



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

**EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y COMPARTIMENTACIÓN RADICULAR EN
PLANTAS DE *Zea mays* L. EXPUESTAS A LA TOXICIDAD POR PLOMO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGIA VEGETAL Y
ECOLOGÍA**

VºBº

Los directores de la Tesis

Dr. Juan Barceló Coll

Dr. Benet Gunsé Forcadell

Tesis presentada por

DIANA GARCÍA VARGAS

Para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas

Por la Universidad Autónoma de Barcelona



Juan Barceló Coll, Catedrático de Fisiología Vegetal y **Benet Gunsé Forcadell**, Profesor Titular de Universidad de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que la bióloga **Diana García Vargas**, ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, el trabajo que para optar al grado de Doctora en Ciencias (Sección Biología) presenta con el título:

EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y COMPARTIMENTACIÓN RADICULAR EN PLANTAS DE *Zea mays* L. EXPUESTAS A LA TOXICIDAD POR PLOMO.

Considerando concluida la presente memoria, autorizamos su presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmamos el presente certificado a 3 de julio de 2006.

Juan Barceló Coll

Benet Gunsé Forcadell

Especialmente para mis padres, mis hermanos y mi esposo.

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas se vieron implicadas durante mi trabajo doctoral. Primero que todo, quiero agradecer al Dr. Juan Barceló Coll, quien ha dado la idea para trabajar en este proyecto, siempre creyó en mí y gestionó los recursos para realizar la investigación experimental a través del proyecto BFU 2004-02237-CO2-01 del Ministerio de Educación y Ciencia de España y los proyectos 2001SGR 00200 y 2005R-00785 de la Generalitat de Catalunya.

Quiero agradecer al profesor Benet Gunsé Forcadell por aceptar la supervisión de esta tesis y quien aceptó ser codirector de la misma. Quien condujo la técnica de sonda de presión, las determinaciones de los parámetros hídricos en las plantas, así como los análisis de microscopía de epifluorescencia y, los análisis de polarografía junto con Rosa Padilla. Quien siempre tuvo disposición para discutir los resultados de la investigación. Por su calidad docente como mentor de esta tesis doctoral.

A las personas que trabajan en la unidad de Fisiología Vegetal por su oportuna ayuda durante los últimos tres años: Charlotte Poschenrieder, Josep Allué, Mercè LLugany, Roser Tolrà, Xavi Feixa, Isabel Corrales, Montserrat Amenós, Livia Chaves, Sandra Martín, Rosa Padilla, y Carmen Naya.

Estos pequeños logros personales son posibles gracias al apoyo emocional y buenos deseos de mis seres queridos durante mi búsqueda del saber.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1	Estrés por metales pesados.....	1
1.2	Estrés por plomo.....	6
1.3	Distribución de plomo en la raíz.....	9
1.4	Plomo en el apoplasto.....	9
	<i>1.4.1 Pared celular.....</i>	<i>9</i>
	<i>1.4.2 Membrana plasmática.....</i>	<i>10</i>
1.5	Transporte de plomo.....	11
1.6	Efectos fisiológicos.....	14
	<i>1.6.1 A altas concentraciones de Pb.....</i>	<i>14</i>
	<i>1.6.2 A bajas concentraciones de Pb.....</i>	<i>15</i>
	<i>1.6.3 Efectos ultraestructurales.....</i>	<i>15</i>
1.7	Efectos bioquímicos.....	16
	<i>1.7.1 Efectos sobre las actividades enzimáticas.....</i>	<i>17</i>
	<i>1.7.2 Efectos sobre la fotosíntesis.....</i>	<i>19</i>
	<i>1.7.3 Efectos sobre la respiración y contenido en ATP.....</i>	<i>21</i>
	<i>1.7.4 Efectos sobre la absorción de nutrientes.....</i>	<i>22</i>
	<i>1.7.5 Efectos sobre las relaciones hídricas.....</i>	<i>23</i>
1.8	Tolerancia al plomo.....	24
	<i>1.8.1 Metabolismo oxidativo.....</i>	<i>24</i>
	<i>1.8.2 Mecanismos de protección vegetal.....</i>	<i>25</i>
	<i>1.8.3 Mecanismos de tolerancia al plomo.....</i>	<i>26</i>
1.9	Remediación de suelos contaminados con plomo.....	29

2.	OBJETIVOS.....	35
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3.1	EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	41
3.2	Muestra biológica.....	42
3.3	Material vegetal y condiciones de cultivo.....	43
3.4	Mediciones realizadas.....	44
	<i>3.4.1 Actividad del Pb libre.....</i>	<i>44</i>
	<i>3.4.2 Medida de la actividad nitrato reductasa.....</i>	<i>44</i>
	<i>3.4.3 Medida del crecimiento.....</i>	<i>45</i>
	<i>3.4.3.1 <u>Determinación del peso fresco, peso seco y contenido hídrico</u>.....</i>	<i>45</i>
	<i>3.4.3.2 <u>Medida del área foliar</u>.....</i>	<i>46</i>
	<i>3.4.3.3 <u>Medición de la longitud radicular</u>.....</i>	<i>46</i>
	<i>3.4.3.3.1 <u>Crecimiento absoluto</u>.....</i>	<i>46</i>
	<i>3.4.3.3.2 <u>Medida de la extensibilidad de coleótilos</u>.....</i>	<i>46</i>
	<i>3.4.4 Medida de relaciones hídricas y fotosíntesis.....</i>	<i>48</i>
	<i>3.4.4.1 <u>Determinación del potencial hídrico de la parte aérea</u>.....</i>	<i>48</i>
	<i>3.4.4.2 <u>Determinación del potencial osmótico de raíz y parte aérea</u>.....</i>	<i>48</i>
	<i>3.4.4.3 <u>Determinación de la conductividad hidráulica y funcionalidad de acuaporinas mediante sonda de presión</u>.....</i>	<i>49</i>
	<i>3.4.4.4 <u>Medición de la tasa de transpiración y fotosíntesis</u>.....</i>	<i>51</i>
	<i>3.4.5 Compartimentación.....</i>	<i>52</i>
	<i>3.4.5.1 <u>Medida del Pb total</u>.....</i>	<i>52</i>

3.4.5.2	<i>Medida del contenido y especiación del Pb en exudados de xilema y en solución nutritiva</i>	54
3.4.5.3	<i>Visualización de la variación en el calcio citoplasmático en puntas de raíz</i>	54
3.4.5.4	<i>Compartimentación y visualización de la penetración de Pb en puntas de raíz</i>	56
3.4.5.4.1	<i>Visualización del Pb apoplástico</i>	56
3.4.5.4.2	<i>Visualización del Pb simplástico</i>	57
3.4.6	<i>Visualización de la viabilidad celular en el ápice radicular mediante tinción vital</i>	57
3.4.7	<i>Tratamiento estadístico</i>	58
4.	RESULTADOS	63
4.1.	Efectos sobre la actividad nitrato reductasa	63
4.2.	Efectos sobre el crecimiento	63
4.2.1	<i>Efectos sobre peso fresco, peso seco y contenido hídrico</i>	63
4.2.2	<i>Efectos sobre el área foliar</i>	67
4.2.3	<i>Efectos sobre la longitud radicular</i>	67
4.2.4	<i>Efectos sobre la extensibilidad, plasticidad y elasticidad</i>	68
4.3.	Efectos sobre relaciones hídricas y fotosíntesis	70
4.3.1	<i>Efectos sobre el H_2O de parte aérea, $\Psi\pi$ de raíz y parte aérea y $\Psi\pi$ de exudados</i>	70
4.3.2	<i>Efectos sobre la conductividad hidráulica y la funcionalidad de las acuaporinas</i>	72
4.3.2.1	<i>Efectos sobre la presión hidrostática de la raíz</i>	72
4.3.2.2	<i>Efectos sobre el módulo β</i>	72
4.3.2.3	<i>Efectos sobre $t_{1/2}$</i>	73
4.3.2.4	<i>Efectos sobre L_{Pr}</i>	74

4.3.3	<i>Efectos sobre la tasa de transpiración y fotosíntesis.....</i>	78
4.4.	Análisis de compartimentación.....	80
4.4.1	<i>Contenido total de Pb en raíz y parte aérea.....</i>	80
4.4.2	<i>Análisis de exudados y contenido en Pb en exudados y solución nutritiva.....</i>	81
4.4.3	<i>Efectos sobre la compartimentación de Pb.....</i>	84
4.4.3.1	<i><u>Pb apoplástico</u>.....</i>	85
4.4.3.2	<i><u>Pb simplástico</u>.....</i>	87
4.4.4	<i>Efectos sobre las variaciones de calcio citoplasmático.....</i>	89
4.5.	Tinción vital.....	89
5.	DISCUSIÓN.....	95
6.	CONCLUSIONES.....	113
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	117

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés por metales pesados.

Algunos metales como el Mn^{+2} , el Fe^{+3} , el Zn^{+2} o el Cu^{+2} son esenciales para el desarrollo normal de las plantas ya que son componentes estructurales y/o catalíticos de proteínas y enzimas. Algunos metales, como el Cr^{+3} , V, Ti, Co y Se, a pesar de no ser esenciales, son beneficiosos. Sin embargo, la actividad humana libera, sobre todo al suelo, grandes cantidades de metales. El exceso de Al^{+3} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , As^{+3} o Pb^{+2} , resultan de especial relevancia tóxica para las plantas.

La fitotoxicidad por metales tóxicos se manifiesta particularmente en suelos ácidos y afecta tanto el crecimiento como a la formación de raíces laterales y secundarias. Además, la acumulación de Cd^{+2} o Pb^{+2} supone un peligro adicional al integrarse en la cadena trófica.

Actualmente se conocen aun poco los mecanismos específicos de absorción de metales pesados por las membranas vegetales. Sin embargo, se sabe que por difusión, flujo en masa e intercambio catiónico, los metales alcanzan fácilmente la raíz para seguir la ruta apoplástica o la ruta simplástica. Este órgano constituye la entrada principal de metal pesado en plantas superiores. La raíz posee cargas negativas en sus células rizodérmicas, pertenecientes a polímeros como los grupos carboxilo del ácido péctico y diversas proteínas estructurales y enzimáticas. Estas cargas negativas, al unirse en el espacio de la rizosfera a cargas positivas, como las de los cationes metálicos Pb^{+2} , forman una interfase en equilibrio. Estos cationes entraran por la pared celular, que es hidrófila y facilita el transporte e intercambio de iones y una vez allí, se unirán a las cargas negativas de la pared celular y serán transportados radialmente, en parte por la vía apoplástica y en parte por la vía simplástica. En las zonas apicales jóvenes la banda de Caspari no se ha formado y todo el metal pasa apoplásticamente hasta la zona vascular, lo que no sucede con raíces adultas, donde la diferenciación de tejidos y formación de endodermis y exodermis obliga a abandonar la vía apoplástica y utilizar la simplástica (Barceló *et al.*, 2005).

Recientes estudios han demostrado el uso de transportadores en membrana, los cuales tienen diferente afinidad por algunos metales y facilitan su paso a través de la misma. La principal familia se denomina ZIP (**Z**RT, **I**RT-like **P**roteine) (Guerinot,

2000).

Respecto al transporte a larga distancia, se considera que los metales viajan desde la raíz hasta el xilema de las hojas como iones libres o acomplexados con un ácido orgánico, siguiendo la corriente de la transpiración (Longnecker y Robson, 1993). En el floema se considera la translocación sistémica de metales absorbidos por las hojas desde la atmósfera y la acumulación vía floema en semillas y/o frutos. La solubilidad del metal en el floema se dificulta por la presencia de P y por el pH alcalino. Sin embargo, se pueden formar complejos con aminoácidos o con la nicotinamida.

El primer compartimento celular en contacto con los metales pesados en el espacio del apoplasto es la pared celular, donde los iones se adsorben a las cargas negativas de la misma y se almacena gran proporción de los metales pesados antes de ser absorbidos por las raíces. Estos metales se almacenan como precipitados o en forma cristalina en las paredes de las células epidérmicas o del córtex exterior y se ha observado que se puede favorecer *in vitro* el desplazamiento de los iones adsorbidos en la pared celular con soluciones de intercambio catiónico.

Algunos metales pueden ocasionar reducción de la elasticidad y de la extensibilidad de las paredes celulares (Gunsé *et al.*, 1997). Estas alteraciones fisicoquímicas de las paredes celulares se sugiere que pueden deberse a trastornos enzimáticos en la biosíntesis de los constituyentes macromoleculares de la pared, cambios en la distribución de cargas y en el ensamblaje de los polímeros, cambios en la distribución de los microtúbulos y del sistema endomembranoso (aparato de Golgi) y/o cambios en la adhesión entre pared y membrana citoplasmática.

El segundo compartimento celular en contacto con los iones metálicos es la membrana plasmática; por lo tanto, el centro controlador del síndrome tóxico de la absorción de ion metálico hacia el interior de las células es el plasmalema. Los efectos iniciales sobre la membrana citoplasmática dependen de la actividad iónica en la superficie externa del plasmalema de las células radicales según cálculos utilizando el método de Gouy-Chapman-Stern (Kinraide, 1994), aunque generalmente los efectos observados se traducen en rotura de membranas, pérdida de la compartimentación celular y, como síntomas finales, apoptosis y necrosis.

En condiciones normales, las cargas negativas del plasmalema están neutralizadas por cationes como Ca^{+2} y Mg^{+2} proporcionando estabilidad a la membrana. Cationes

tóxicos como el Hg^{+2} , con elevada afinidad por los grupos sulfhidrilo de las membranas ocasionan cierre de las acuaporinas o canales hídricos y excesivo flujo de K^+ (Ernst, 1998), a la vez que puede ocasionar la inhibición competitiva de canales iónicos como el canal de Ca^{+2} .

Aunque el mecanismo primario responsable de la disfunción de las membranas es la peroxidación de lípidos, no se puede confundir el estrés oxidativo de la fase degenerativa con el metabolismo oxidativo causado por cationes metálicos. Existen varias estrategias de acción directa e indirecta de los iones metálicos para generar radicales libres de oxígeno y de especies reactivas al oxígeno (ROS) que, a su vez, dañan crónicamente las membranas, los ácidos nucleicos y la fotosíntesis (Dietz *et al.*, 1999).

Los metales pesados inhiben el flujo de electrones de la cadena de transporte o del Ciclo de Calvin; por lo tanto, cuando la intensidad lumínica es alta, el aparato fotosintético absorbe más energía lumínica que la que suele utilizarse en reacciones metabólicas normales. Como consecuencia, el aparato fotosintético transfiere la energía a los únicos aceptores disponibles en los cloroplastos: los radicales de oxígeno, donde sucede la reacción de Mehler, cuyo producto, el radical anión superóxido, forma peróxido de hidrógeno. El exceso de peróxido de hidrógeno fomenta la formación de radicales hidroxilo (OH^\cdot), oxidantes fuertes de ácidos orgánicos que pueden iniciar la formación en cadena de nuevos radicales altamente tóxicos para las células. Adicionalmente, la inhibición de la cadena de transporte electrónico fotosintético también puede favorecer la transferencia de energía desde la clorofila excitada por la luz hacia el O_2 formándose oxígeno en estado de singlete, el cual, debido a su elevada reactividad es altamente tóxico para las células.

La reacción de defensa de las células consiste en la producción de enzimas antioxidantes como la peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD), mediante la cadena redox ascorbato-glutatión; sin embargo, la toxicidad de los metales pesados ocasiona disminución de la capacidad antioxidante de las células (Van Assche y Clijters, 1990). También se ha observado la inhibición de la asimilación de CO_2 , tanto por aumento en la resistencia estomática, como de la resistencia mesofílica. Plantas expuestas a Cd, Al, Cu, Cr, Ni, Zn o Hg mostraron cierre estomático por déficit hídrico inducido por los metales a causa de sus efectos tóxicos iniciales en las raíces y su interferencia con la

absorción y translocación del agua.

La reducción de la apertura estomática en la inhibición de la fotosíntesis inducida por metales pesados seguramente depende del tipo de metal (Poschenrieder y Barceló, 1999). El Cd y el Al inhiben, con similar intensidad, la fotosíntesis y la transpiración, mientras que Zn, Pb y Cu pueden causar una drástica reducción en la eficiencia del uso del agua, lo que sugiere que factores diferentes a los propios del cierre de estomas juegan un papel en la inhibición de la fotosíntesis por estos metales.

Las adaptaciones específicas de las plantas al estrés por metales se basan en mecanismos de resistencia que reducen su entrada en la planta, o que, una vez absorbidos, permiten su almacenamiento en lugares no perjudiciales para las células.

Inicialmente se manifiestan los mecanismos de prevención o “avoidance” según Levitt (1980), que permiten mantener una baja concentración de metal en el simplasto tales como:

- la exudación de sustancias hacia la rizosfera.
- la inmovilización en el apoplasto.
- la secreción foliar.
- la volatilización.
- el eflujo.

La absorción de metales puede disminuir por unión a ácidos orgánicos exudados al suelo por los ápices radiculares o por los localizados en las paredes celulares, así como por la restricción de su transporte a través de la membrana plasmática. La naturaleza quelante de metales de los ácidos orgánicos es característica de cada especie. Para el maíz y la judía es el citrato, y para el trigo es el malato (Tudela y Tadeo, 1993).

Adicionalmente, los metales también tienen afinidad por fenoles y ciertos aminoácidos tales como los sideróforos de origen microbiano y los fitosideróforos exudados por las propias plantas. El mucílago (mucopolisacáridos) segregado por la cofía, mantiene húmeda la zona apical radicular y favorece la penetración de la raíz a través del suelo; además, puede retener en sus cargas negativas cationes como Pb^{2+} , Cu^{2+} o Cd^{2+} previniendo la entrada de estos iones tóxicos al ápice radicular (Marschner, 1995).

