarg del temps de cultiu en presència de Ni (Figura 28) que, per altra banda, podria estar relacionat amb les alteracions del balanç hídric observades en les plantes sota estrés per Ni (Taules 2 i 3). Les pèrdues de  $K^+$  podrien, doncs, estar causades per la compensació electroquímica durant la incorporació dels metalls, més que per canvis de la permeabilitat de la membrana (Buwalda et al., 1988). En el cas del Ni en plantes d'arròs no s'observen efectes sobre la permeabilitat en les arrels quan es determina l'eixida de  $K^+$  en valors absoluts, però sí quan s'expressa en funció del contingut intern (Figures 26 i 29). Murphy et al. (1999) indiquen que una pèrdua de  $K^+$  a llarg termini es correlaciona inversament amb la tolerància al Cu de diferents ecotips d'*Arabidopsis*, mentre que l'eixida a curt termini, que no es dona amb arròs (Figura 23), més que com un símptoma de toxicitat

(danys en membranes), pot associar-se a mecanismes de destoxificació del Cu (alliberament al medi d'àcids orgànics).

## 2. METABOLISME ENERGÈTIC: EFECTES SOBRE LA RESPIRACIÓ

La presència de Ni 0,5 mM o Cd 0,1 mM en el medi de cultiu afecta dràsticament els processos bàsics del metabolisme energètic, fotosíntesi i respiració. Sota les condicions de cultiu utilitzades, les plantes depenen de les reserves emmagatzemades en la llavor durant els primers dies i, si creixen en solució nutritiva control, passen a ser autònomes energèticament uns 7 dies després de l'inici de la il·luminació (Figura 30). L'addició dels metalls al medi canvia aquesta pauta temporal del desenvolupament de les plantes, ja que redueix dràsticament l'activitat fotosintètica i dóna lloc a un balanç favorable a la respiració. En cap moment del tractament d'estrés per metalls s'arriba al punt de compensació del CO<sub>2</sub> (PC<sub>CO2</sub>). La respiració, per tant, no sembla ser afectada en el mateix grau que la fotosíntesi. Altres autors han mostrat una inhibició de la fotosíntesi per metalls pesants, concomitant amb augments (Lamoreaux i Chaney, 1978) o absència d'efecte sobre la respiració (Schlegel et al. 1987).

Les plantes d'arròs mostren una sensibilitat menor al Ni que altres plantes de cultiu. Així, l'addició de Ni 0,1 mM al medi nutritiu no afecta el creixement de les plantes (Figura 10), mentre que s'ha indicat que una concentració 10 vegades menor causa una reducció del 30 al 40 % de biomassa en pèsol o en iute (Gabbrielli et al., 1999; Saleh, 2002). A 0,5 mM, però, el creixement d'arròs es veu severament afectat (Figures 10 i 15). Part de la diferència en pes fresc respecte als controls es pot adscriure a un descens progressiu del contingut hídric en les plantes tractades (Taula 2). L'existència d'una correlació negativa entre la concentració de Ni i el contingut hídric ha sigut indicada també en pèsol (Gabbrielli et al., 1999). Tanmateix, el descens en contingut hídric no explica totalment la diferència en creixement observada. Sota l'assumpció que la respiració constitueix un dels millors predictors del creixement (Smith et al., 2001), caldria esperar que l'important descens causat

per Ni hagués estat acompanyat de disminucions significatives de la respiració, cosa que no succeeix (Figura 31).

Investigacions realitzades per Burzynski i Buczek (1994) amb cogombre mostren que el tractament amb Ni afecta negativament l'absorció de  $\text{NO}_3^-$ , un procés altament dependent de la provisió d'energia, però no modifica la taxa respiratòria a curt termini. Aquests autors indiquen que el consum d' $\text{O}_2$  tan sols minva a llarg termini o bé per tractament amb concentració elevada de Ni (1 mM). En arròs, les concentracions que afecten el creixement de les plantes o fins i tot majors (0,5 i 1 mM) no alteren la respiració de les arrels a curt termini (Figura 34). Açò contrasta amb l'efecte del Cd 1 mM, que indueix un descens significatiu a partir de les 2 hores de tractament. Sembla que l'efecte del Ni pot no ser immediat, com han indicat abans altres autors (Zornoza et al., 1999; Kukier i Chaney, 2001). Açò s'ajusta també als resultats obtinguts en aquest treball en relació amb el seu efecte sobre la permeabilitat de les membranes, que tampoc no es manifesta de forma ràpida (Figures 23 i 25), com és el cas del Cd.

Quan l'efecte dels metalls sobre la respiració s'estudia a llarg termini en arrels i tiges separatament es pot comprovar que el Cd 0,1 mM, que no presenta acció immediata sobre les arrels, tampoc no l'exerceix al llarg del temps de cultiu, ni en arrels ni en tiges. Fins als 10 dies de tractament amb aquest metall els valors obtinguts no es diferencien del control (Figura 32). Al seu torn, el Ni provoca una clara inhibició de la respiració en les arrels i, alhora, un lleuger augment en les tiges (Figura 33). Encara que, d'acord amb Pinel et al. (2003), el transport de Ni de les arrels a la part aèria està afectat per nombrosos factors, Gerendás et al. (1999) indiquen que, en comparació amb altres metalls, el Ni és bastant mòbil dins les plantes. Rubio et al. (1994) han mostrat que en arròs i en contrast amb el que succeeix amb Cd, que presenta una baixa mobilitat, una proporció elevada del Ni absorbit per les arrels es transporta cap a les tiges. Per tant, cal esperar que el Ni pugui exercir algun efecte en la part aèria. De fet, el grau de reducció del creixement de les plantes (Figures 10 i 15) no pot ser explicat per canvis en la biomassa de les arrels exclusivament, ja que aquestes representen únicament al voltant del 15 % del pes total (Rubio et al., 1994). Tant el pes fresc de les arrels com el de les tiges

són reduïts significativament pel tractament amb Ni (Figures 16 i 17). El lleuger increment de la respiració en les tiges causat pel metall (Figura 33) ocorre, per tant, de forma concomitant amb la disminució del creixement. El descens de la respiració en les arrels sembla compensat per l'augment observat en les tiges i, en conjunt, a nivell de planta sencera no es detecta cap efecte.

És un fet conegut que el Ni inhibeix fortament el creixement de les arrels (Woolhouse, 1983), però s'ha indicat per a diverses espècies herbàcies, incloent-hi cereals com ara el blat, que els seus efectes són més pronunciats en tiges (Ewais, 1997; Kovacevic et al., 1999). En contrast, el nivell d'estrés imposat en aquest estudi pareix exercir un major efecte en les arrels d'arròs que en les tiges, la qual cosa està d'acord amb resultats de Gabbrielli et al. (1999) per a pèsol. Aquests autors indiquen que els efectes tòxics del Ni són marcadament superiors en les arrels. En arròs, tant el creixement de l'arrel com la demanda energètica estan dràsticament reduïts pel tractament de Ni i, consegüentment, l'alleugeriment de l'estrés per eliminació del metall del medi indueix una recuperació tant del pes fresc com de la respiració. Per contra, l'activitat respiratòria de les tiges es manté o fins i tot augmenta, pel tractament amb el metall. Com que el creixement de l'òrgan disminueix, una major proporció de l'energia produïda per la respiració en les tiges és utilitzada per al manteniment dels teixits sotmesos a estrés. La tendència a minvar la respiració que té lloc després de l'eliminació del metall, s'ajusta bé a aquesta hipòtesi. Canvis en la distribució de l'energia resultant de la respiració entre creixement i manteniment han sigut descrits per a arrels de plantes sota diferents estressos (Collier et al., 1993; Lambers et al., 2002) i és el que sembla ocórrer també en les tiges d'arròs sota estrés per Ni.

### **3. SÍNTESI D'ETILÉ: REDUCCIÓ PER Cd I Ni**

Està àmpliament acceptat que una resposta generalitzada de les plantes en situacions d'estrés és l'augment de la producció d'etilé, ja que existeixen nombroses evidències que sota estrés biològic, físic o químic s'incrementa la seua síntesi (Hyodo, 1991; Inaba et al., 1991; Wang i Gemma, 1991; Chen i

---

Kao, 1994; Lutts et al., 1996; Arshad i Frankenberger, 2002; Sharp i LeNoble, 2002).

Els metalls pesants no són una excepció i la bibliografia existent dins de la literatura científica així ho indica; l'estrés per metalls pesants en plantes provoca un increment en la síntesi d'etilé (Rodecap i Tingey, 1981; Gora i Clijsters, 1989; Lu i Kirkham, 1991; Mattoo et al., 1992; Peng i Yamauchi, 1992; Kao, 1995).

Malgrat això, els nostres resultats mostren que els tractaments amb els metalls Ni i Cd redueixen la capacitat de sintetitzar etilé en plantes d'arròs, fins i tot a concentracions que no provoquen efectes detectables sobre el creixement (Figures 37 i 38 *versus* Figures 10 i 11). Aquesta caiguda en la producció d'etilé respecte dels controls es manté fins al final de l'experiment, i s'aprecia una tendència a augmentar quan els metalls són eliminats del medi (Taula 4).