La inmovilización acumula una proporción importante del contenido total de metales de una planta en tres fracciones apoplásticas radiculares: en el espacio libre de

agua para las formas solubles; en el espacio libre de Donnan formado por cargas negativas de los ácidos poligalacturónicos, los cuales se unen a los cationes metálicos en función de la secuencia $Al > Pb > Cr > Cu > Zn = Mn$ (Ernst *et al.*, 1992, Rengel, 1997) y en la superficie, pared o espacios intercelulares de las raíces como depósitos sólidos (Barceló y Poschenrieder, 1999).

El eflujo activo a través del plasmalema puede cambiar las propiedades fisicoquímicas del suelo y la especiación de los metales manteniendo bajas concentraciones de metales en el simplasto.

Una vez han entrado los metales en la célula, empiezan a funcionar los mecanismos de tolerancia que permiten soportar altas concentraciones de metal en el simplasto y facilitan el almacenamiento de los iones tóxicos en lugares no perjudiciales para las células. Estos mecanismos son:

- Desintoxicación (complejos con ácidos orgánicos).
- Compartimentación (acumulación en vacuola).
- Actividad de enzimas tolerantes.

Los metales absorbidos en la célula pueden ser eliminados del citoplasma por unión a los mismos ácidos que también están presentes en la pared, o mediante enlaces tiol a péptidos de bajo peso molecular ricos en el aminoácido cisteína (fitoquelatinas). Posteriormente, los metales unidos a estos compuestos son almacenados en la vacuola (Ernst, 1975). Las fitoquelatinas son ricas en grupos SH, por lo que también se les conoce como cadistinas, y presentan elevada afinidad para cationes de metales. Los diferentes iones metálicos tienen diferente capacidad de inducir la síntesis de fitoquelatinas, según la progresión $Hg > Cd > As > Ag > Cu > Ni > Pb > Zn$. La sensibilidad al Cd aumenta en plantas tratadas con BSO (un inhibidor de la síntesis de fitoquelatinas) y en mutantes de *Arabidopsis thaliana* con bajos niveles de glutatión el cual es un precursor de la síntesis de fitoquelatinas. Parece que la síntesis de fitoquelatinas es esencial para niveles constitutivos normales de tolerancia al Cd, Hg y As, pero no para la tolerancia normal al Cu o Zn. La hipótesis de que las fitoquelatinas actúen como posible forma de transporte de metales, especialmente del Cd, las relaciona, además, con la compartimentación vacuolar. No obstante, la elevada tolerancia al Cd seleccionada bajo condiciones naturales en metalofitas no se debe, aparentemente, a las fitoquelatinas. Así, a igual concentración externa, algunos ecotipos

sensibles al Cd de *Silene vulgaris* sintetizan más fitoquelatinas que los tolerantes. El estímulo de la síntesis de fitoquelatinas es una respuesta a la presencia de elevadas concentraciones internas de iones metálicos tóxicos de forma que más que un síntoma de tolerancia, parece ser un marcador bioquímico de la tensión sufrida por la planta (De Knecht *et al.*, 1994).

El análisis de la actividad enzimática en medios con concentraciones crecientes de metales pesados, por regla general, muestra que no hay diferencias sustanciales entre metalofitas y plantas no tolerantes en la sensibilidad de las enzimas citoplasmáticas a la toxicidad de iones metálicos (Ernst *et al.*, 1992). Sin embargo, se han observado diferencias en la actividad de enzimas extracelulares tales como fosfatasa ácida en ecotipos de *Agrostis tenuis* con tolerancia diferencial al Cu (Woolhouse y Walter, 1983). Esta observación implica que diferencias en la tolerancia a elevadas concentraciones tisulares de metales pesados se deben, por regla general, a diferencias en la especiación y/o compartimentación de estos metales. No obstante, hasta la fecha hay pocos datos para poder establecer, con carácter general, una clara relación entre la especiación apoplástica y/o simplástica de los metales, las actividades enzimáticas y las diferencias genéticas en la tolerancia (Poschenrieder y Barceló, 2003).

1.2 Estrés por plomo

El plomo es un miembro del Grupo IVB de la tabla periódica de los elementos. Tiene dos estados de oxidación, Pb (II) y Pb (IV), que son estables, pero la química ambiental del elemento es dominada por el ion plumboso (Pb^{2+}). El Pb elemental es un denso metal azul grisáceo (11.3 g/cm^3) con punto de fusión a $327 \text{ }^\circ\text{C}$ y de ebullición a $1744 \text{ }^\circ\text{C}$. El bajo punto de fusión permitió fundirlo y trabajarlo en las sociedades primitivas. El metal es muy blando y tiende a deslizarse. Es por eso que fácilmente se puede cortar y moldear y durante mucho tiempo ha sido usado sobre tejados o para la fabricación de cañerías. El plomo metálico es relativamente opaco a la radiación ionizante, y hace de escudo de defensa al trabajar con rayos X y radioisótopos.

El plomo se une a otros metales fácilmente: el Pb/Sb es principalmente usado para hacer placas de baterías pero también es usado para las balas de las armas y frecuentemente ésta aleación se usa para soldar. El plomo metal en combinación con PbO_2 , es usado para fabricar el plomo ácido en los electrodos de acumuladores y

baterías. Otros componentes inorgánicos son ampliamente usados. Por ejemplo, el cromato amarillo para pintar las calzadas y muchas otras pinturas contienen óxidos de plomo. También se usan jabones de plomo para promover la polimerización en la industria petroquímica del plástico. Existe una extensa química orgánica de los compuestos del plomo (IV), especialmente tetra-alquilos y tetra-arilos (Greninger, 1974).

El plomo no es un elemento esencial o beneficioso para las plantas y animales. Es un veneno bien conocido para los mamíferos y en humanos se teme a los síndromes clínicos de la toxicidad por plomo.

El plomo afecta el sistema nervioso humano, la producción de células sanguíneas, los riñones, el sistema reproductivo y la conducta. La intoxicación producida por el plomo se denomina saturnismo y sus síntomas se manifiestan como la aparición de fatiga, dolores de cabeza, dolores musculares y de estómago, anorexia, estreñimiento y, en su fase más crítica, "cólico del plomo", es decir, calambres abdominales intensos, acompañados de náuseas, vómitos y presión arterial elevada. Han sido observados casos concretos en niños que han estado en contacto con el suelo o con partículas en suspensión (Wixson, 1994) que presentaron plomo en sangre. Según Nriagu, (1978) el plomo ha sido el veneno de la antigüedad porque reside en el suelo y, debido a su baja solubilidad, resiste la degradación microbiana; en suma, permanece biodisponible para el futuro.

La contaminación por plomo originariamente es debida a la extracción de minerales de plomo del suelo utilizando el calor en los afloramientos naturales. El agua transportada por percolación, lixiviación o escorrentía, es decir, por procesos propios del ciclo hidrológico transporta plomo en pequeñas partículas provenientes de las minas (Laxen y Harrison, 1977). Otras actividades antropogénicas hacen que predomine en las zonas rurales, urbanas e industriales.

Las principales fuentes de contaminación por plomo son:

- Deposición aérea en minas explotadas
 - Gases contaminantes urbanos
 - Partículas de combustible no quemado
 - Deposición de residuos sólidos urbanos (Chaney y Ryan, 1994)
 - Fundición de minerales
-

- Efluentes de plantas de reciclaje de baterías industriales
- Chimeneas de fábricas
- Aditivos para pinturas y gasolina (Eick *et al.*, 1999)
- Uso de municiones militares (Shmaefsky, 2003; Brian, 2003)
- Procesos de plateado y terminación de metales
- Uso de fertilizantes (Stefanov *et al.*, 1995; Shmaefsky, 2003)

El plomo se une preferentemente a oxígeno, grupos amino o sulfhidrilo y ocasiona estrés iónico debido a su elevado índice de covalencia. En la mayoría de los casos, el catión libre (Pb^{2+}) suele ser la forma más fitotóxica.

Los factores que afectan la disponibilidad y absorción de plomo son el tamaño de las partículas del suelo y la capacidad de intercambio catiónico, además de los factores de la planta tales como la superficie de la raíz, los exudados de la raíz, la micorrización y la tasa de transpiración (Davies, 1995).

El plomo está clasificado como un ácido débil de Lewis dado que es una sustancia que sin contener hidrógeno se comporta como un ácido siendo capaz de aceptar un par electrónico mediante la formación de enlaces covalentes coordinados según la Teoría de Lewis Gilbert Newton (1875-1946). Por lo tanto, el plomo presente en el suelo está estrechamente ligado a la materia orgánica de las plantas o materia coloidal del suelo o como precipitado. Todas estas formas reducen la absorción de plomo por las raíces de las plantas.

La absorción de plomo como plomo metal en el suelo sigue la relación de Langmuir, incrementándose en función del incremento del pH desde 3.0 hasta 8.5 (Lee *et al.*, 1998). En este sentido, Nikazar y Afshari (2005) en un estudio sobre la adsorción de Pb (II), Cd (II) y Cr (VI) sobre paja y salvado de trigo empleando técnicas de columna observaron que la adsorción de Pb (II), Cd (II) y Cr (VI) aumenta al crecer el pH, y disminuye cuando se aumenta la temperatura y la velocidad de flujo de la solución. Sin embargo, Blaylock *et al.* (1997) han mostrado que en el suelo con un pH entre 5.5 y 7.5 la solubilidad del plomo es controlada por fosfato o precipitados de carbonato y muy poco plomo está disponible para las plantas incluso aunque éstas presenten la capacidad genética para acumularlo.

En la investigación sobre la fitotoxicidad del plomo predomina el estudio de la capacidad de acumulación del plomo y su posible transmisión hacia el hombre a través

de la cadena trófica. Por tal razón, las plantas son útiles para conocer los mecanismos de absorción y transporte de plomo con el objeto de conseguir la selección y el desarrollo de variedades tolerantes, capaces de aumentar la acumulación del elemento en sus tejidos.

1.3 Distribución de plomo en la raíz

Hacia la superficie de la raíz el Pb^{2+} se une a los grupos carboxilo del ácido urónico del mucílago. El mucílago establece una barrera importante protegiendo el sistema radicular del metal entrante. Algunas de las uniones de los metales son liberadas cuando el mucílago es biodegradado (Morel *et al.*, 1986).

Los microorganismos del suelo pueden afectar la disponibilidad del metal pesado por procesos de biosorción, bioacumulación y solubilización. Adicionalmente, las ectomicorrizas pueden influenciar la entrada, transporte y toxicidad del Pb^{2+} en abeto noruego (Marschner *et al.* 1996).

1.4 Plomo en el apoplasto

1.4.1 Pared celular

La retención de plomo en las raíces está basada en la unión de Pb^{2+} hacia iones con sitios intercambiables sobre la pared celular formando depósitos en la misma. Esta precipitación extracelular corresponde principalmente a la forma de carbonato de plomo.

La adición de quelantes sintéticos, tal como H-EDTA o EDTA, en combinación con un bajo pH, previene la retención de Pb^{2+} en la pared celular, permitiendo su absorción y translocación hacia la parte aérea (Jarvis y Leung, 2002), siendo la localización del metal mayor en raíces que en otras partes de la planta. El Pb^{2+} se une fuertemente a los grupos carboxilo del ácido galacturónico y al propio ácido galacturónico en la pared celular, el cual restringe su transporte vía apoplasto (Rudakova *et al.*, 1988).

1.4.2 Membrana plasmática

En general, las plantas dicotiledóneas acumulan significativamente altas cantidades de plomo en raíces en comparación con las raíces de las plantas monocotiledóneas

(Huang y Cunningham, 1996). El plomo transportado desde el suelo hacia las células tiene que cruzar la membrana plasmática de las células de la raíz. Una posible vía de transporte de plomo a través de la membrana plasmática parece que es a través de los canales catiónicos de la misma, tales como canales de Calcio. En este sentido, ha sido caracterizado un canal de Ca^{+2} operado por voltaje en la membrana plasmática de raíz en trigo y maíz (Marshall *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1994). Huang y Cunningham (1996) encontraron que el Pb^{2+} inhibe significativamente el voltaje medido como consecuencia de la actividad de los canales de Ca^{+2} en el plasmalema de raíces de trigo. La inhibición de los canales de Ca^{+2} por Pb^{2+} puede originarse por bloqueo del canal por el Pb^{2+} o debido a transporte competitivo de Pb^{2+} a través del canal de Ca^{+2} .

Los bloqueadores de los canales del calcio son capaces de inhibir la proliferación celular y la falta de calcio ocasiona la apoptosis o muerte celular. En este sentido, Tomsig y Suszkiw (1991), observaron permeación de plomo a través de los canales de calcio en células cromafínicas de médula de glándulas suprarrenales de bovino. Estos investigadores encontraron que el voltaje emitido por transporte de plomo fue bloqueado por nifedipina (bloqueador del canal de Ca^{+2}) e incrementado por BAY K8644, un canal de calcio tipo-L que inhibe el flujo de Ca^{+2} a través de un receptor con un ligando de glutamato Donald (1999). Su toxicidad depende parcialmente de su activación por voltaje emitido (sensibilidad al tóxico “plomo”) por los canales de calcio. Sin embargo, se puede hacer reversible la toxicidad por despolarización, ya que puede beneficiar la supervivencia de las células a través de otros mecanismos diferentes al flujo de calcio a través del voltaje emitido por los canales de calcio.

Por otra parte, el Ca^{2+} bloquea el transporte de Pb^{2+} dentro de la raíz y, en consecuencia, disminuye la toxicidad por Pb^{2+} sobre el crecimiento de la misma. El efecto protector del Ca^{+2} sobre la toxicidad del Pb^{2+} puede ser relacionada con su inhibición para ser acumulado el metal pesado en la punta de la raíz, sitio potencialmente blanco de la toxicidad del Pb^{2+} . El Mg^{2+} , a pesar de que bloquea tanto como el calcio la absorción de Pb^{2+} , no mejora la toxicidad por Pb^{2+} sobre el crecimiento de la raíz tanto como el calcio. Estos resultados sugieren que el efecto protector del Ca^{+2} sobre la toxicidad del Pb^{2+} involucra múltiples mecanismos, incluyendo la competición para entrar, y que el Pb^{2+} y el Cd^{2+} pueden competir con cationes divalentes por el transporte dentro de las raíces de plantas de arroz (Yo-

Young., *et al.* 2002).

1.5 Transporte de plomo

El plomo se mueve predominantemente dentro del apoplasto de la raíz en una forma radial a través del córtex y se acumula cerca de la endodermis. La endodermis actúa como una barrera parcial al movimiento de plomo entre la raíz y la parte aérea. Tal y como muestran la mayoría de datos referidos a la elevada acumulación de plomo en raíces comparada con la de la parte aérea (Jones *et al.*, 1973; Verma y Dubey, 2003). En semillas de *Oryza sativa* L. germinadas durante 10 ó 20 días en cultivos de arena con solución nutritiva a la que se añadió 500 μM o 1000 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, el crecimiento de las raíces fue reducido entre un 22 % y un 42 %, mientras que el crecimiento de la parte aérea fue reducido en un 25 %, ya que la localización de plomo absorbido fue 1.7 a 3.3 veces más alta en las raíces que en la parte aérea. El transporte limitado de plomo desde las raíces hacia otros órganos es debido a la barrera de la endodermis de la raíz. Parece ser que la banda de Caspari de la endodermis es el mayor factor limitante que restringe el transporte de plomo dentro del tejido del cilindro central (Seregin e Ivanov, 1997). Sin embargo, parece haber controversia sobre el movimiento del plomo en la raíz pues, si bien Lane y Martin (1977) afirman que el plomo se mueve en el simplasto, según Broyer *et al.*, (1972) el movimiento del plomo en la raíz sigue primariamente la vía del apoplasto debido a que una proporción representativa de plomo es extraída del agua.

Teóricamente, según Sánchez y Aguirreola (1993) se pueden resumir tres vías anatómicamente diferentes a través de las cuales podría moverse el agua:

En primer lugar, la ruta externa al citoplasma vivo, es decir, el continuo de paredes celulares externo a la membrana celular. Esta vía se denomina apoplasto. El apoplasto de la raíz representa, aproximadamente, un 10% del volumen de la misma y equivale al espacio libre.

En segundo lugar, existe la posibilidad de que el agua atraviese la pared celular y el plasmalema, para entrar luego en el citoplasma. Posteriormente, se movería a lo largo del continuo citoplasmático a través de los plasmodesmos que conectan el citoplasma con las células adyacentes. Esta ruta, que representa la porción viva de la célula, se denomina vía del simplasto.

Finalmente, existe la posibilidad de que el agua atraviese tanto el plasmalema como

el tonoplasto, de tal manera, que la vacuola pasaría a ser una parte integral de la vía de transporte.

La posibilidad de transporte simplástico del plomo ha sido demostrada en raíces de cebolla e hipocótilos de berro (Wierzbicka, 1987). Altas concentraciones de plomo causan lesiones e interrupción en la función de la barrera del plasmalema tanto en la permeabilidad selectiva del plasmalema como en el tonoplasto.

Se ha demostrado que el plomo se retiene más en la superficie del plasmalema que en las paredes celulares. El plomo puede entrar en células dañadas junto con otros componentes como determinados colorantes, los cuales no entran en células no dañadas (Seregin *et al.*, 2004).