Tot i que, com s'ha indicat adés, abunden més els estudis que mostren un augment d'etilé sota estrés per metalls, també altres autors han indicat l'efecte contrari, la qual cosa estaria d'acord amb els nostres resultats. Així, els obtinguts per Bhattacharjee (1997/1998) amb concentracions de Cd semblants a les utilitzades en aquest treball, mostren com concentracions creixents d'aquest metall produeixen una inhibició de la síntesi d'etilé en plantes d'amarant 7 dies després d'iniciat el tractament. Poschenrieder et al., (1993) també aporten dades de la inhibició en l'evolució d'etilé en bajoca i de la seua dependència de la concentració de Cr. Vassilev et al. (2004), per altra banda, refereixen un efecte del Cd dependent de la concentració aplicada, de forma que les concentracions baixes augmenten la producció d'etilé en plantes d'ordi, mentre que a elevades concentracions es dona una disminució, i alhora canvis en el contingut total d'àcids grassos de les membranes cloroplàstiques.

Diversos estudis mostren que diferents cations divalents, com ara el  $\text{Co}^{2+}$  o el  $\text{Ni}^{2+}$  o també algun monovalent, com la  $\text{Ag}^{2+}$ , a concentracions dins del rang mil·limolar, inhibeixen la síntesi d'etilé (Beyer 1976; Lau i Yang, 1976; Abeles et al., 1992; Pennazio i Roggero, 1992). És sabut que l'enzim ACC oxidasa és fortament inhibida per quelants metàl·lics (Apelbaum et al., 1981; Tsai i Chiang, 1994) i que necessita, tant *in vivo* com *in vitro*, del  $\text{Fe}^{2+}$  com a



cofactor essencial (Bouzayen et al., 1991; Ververidis i John, 1991; Fernández-Maculet i Yang, 1992). Alguns autors indiquen que la inhibició per Ni estaria relacionada amb l'acció del metall sobre aquest l'enzim (Pennazio i Roggero, 1992). Yang i Hoffman (1984) situen l'ACC oxidasa en les membranes i com a requisit fonamental per a la seua funcionalitat, la integritat d'aquestes. Alguns autors han suggerit que els efectes tòxics de metalls pesants com el Cr sobre les membranes, serien els responsables de la inhibició de la síntesi d'etilé (Vázquez et al., 1987). No obstant, altres investigacions situen majoritàriament l'enzim en la fracció citosòlica (Fernández-Maculet i Yang, 1992; Chung et al., 2002).

El descens dels nivells d'etilé causat per l'estrés podria deure's també a les característiques de la planta utilitzada en aquest estudi. Citant a Larcher (2003), es pot dir que diferents espècies responen de forma diferent a un mateix estrés, en funció de la seua "norma de reacció" genèticament determinada. Així, en moltes plantes semiaquàtiques, contràriament al que ocorre en la majoria de plantes terrestres, el creixement és promogut per etilé (Abeles, 1992; Reid, 1995).

En aquest tipus de plantes, com ara l'arròs (Kende et al., 1998; Sauter, 2000) o el *Rumex* (Voesenek et al., 2003), s'ha descrit que l'augment d'etilé en les parts submergides provoca un descens dels nivells d'ABA, la qual cosa condueix a un increment en la sensibilitat a GAs i a l'elongació de les tiges. Però addicionalment a l'efecte de l'etilé sobre les GAs, també s'ha demostrat que les GAs augmenten la síntesi d'etilé (Kaneta et al., 1997). En el present treball hem pogut comprovar que, en contrast amb el que succeeix amb l'ABA, si bé l'àcid gibberèl·lic no afecta la producció d'etilé quan la planta no es troba sota estrés (Figura 39), sí que l'augmenta en les plantes tractades amb metalls i contraresta el seu efecte inhibidor (Figura 40).

Sembla clar que l'efecte dels metalls sobre la producció d'etilé en el cas de l'arròs és d'inhibició. El fet que aquest descens es done fins i tot quan els metalls s'apliquen a concentracions baixes que no afecten el creixement de les plantes, suggereix que no és un simple reflex de danys produïts per l'estrés.

---

## **CONCLUSIONS**

---

## CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en les nostres investigacions sobre les respostes fisiològiques a l'estrés pels metalls Cd i Ni en plantes d'arròs, poden resumir-se en les conclusions següents:

- 1) L'efecte dels metalls Cd i Ni sobre la funcionalitat de les membranes mostra trets diferencials.
  - El Cd presenta una clara acció sobre els dos vessants estudiats. Tant la permeabilitat de les membranes com la diferència de potencial transmembrana ( $E_m$ ) es veuen afectades per aquest metall, que afecta la component activa d' $E_m$  de forma transitòria.
  - Contràriament, el Ni no provoca alteracions d' $E_m$  en les arrels, ni es detecten augments de la permeabilitat a curt termini. En tiges, el tractament a llarg termini amb Ni sí que afecta la permeabilitat de les membranes.
  - Al llarg del temps de cultiu amb el Ni es dona una disminució del contingut de  $K^+$  a les arrels, que podria estar relacionada amb la símptomatologia associada a l'estrés per aquest metall, ja que es detecta una reducció important del contingut hídric de les plantes tractades.
- 2) Ambdós metalls afecten dràsticament l'activitat fotosintètica de les plantes i a nivell de planta sencera, no es detecten canvis en l'activitat respiratòria. Respecte a açò, també apareixen efectes distintius dels dos metalls:
  - El Cd no altera la taxa respiratòria de tiges ni d'arrels, quan es mesuren separatament, excepte a concentracions elevades.
  - El Ni provoca una clara inhibició de la respiració en les arrels, mentre que augmenta lleugerament la de les tiges. Aquest efecte indica un canvi en la distribució de l'energia que resulta de la respiració entre creixement i manteniment dels teixits.

- 3) Els dos metalls presenten un efecte comú sobre la producció d'etilé. Contràriament al que succeeix en altres espècies, el Cd i el Ni indueixen una disminució de l'alliberament de l'hormona. El GA<sub>3</sub>, però no l'ABA, interacciona amb l'efecte inhibitori dels metalls, i augmenta la producció d'etilé fins a valors semblants als dels controls.

En conjunt, podem dir que existeix una clara i ràpida acció del Cd sobre les propietats de les membranes, que es manifesta ja en els experiments a curt termini (hores). En contrast, els efectes del Ni s'exerceixen a més llarg termini (dies) i, d'entre els processos fisiològics estudiats, es manifesten particularment en canvis en la respiració. Tots els efectes detectats, i per als dos metalls estudiats, poden ser revertits, al menys parcialment, per l'eliminació dels metalls del medi on creixen les plantes.

---

## **BIBLIOGRAFIA**

---

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Abeles FB (1973) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York.
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992) Ethylene in Plant Biology, Ed 2. Academic Press, New York.
- Ahonen-Jonnarth U, Finlay RD (2001) Effects of elevated nickel and cadmium concentrations on growth and nutrient uptake of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant Soil*. 236:129 -138.
- Aidid SB, Okamoto H (1992) Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem/symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*. *Environ. Exp. Bot.* 32, 439 - 448.
- Apelbaum A, Burgoon AC, Anderson JD, Solomos T, Lieberman M (1981) Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiol.* 67: 80 - 84.
- Arshad M, Frankenberger WT Jr (2002) Ethylene: agricultural sources and applications. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York.
- Aurisano N, Bertani A, Reggiani R (1995) Involvement of calcium and calmoduline in protein and aminoacid metabolism in rice roots under anoxia. *Plant Cell Physiol.* 36: 1525 -1529.
- Bajaj S, Mohanty A (2005) Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnol. J* 3: 275 – 307.
- Baker AJM (1987) Metal tolerance. *New Phytol.* 106: 93 -111.
- Becerril JM, Muñoz-Rueda A, Aparicio-Tejo P, González-Murua C (1988) The effects of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 357 - 363.
- Bertrand M, Guary JC, Schoefs B (2001) How plants adapt their physiology to an excess of metals. In Passarakli M (ed.) *Handbook of plant and crop physiology*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp 751 - 761.

- Beyer EM (1976) Silver ion: a potent antiethylene agent in cucumber and tomato. *HortScience*. 11: 195 -196.
- Bharali B, Bates JW (2004) Influences of extracellular calcium and iron on membrane sensitivity to bisulphite in the mosses *Pleurozium schreberi* and *Rhytiadelphus triquetrus*. *J. Briol.* 26: 53 - 59.
- Bhattacharjee S (1997-1998) Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. *Biol. Plant.* 40: 131 -135.
- Blaudez A, Botton B, Charlot M (2000) cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology-UK*. 146: 1109 - 117.
- Bollard EG (1983) Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition. *In: A Läubli, RL Bielecki (eds) Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol15B Inorganic plant nutrition*. Berlin: Springer Verlag, p 695 - 744.
- Bouzayen M, Felix G, Latche A Pech JC, Boller T (1991) Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Planta*. 184: 244 - 247.
- Breckle S-W, Kahle H (1992) Effect of toxic and heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Vegetatio* 101: 43 - 53.
- Brune A, Urbach W, Dietz KJ (1994) Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanism involved in zinc tolerance. *Plant, Cell Environ.* 17: 153 - 162.
- Brune A, Urbach W, Dietz KJ (1995) Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. *New Phytol.* 129: 403 - 409.
- Burzynski M, Buczek J (1994) The influence of Cd, Pb, Cu and Ni on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by cucumber seedlings. I. Nitrate uptake and respiration of cucumber seedlings roots treated with Cd, Pb, Cu and Ni. *Acta Physiol. Plant.* 16: 291 - 296.