El patrón de distribución de plomo en la raíz difiere considerablemente dependiendo de concentraciones de plomo y variando según la concentración (Seregin *et al.*, 2004). A bajas concentraciones de plomo predomina el flujo de iones plomo en el apoplasto, mientras que a altas concentraciones, la barrera funcional de plasmalema es dañada y una gran cantidad de plomo penetra dentro de las células.

En general, la aparente concentración de plomo en partes aéreas de la planta decrece con la distancia desde las raíces. La principal causa es que la mayor concentración de plomo se halla en las paredes celulares de la raíz a diferencia de otras partes de la planta. Adicionalmente, se presentan uniones con el plomo en tejidos lignificados con mayor frecuencia que en tejidos no lignificados. En este sentido, Suchodoller (1967) observó mayor retención de plomo en la epidermis de la raíz de cebada y una mínima cantidad en los tejidos vasculares, lo que sugiere que hasta cierto punto la localización de plomo en diferentes tejidos de la planta es también dependiente de la especie.

En semillas, la testa previene la entrada de plomo dentro de los tejidos internos hasta su ruptura por el desarrollo de la radícula. Una vez la testa se rompe, el plomo entra rápidamente, con notables excepciones, en las regiones meristemáticas de la radícula e hipocótilos. En los cotiledones, el plomo se mueve a través de los tejidos vasculares y tiende a acumularse en áreas discretas en las partes distales (Lane y Martin, 1977).

El contenido de plomo en varios órganos de la planta tiende a decrecer en el siguiente orden: raíces > hojas > tallos > inflorescencia > semillas. Sin embargo, este orden puede presentar variaciones intraespecíficas (Antosiewicz, 1992).

En plantas de cebolla (*Allium cepa*), el plomo absorbido es localizado en altas

concentraciones en las puntas de la raíz seguidas por partes proximales de la raíz, mientras que bajas concentraciones han sido encontradas en la base de la raíz (Michalak y Wierzbicka, 1998). Las hojas difieren su capacidad para acumular plomo dependiendo de la edad. El máximo contenido de plomo es encontrado en hojas senescentes y el mínimo en hojas jóvenes (Godzik, 1993).

Estudios ultraestructurales han revelado que cantidades variables de depósitos de plomo están presentes principalmente en el espacio intercelular, pared celular y vacuolas, mientras que pequeños depósitos de este metal han sido vistos en el retículo endoplasmático, dictiosomas y vesículas derivadas de los mismos. La pared celular y la vacuola juntas suman 96% del plomo absorbido (Wierzbicka y Antosiewicz, 1993).

El factor por el cual el plomo es encontrado en el retículo endoplasmático y dictiosomas está aparentemente relacionado con la secreción del metal de la superficie celular dentro de la vacuola. Puesto que una pequeña cantidad de plomo alcanza el núcleo, cloroplastos y mitocondrias, es lógico suponer que ejerce su efecto tóxico sobre estos orgánulos.

Los gradientes del potencial electroquímico entre vacuolas y la solución externa de células de la hoja de *Potamogeton sp.*, varía entre [-150 y -240 mV], lo cual debe favorecer una entrada pasiva de plomo dentro de las vacuolas durante el tratamiento con este metal (Denny y Weeks, 1968).

De particular interés es la invaginación del plasmalema para formar vacuolas pinocitóticas en muchas especies de plantas, tal como en *Stigeoclonium*. La formación de tales vacuolas es importante para el secuestro del exceso de iones metálicos de forma que dichas vacuolas podrían proteger los contenidos celulares de los efectos tóxicos del plomo (Silverberg, 1975). Frecuentemente, en regiones muy próximas a los plasmodesmos, se encuentran partículas grandes de plomo ocupando una elevada porción del volumen de la pared celular. En otras regiones donde la pared celular es más gruesa y substancial, partículas pequeñas se sitúan dentro de la pared celular hacia la periferia. La deposición de aquellas partículas pequeñas de plomo ocurre posiblemente a través de la acción de vesículas pinocitóticas (Ksiazek *et al.*, 1984).

Por otro lado, el estudio de la localización del plomo en células de plantas acuáticas aún está en proceso de investigación. Plantas de *Lemma minor* L. tratadas durante una hora con plomo mostraron contenidos elevados de plomo en vacuolas pequeñas, a la vez

que en tratamientos a más largo plazo (6 y 12 h) se observó un incremento del contenido en Pb en la pared celular (Samardakiewicz y Wozny, 2000). La localización de plomo en la pared celular posiblemente es consecuencia de una redistribución de plomo y refleja un incremento en el transporte apoplástico. A su vez, la presencia de plomo en vesículas pequeñas en *Lemma minor* sugiere que la endocitosis juega un papel importante en la entrada de plomo en estas plantas.

1.6 Efectos fisiológicos

La fitotoxicidad por plomo ocasiona desordenes en las actividades fisiológicas normales de las plantas hasta matar eventualmente las células a altas concentraciones (Ernst, 1998; Seregin e Ivanov, 2001). Los principales procesos fisiológicos afectados son la actividad enzimática, la nutrición mineral, el potencial hídrico, el estatus hormonal, la estructura de la membrana y el transporte de electrones.

Los síntomas de toxicidad por Pb pueden dividirse en síntomas no específicos y específicos. Según Burton *et al.* (1984), los síntomas visuales no específicos consisten en una inhibición rápida del crecimiento radicular, reducción del área foliar, clorosis y aparición de manchas pardo-rojizas fenólicas en tallos, pecíolos y hojas, y necrosis foliar. Por otra parte, según Mishra y Choudhari (1998), la toxicidad por plomo inhibe la germinación de las semillas y retarda el crecimiento de las plantas. Los síntomas específicos consisten en una disminución del porcentaje e índice de germinación, de la proporción longitud radicular/parte aérea, del índice de tolerancia a plomo y mercurio, y del peso seco de las raíces y de la parte aérea.

La anterior síntesis permite introducir varias investigaciones publicadas sobre efectos adversos por plomo en plantas. Estos efectos se pueden separar en dos grupos: efectos adversos a altas concentraciones de plomo y efectos adversos a bajas concentraciones de plomo.

1.6.1 A altas concentraciones de Pb

Los efectos ocasionados por el plomo a altas concentraciones son:

- Disminución del 14 al 30 % en la germinación de semillas de arroz y reducción del crecimiento de semillas de 13 a 45 % con 1mM Pb (Verma y Dubey, 2003).
-

-
- Reducción del número de semillas en germinación y encogimiento del hipocótilo de *Lupinus* (Wozny, *et al.*, 1982).
 - Inhibición de crecimiento de la raíz a 10^{-2} - 10^{-6} M Pb *in vitro* o con un contenido superior a 10 mg / kg de contenido de plomo en el suelo (Breckle, 1991).
 - A nivel celular el plomo inhibe las actividades de enzimas que contienen grupos sulfhidrilo (-SH) necesarios para su actividad (Van Assche y Clijsters, 1990).

1.6.2 A bajas concentraciones de Pb

Los efectos ocasionados por el plomo a bajas concentraciones son:

- Mayor sensibilidad en el desarrollo y la extensión de la raíz principal a diferencia de las raíces laterales (Obroucheva *et al.*, 1998).
- Incremento del contenido de plomo en las raíces en relación directa con la concentración en niveles de entre 0.1 y 2 μ M de Pb en *Picea abies*. Paralelamente, cuando se realiza una exposición de las plantas a 0.5 μ M de Pb durante 4 semanas se reduce el crecimiento de las raíces primaria, secundaria y terciaria (Godbold y Kettner, 1991).
- En semillas de *Zea mays*, se ha observado una fuerte inhibición del crecimiento de la raíz primaria y una corta zona de ramificación cuyas raíces laterales son más compactas, ocupando una posición mucho más íntima en la punta de la raíz con respecto a raíces crecidas en la ausencia de plomo (Obroucheva *et al.*, 1998).

1.6.3 Efectos ultraestructurales

Estudios sobre el crecimiento radicular, división celular, morfología cromosómica y de los nucleolos de las células de las puntas de raíz de *Allium cepa* L. a diferentes concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, realizados por Yang *et al.* (2000), pusieron de manifiesto una inhibición en el crecimiento radicular. Este efecto fue posteriormente confirmado por la presencia de irregularidades mitóticas y adhesión de los cromosomas.

Durante la interfase, las células de las raíces tratadas con Pb presentaban micronucleosis, irregularidad en la forma del núcleo y descomposición del material

nuclear (Wierzbicka, 1994). Paralelamente, se detectaron perturbaciones en el alineamiento de los microtúbulos a una concentración dependiente de una concentración inicial de 10 μM , lo que contribuye a la inhibición del crecimiento de la raíz (Yang *et al.*, 2000).

El plomo destruye los microtúbulos del huso mitótico causando *c*-mitosis (*colchicina*-mitosis) caracterizada por bloqueo celular en prometafase. En otras palabras, el plomo inhibe la formación del huso cromático. Este bloqueo, sin embargo, no es permanente (Wierzbicka, 1994).

En conclusión, los microtúbulos de diferentes regiones del meristemo de la raíz y de diferentes estadios del ciclo celular muestran susceptibilidad diferencial al plomo. Poschenrieder *et al* (2004) hallaron que el Al induce alteraciones de la organización y orientación de los microtúbulos antes de que se produzca la inhibición de la elongación radicular.

A partir de las anteriores experiencias se ha propuesto como hipótesis que la inhibición del crecimiento radicular bajo toxicidad con plomo puede ser un resultado de la inhibición de la división celular de las puntas de la raíz (Eun *et al.*, 2000).

1.7 Efectos bioquímicos

Los primeros estudios sobre la acción del plomo a nivel bioquímico se centraron en descripciones sobre la considerable reducción de la síntesis de DNA, RNA y proteínas en el embrión axial, y en los endospermos de plantas de arroz en germinación sometidos a concentraciones crecientes de plomo (Maitra y Mukherji, 1977).

Asimismo se ha aceptado que la toxicidad por plomo además de disminuir los niveles del contenido de proteínas en tejidos también causa alteraciones significativas en la composición lipídica (Przymusinski *et al.*, 1991; Stefanov *et al.*, 1995). En el caso de *P. vulgaris* y *Z. mays* se observaron cambios sustanciales a nivel de glucolípidos, especialmente monogalactosil y diacilgliceroles, los cuales fueron asociados con alteraciones en la permeabilidad de la membrana en los cloroplastos (Stefanov *et al.*, 1993). Específicamente, al incubar cloroplastos con concentraciones constantes de sales de plomo, los niveles de ácidos grasos insaturados ascendieron notablemente con respecto a los ácidos grasos saturados (18:3) (Stefanov *et al.*, 1995).

Los datos sobre la disminución en el peso seco presentan variabilidad. Así,

(Kosobrukhev, 2004) observaron una disminución en *Plantago major* bajo tratamiento con plomo pero en ciertos casos, tales como en plantas de maíz, se ha observado un aparente incremento en el peso seco de los órganos de las plantas que fueron correspondidos con un incremento de la síntesis de polisacáridos de la pared celular al ser expuestos a tratamientos con plomo (Wierzbicka, 1998).

Por otra parte, Malkowski *et al.*, (2002) trabajando con maíz con concentraciones de plomo $10^{-4} - 10^{-3} M$, observaron que el crecimiento del mesocótilo y del coleóptilo fueron afectados de forma similar; sin embargo, la concentración de plomo en el mesocótilo fue tres veces mayor que en el coleóptilo, proponiendo que la disminución del crecimiento de la parte aérea en maíz no es una consecuencia de la liberación de potasio o de la acumulación de plomo en la raíz, sino que es debido a una “señal” no conocida inducida en las raíces, como respuesta a la exposición por plomo la cual es transmitida a la parte aérea.

1.7.1 Efectos sobre las actividades enzimáticas

Las actividades de un amplio rango de enzimas de diferentes vías metabólicas son afectadas por el plomo. La inhibición del 50 % de la mayoría de enzimas se produce a una concentración de entre 10^{-5} y $2 \cdot 10^{-4} M$ de plomo. A esta concentración se hace referencia en términos de la constante de inactivación (K_i).

La inhibición sobre la actividad enzimática es causada por la interacción de Pb con los grupos sulfidrilo (-SH) que están presentes en el centro activo de los enzimas, los cuales son esenciales para la estabilización de su estructura terciaria. Además, la reacción con los grupos (-SH) puede bloquear los grupos -COOH con iones plomo, lo que parecer también juega un papel importante en la inhibición de la actividad enzimática bajo el tratamiento con este metal (Levina, 1972).

El plomo forma un mercáptido con el grupo (-SH) de la cisteína y también forma complejos con grupos fosfato. La inhibición de metaloenzimas bajo tratamiento con plomo parece ser debida a un desplazamiento del metal esencial por plomo. La inhibición de la actividad enzimática debida al plomo no parece ser específica para este metal: tales inhibiciones son también evidentes con otros cationes que tienen

PROCESOS METABÓLICOS	ENZIMAS	ESPECIES VEGETALES	EFECTO DEL Pb	REFERENCIAS
Síntesis de Clorofila	α -amino levulinato dehidrogenasa	<i>Pennisetum typhoideum</i>	(-)	Prasad & Prasad (1987)
Fijación de CO ₂	Ribulosa-1,5 bis fosfato Fosfoenol Piruvato Carboxilasa	<i>Avena sativa</i> <i>Zea mays</i>	(-) (-)	Moustakas <i>et al.</i> (1994) Vojtechova & Leblova (1991)
Ciclo de Calvin	Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa	<i>Spinach oleracea</i>	(-)	Vallee & Ulmer (1972)
	Ribulosa 5 fosfato kinasa	<i>Spinach oleracea</i>	(-)	Vallee & Ulmer (1972)
Vía Pentosa Fosfato	Glucosa 6-fosfato Dehidrogenasa	<i>Spinach oleracea</i>	(-)	Vallee & Ulmer (1972)
Asimilación De N ₂	Nitrato reductasa	<i>Cucumis sativus</i>	(-)	Burzynski (1984)
	Glutamina sintetasa	<i>Glicine max</i>	(-)	Lee <i>et al.</i> (1976)
Enzimas Nucleolíticas	Deoxyribonucleasa	<i>Hydrilla verticillata</i>	(+)	Jana & Choudhary (1982)
	Ribonucleasa	<i>Hydrilla verticillata</i>	(+)	Jana & Choudhari (1982)
Hidrólisis de Proteínas	Proteasa	<i>Hydrilla verticillata</i>	(+)	Jana & Choudhari (1982)
Fosfohidrolasa	Alcalina fosfatasa	<i>Hydrilla verticillata</i>	(+)	Jana & Choudhari (1982)
	Acido fosfatasa	<i>Glycine max</i>	(+)	Lee <i>et al.</i> (1976)
Metabolismo De Glucosa	α -amilasa	<i>Oryza sativa</i>	(-)	Mukherji & Maitra (1977)
Generación de Energía	ATP sintetasa	<i>Zea mays</i>	(-)	Tu Shu & Brouillette (1987)
	ATPasa	<i>Zea mays</i>	(-)	Tu Shu & Brouillette (1987)
Metabolismo Antioxidativo	Catalasa	<i>Oryza sativa</i>	(-)	Verma & Dubey (2003)
	Guiacol peroxidasa	<i>Glicine max</i>	(+)	Lee <i>et al.</i> (1976)
	Ascorbato oxidasa	<i>Phaseolus aureus</i>	(+)	Rashid & Mukherjee (1991)
	Ascorbato peroxidasa	<i>Oryza sativa</i>	(+)	Verma & Dubey (2003)
	Glutatión reductasa	<i>Oryza sativa</i>	(+)	Verma & Dubey (2003)
	Superóxido dismutasa	<i>Oryza sativa</i>	(+)	Verma & Dubey (2003)

Tabla 1: Inhibición (-) o incremento (+) de la actividad enzimática en plantas tratadas con Pb. Tomado de Sharma y Dubey (2005).

comparables afinidades por grupos proteicos funcionales. Sin embargo, las actividades de algunos enzimas se han visto incrementadas al ser expuestas a plomo. Tales resultados aparentemente conciernen a cambios en la síntesis enzimática, inmovilización de los inhibidores de los enzimas, o como un resultado efector de moléculas, las cuales son sintetizadas bajo fitotoxicidad con plomo.

Las actividades enzimáticas afectadas por la toxicidad por Pb han sido ampliamente reportadas por varios investigadores basándose en los principales procesos metabólicos que suceden en las especies vegetales. Los efectos del plomo se presentan con un signo (+/-) indicando un incremento o un decrecimiento de la actividad enzimática por acción del plomo (Tabla 1).

1.7.2 Efectos sobre la fotosíntesis

El proceso de la fotosíntesis de las plantas es alterado en los cloroplastos por la toxicidad por plomo causando innumerables efectos adversos. Sin embargo, se pueden resumir a continuación para facilitar su comprensión:

- Disminución de la tasa fotosintética
- Distorsión de la ultraestructura del cloroplasto
- Restricción de síntesis de clorofila, plastoquinona y carotenoides
- Obstrucción de transporte de electrones
- Inhibición de actividades enzimáticas del ciclo de Calvin.
- Deficiencia de CO₂ como un resultado de cierre estomático.

Los cloroplastos son los principales órganos indicadores de los daños ocasionados por el plomo sobre el proceso metabólico de la fotosíntesis. Plantas de *Ceratophyllum demersum* crecidas en medio acuático con Pb (NO₃)₂ mostraron distintos cambios en la ultraestructura de los cloroplastos (Rebechini y Hanzely, 1974). Las células de las hojas de tales plantas exhibieron reducción de apilamientos de granas junto con una reducción en la cantidad de estroma en relación con la del sistema lamelar. También exhibieron ausencia de granos de almidón. El tratamiento con plomo también cambió la composición lipídica de las membranas tilacoidales en hojas de *Zea mays* L. (Stefanov *et al.*, 1995)

El plomo perjudica la absorción de elementos esenciales tales como hierro y magnesio en plantas de pepino y, como consecuencia, inhibe la síntesis de clorofila

(Burzynski, 1987). Estos daños de los aparatos fotosintéticos son debido a la afinidad del plomo por ligandos de proteínas N- y S- (Ahmed y Tajmir-Riahi, 1993). Asimismo se ha observado degradación de la clorofila debido al incremento de la actividad clorofilasa (Drazkiewicz, 1994). También se ha hallado que la clorofila *b* es más afectada que la clorofila *a* por tratamiento con plomo en abetos de Noruega (Vodnik *et al.*, 1999).

Acerca del efecto sobre la obstrucción del transporte de electrones (Rashid *et al.*, 1994) se sabe que el plomo afecta el sitio donador y el sitio receptor del fotosistema II (PS II), el complejo citocromo *b/f* y el fotosistema I (PS I). Esto ha sido en su mayor parte aceptado ya que la inhibición del transporte de electrones del PS I es más sensible que la del PS II en cloroplastos de espinaca (Mohanty *et al.*, 1989; Sersen *et al.*, 1998).

El plomo también causa una fuerte disociación del polipéptido extrínseco del complejo disociador de oxígeno del PS II originando desplazamiento de Ca, Cl⁻ y Mn desde este sitio donador del PSII (Rashid *et al.*, 1991). Esto hace proponer que los cambios conformacionales de las LHC II (**L**ight **H**arvesting **C**omplexes) subunidades fundamentales del PSII, conllevan al no ensamblaje de los componentes redox, de los cofactores y de las proteínas extrínsecas, conduciendo a la degradación de las subunidades PSII (Ahmed y Tajmir-Riahi, 1993). En suma, el plomo *in vitro* altera los complejos proteína-pigmento responsables de la absorción de la radiación incidente.

Retomando esta última anotación Sarvari *et al.* (2002) probaron concentraciones de plomo en el desarrollo del tilacoide de pepino y álamo, y observaron incremento del contenido de clorofila en las LHC II a bajas concentraciones de plomo, mientras que a una concentración de 50 mM de plomo el nivel de clorofila decreció en las plantas. Este hecho ha sido comprobado nuevamente en segmentos de hojas de *Pisum sativum* tratados a 50 mM Pb por Sengar y Pandey, 1996. Consecuentemente, el nivel de concentración de plomo dentro de la hoja puede incidir directamente en la síntesis de clorofila.

Para limitar la descripción sobre los múltiples efectos del plomo en el proceso fotosintético existen otras hipótesis importantes para cerrar el tema, como la de Bazzaz *et al.*, (1975) quien considera que el decrecimiento de la fotosíntesis en maíz es el resultado del cierre estomático. Hipótesis respaldada por Kosobrukhov *et al.*, (2004) quienes consideran que la actividad fotosintética es gobernada por factores como el

tamaño de la célula estomática, el número de estomas, la conductancia estomática y el área foliar.

1.7.3 Efectos sobre la respiración y contenido en ATP

Con el objeto de determinar los efectos sobre la respiración se han realizado experimentos *in vitro* con preparaciones de mitocondrias de células vegetales de *Nicotiana tobacum* L. var. Xanthí encontrándose que la tasa de respiración disminuye cuando se incrementan las concentraciones de plomo aplicadas (Reese y Roberts, 1985). Además de las mitocondrias se han aislado cloroplastos de diferentes especies de plantas para mostrar que el plomo afecta el flujo de electrones vía el sistema de transporte de electrones (Miles *et al.*, 1972; Bazzaz y Govindjee, 1974). De este modo, parece ser que el Pb a elevadas concentraciones ocasiona desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Miller *et al.*, 1973; Koepfe, 1977; Ernst, 1980), mayor oxidación de sustratos (glicina, succinato, malato), incremento de la demanda de ATP como de ATP / ADP e incremento de la actividad de NAD⁺malato-deshidrogenasa a altas concentraciones (Romanowska *et al.*, 2002), y por el contrario, se estimula la respiración a bajas concentraciones (Lee *et al.*, 1976), lo cual ha sido demostrado en hojas cortadas (Lamoreaux y Chaney, 1978), en protoplastos aislados (Parys *et al.*, 1998) y en mitocondrias (Koeppel y Miller, 1970).

En relación con los enzimas fotorrespiratorios el mecanismo sobre la estimulación de la respiración por plomo aún no está claro. Se plantean varias incongruencias; una de éstas es que se inhibe la actividad cloroplástica de la ATP sintetasa /ATPasa (Tu Shu y Brouillette, 1987) y no se afectan otros enzimas como NADH-hidroxipiruvato reductasa, glicolato oxidasa y el enzima NAD-málico (Romanowska *et al.*, 2002) bajo exposición a plomo.

Aunque la sensibilidad de la fotofosforilación a los iones de los metales pesados está bien documentada, no hay un acuerdo general sobre el sitio de acción ni sobre el mecanismo señalado. Solamente algunos experimentos pueden sugerir diferentes mecanismos existentes para la acción de los iones de los metales pesados sobre la actividad ATPasa cloroplástica cuando estos iones metálicos son aplicados bajo condiciones *in vivo* o *in vitro*.

1.7.4 Efectos sobre la absorción de nutrientes

Muchas de las acciones atribuidas al plomo parecen ser indirectas como un resultado del desequilibrio mineral dentro de los tejidos. Así, se sabe que altas concentraciones de plomo en el suelo causan desequilibrio en las proporciones de nutrientes minerales dentro de los tejidos de las plantas en crecimiento.

Cambios significativos se han observado tanto en los contenidos de nutrientes como en las proporciones internas de nutrientes en plantas bajo la toxicidad con plomo (Kabata-Pendias y Pendias, 1992). En la mayoría de los casos, el plomo bloquea la entrada de cationes (K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3}) y aniones (NO_3^-) en el sistema radicular.

Hasta el momento, los mecanismos sugeridos para regular la entrada de micro- y macronutrientes bajo toxicidad por plomo consisten en el mecanismo físico y químico.

El primer mecanismo, se relaciona con el tamaño de los radios iónicos del metal, que pueden actuar bloqueando el acceso de muchos iones en los sitios de absorción de las raíces (Godbold y Kettner, 1991). Aunque tanto el contenido de plomo en la punta como en la base de la raíz pueden parecer similares, el plomo altera los niveles de elementos minerales en las mismas. En las puntas de la raíz los niveles de Ca^{+2} , Fe^{+3} y Zn^{+2} decrecen después de la exposición a Pb. En el abeto noruego, después de aplicar plomo se presenta la inhibición del crecimiento de la raíz que puede ser debido a una disminución de los niveles de Ca^{+2} , puesto que en las puntas de la raíz un 40 % del Ca^{+2} absorbido es usado para su crecimiento, de forma que pueden decrecer la división o la elongación celular (Haussling *et al.*, 1988). Concomitantemente, en agujas de abeto noruego los niveles de Ca^{+2} y Mn^{+2} decrecen con el tratamiento con plomo, lo cual no puede ser un resultado del decrecimiento en el número de las puntas de raíz y de los sitios destinados para el flujo de solutos apoplástico a través de la endodermis.

Al valorar el nivel de manganeso bajo condiciones de tratamiento con plomo, se observó una disminución del mismo en agujas de *Picea abies* (Sieghardt, 1988). En plantas de *Cucumis sativa* el plomo disminuye la absorción de K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y NO_3^- y, en *Zea mays* la absorción de Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ y P (Walker *et al.*, 1977).

El plomo influye en la distribución total de los elementos nutritivos dentro de los diferentes órganos de la planta. Ya que, la distribución total de Mn y S cambió a favor de la raíz por encima de la parte aérea bajo condiciones de toxicidad con plomo, lo cual

representa retención de estos iones en la raíz. Con respecto al contenido de fósforo, en *Pisum sativum* siempre se han hallado correlaciones negativas con el contenido de plomo en el suelo, y también se ha detectado que la actividad fitasa es afectada por el contenido de plomo (Paivoke, 2002).

En relación con el nitrógeno sucede que el contenido de nitrógeno en la raíz es significativamente reducido bajo toxicidad por plomo. La absorción de nitrato declina en plantas de pepino expuestas a plomo con una concomitante bajada de la actividad nitrato reductasa NR y afecta el metabolismo del nitrógeno. El descenso de la absorción de nitrato debido al plomo puede ser como resultado del estrés hídrico creado por el plomo (Burzynski y Gabrowski, 1984).

En ciertas especies como *Pisum sativum*, incrementa el contenido de nitrógeno de raíces bajo tratamiento con plomo a una concentración de 2 mmol kg^{-1} de suelo, lo cual probablemente ocurre debido a efectos inhibitorios de plomo sobre la actividad nitrato-reductasa (Paivoke, 2002).

El segundo mecanismo sugerido para explicar la disminución de la absorción de micro y macronutrientes bajo toxicidad con plomo se relaciona con el desorden que induce el plomo en el metabolismo celular causando cambios en las actividades enzimáticas de la membrana y en la estructura de la membrana. Aparentemente, un ejemplo puede ser el eflujo de K^+ desde las raíces, el cual es debido a la extrema sensibilidad de la ATPasa y de los grupos $-\text{SH}$ de las proteínas de la membrana celular hacia el plomo.

1.7.5 Efectos sobre las relaciones hídricas.

Una disminución en la tasa de transpiración y en el contenido hídrico de los tejidos ocurre en plantas crecidas bajo exposición con plomo. Varios mecanismos se han sugerido para comprender cómo el plomo induce estos efectos. Inicialmente, el plomo retarda el crecimiento dando como resultado una reducida área foliar, y por consiguiente una desventaja para los órganos con mayor transpiración en las plantas, las hojas (Iqbal y Moshtaq, 1987). Así, se ha observado que las células guarda generalmente presentan un tamaño menor al ser tratadas con plomo.

El plomo baja el nivel de componentes que están asociados con el mantenimiento de la turgencia celular y de la plasticidad de la pared celular. De esta forma, baja el

potencial hídrico dentro de la célula. Los iones metálicos, incluyendo el plomo, incrementan el contenido en ABA e inducen el cierre estomático. Desordenes en la respiración y en la fosforilación oxidativa observados bajo toxicidad con plomo también pueden causar desajustes en el régimen hídrico. Así, experimentos con fragmentos de epidermis flotando en solución con plomo han mostrado que el plomo induce el cierre de estomas (Bazzaz *et al.*, 1974). Experimentos con hojas separadas de maíz y soja han indicado que los metales incrementan la resistencia estomática no únicamente cuando se aplican directamente a células guarda o células epidérmicas sino también cuando éstos alcanzan los conductos del xilema (Bazzaz *et al.*, 1974).

Una hipótesis unificada con respecto al cierre estomático inducido por plomo indica que tal efecto es debido a la inhibición de un sistema de energía o debido a alteraciones de flujos de K^+ a través de las membranas (Bazzaz *et al.*, 1974).

1.8 Tolerancia al plomo

1.8.1 Metabolismo oxidativo

Uno de los efectos del plomo consiste en la inducción del estrés oxidativo en partes de plantas en crecimiento debido a un aumento de la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) provocando un desequilibrio del estado redox celular.

Un número de diferentes ROS: el anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidrófilo ($-OH$) son producidos durante el metabolismo normal oxidativo en organismos aeróbicos, pero estas ROS pueden ser severas cuando se producen elevadas cantidades, puesto que aunque algunas ROS pueden funcionar como importantes señales moleculares alterando la expresión génica y modulando la actividad de proteínas específicas de defensa. Todas las ROS pueden ser extremadamente dañinas para los organismos a altas concentraciones.

El plomo induce la producción de ROS dentro de las plantas y ésta depende de la intensidad del estrés, períodos repetitivos de estrés, tipo de especie y edad de la planta (Asada, 1994; Chaitnya y Naithani, 1999; Verma y Dubey, 2003).

La peroxidación de lípidos, la cual es conocida como un indicador de daño oxidativo, involucra la degradación oxidativa de residuos acil grasos poliinsaturados de membrana (Girroti, 1990). Los iones de plomo inducen la peroxidación lipídica, por lo

tanto decrece el nivel de ácidos grasos saturados e incrementa el nivel de ácidos grasos insaturados de membrana en varias especies de plantas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Aunque la generación de ROS es suave bajo condiciones normales, el plomo acelera este proceso (Verma y Dubey, 2003). En el estudio de caso de *Oryza sativa* se han expuesto a 500 y 1000 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en un medio con arena. Durante un período de 5 a 20 días se ha incrementado el nivel de lípidoperoxidasas del 21 al 177 %, indicando que el plomo induce estrés oxidativo en estas plantas (Verma y Dubey, 2003).

1.8.2 Mecanismos de protección vegetal

Existe un amplio rango de mecanismos de protección en las células vegetales que sirven para eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) antes de que puedan dañar partes sensibles de la maquinaria celular. Es conveniente dividir estos mecanismos en dos grupos, estos son, antioxidantes-no-enzimáticos tales como tocoferoles, carotenoides, componentes del ácido ascórbico (AsA) y glutatión (GSH), incluyendo sus formas oxidadas, -el ácido dehidroascórbico (DHA) y GSSG y, antioxidantes enzimáticos tales como catalasa, peroxidasas y superóxido dismutasas (SOD)- además de los enzimas del ciclo ascorbato-glutatión, tales como: ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH (Verma y Dubey, 2003).

Este mecanismo funciona con la base química del Ciclo Haber Weiss y el mecanismo Fenton, los cuales generan H_2O_2 y radicales hidróxilo (-OH) desde el anión superóxido O_2^- .

El plomo no es un metal oxido-reductor como el hierro. Por eso el estrés oxidativo parece ser un efecto indirecto de la toxicidad del plomo llevando a producción de ROS, aumentando el estado pro-oxidante de la célula por reducción de las moléculas de glutatión reducido (GSH), activando sistemas calcio-dependientes y afectando los procesos mediados por el hierro (Pinto *et al.*, 2003):

Entre los enzimas antioxidantes, se encuentra la catalasa, que descompone H_2O_2 produciendo agua y oxígeno. Se ha observado disminución en la actividad catalasa sobretudo en dos isoenzimas de la catalasa en la parte aérea de plantas tratadas con plomo (Verma y Dubey, 2003). Estas isoformas están controladas por diferentes genes (Frugoli *et al.*, 1996). Tal disminución parece ser debida a una menor síntesis de enzima

o a un cambio en el ensamblaje de subunidades enzimáticas (Hertwig, 1992).

La toxicidad por plomo induce la actividad peroxidasa en plantas de soja, arroz, etc. (Lee *et al.*, 1976; Verma y Dubey, 2003). Este enzima ha sido ampliamente aceptado como un enzima de estrés en plantas (Gaspar, 1982; Subhashini y Reddy, 1990), y se cree que el incremento de su actividad se debe a la liberación de peroxidasa localizada en la pared celular (Gaspar, 1982).

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se ha detectado en plantas de *Lupenus luti*us y *O. sativa* (Przymusinski *et al.*, 1995; Verma y Dubey, 2003). El incremento de la SOD en respuesta a la presencia de plomo es debido a la síntesis *de novo* de proteína enzimática (Lozano *et al.*, 1996).

El estrés por plomo en plantas de arroz también se manifiesta como un incremento de la actividad de la APX y de la GR (Verma y Dubey, 2003). Aunque la APX es considerada el enzima clave del mecanismo de defensa antioxidativo (Sharma y Dubey, 2004) porque condiciona la concentración celular de O_2^- y H_2O_2 , parece ser que dos enzimas (SOD y GR) combaten los daños ocasionados por el estrés oxidativo inducido por el plomo en plantas de arroz (Verma y Dubey, 2003).

Bajo la toxicidad con plomo también se incrementa la actividad GR cuya función de defensa es reciclar glutatión oxidado para reducirlo a glutatión (GSH/GSSG) y a glutatión total (Foyer *et al.*, 1997). El incremento en la actividad GR bajo estrés ha sido atribuido a síntesis *de novo* del enzima (Baisak *et al.*, 1994).

1.8.3 Mecanismos de tolerancia al plomo

Baker (1981) ha sugerido dos estrategias básicas relacionadas con la absorción del metal y la tolerancia de las células vegetales. Las respuestas celulares al estrés tóxico son tolerancia por exclusión y tolerancia por acumulación.

La estrategia por exclusión consiste en el mantenimiento de niveles bajos y constantes del metal en el suelo, y se mantiene hasta que las concentraciones en el mismo alcanzan niveles críticos a partir de los cuales no pueden ser mantenidos y se produce toxicidad. Por otra parte, la tolerancia por acumulación consiste en concentrar el metal activamente dentro de los tejidos vegetales, implicando procesos fisiológicos altamente especializados. En este sentido, Berry W.L. (1986) sugirió tres estrategias básicas de respuesta: evitación, detoxificación y tolerancia bioquímica, cada una de las

cuales afecta las concentraciones del metal en los tejidos en diferentes formas.

La tolerancia por exclusión esta relacionada con la capacidad de las plantas para transportar oxígeno y perder radicales de oxígeno por las raíces resultando en una gran habilidad para modificar la rizosfera e inmovilizar metales en la misma. Estas observaciones se han deducido colectivamente en *Typha latifolia* por Ye *et al.*, 1997, quienes sostienen que *Typha latifolia* es una planta que puede colonizar tanto áreas contaminadas con plomo como no contaminadas con plomo, y que, por lo tanto, sirve como indicador biológico de investigación. Así, se ha encontrado que sus hojas pueden mantener bajas las concentraciones de plomo bajo estrés con plomo.