- Buwalda F, Thomson CJ, Steigner W, Barrett-Lennard EG, Gibbs J, Greeway H (1988) Hypoxia induces membrane depolarization and potassium loss from wheat roots but does not increase their permeability to sobitol. *J Exp. Bot.* 39: 1169 - 1183.
- Carpentier R (2001) The negative action of toxic divalent cations on the photosynthetic apparatus. In Passarakli M (ed) *Handbook of plant and crop physiology*. New York: Marcel Dekker, Inc, p. 763 - 772.
- Chen SL, Kao CH (1994) Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Science*. 104: 135-138.
- Chung MC, Chou SJ, Kuang LY, Chang YY, Yang SF (2002) Subcellular localization of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in apple fruit. *Plant Cell Physiol.* 43: 549 - 554.
- Cobbett CS (1999) A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *TIPS* 4, 335 - 337.
- Cocucci M, Morgutti S (1986) Stimulation of proton extrusion by  $K^+$  and divalent cations ( $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) in maize root segments. *Physiol. Plant.* 86: 497 -501.
- Collier DE, Ackermann F, Somers DJ, Cummins WR, Atkin OK (1993) The effect of aluminum on root respiration in an aluminum-sensitive and an aluminum-tolerant cultivar of *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* 87: 447 - 452.
- Davies KL, Davies MS, Francis D (1991) Zinc-induced vacuolation in root meristematic cells of *Festuca rubra* L. *Plant, Cell Environ.* 14: 399 - 406.
- De Filippis LF (1979) The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 39 - 49.
- Ella ES, Kawano N, Yamauchi Y, Tanaka K, Ismail AM (2003) Blocking ethylene perception enhances flooding tolerance in rice seedlings. *Functional Plant Biol.* 30: 813 - 819.
- Ernst WHO, Verkleij JAC, Schat H (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 41: 229 - 248.



- Ewais EA (1997) Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and protein of weeds. *Biol. Plant.* 39: 403 - 410.
- Fernandez-Maculel JC, Yang SF (1992) Extraction and partial characterisation of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. *Plant Physiol.* 99: 751 - 754.
- Fodor E, Szabó – Nagy A, Erdei L (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup> -ATPase activity of plasma membrana from sunflower and wheat roots. *J Plant Physiol.* 147: 87 - 92.
- Foy CD, Chaney RL, White MC (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 511 - 566.
- Fuhrer J (1982) Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 70: 162 -167.
- Gabrielli R, Pandolfini T, Espen L, Palandri MR (1999) Growth, peroxidase activity and cytological modifications in *Pisum sativum* seedlings exposed to Ni<sup>2+</sup> toxicity. *J Plant Physiol.* 155: 639 - 645.
- Gerendás J, Polacco JC, Freyermuth SK, Sattelmacher B (1999) Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J Plant Nutr. Soil Sci.* 162: 241 - 256.
- Gimeno-García E, Andreu V, Boluda R (1996) Heavy metals incidence in the application of organic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ. Pollut.* 92: 19 - 25.
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Glaba YY, Raskin I (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5973 - 5977.
- Gora L, Clijsters H (1989) Effect of copper and zinc on the ethylene metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. *In:* Clijsters H, De Proft M, Marcelle R, Van Poucke M (eds) *Biochemical and physiological aspects of ethylene productions in lower and higher plants.* pp. 219 - 228. Kluwer Acad. Publ. Dordrech.

- Greger M, Lindberg S (1987) Effects of Cd<sup>2+</sup> and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). II. Net uptake and distribution of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>. *Physiol. Plant.* 69: 81 - 86.
- Greger M, Brammer E, Lindberg S, Larsson G, Idestam-Almquist J (1991) Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beets (*Beta vulgaris*) related to mineral provision. *J. Exp. Bot.* 42: 729 - 737.
- Grichko VP, Glick BR (2001) Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 1 - 9.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp. Bot.* 53 (336): 1 - 11.
- Hernández LE, Carpena-Ruiz, Gárate A (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J Plant Nutr.* 12: 1581-1598.
- Hoffman-Benning S, Kende H (1992) On the role of ABA and GA in the regulation of growth in rice. *Plant Physiol.* 99: 1156 -1161.
- Hou YT, Kao CH (1993) Characteristics of the induction of ethylene by cadmium in detached rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 34:163 -168.
- Hsu YT, Kao CH (2003) Role of ABA in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Cell Environ.* 26: 867 - 874.
- Hyodo H, tanaka K, Yoshisaka J (1985) Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in wounded mesocarp tissue of winter squash fruit and the effects of ethylene. *Plant Cell Physiol.* 26 (1): 161-167.
- Hyodo H (1991) Stress/wound ethylene, *In: Mattoo AK, Suttle JC (eds). The Plant Hormone Ethylene.* CRC Press. pp: 43 - 65.
- Inaba A, Gao JP, Nakamura R (1991) Induction by electric currents of ethylene biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruits. *Plant Physiol.* 97: 1161-1165.
- Jackson MB (1985) Ethylene and responses of plant to soil waterlogging and submergence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 145 - 174
- Jackson PJ, Unkefer PJ, Delhaize E, Robinson NJ (1990) Mechanisms of trace

- metal tolerance in plants. *In*: F Katterman (ed) Environmental injury to plants. pp 231-255. Academic Press. San Diego.
- Kaneta T, Kakimoto T, Shibaoka H (1997) Gibberellin A<sub>3</sub> cause a decrease in the accumulation of mRNA for ACC oxidase and in the activity of the enzyme in azuki bean (*Vigna angularis*) epicotyls. *Plant Cell Physiol.* 38: 1135 -1141.
- Kao CH (1995) Stimulation of ethylene production in detached rice leaves by vanadate. *Plant Groth Regul.* 18 (3): 161 - 164.
- Keck RW (1978) Cadmium alteration of root physiology and potassium ion fluxes. *Plant Physiol.* 62: 94 - 96.
- Kende H, van der Knaap E, Cho HT (1998) Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiol.* 118: 1105 - 1110.
- Kennedy CD, Gonsalves FAN (1987) The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H<sup>+</sup> efflux of excised roots. *J. Exp. Bot.* 38: 800 - 817.
- Kepeczynski J, Kepeczynska E, Bihun M (2003) The involvement of ethylene in the release of primary dormancy in *Amaranthus retroflexus* seeds. *Plant Growth Regul.* 39: 57-62.
- Kovacevic G, Kastori R, Merkulov IJ (1999) Dry matter and leaf structure in young wheat plants as affected by cadmium, lead, and nickel. *Biol. Plant.* 42:119 -123.
- Krishnamurti GSR, Huang PM, Van Rees (1996) Studies on soil rhizosphere: Speciation and availability of Cd. *Chem. Spec. Bioavail.* 8: 23 - 28.
- Kukier U, Chaney RL (2001) Amelioration of nickel phytotoxicity in muck and mineral soils. *J Environ. Qual.* 30:1949 -1960.
- Lambers H, Atkin OK, Millenaar FF (2002) Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. *In*: Waisel Y (ed) *Plant roots: the hidden half.* New York: Marcel Dekker Inc; p. 521 - 552.

- Lamoreaux RJ, Chaney, W.R. (1978) The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol. Plant.* 43: 231-236.
- Larcher W (2003) *Physiological Plant Ecology*. Berlin: Springer Verlag
- Lau OL, Yang SF (1976) Stimulation of ethylene production in the mung bean hypocotyls by cupric ion, calcium ion, and kinetin. *Plant Physiol.* 57: 88 - 92.
- Lindberg S, Wingstrand G (1985) Mechanism for  $\text{Cd}^{2+}$  inhibition of  $(\text{K}^+ + \text{Mg}^{2+})$  ATPase activity and  $\text{K}^+(\text{}^{86}\text{Rb}^+)$  uptake in roots of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.* 63: 181-186.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2001) Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *J Environ. Qual.* 30:1919 -1926.
- Lu WP, Kirkham MB (1991) Genotypic tolerance to metals as indicated by ethylene production. *Water Air Soil Pollut.* 57-58: 605 - 615.
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J (1996) Ethylene production by leaves of rice (*Oryza sativa* L.) in relation to salinity tolerance and exogenous putrescine application. *Plant Sci.* 116: 15 - 25.
- Mann A, Nandwal AS, Sheoran IS, Kundu BS, Sheokand S, Kamboj DV, Sheoran A, Kumar B, Kumar N, Dutta D (2002) Ethylene evolution,  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging enzymes and membrane integrity of *Cicer arietinum* L. nodules as affected by nitrate and aminoethoxivinyglycine. *J Plant Physiol.* 159: 347 - 353.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd Ed. Academic Press.
- Martínez-Cortina C, Ullrich CI, Sanz A (1992) Hormone effects on the membrane potential and on sucrose-induced depolarization of young *Citrus* leaves. *Plant Cell Physiol.* 33: 1165 -1170.
- Mathooko FM, Inaba A, Nakamura R (1998) Characterization of carbon dioxide stress-induced ethylene biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. *Plant Cell Physiol.* 39: 285 - 293.