Un aspecto importante de la tolerancia por exclusión se ha encontrado en las raíces de arroz, donde se sintetiza oxalato por oxidación de glicolato para obtener glioxilato y luego oxidación de glioxilato para obtener oxalato. Así, pues, las variedades tolerantes de arroz autorregulan la síntesis y secreción de oxalato, un compuesto que precipita el plomo y reduce su absorción por las raíces (Yang *et al.*, 2000). También se ha observado que los grupos -COO^- del ácido urónico del mucílago se unen al plomo restringiendo su entrada a la raíz (Morel *et al.*, 1986).

Por otro lado, la fuerte unión del plomo a los grupos carboxilo de los carbohidratos de la pared celular disminuye el transporte por vía apoplástica (Rudakova *et al.*, 1988). Este mecanismo de tolerancia se presenta en *Anthoxanthum odoratum*, ya que la observación de las puntas de raíz mediante microscopía electrónica reveló la presencia de plomo tanto en la pared celular como en el citoplasma. Así, se sugiere que el mecanismo de tolerancia de esta planta está asociado con la capacidad de restringir la localización del plomo en la pared celular (Qureshi *et al.*, 1986).

Dentro de la célula, la mayor parte de plomo es secuestrado en la vacuola en forma de complejos. Esto puede representar otro mecanismo de detoxificación de plomo en plantas. Por ejemplo, la pinocitocis es observada en células foliares de muchas plantas tratadas con sales de plomo en solución debido a estas vesículas pinocíticas, las partículas de plomo pueden ser descargadas dentro de la vacuola (Wierzbica y Antosiewicz, 1993).

La acumulación total de un exceso de aminoácidos en respuesta al plomo puede ser conocida como una importante respuesta adaptativa de las plantas para evitar la toxicidad al plomo. Varios trabajos han enfatizado la importancia de la síntesis de

compuestos quelantes del metal tales como aminoácidos afines a la prolina para evitar la toxicidad de metales pesados (Alia y Saradhi, 1991). En estudios de toxicidad por Cu en *Silene armeria* se ha considerado que prolina y glicina pueden estar implicadas en la detoxificación del Cu en raíces (Barceló *et al.* 2005).

Plantas expuestas a plomo y otros metales pesados altamente contaminantes como Cd, Zn, Cu, Hg sintetizan cisteína y polipéptidos de bajo peso molecular llamados fitoquelatinas (Cobbet, 2000). Las fitoquelatinas (PCs) forman una familia de estructuras repetitivas del dipéptido γ -Glu-Cis seguidos por una estructura terminal Gli; $(\gamma\text{-Glu-Cis})_n\text{-Gli}$, donde n alcanza un valor máximo de 11, pero generalmente se sitúa en el rango de 2 a 5 (Zenzk, 1996). En muchas especies se ha demostrado que los metales Cd y Pb, se unen a las fitoquelatinas después de inducir su producción (Grill *et al.*, 1987). Además, la capacidad de unión de las fitoquelatinas a los diferentes metales difiere, ya que compuestos de Cd se unen con más fuerza a las PCs que los del Pb, debido a que éste último presenta un radio iónico de conformación octahedral y tiene un número de coordinación alto (Pb, 6 – 8).

La inducción de las PCs se ha demostrado en cultivos de *Rauwolfia serpentina* a las que se añadió 1 mM Pb a su medio. Tal síntesis fue acompañada por una disminución del glutatión celular total (Grill *et al.*, 1987). Estos resultados reforzaron la creencia con respecto a que la síntesis de fitoquelatinas parte del glutatión y que tal síntesis es debida a la transpeptidación de dipéptidos de γ -glutamil cisteinil desde glutatión por la acción de una enzima constitutiva presente, la PC sintetasa (Chen *et al.*, 1997). Las uniones entre fitoquelatinas y los iones de plomo llevan al secuestro de iones plomo en plantas y de esta forma sirve como un importante componente que favorece el mecanismo de detoxificación en vegetales.

Además de las estrategias vegetales de tolerancia por exclusión y por acumulación, se ha de tener en cuenta otros sistemas de defensa no-específicos que se manifiestan cuando las plantas sufren estrés por plomo. Estos sistemas de defensa no-específicos incluyen síntesis de sustancias osmóticamente activas (prolina) y poliaminas (putrescina), antioxidantes, aminoácidos, cambios en la composición química de la pared celular (deposición de callosa y suberina), y cambios en el balance hormonal, principalmente sobre el etileno y ABA (Seregin e Ivanov, 2001).

Hay diferentes opiniones sobre los mecanismos de defensa no específicos mediante

el cual las sustancias osmóticamente activas como la prolina alivian los efectos de la toxicidad del metal dentro de la célula. Paleg *et al.*, (1984) han demostrado que la prolina libre actúa como osmoprotectora; Sharma y Dubey (2004), como proteína estabilizadora (Farago y Mullen, 1979), como quelante del metal; (Mehta y Gaur, 1999), como inhibidor de la peroxidación lipídica (Alia *et al.*, 2001) o como un radical libre reciclador o como un productor de oxígeno singlete.

1.9 Remediación de suelos contaminados con plomo

La remediación de suelos contaminados con plomo representa un significativo desafío para muchas industrias e instituciones gubernamentales. Hasta la fecha las áreas contaminadas con plomo han sido remediadas con una amplia gama de técnicas basadas en la ingeniería (Salt *et al.*, 1995). Los suelos excesivamente contaminados inicialmente son excavados, estabilizados con cemento y luego localizados en terrenos seguros. Este proceso es costoso y requiere lugares de restauración adicionales a los terrenos de partida.

Desde hace unos años el concepto de usar plantas para remediar la contaminación de los suelos ocasionada por los metales pesados, denominado fitorremediación, ha recibido gran atención (Raskin *et al.*, 1994; Vassil *et al.*, 1998; Jarvis y Leung, 2002; Barceló, 2003; Barceló y Poschenrieder, 2003).

La fitorremediación puede involucrar dos procesos: fitoestabilización y fitoextracción. La fitoestabilización reduce a niveles constantes la contaminación del suelo o la biodisponibilidad del metal pesado, mientras que, la fitoextracción usa plantas para extraer el contaminante del suelo. El concepto de usar plantas para acumular metal para su posterior procesamiento es técnica y económicamente atractivo.

Por razones prácticas, la concentración de plomo en la parte aérea es el parámetro fisiológico más importante para evaluar el potencial de fitoextracción de plomo de las plantas (Huang y Cunningham, 1996). Esto es debido a que la acumulación de plomo en raíces es significativamente superior que en la parte aérea, posiblemente debido a la baja translocación de plomo desde las raíces hacia la parte aérea (Cunningham *et al.*, 1995; Verma y Dubey, 2003). Sin embargo en *Thlaspi rotundifolium*, se ha encontrado una alta acumulación de plomo en la parte aérea en relación con la raíz, ya que acumula entre 130 y 8200 mg Pb.kg⁻¹ de peso seco de la parte aérea (Reeves y Brooks, 1983).

Por lo tanto algunas especies vegetales tienen la capacidad de translocar plomo con mayor eficiencia que otras. A razón de que su crecimiento es lento y su biomasa es pequeña, no obstante, estas especies no son candidatos vegetales ideales para hacer fitoextracción de plomo de suelos contaminados. En algunos cultivos de *Brassica juncea* se ha determinado una acumulación tan alta como el 1.5 % de Pb en la parte aérea cuando crece en solución nutritiva con 760 μM Pb (Kumar *et al.*, 1995). Sin embargo, un año después se observó que la concentración de plomo en la parte aérea de maíz era más alta que la acumulada por el mejor cultivo acumulador de plomo cuando las plantas fueron crecidas sobre un suelo contaminado con plomo (Huang y Cunningham, 1996).

Los resultados de experimentos de quelación indicaron que la concentración de plomo en la parte aérea puede ser incrementada dramáticamente cuando la concentración de plomo en el suelo es incrementada por la adición de un quelante sintético al suelo contaminado. Es decir, el uso de quelantes en el suelo puede favorecer la toxicidad del plomo. El quelante sintético EDTA forma un complejo soluble con muchos metales, incluyendo plomo (Kroschwitz, 1995) y puede solubilizar plomo desde partículas del suelo (Vassil *et al.*, 1998). La aplicación de EDTA a suelos contaminados ha mostrado que la absorción por plantas causa que el plomo se acumule por encima del 1% (p/p) de la biomasa seca de la parte aérea (Huang y Cunningham, 1996; Huang *et al.*, 1997). Las grandes partículas de Pb no pueden cruzar fácilmente la banda de Caspari debido a su tamaño y a sus cargas características, pero una vez forman un complejo con tales quelantes, como EDTA, su solubilidad incrementa y el tamaño de la partícula decrece haciendo creer que son parcialmente “invisibles” hacia aquellos procesos que normalmente deberían prevenir su movimiento sin restricción tal como precipitación con fosfatos y carbonatos o uniones a la pared celular mediante el mecanismo de intercambio catiónico (Jarvis y Leung, 2002).

El mecanismo por el cual los solutos se mueven simplásticamente se ha considerado como un tipo de transporte que utiliza una molécula de alta selectividad, que se opone a la difusión facilitada (Raven *et al.*, 1999). Aunque es claro que este mecanismo no involucra el transporte de plomo, y que el movimiento de partículas cargadas de plomo a través de esta vía podrían ser impedidas por su extensión, parecer ser que el complejo plomo-quelante facilita su transporte vía simplasto pudiendo pasar por esta vía

sucesivamente. Como punto final es importante controlar el uso y manejo de quelantes añadidos a los suelos, ya que el plomo acomplejado se moviliza dentro de las partículas del agua y se facilita su migración a otros medios en el ambiente. (Huang y Cunningham, 1996).

Otra tecnología limpia prometedora es la rizofiltración para eliminar contaminantes tales como metales pesados de aguas contaminadas utilizando raíces de plantas (Dushenkov *et al.*, 1995). Basándose en este planteamiento, Tung y Temple (1996) determinaron la deposición de plomo en las puntas de las raíces de maíz mediante estudios de microscopía electrónica e histoquímica realizados en plantas incubadas en un medio con 0.66 mM Pb durante 19 días. Estos autores observaron una fuerte deposición tanto en la superficie como en los tejidos internos dentro de los 2 primeros milímetros de la raíz principal y de las raíces secundarias.

Malkowski *et al.*, (2002) también han encontrado mayor acumulación de plomo en las puntas de las raíces de *Zea mays* L., en las puntas de las raíces se halló una concentración de Pb de 138,430 mg Kg⁻¹ en comparación con la acumulación en la parte basal de la raíz de 26,833 mg Pb.Kg⁻¹.

A partir de las anteriores investigaciones, se deduce que de todo el sistema radicular, aproximadamente el 50 % del plomo es acumulado en los primeros 8 mm de la parte apical de la raíz, y a su vez, que los sistemas radiculares con mayor ramificación pueden absorber más cantidad de plomo u otros metales pesados, a diferencia de plantas que tienen raíces largas y sistemas radiculares poco ramificados.

Actualmente se está avanzando en el conocimiento y desarrollo de la investigación en tecnologías como la fitoremediación y rizofiltración, ya que parecen ser tecnologías de futuro con un gran potencial para limpiar los suelos contaminados con plomo y otros metales pesados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El presente trabajo se inscribe en una de las líneas de investigación que se llevan a cabo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona bajo la dirección del Dr. Juan Barceló Coll y la Dra. Charlotte Poschenrieder sobre la fitotoxicidad por metales pesados y, de una forma más genérica, el estrés abiótico en vegetales. En dicho contexto, las investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio han ido evolucionando a la par que ha aumentado la experiencia del equipo en las distintas técnicas de estudio de los procesos y mecanismos responsables de las respuestas de los vegetales a las situaciones adversas.

A lo largo del tiempo que se ha dedicado a la investigación de estos fenómenos, tanto las técnicas como los enfoques han variado desde el análisis de nutrientes a nivel de órgano entero hasta la aplicación de técnicas de marcaje molecular y micromanipulación celular en línea con los avances desarrollados en este campo tanto por equipos nacionales como internacionales, manteniendo siempre una plena integración en los mismos como avala el nivel de las publicaciones y contribuciones a congresos alcanzado.

En este contexto se ha realizado el presente trabajo, con el ánimo de dilucidar algunos de los mecanismos más inmediatos de la actuación de un metal tan tóxico para los seres vivos como es el plomo.

La experiencia acumulada tanto por nuestro equipo como por los más relevantes equipos en el ámbito internacional en el campo de la fitotoxicidad por metales tóxicos, sean pesados o no, nos ha mostrado que los mecanismos más inmediatos de su actuación propenden a actuar sobre el primer órgano que entra en contacto con ellos, verbigracia, la raíz, y que los síntomas visuales que puedan aparecer pertenecen a estadios ya desarrollados de fenómenos que se manifiestan a tiempos muy tempranos de la entrada en contacto con las condiciones adversas. Es por ello que en este trabajo se ha aprovechado la experiencia en las técnicas de visualización más inmediatas a nivel de las zonas más sensibles de la raíz, a tiempos cortos, sin olvidar el estudio de fenómenos que requieren de un cierto tiempo para manifestarse, a la hora de planear los diferentes experimentos objeto del presente estudio.

Siguiendo esta línea, se planteó un conjunto de experimentos que van desde el momento casi inmediato de exposición al metal hasta niveles que llegan hasta las 48 horas de exposición al mismo, en el intento de dilucidar la secuencia de mecanismos que pueden dispararse como consecuencia y/o respuesta a las condiciones adversas impuestas por el medio. De esta forma, se diseñó una serie de experimentos en los cuales se combinaron diferentes técnicas y diferentes tiempos de exposición al metal.

En primer lugar, se diseñó una serie de experimentos utilizando una técnica ya utilizada con anterioridad en nuestro laboratorio para estudiar los efectos más inmediatos sobre la membrana celular combinados con técnicas de visualización de la compartimentación del plomo y sus posibles efectos sobre mensajeros celulares como el calcio. Con esta serie de experimentos se pretendía obtener una imagen clara tanto de la distribución del plomo a nivel apoplástico como simplástico, a la vez que se intentaba obtener una imagen clara de la respuesta de las diferentes zonas del ápice de la raíz a la exposición al metal. En concreto, el estudio de la distribución y de la penetración del plomo en las distintas zonas tiene que ser de gran importancia a la hora de desentrañar los mecanismos inmediatos de la actuación del metal, por lo que se procedió a la delimitación de la raíz en diferentes zonas que iban desde la zona más extrema del ápice radicular hasta las zonas en las que la diferenciación ya se había llevado a cabo completamente y en las que las células ya pueden considerarse completamente maduras, en orden a observar si los efectos a inmediatos o a corto plazo podrían depender del grado de desarrollo de las células sobre las que actuase el metal y la posible presencia de mecanismos de defensa que actuaran en las diferentes zonas de ataque.

Por otra parte, en el planteamiento no se olvidó la globalidad de la raíz como órgano ni tampoco la de la planta como un organismo diferenciado y con una estrecha coordinación entre sus partes. Es por ello que se plantearon experimentos encaminados a observar el comportamiento de las relaciones hídricas de la raíz y la parte aérea midiendo los diferentes parámetros hídricos que pueden influenciar tanto la conductividad hidráulica como el propio transporte de plomo hacia las partes aéreas.

Además, dada la importancia que para el transporte de los metales tiene la síntesis de diferentes compuestos acomplejantes que pueden servir para facilitar el transporte de diferentes metales por el xilema hacia las partes aéreas, se decidió analizar tanto los exudados de xilema como su contenido en plomo, bien directamente como después de

realizar una digestión de los mismos mediante técnicas polarográficas que permitieran discernir si el plomo viajaba como metal libre o acomplexado con alguna molécula orgánica.

Dado que muchos metales tóxicos presentan sus efectos a niveles muy bajos de concentración en los órganos afectados, se decidió realizar una medición de diferentes parámetros fotosintéticos y de transpiración con la doble intención de correlacionar los posibles efectos sobre la transpiración con los efectos que pudieran observarse en la conductividad hidráulica de la raíz junto con los posibles efectos sobre la fotosíntesis derivados de una posible menor eficiencia hídrica de las plantas sometidas a la exposición al Pb o, en su caso, intentar determinar si las posibles causas que se observaran podrían ser explicadas por mecanismos distintos al mero cierre estomático y más relacionados con una actuación directa del plomo a nivel más directo sobre los procesos implicados en la fotosíntesis.

Finalmente, la bibliografía consultada hace particular énfasis en la posible interacción del EDTA con la disponibilidad del plomo en el medio, particularmente en la capacidad de este agente quelante para disminuir la toxicidad por el metal. Por ello, todos los experimentos reseñados se plantearon aplicando el plomo tanto en presencia de EDTA como en ausencia del mismo, para así poder tener una visión clara de dicho efecto beneficioso reseñado en la literatura sobre el tema.