- Mattioni C, Gabrielli R, Vangrosveld J, Clijsters H (1997) Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in Ni-tolerant and non-tolerant populations of *Silene italica* Pers. J Plant Physiol. 150: 173 - 177.
- Mattoo AK, Mehta RA, Baker JE (1992) Copper-induced ethylene biosynthesis in terrestrial (*Nicotiana tabacum*) and aquatic (*Spirodela oligorrhiza*) higher plants. Phytochemistry. 31: 405 - 409.
- Meharg AA (1993) The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. Physiol. Plant. 88: 191 -198.
- Meharg AA (1994) Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptative plant responses to elevated metal concentrations in the environment. Plant, Cell Environ. 17: 989 – 993.
- Moran N, Fox D, Slatter R (1990) Interaction of the depolarization-activated K<sup>+</sup> channel of *Samanea saman* with inorganic ions: A patch-clamp study. Plant Physiol. 94: 424 - 431.
- Moya JL, Ros R, Picazo I (1993) Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. Photos. Res. 36:75 - 80.
- Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian LV, Taiz L (1999) Early copper-induced leakage of K<sup>+</sup> from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. Plant Physiol. 121: 1375-1382.
- Obata H, Inoue N, Umebayashi M (1996) Effect of Cd on plasma membrane ATPase from plant roots differing in tolerance to Cd. Soil Sci. Plant Nutr. 42: 361 - 366.
- Ouariti O, Gouia H, Ghorbal MH (1997) Responses of bean and tomato plants to cadmium: Growth, mineral nutrition and nitrate reduction. Plant. Physiol. Biochem. 35: 347 - 354.
- Peng XX, Yamauchi M (1992) Ethylene production in rice bronzing leaves by ferrous iron. Plant Soil. 149 (2): 227 - 234.
- Pennazio S, Roggero P (1992) Effect of Cd and Ni on ethylene biosynthesis in soybean. Biol. Plant. 34: 345 - 349.

- Philosoph-Hadas S, Aaron N, Yang SF (1986) Carbon dioxide enhances the development of the ethylene forming enzyme in tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* 82: 925 - 929.
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 15 - 39
- Pinel F, Leclerc-Cessac E, Staunton S (2003) Relative contributions of soil chemistry, plant physiology and rhizosphere induced changes in speciation on Ni accumulation in plant shoots. *Plant Soil.* 255: 619 - 629.
- Polle A, Schützendübel A (2003) Heavy metal signalling plants: linking cellular and organismic responses. *Topics in Current Genetics*, vol. 4. Hirt H, and Shinozaki K (eds). *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. Pp 187 - 215.
- Poschenrieder C, Gunse B, Barceló J (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.* 90: 1365 - 1371.
- Poschenrieder Ch, Günsé B, Barceló, J (1993) Chromium-induced inhibition of ethylene evolution in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves. *Physiol. Plant.* 89: 404 - 408.
- Prasad MNV, Freitas H (2003) Metal hyperaccumulation in plants- Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458. Vol. 6.
- Rausser WE (1978) Early effects of phytotoxic burdens of cadmium, cobalt, nickel and zinc in white beans. *Can J Bot.* 56: 1744 -1749.
- Reid, M.S. (1995) Ethylene in plant growth, development, and senescence. *In*: PJ Davies (ed) *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 486-508.
- Rodecap K, Tingey D (1981) Stress ethylene: A bioassay for rhizosphere-applied phytotoxicans. *Environ. Monit. Assess.* 1: 119 - 127.
- Romanowska E, Igamberdiev AU, Parys E, Gardestrom P (2002) Stimulation by  $Pb^{+2}$  in detached leaves and mitochondria of C3 and C4 plants. *Physiol. Plant.* 116:148 -154.