A partir del planteamiento anteriormente reseñado, esperamos obtener una imagen de los fenómenos implicados en la toxicidad por plomo que nos permita avanzar en el conocimiento de los mecanismos más inmediatos así como del posible efecto remediador de sustancias acomplexantes como el EDTA en un intento de conocer los mecanismos más tempranos que regulan la toxicidad por metales a fin de intentar contrarrestar los mismos con la mayor eficiencia posible antes de que su manifestación sea irreversible.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Experimentos realizados

Los Experimentos efectuados en el presente estudio son:

1. Determinación de la actividad Nitrato Reductasa en *Zea mays* L. c.v. Bakero en soluciones nutritivas CEE II control sin/con EDTA suplementados sin/con Mo, para determinar si el cofactor Mo afectaría la actividad Nrasa en los próximos experimentos.
 2. Medidas del crecimiento de la raíz y de la parte aérea expresadas en la longitud radicular absoluta, y, el área foliar, y, la medida de la extensibilidad, plasticidad y elasticidad de coleóptilos. En este experimento se han cultivado las plantas en hidropónicos sin/con EDTA suplementados con 100 μM Pb^{+2} , condiciones que se aprovechan para hacer la medida del contenido total de Pb^{+2} en raíz y parte aérea.
 3. Determinación de la conductividad hidráulica y la funcionalidad de las acuaporinas en la raíz entera de *Zea mays* L. c.v. Bakero en relación con los efectos del Pb^{+2} mediante la sonda de presión. Simultáneamente, estudio de las relaciones hídricas de la raíz y de la parte aérea mediante la determinación del potencial hídrico de la parte aérea, el potencial osmótico de la raíz y de la parte aérea. Para finalizar esta parte, medida de las tasas de transpiración y fotosintética bajo condiciones de invernadero y de cámara de cultivo.
 4. Análisis de exudados de xilema para determinar su potencial osmótico. En correlación, se han hecho mediciones del contenido y especiación del Pb^{+2} en exudados de xilema y soluciones nutritivas.
 5. Visualizaciones del simplasto, apoplasto, citoplasma y nivel intracelular, de ápices de raíces, con fluoróforos, aptos para microscopia con epi-fluorescencia. Con la microscopia de epi-fluorescencia se ha planteado cómo sucede la evolución del Ca^{+2} citoplasmático cuando sucede la penetración del Pb^{+2} en la punta de la raíz y su compartimentación.
 6. Detección de los daños de membrana ocasionados por el Pb^{+2} en los ápices de raíces usando la técnica de tinción vital.
-

3.2. Muestra biológica

El estudio se ha realizado utilizando como material vegetal raíces en germinación, coleóptilos y plántulas de *Zea mays* trihíbrido Bakero de la casa Semillas Batlle S.A., (Lleida, Barcelona). Esta planta corresponde a una monocotiledónea de origen francés, cuya clasificación taxonómica es:

Nombre común: Maíz

Nombre científico: *Zea mays*

Familia: Gramíneas.

El maíz es una planta anual con un gran desarrollo vegetativo, tallo nudoso y macizo con quince a treinta hojas alargadas y abrazadoras. Las raíces son fasciculadas y su misión es la de aportar un perfecto anclaje a la planta. En algunos casos sobresalen unos nudos de las raíces a nivel del suelo y suele ocurrir en aquellas raíces secundarias o adventicias.

Su cultivo *in situ* requiere temperaturas entre los 18 y 26 °C y un buen suministro de agua a través de su ciclo vegetativo, principalmente durante la floración. Es así, como se requieren suelos con buen drenaje, sueltos, aireados, planos o ligeramente quebrados. No es aconsejable suelos arcillosos debido a su alta retención de humedad, ya que esta condición disminuye el aire del suelo, esencial para el desarrollo de la planta.

Es una planta con inflorescencia monoica o sea que cada una lleva flores masculinas y femeninas separadas dentro de la misma planta. En cuanto a la inflorescencia masculina presenta una panícula (vulgarmente denominadas espigón o penacho) de coloración amarilla que posee una cantidad muy elevada de polen en el orden de 20 a 25 millones de granos de polen. En cada florecilla que compone la panícula se presentan tres estambres donde se desarrolla el polen. En cambio, la inflorescencia femenina marca un menor contenido en granos de polen, alrededor de los 800 o 1000 granos y se forman en unas estructuras vegetativas denominadas espádices que se disponen de forma lateral por lo que se pueden crear varias recombinaciones (cruces) y crear nuevos híbridos para el mercado.

Como planta fitorremediadora se ha intentado utilizar semillas del maíz cv. Himeca 95 para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de petróleo 3 y 6 % en tres períodos de siembra después de ocurrido el derrame petrolero sobre la germinación de las semillas de dicho maíz. En general, se encontró que los mejores resultados fueron

para las semillas que se sembraron después de 1 a 2 semanas de ocurrida la contaminación petrolera indicando que en suelos afectados por petróleo debería realizarse la siembra al poco tiempo después de la contaminación y no inmediatamente después (Méndez, *et al.*, 2004).

Por otra parte, con la planta experimental objeto de nuestro estudio, *Zea mays* trihíbrido Bakero, se estableció que es una especie de menor tolerancia al aluminio (Garzón, T., 2004).

3.3. Material vegetal y condiciones de cultivo.

Salvo en la medida de la extensibilidad de coleóptilos, y en las técnicas utilizadas en los apartados 3.4.5.3 y 3.4.5.4, el protocolo de siembra y tratamientos realizados fue el siguiente:

Las semillas de *Zea mays* se hicieron germinar mediante el sistema de “sándwich”. Para ello las semillas se colocaron entre dos capas de papel de filtro húmedo rodeadas de espuma de poliuretano también húmeda, repitiendo esta disposición de 2 a 3 veces. Este montaje se hallaba entre dos placas de metacrilato unidas con cinta adhesiva y el conjunto se sumergió por la parte inferior en una cubeta llena hasta una altura de 5 cm de agua corriente. El montaje se mantuvo en la cámara de cultivo durante 7 días, momento en que las plántulas eran suficientemente grandes como para ser transplantadas a la solución nutritiva en la que se realizaron los tratamientos.

Se utilizó la solución nutritiva CEE II. La composición de esta solución es la siguiente: K_2SO_4 , 100 μM ; $CaCl_2$, 200 μM ; $MgSO_4$, 50 μM ; $Ca(NO_3)_2$, 200 μM ; $MnSO_4$, 5 μM ; $ZnSO_4$, 0.38 μM ; $CuSO_4 \cdot 7H_2O$, 16 μM ; Fe-EDTA, 20 μM ; NaH_2PO_4 , 6.7 μM ; NH_4NO_3 300 μM ; H_3BO_3 , 8 μM . El componente $(NH_4)_6Mo_7O$ no se incluye en la preparación porque, según los cálculos realizados con el programa GEOCHEM (Parker, 1995; Parker *et al.*, 1987) forma precipitados con plomo. A partir de estos cálculos se observó que el Mo no estaba disponible en los tratamientos con Pb de forma que se decidió eliminarlo también de los controles para una mejor comparación entre los tratamientos. Previamente se realizó una medida de la actividad nitrato reductasa en solución nutritiva control con y sin Mo para comprobar el efecto que la adición o no de este micronutriente podía tener sobre los resultados.

Los cultivos se realizaron hidropónicamente en cubetas de 5L de capacidad con 5

plantas por cubeta. Las condiciones del cultivo fueron las siguientes (día/noche): Fotoperíodo: 16/8h T^a: 26/18 °C; H.R., 50/80% Iluminación: 330/0 μE.

Previamente a los tratamientos, las plantas se mantuvieron durante 24 h en solución nutritiva control + Mo a pH 4.5 con aireación constante y, pasado este período de aclimatación, fueron transferidas a las soluciones con los correspondiente tratamientos. El valor del pH se mantuvo en 4.5 en todos los tratamientos. Las plantas se mantuvieron 24 ó 48 horas en tratamiento antes de su recolección para ser analizadas.

Las soluciones control se diferencian en la presencia o ausencia de EDTA. Las mismas soluciones se han suplementado con Pb(NO₃)₂ 100 μM para obtener las soluciones tratadas con plomo. De esta forma, la nomenclatura empleada para los cuatro tratamientos realizados es la siguiente:

-EDTA – Pb; +EDTA –Pb; -EDTA –Pb; +EDTA +Pb.

3.4. Mediciones realizadas

3.4.1 Actividad del Pb libre

La actividad del plomo libre en la solución nutritiva utilizada se calculó con el programa GEOCHEM versión 2.0 para PC (Parker, 1995; Parker *et al.*, 1987).

La suma de especies monoméricas de Pb⁺² en la solución –EDTA, para una adición de Pb⁺² 100 μM a la solución nutritiva especificada, da un valor de 93.8 μM, presentando una actividad libre del cation plomo Pb⁺² de 76.89 μM. Por otro lado, la suma de especies monoméricas de Pb⁺² en la solución +EDTA con una concentración de Pb²⁺ 100 μM es 75.11 μM. Y presentaba una actividad libre del catión plomo Pb²⁺ de 61.39 μM

3.4.2 Medida de la actividad nitrato reductasa

El procedimiento utilizado consistió en germinar semillas de *Zea mays* L. trihibrido c.v. Bakero en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Los tratamientos realizados también fueron los mismos que los descritos, pero en lugar de Pb, a la solución nutritiva se le añadió o no Mo., de forma que se obtuvieron cuatro tratamientos según el esquema:

-EDTA – Mo; +EDTA –Mo; +EDTA –Mo; +EDTA +Mo

El ensayo *in vivo* se realizó cortando 1 cm de las puntas de raíz contando desde el ápice y pesándolas. Dichas raíces se introdujeron en tubos con 3 mL de sustrato tamponado (KNO_3 100 mM + isopropanol 1 % pH 7.0) durante 25 minutos en un sistema de vacío. Transcurrido este tiempo se retiraron las raíces de la solución y se añadió naftiletildiamina 0.05 % y ácido sulfanílico 1 %. Los tubos se homogenizaron y se dejaron reposar durante 15 minutos para esperar la reacción cromogénica. Finalmente se procedió a la lectura del producto formado a una longitud de onda de 540 nm. El tiempo de muestreo puede ser de 10 minutos a 2 horas debido a la alta estabilidad de la muestra, aunque no deben pasar más de 8 horas desde la toma de la misma y su análisis (Hageman y Flesher, 1975).

3.4.3 *Medida del crecimiento*

3.4.3.1 *Determinación del peso fresco, peso seco y contenido hídrico*

Las muestras obtenidas para la determinación de peso fresco y peso seco se utilizaron también para la determinación del contenido en plomo.

Las plantas fueron crecidas en los diferentes tratamientos según se detalla en el apartado 3.1 y se tomaron muestras a las 24 y 48 horas de tratamiento. Para ello, se separaron en raíces y parte aérea.

Previamente a la determinación del peso fresco, las raíces fueron sumergidas en una solución de CaCl_2 1 mM durante 1 minuto para reabsorber el exceso de Pb proveniente de la solución nutritiva y al cabo de dicho tiempo se lavaron cuidadosamente con agua destilada. Posteriormente, se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de agua.

Las muestras pesadas fueron introducidas en bolsas de papel previamente taradas y depositadas en una estufa a 105°C durante 24 h, al cabo de las cuales se procedió a la determinación del peso seco. Para ello se pesó el conjunto de la muestra más la bolsa de papel y, al conjunto se le restó el peso previamente anotado de la bolsa. Las muestras se guardaron en un desecador hasta su procesado para la determinación del contenido en Pb.

El contenido en agua se determinó mediante la diferencia entre el peso fresco y el peso seco y se expresó en porcentaje sobre el peso fresco.

3.4.3.2 Medida del área foliar

La medición del área foliar se realizó por separado en cada una de las hojas desarrolladas en el momento de la toma de muestras (24 y 48 horas). Para ello, se procedió a digitalizar cada hoja por separado mediante un escáner plano AGFA Photoscan 320 y posteriormente fueron procesadas mediante el programa Image Pro Plus 2.0, previamente calibrado digitalizando una imagen de un retículo a la misma resolución que las imágenes de las hojas.

3.4.3.3 Medición de la longitud radicular

3.4.3.3.1 Crecimiento absoluto

Las mediciones de la longitud de las raíces se realizaron con una regla milimetrada a las 24 h y 48 h de crecimiento en cada uno de los tratamientos empleados. Se tomaron 3 réplicas de cada medición.

3.4.3.3.2 Medida de la extensibilidad de coleóptilos.

Con el objeto de establecer la posible función del plomo como inductor de alteraciones de estos parámetros en la inhibición del crecimiento, se ha planteado determinar la influencia *in vitro* de diferentes concentraciones de Pb sobre la extensibilidad, la plasticidad y la elasticidad de la pared celular,

Los experimentos se han realizado con coleóptilos no curvados de 15 mm de longitud obtenidos de semillas etioladas de *Zea mays* L trihíbrido Bakero. Los coleóptilos crecieron en la oscuridad a 26 ± 1 °C durante tres días (Malkowski *et al*, 1996). Los coleóptilos se cortaron desde las semillas hasta 3 mm por debajo de la punta. Después de extraer las primeras hojas con una pinza se colocaron en placas de Petri con 10 mL de solución conteniendo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a 0, 250, 500 ó 1000 μM . Y se mantuvieron en agitación continua durante 30, 60 ó 120 min. Posteriormente se lavaron con una solución de CaCl_2 0.4 mM seguida de agua destilada (MilliQ) y después de secarlos con un papel de filtro, se congelaron a -30 °C.

La técnica seleccionada para medir las propiedades mecánicas de la pared celular está basada en la técnica de Instron combinada con un test de deslizamiento de acuerdo

con Kutschera y Schopfer (1986), según el esquema de la figura 1.

Para medir la elongación de los coleóptilos se utilizaron transductores de desplazamiento lineal (LVDT) del tipo DF-1, los cuales se alimentaron con corriente continua a partir de un amplificador de señales DCU1B (Sangamo, U.K.). El sistema presenta una sensibilidad aproximada de $75 \text{ mV} / \text{V}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ y un rango de salida ajustado a $\pm 8 \text{ V DC}$ ($\pm 1 \text{ mm}$) (Gunsé, *et al.*, 1992).

El software utilizado ha sido diseñado con el fin de controlar individualmente el transductor, pudiendo ser éste de distinta sensibilidad según las necesidades del

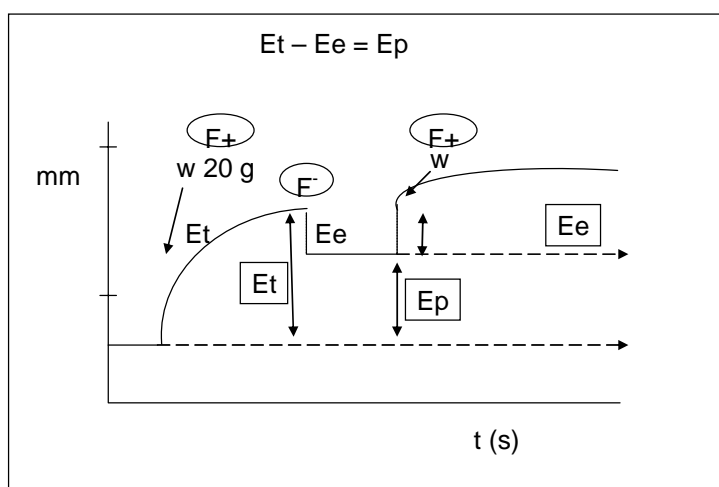


Figura 1. Curva esquemática de extensibilidad *in vitro*, indicando extensibilidad total, plástica y extensibilidad elástica tomada de Kutschera y Schopfer (1985).

coleóptilo. La posición de los transductores se puede ajustar en caso de que la elongación del coleóptilo supere el máximo desplazamiento que proporciona el transductor (10 mm). El peso que soporta el coleóptilo es de 5 g.

Los transductores están conectados a una tarjeta de conversión ADDA 14 (Analógico / Digital - Digital

/ Analógico, Flytech, Taiwan) con las siguientes características: permite recibir señales de hasta 16 canales con una resolución de 14 bits y un tiempo de ciclaje menor de $42 \mu\text{s}$. Esta tarjeta está conectada a un computador compatible PC / XT (Elbe Microsystems PCX, Barcelona, España) con un procesador principal 8088 y un coprocesador matemático 8087 que corre a 4.77 ó 10 MHz. La resolución del sistema es de $10 \mu\text{m}$ con una fluctuación del 1 %.

Los programas para la tarjeta ADDA 14 se han escrito en GWHBASIC (Microsoft Corporation) (Gunsé, *et al.*, 1992). Para el procesamiento de los datos se generan archivos ASCII que pueden ser cargadas por las hojas de calculo actuales, de esta forma se han ampliado los procesos matemáticos y estadísticos.

En la figura 1 puede observarse el deslizamiento gráfico cuando las paredes celulares rompen sus proteínas y se someten a dos extensiones sucesivas bajo una fuerza

constante. El estrés a lo largo de la pared se representa en función de la extensión. La primera extensión implica tanto un componente elástico (reversible) y uno plástico (irreversible), mientras que de la segunda extensión se obtiene exclusivamente el componente elástico. Si se repitieran más extensiones se obtienen curvas similares a la de la segunda extensión.

3.4.4 Medida de relaciones hídricas y fotosíntesis

3.4.4.1 Determinación del potencial hídrico de la parte aérea

Para la realización de las mediciones se empleó el método de cámara de presión de Scholander (Scholander, PF. 1964; 1965; 1966), utilizando una cámara de presión ARIMAD 2, con aire no respirable comprimido como gas a presión y realizando las mediciones a temperatura ambiente.

Las medidas del potencial hídrico de la parte aérea se han realizado separando con una cuchilla muy afilada la parte aérea de la raíz. Posteriormente, el tallo se introdujo en un sello de silicona ajustado al diámetro del mismo y las hojas se introdujeron en la cámara de presión procurando que salieran al exterior unos pocos milímetros del extremo del tallo cortado. Se aumentó la presión en la cámara a una velocidad de aproximadamente 0,15 MPa cada 30 segundos y se observó con una lente de aumento la formación de pequeñas gotas en el extremo del peciolo. Debido a que los tallos de *Zea mays* L. tienen cierta cantidad de aire, la primera aparición de gotas en el extremo libre del tallo en muchas ocasiones era debida a la expulsión de aire pero no a la extrusión de savia, debido a lo cual fue necesario proceder a la eliminación de estas burbujas con papel secante para poder observar la verdadera aparición de la misma (Gunsé, 1987).

3.4.4.2 Determinación del potencial osmótico de raíz y parte aérea.

La lectura del potencial osmótico se realizó tanto en raíces como en parte aérea, para cada tratamiento y tiempo de exposición.

Previamente a la determinación del potencial osmótico, las muestras fueron congeladas para romper las estructuras y permitir una mejor extracción de la savia. Se procedió a extraer la savia mediante una pequeña prensa de mano y con ella se humedeció un papel de filtro (Whatman n° 2) que fue introducido en la cámara de

lectura, la cual se dejó estabilizar y se enfrió hasta el punto de rocío, midiendo la resistencia de un termopar a dicha temperatura y refiriéndola a una escala patrón realizada con diferentes soluciones de molaridad conocida.

Las lecturas fueron realizadas con un Psicrómetro Wescor HR-33T dew point microvoltmeter.

3.4.4.3 Determinación de la conductividad hidráulica y funcionalidad de acuaporinas mediante sonda de presión

Raíces principales crecidas en soluciones control sin/con EDTA durante 24 h a pH 4.5, fueron transplantadas a una cubeta con un litro de soluciones control sin/con EDTA o soluciones tratadas con Pb al mismo pH. Rápidamente, se conectó la raíz a la sonda de presión, la cual se mantuvo sumergida dentro de las soluciones en la cubeta hasta las 24 h y las 48 h para su medición, usando el método hidrostático descrito por Steudle y Jeschke (1983) según el montaje de la figura 2.

La Sonda de Presión (Dr. Steudle., Bayreuth-Alemania) se compone de un capilar ($\Phi=250 \mu\text{m}$) lleno de aceite de silicona (AS4, Wacker Chemie, Munich, Germany) y agua, formándose una interfase considerada como el menisco. El capilar debe mantenerse libre de micro partículas que pueden entrar durante su manipulación y alterar la presión radicular. Este se une a un transductor de presión que a su vez se une a un tornillo o huso micrométrico mediante una barra de metal extrafina.

Se introduce la raíz principal en tapones de silicona perforados (con diferentes diámetros radiculares) ajustados sobre el extremo final del capilar de la Sonda de Presión, este montaje constituye la sonda de presión radicular (SP_r), y se espera a que suba la presión hidrostática del xilema haciendo seguimiento mediante un registro continuo de la misma. La estabilización de la presión sucede en uno o dos días, por lo que se han registrado los datos a las 24 h y 48 h de tratamiento.

La lectura se hace ubicando el menisco de la interfase agua/silicona dentro del capilar seguido mediante un estéreo microscopio (Wild M3Z, Leica Heerbrugg AG Heerbrugg, Suiza) provisto de un ocular graduado y calibrado. Para realizar las mediciones se desplaza el menisco sobre el capilar aplicando con el huso micrométrico presiones negativas y positivas homogéneas a la raíz a través del capilar y se registran los cambios de presión y las curvas de relajación obtenidas. Este registro es digitalizado

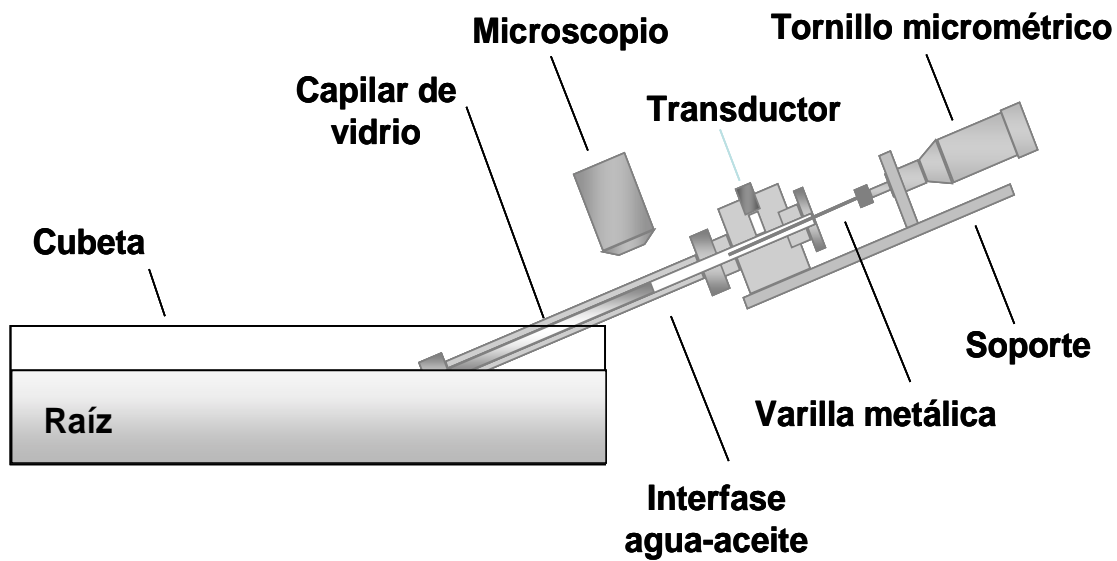


Figura 2: Sistema de sonda de presión de raíz empleado para la medida de los diferentes parámetros hídricos según se detalla en el texto.

punto a punto en un tablero digitalizador (KD 4610 Graphtec Corp., Yokohama, Japón) conectado a un computador tipo PC y los datos obtenidos se guardaron en archivos de texto ASCII para su posterior procesamiento mediante los programas desarrollados en nuestro laboratorio a tal fin (Gunsé *et al.*, 1992).

La conductividad hidráulica (L_{pr}) de la raíz fue evaluada considerando la diferencial de presión en función del diferencial del volumen provocado por el movimiento del menisco, en un sistema constante como es el volumen del cilindro vascular de la raíz (sin punta apical). El inverso de la extensibilidad elástica del sistema ($\beta = \Delta P / \Delta V$) fue determinado como el cambio de la presión (P) en respuesta a un cambio en volumen (V) causado por el movimiento del menisco hacia delante o hacia atrás. Las relajaciones de la presión radicular fueron obtenidas por incremento (flujo exosmótico) o disminución (flujo endosmótico) del volumen de líquido en la cabeza de la sonda de presión. La conductividad hidráulica (L_{pr}) fue calculada de acuerdo con la ecuación de Azaizeh y Steudle (1991):

$$L_{pr} = \frac{1}{A} \frac{\ln 2}{\beta t_{1/2}}$$

En donde:

Conductividad hidráulica:	$L_{pr} = \mu\text{m MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$
Área del cilindro correspondiente a la raíz:	$A_r = \pi \cdot h \cdot d$
Coefficiente del sistema ($\Delta P / \Delta V$):	$\beta = \text{MPa}^{-1} \text{m}^3$
Tiempo medio de relajación:	$t_{1/2} = \text{s}$

Para verificar si las acuaporinas sensibles a HgCl_2 están presentes, tras la primera medición, se cambió la solución nutritiva inicial por solución nutritiva con $50 \mu\text{M/L}$ HgCl_2 y se dejó la SP_r en este tratamiento durante 5 min. A continuación se cambió la solución anterior por la solución nutritiva inicial, se esperó durante 5 min a que el sistema se estabilizara, y se realizó una nueva medición de Lp_r .

Posteriormente se sumergió la raíz en solución nutritiva fresca con el tratamiento correspondiente a la que se había añadido DTT ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) 5mM (43815-Fluka) para eliminar el mercurio de las raíces y se dejó en este tratamiento durante 5 min.

Nuevamente, se cambió la solución anterior por la solución nutritiva inicial, se dejó la SP_r durante 5 min y se realizó una nueva medición de Lp_r .

Al acabar los tratamientos descritos se procedió a la medición de la longitud de la raíz con una regla milimetrada y el diámetro mediante el ocular graduado y calibrado del estereomicroscopio.

Los parámetros de la conductividad hidráulica y las tasas de elongación de las raíces fueron tomados de tres muestras por tratamiento, tanto a las 24 h como a las 48 h.

3.4.4.4 Medición de la tasa de transpiración y fotosíntesis

La medición de la tasa fotosintética y de transpiración se ha realizado tanto en condiciones de cámara de cultivo como de invernadero, a fin de minimizar los efectos de la posible baja iluminación en la cámara de cultivo y así poder asegurar que las variaciones observadas se debían realmente a la exposición al Pb y no a la variación en las condiciones de cultivo.

Se ha utilizado un sistema portátil para fotosíntesis, LCI (A.D.C.-LCA4, Inglaterra) utilizando una cámara de medición con un área de $6,0 \text{ cm}^2$ en la cual se introducen las hojas de las plantas. Las hojas se dispusieron con la cara adaxial dirigida hacia la luz solar en el invernadero o hacia el foco de luz en la cámara de cultivo. Para conocer la concentración de CO_2 de referencia en la atmósfera, se toma una muestra de aire externo a la cámara de cultivo o invernadero a través de un tubo conectado al IRGA. La temperatura de la hoja es controlada usando la circulación del aire dentro de la cámara de medición. Esta temperatura se mide con un termopar conectado a la cámara de medición. El aire que entra en dicha cámara es secado y pasado a través de la misma con un caudal de 1 L min^{-1} .

En las mediciones en cámara de cultivo la luz fue proporcionada por una lámpara halógena de 500 W, que se colocó 30 cm por encima de la cámara de medición. La PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) de la hoja dentro de la cámara fue mantenida al máximo de irradiancia posible durante el período de la medición, siendo ($530 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en cámara de cultivo y en torno a los $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en condiciones de invernadero

3.4.5 *Compartimentación*

3.4.5.1 Medida del Pb total

Se tomaron 3 plantas de cada tratamiento, tanto a las 24 h como a las 48 h de exposición al plomo y se separaron en raíz y parte aérea. Se lavaron con CaCl_2 0,4 mM para eliminar el exceso de Pb^{+2} , y a continuación con agua desionizada (grado MilliQ Q-Plus, Millipore, Francia) a la que se añadió HNO_3 1% para eliminar los residuos no solubles. Se determinó el peso fresco y, las muestras se secaron a 105°C durante 24 h. Una vez secas, se procedió a determinar el peso seco y las muestras se guardaron en un desecador hasta el momento de su utilización.

Para la determinación del Pb se utilizó una técnica de digestión ácida de la muestra mediante HNO_3 : H_2O_2 en vasos cerrados mediante calentamiento por microondas. Para ello, se utilizaron 0,15g de material seco que se introdujeron en los vasos de digestión de 90 ml, y se añadieron 2 ml de H_2O_2 30 % y 5 ml HNO_3 69 %. Los vasos fueron sellados herméticamente e introducidos en un digestor de microondas (O-I Analytical Microwave digestion System Model 7295) a una presión estándar de 140 psi. El digestor se llevó a esta presión de estabilización mediante una rampa de 7 pasos. Para cada paso, se cumplieron condiciones específicas: de presión, de potencia del digestor, de tiempo de estabilización (mínimo) y de tiempo de finalización (máximo). Estas condiciones se resumen en la tabla 2.

Pasos	Potencia %	Presión (<i>Psig</i>)	Tiempo mínimo (<i>min</i>)	Tiempo máximo (<i>min</i>)
1	30	20	2	5
2	30	40	5	6
3	30	60	2	3
4	30	80	2	3
5	50	100	2	3
6	60	120	2	3
7	70	140	15	16

Tabla 2. Rampa de digestión utilizada en el digestor de microondas O-I Modelo 7295.

Finalizado este proceso se enrasó el producto digerido con 25 ml de agua milliQ y se procedió a la lectura de Pb^{+2} en un stand polarográfico MDE150 (TraceLab 50 Radiometer analytical), controlado por un microprocesador y el programa TraceMaster 5, mediante, voltimetría de onda cuadrada (S.W.V.) (Bott A.W., 1995), aplicando los siguientes parámetros:

- Electrodo: HMDE Electrodo de Hg de gota colgante; Gota (Nbr): 4; Velocidad de agitación: 400 r.p.m.; Tiempo de purga: 300 s; Tiempo de electrolisis: 50 s; Tiempo de adsorción: 10 s; Tiempo de caída de la gota de Hg: 0.7 s.
- Rango de potenciales: -800 / 50 mV; duración del paso: 0.04 s; amplitud del escalón: 1 mV; amplitud del pulso: +50 mV.
- Escala de corriente: mínimo: 10 n A, máximo: 10 μ A
- Elemento identificador: Pb (-380 Mv).

La curva de calibración se realizó con soluciones estándar de 25, 50 y 100 ppb.

Para la determinación de Pb en muestras vegetales se trabajo dentro de los siguientes límites de detección: 5 – 200 μ g/l (ppb).

El sistema estaba controlado por el software TraceLabTM50.

Se realizó un total de 3 réplicas por órgano (raíz o parte aérea) por cada tratamiento.

3.4.5.2 Medida del contenido y especiación del Pb en exudados de xilema y en solución nutritiva

Para proceder a la especiación de plomo en exudados de xilema, las plantas se cultivaron como se ha descrito en apartados anteriores. Una vez transplantadas a las condiciones de tratamiento, se cortó con un bisturí la parte aérea de 10 plantas dejando unos pocos milímetros de tallo para poder ajustarlo a los tubos de recolección.

Inmediatamente después de cortados, se procedió a introducir la base del tallo en tubos flexibles de silicona de entre 2 y 3,5 mm de diámetro interno, dependiendo del diámetro del tallo que, a su vez, estaban conectados a tubos de 10 ml en los cuales se almacenaba el exudado del xilema radicular.

La recolección de los exudados se realizó durante 24h. En los exudados correspondientes a una exposición de 48 horas al Pb, se mantuvieron en solución con el tratamiento durante 24 h sin cortar y, pasado este tiempo, se realizó la recolección durante 24 h., de forma que la exposición total al metal fue de 48 h. Seguidamente, se procedió a mantener los exudados en congelación (-80°C), hasta la medida del contenido y especiación de plomo.

La medición del Pb en los exudados se realizó tanto directamente del exudado recogido, como tras una digestión ácida de las muestras. Esta digestión difirió ligeramente de la realizada con el material seco, y para ello se emplearon 300 µl de muestra y 200 µl de HNO₃ 70 %. El proceso de calentamiento fue el mismo que el realizado en el apartado anterior y una vez finalizado el mismo, se enrasó el producto digerido con 1000 µl de agua milliQ.

Para la determinación del Pb, se utilizó el mismo protocolo de voltametría que en el apartado anterior, tanto para las muestras sin digerir como para las muestras digeridas.

En el caso de la solución nutritiva, se siguió el mismo protocolo que en los exudados del xilema.

3.4.5.3 Visualización de la variación en el calcio citoplasmático en puntas de raíz

Se replicó el protocolo de preparación y tinción desarrollada por Nichol B.E. y Oliveira L.A. (1995) bajo condiciones de oscuridad debido a la alta fotosensibilidad del fluoróforo.

Inicialmente, se procedió a la disolución del indicador. Se disolvieron 5 µg de Fluo-3 con 1 ml de DMSO (1 Mm) y se obtuvo una concentración 50 µM de Fluo-3.

Para realizar las tinciones de los ápices radiculares, se han realizado tres tinciones por cada tratamiento. Cada tinción requiere una preparación de 1:10 entre el indicador y el tratamiento a probar: se preparó Fluo-3 (1 mM) en eppendorf de 0.2 ml por cada punta de raíz. Adicionando, 10µl Fluo-3 y 190µl de solución nutritiva sin/con EDTA a p.H. 4.5. Rápidamente, se homogenizó la preparación con la misma punta de la micropipeta. Mientras tanto, se cortó la punta de la raíz (5 mm) con el bisturí y se sumergió dentro de la preparación del Fluo-3. Se procuró no alterar el tejido por roce con la base del eppendorf. Se incubó la tinción a 26°C durante 20 min. Sin retirar el eppendorf, de la estufa, se procedió a lavar dos veces la punta de la raíz en un eppendorf con 200 µl H₂O_D durante 5 min/cada vez. De esta forma, se aseguró la remoción del Ca⁺² apoplástico y minimización de una posible emisión parásita.

De aquí en adelante, se ha de tener presente que tanto para ésta visualización como para las descritas en otros apartados, la fijación del ápice de la raíz, el montaje y la visualización de la raíz por microscopia con epi-fluorescencia invertida tienen la misma técnica.

Para la fijación del ápice de la raíz al cubre-objetos. Se continuó procediendo en condiciones de oscuridad. Se secó con papel filtro el exceso de H₂O_D residual de la punta de la raíz, de forma cuidadosa. Inmediatamente, se fijó la raíz al cubre-objetos con resina (Blue-tack, Bostik Findley, S.A., Rubí, Barcelona). Se elaboraron bandas muy finas de resina, luego, se fijó el ápice de la raíz al cubre-objetos, pasando una banda de resina por encima del extremo apical de la raíz, y otra, hacia el sitio de corte.