- 
- Ros R, Cooke DT, Martínez-Cortina C, Picazo I (1992) Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton-pumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bahía) shoots. *J Exp. Bot.* 43: 1475 -1481.
- Ros R, Morales A, Segura J, Picazo I (1992) *In vivo* and *in vitro* effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots. *Plant Sci.* 83: 1 - 6.
- Rothan C, Nicolas J (1994) High CO<sub>2</sub> levels reduce ethylene production in kiwifruit. *Physiol. Plant.* 92: 1 - 8.
- Rubio MI, Escrig I, Martínez-Cortina C, López-Benet F, Sanz A (1994) Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regul.* 14: 151 -157.
- Saleh AAH (2002) Response of anabolic capacities, proline, protein patterns and mineral elements to nickel and EDTA stress in *Corchorus olitorius*. *Pakistan J Biol. Sci.* 5: 455 - 460.
- Saltveit ME, Yang SF (1987) Ethylene. En: Rivier L, Crozier A (eds) Principles and practice of plant hormone analysis. Vol 2. pp 367 - 401. Academic Press.
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41: 105 - 130.
- Sauter M (2000) Rice in deep water: "How to take heed against a sea of troubles". *Naturwissenschaften.* 87: 289 - 303.
- Schlegel H, Godbold DL, Hüttermann A (1987) Whole plant aspects of heavy metal induced changes in CO<sub>2</sub> uptake and water relations of spruce (*Picea abies*) seedlings. *Physiol. Plant.* 69: 265 - 270.
- Sharp RE, LeNoble ME, Else MA, Thorne ET, Gherardi F (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *J Exp. Bot.* 51: 1575 -1584.

- Sharp RE, LeNoble ME (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp. Bot.* 53: 33 - 37.
- Slivinskaya RB (1991) Nickel effect on sunflower leaf cell membranes. *Acta Bot. Neerl.* 40: 133 - 138.
- Smith BN, Harris LC, McCarlie VW, Stradling DL, Thygerson T, Walker J, Criddle RS, Hansen LD (2001) Time, plant growth, respiration, and temperature. *In: Pessaraki M (ed) Handbook of plant and crop physiology.* New York: Marcel Dekker Inc. p. 1 - 11.
- Steffens JC (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 553 - 575.
- Sun EJ, Wu FY (1998) Along-vein necrosis as indicator symptom on water spinach caused by nickel in water culture. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 255 - 259.
- Tetteroo FAA, de Bruijn AY, Henselmans RNM, Wolkers WF, van Aelst AC, Hoekstra FA (1996) Characterization of membrane properties in desiccation-tolerant and -intolerant carrot somatic embryos. *Plant Physiol.* 111: 403 - 412.
- Tsai FY, Kao CH (1994) The effects of 2,2'-bipyridine and other chelators on the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in rice. *Plant Growth Regul.* 14: 145 - 149.
- Vassilev A, Lidon F, Scotti P, Da Graca M, Yordanov I (2004) Cadmium-induced changes in chloroplast lipids and photosystem activities in barley plants. *Biol. Plant.* 48: 153 – 156.
- Vázquez MD, Poschenrieder Ch, Barceló J (1987) Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) *Ann. Bot.* 59: 427 – 438.
- Verkleij JAC, Schat H (1990) Mechanisms of metal tolerance in higher plants. *In: AJ Shaw (ed) Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects.* pp 179 -193. CRC Press. Boca Ratón.
- Verkleij JAC, Koevoets PLM, Mechteld MA, Blake-Kalff MMA, Chardonnens AN (1998) Evidence for an important role of the tonoplast in the mechanism



- of naturally selected zinc tolerance in *Silene vulgaris*. J Plant Physiol. 153: 188 - 191.
- Ververidis P, John P (1991) Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. Phytochemistry 30: 725 -728
- Voeselek LACJ, Benschop JJ, Bou J, Cox MCH, Groeneveld HW, Millenaar FF, Vreeburg RAM, Peeters AJM (2003) Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. Ann. Bot. 91: 205 - 211.
- Wang HG, Gemma H (1991) Effectes of low temperature on ethylene formation, membrane permeability and fatty acid composition in callus derivated from apple (*Malus pumila* Mill. Cv. Sensyu) fruit. J Japan. Soc. Hort. Sci. 60: 225 - 230.
- Wang M Y, Glass A D M, Shaff J E, Kochian LV (1994) Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. Plant Physiol. 104: 899-906.
- Woolhouse HW (1983) Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In: OL Lange, PS Nobel, CB Osmond, H Ziegler (eds) Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol 12C Physiological Plant Ecology. Berlin: Springer Verlag. p. 245-300.
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 155 - 189.
- Zenk M H (1996) Heavy metal detoxification in higher plants. A review. Gene 179: 21 - 30.
- Zornoza P, Robles S, Martin N (1999) Alleviation of nickel toxicity by ammonium supply to sunflower plants. Plant Soil. 208: 221 - 226