Para proceder al montaje del ápice radicular sobre el porta-objetos excavado, se preparó el porta-objetos excavado con 200 µl del tratamiento a visualizar. Los tratamientos correspondieron a soluciones nutritivas control y soluciones tratadas con 100 µM Pb(NO₃)₂ a p.H. 4.5. Estos tratamientos son: +EDTA; -EDTA; +EDTA+Pb; -EDTA+Pb. Seguidamente, se montan el cubre-objetos (con el ápice hacia abajo) sobre el porta-objetos excavado sin formar burbujas de aire y dejando el ápice centrado en el pozo excavado, sumergido en el tratamiento y sin alterar su morfología. Para terminar, se absorbió el exceso de tratamiento que sobresalió del cubre-objetos con papel filtro y se aplicó laca de secado rápido a los bordes del cubre-objetos, de esta manera, se selló,

el cubre-objetos al porta-objetos excavado. Inmediatamente, los ápices radiculares fueron observados por microscopia con epi-fluorescencia invertida.

Para la captación de imágenes correspondientes al incremento de la luminancia de la fluorescencia en las células apicales de la punta de la raíz. Se utilizó un microscopio invertido con epi-fluorescencia, ECLIPSE TE 2000, Nikon, (Equipado con lámpara de Hg, espejo dicróico, filtro de excitación/emisión: 420 nm/520 nm). Este tipo de microscopia garantizó la eliminación de luz parásita. Se utilizó un objetivo PL EWLD 40x. Se utilizó el fluoróforo: Fluo-3, excitado con las líneas de los 420 nm y 520 nm con una lámpara de Hg de 100 W., y, se procedió a tomar las imágenes del ápice radicular a intervalos de 7 minutos durante 30 min, con un tiempo de exposición de 1750 ms.

Una vez tomadas las imágenes del incremento de la luminancia para los intervalos estudiados, se procesaron las 7 pilas de imágenes, con el programa de adquisición de imágenes, Image Pro Plus v. 3.0. Para ello se procedió a identificar 20 células por muestra y a crear una máscara se realizó la medición de la luminancia total de cada célula tanto al inicio como al final del tratamiento, y los resultados se expresaron en forma de variación porcentual de la luminancia entre los intervalos escogidos. Como se obtuvo que la luminancia variaba linealmente con el tiempo, se decidió utilizar únicamente los valores proporcionados al principio y al final del experimento (a los 0 y 30 minutos), de forma que los valores representados en el gráfico corresponden a la variación de la luminancia en ese período de tiempo, expresados en forma de porcentaje respecto al tiempo inicial.

Para la utilización de los fluoróforos Phen GreenTM FL Diacetato y LeadmiumTM Green AM, Phen Green SK Dipotassium Salt, se utilizó el mismo protocolo de microscopia que en este apartado.

3.4.5.4 *Compartimentación y visualización de la penetración de Pb en puntas de raíz*

3.4.5.4.1 *Visualización del Pb apoplástico.*

Para la medición de la evolución del Pb⁺² apoplástico, se utilizó el fluoróforo, Phen Green SK Dipotassium Salt (P14312 Molecular probes) y se utilizó el mismo protocolo descrito en el apartado anterior. La captación de imágenes, difirió, en cuanto que se

utilizó un tiempo de exposición menor, 600 ms.

3.4.5.4.2 Visualización del Pb simplástico

Para la medición de la evolución del Pb citoplasmático en puntas de raíz. Se utilizaron dos fluoróforos, Phen GreenTM FL Diacetato y LeadmiumTM Green AM. Durante el procedimiento de preparación y tinción, se mantuvieron las condiciones de oscuridad.

Para la preparación del Phen GreenTM FL Diacetato (P6763 Molecular Probes) y LeadmiumTM Green AM. (I36352 Molecular Probes), y, la fijación del ápice de la raíz, el montaje y la visualización por microscopia con epi-fluorescencia invertida, se utilizó la misma técnica que en el apartado 3.4.5.3., excepto que, se capturaron las imágenes del ápice radicular con un tiempo de exposición de 600 ms.

3.4.6 Visualización de la viabilidad celular en el ápice radicular mediante tinción vital

Se utilizaron raíces crecidas en cultivos hidropónicos en soluciones control sin/con EDTA y soluciones tratadas con Pb durante 24 y 48 h.

Para proceder a la tinción vital, se utilizó un fluorocromo vital, el diacetato de fluoresceína, FDA, (SIGMA 209-877-6), y, un fluorocromo letal, ioduro de propidio, PI, (SIGMA 247-081-0). Se replicó el protocolo de tinción según Koyama *et al.*, (1995).

Para la preparación de los dos fluorocromos se prepararon las soluciones stock: una solución stock de FDA, con 5 mg de FDA en 1 ml de acetona y, una solución stock de PI, diluyendo 1 mg de PI en 50 ml de DPBS (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline). Previamente, se preparó el buffer DPBS con NaCl 140 mM; Na₂HPO₄ 6 mM; KH₂PO₄ 4 mM para un volumen de 100 ml, en un rango de pH entre 6.9-7.1. Las soluciones stock, se guardaron en el congelador para su posterior utilización, y siempre, se manejaron evitando su alta sensibilidad a la luz.

Para la tinción del ápice radicular con FDA, se diluyeron 40 µl de la solución stock de FDA, con 10 ml de DPBS, obteniéndose una concentración de 5 µM de FDA. De la preparación anterior, se colocaron 100 µl de FDA 5 µM, en un eppendorf, en la cual, se sumergió un ápice radicular, durante un tiempo de tinción, de 3 minutos. Seguidamente,

se lavó, el ápice radicular en otro eppendorf con DPBS, moviendo la raíz dentro del buffer, cuidadosamente, durante 1 minuto.

Inmediatamente, se procedió a hacer la tinción con PI, utilizando un eppendorf, donde se sumerge el ápice radicular en 30 μ l de solución stock de PI, durante un tiempo de tinción de 10 minutos.

Para proceder al montaje del ápice radicular, se colocó la raíz teñida sobre un porta-objetos con 200 μ l de DPBS, y, se colocó el cubre-objetos sobre el porta-objetos, empezando con un ángulo de inclinación agudo, hasta la posición horizontal, del cubre-objetos con la raíz y con el porta-objetos, se evitó deformar el ápice radicular y la formación de burbujas de aire. Para finalizar el montaje, se absorbió el exceso de DPBS con papel secante en los borde del cubre-objetos.

La visualización se realizó con microscopio de epifluorescencia NIKON Optiphot 2. Equipado con lámpara de mercurio. Filtro UV-1A (filtro de excitación: 365/10 nm, espejo dicróico: 400 nm y filtro barrera a 400 nm). Finalmente, se adquirieron las imágenes de tres ápices radiculares por cada tratamiento, con el programa Image Pro Plus v 3.0. (GUNSÉ *et al.* 2003).

3.4.7 *Tratamiento estadístico*

En cada apartado de este capítulo se ha descrito la forma de obtener y analizar los resultados para cada experimento. Sin embargo, para el proceso de los datos globales se ha procedido a calcular los promedios, las desviaciones estándar, las diferencias significativas entre tratamientos y algunas regresiones lineales con el programa STATISTICA v. 4.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efectos sobre la actividad nitrato reductasa.

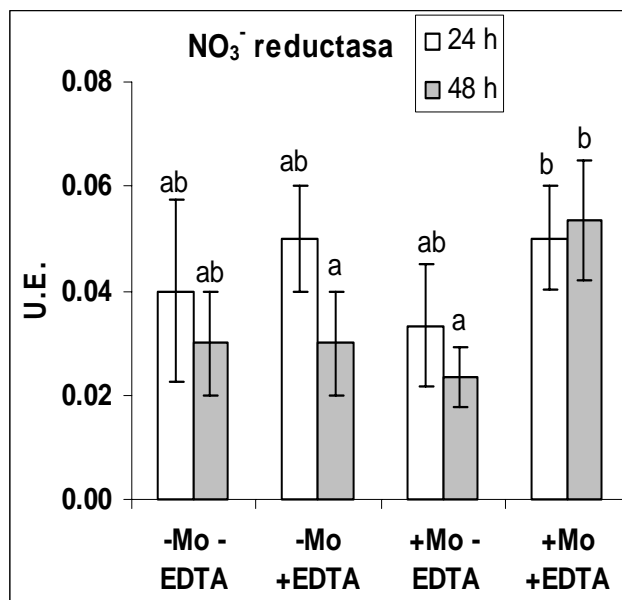


Gráfico 1. Actividad nitrato reductasa de raíces de *Zea mays* L. tratadas con soluciones control en ausencia de molibdeno (medias \pm s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

La comprobación del efecto de la falta de Mo sobre la actividad nitrato reductasa muestra claramente que la no adición de dicho micronutriente en la solución no ha afectado significativamente los niveles de actividad de esta enzima.

En todo caso, en el gráfico 1, sí que se observa una ligera, aunque no significativa, reducción en la actividad a las 48 h en los tratamientos -Mo-EDTA, -Mo+EDTA y +Mo-EDTA, que no aparece en el tratamiento +Mo+EDTA. Estos resultados

claramente muestran que las variaciones observadas no se deben a los tratamientos y únicamente en los casos reseñados se pueden deber al tiempo de crecimiento de la plántula, aunque, igualmente al comparar estos tratamientos entre sí, no hay diferencias significativas entre ellos. Donde sí que se observan diferencias significativas a las 48 horas entre el tratamiento +Mo-EDTA y el tratamiento +Mo+EDTA, aunque no se presentan diferencias entre este último y el resto de tratamientos, ni a las 24 ni a las 48 horas de crecimiento.

4.2. Efectos sobre el crecimiento

4.2.1 Efectos sobre peso fresco, peso seco y contenido hídrico

En el gráfico 2A se observa que el peso fresco de la raíz solamente presenta diferencias significativas en el tratamiento +Pb-EDTA a las 48 h si lo comparamos con

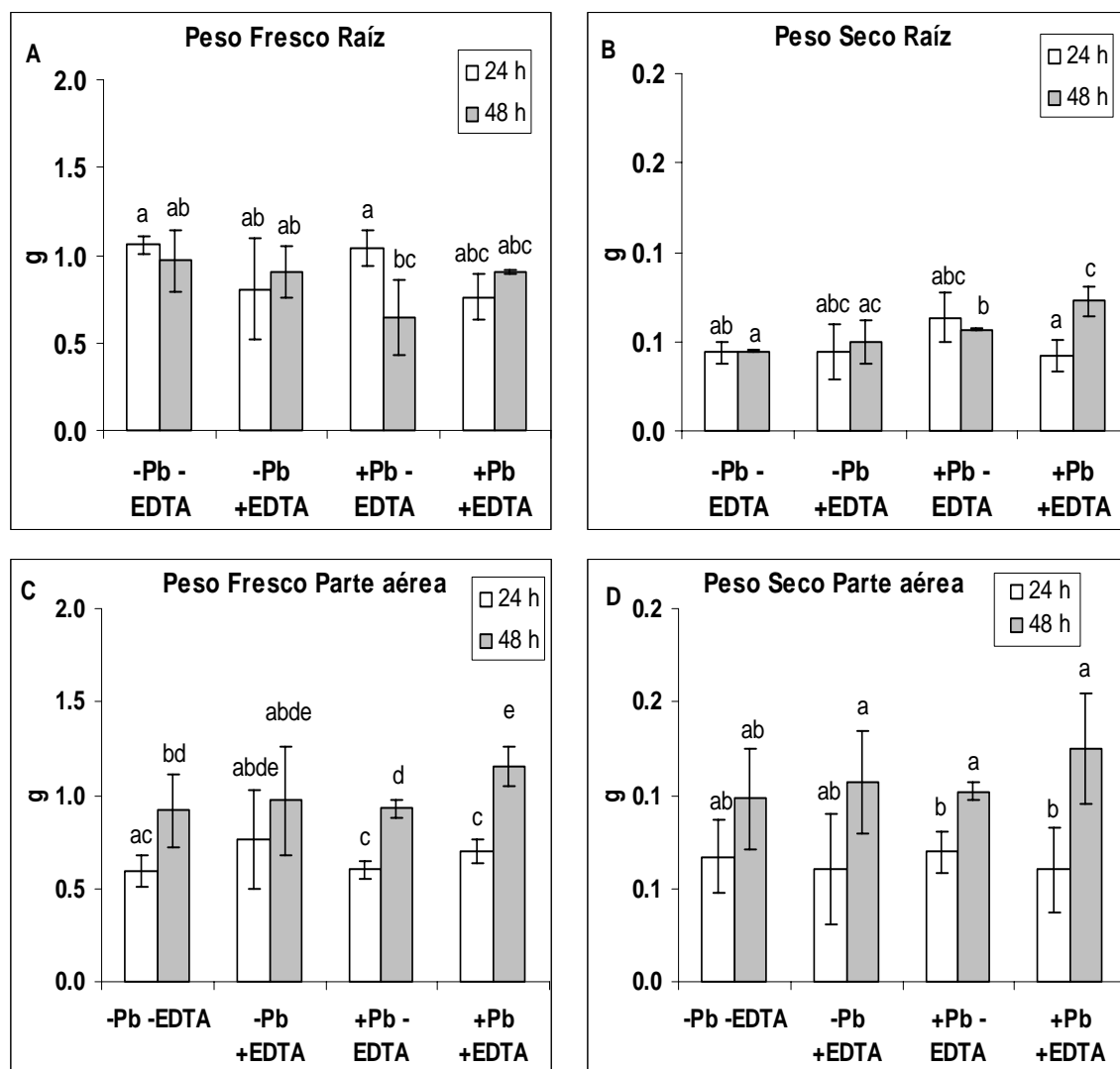


Gráfico 2. A, B, peso fresco y peso seco de raíz, y C, D, peso fresco y peso seco de parte aérea de plantas de *Zea mays* L. crecidas en soluciones control y soluciones tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (medias \pm s.d.; $n=3$). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

el mismo peso a las 24 h. Estas diferencias se establecen en el mismo tratamiento al comparar los tiempos de exposición, pero no entre tratamientos para un mismo tiempo de exposición. En el gráfico 2C, correspondiente al peso fresco de la parte aérea, se muestran claras diferencias al comparar los tiempos de exposición. En efecto, es mayor el crecimiento a las 48 h en todos los tratamientos, pero no se presentan diferencias entre tratamientos.

El comportamiento del peso seco de la raíz (Gráfico 2B) presenta menor variabilidad que el peso fresco (Gráfico 2A), mientras que el peso seco de la parte aérea (Gráfico 2D) presenta un comportamiento similar al del peso fresco de este mismo

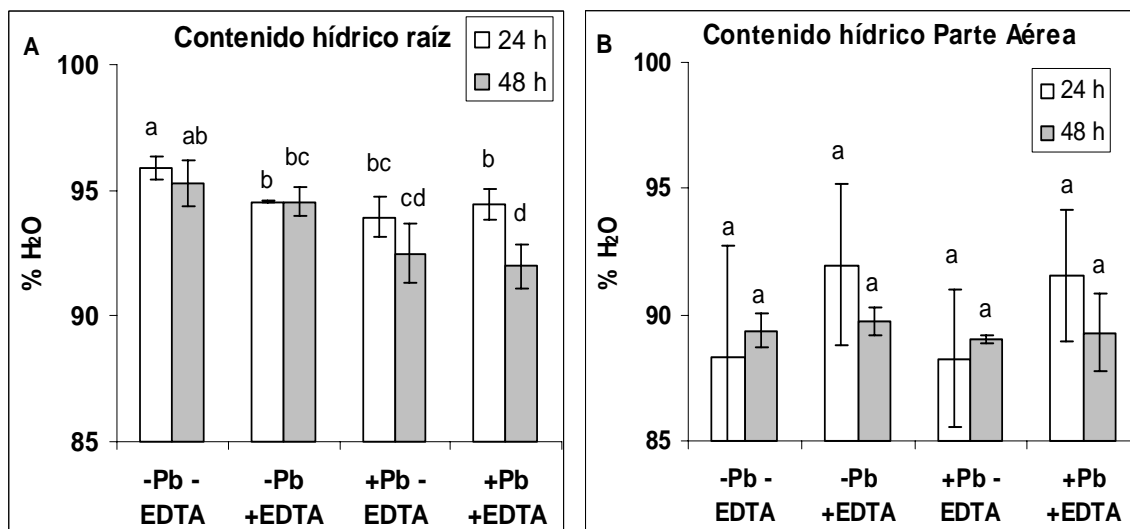


Gráfico 3. A, contenido hídrico de la raíz, y B, contenido hídrico de la parte aérea de *Zea mays* L. crecidas en soluciones control y soluciones tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (medias \pm s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

órgano (Gráfico 2C), observándose también diferencias entre los tiempos de exposición en un mismo tratamiento, aunque su variabilidad es un poco mayor que en el caso del peso fresco.

A pesar de que las diferencias de crecimiento en peso seco con el tiempo se observan en todos los tratamientos, solamente se muestran significativas en los tratamientos con Pb, especialmente en la parte aérea, en donde ambos tratamientos con Pb mostraron diferencias significativas de crecimiento entre los dos tiempos de exposición (gráfico 2 D), mientras que en el caso de las raíces únicamente se presentaron en las plantas tratadas con Pb y EDTA (gráfico 2B).

Por lo que respecta al contenido hídrico, se observan claras diferencias entre la raíz y la parte aérea. En la raíz es posible observar una disminución en el contenido hídrico tanto entre tratamientos como con el tiempo. Así, se observa una disminución significativa en todos los tratamientos en relación con el tratamiento -Pb-EDTA, aunque no hay diferencias significativas entre los tratamientos con Pb ni entre ellos y el tratamiento -Pb+EDTA (gráfico 3A). Sin embargo, sí que es posible observar que a las 48 h de tratamiento se establece una clara diferencia entre los tratamientos sin Pb y con Pb, siendo significativamente menores los contenidos hídricos correspondientes a las raíces de las plantas tratadas con Pb respecto a las de las plantas no expuestas al metal (gráfico 3A). Por otra parte, comparando en este mismo gráfico la evolución del

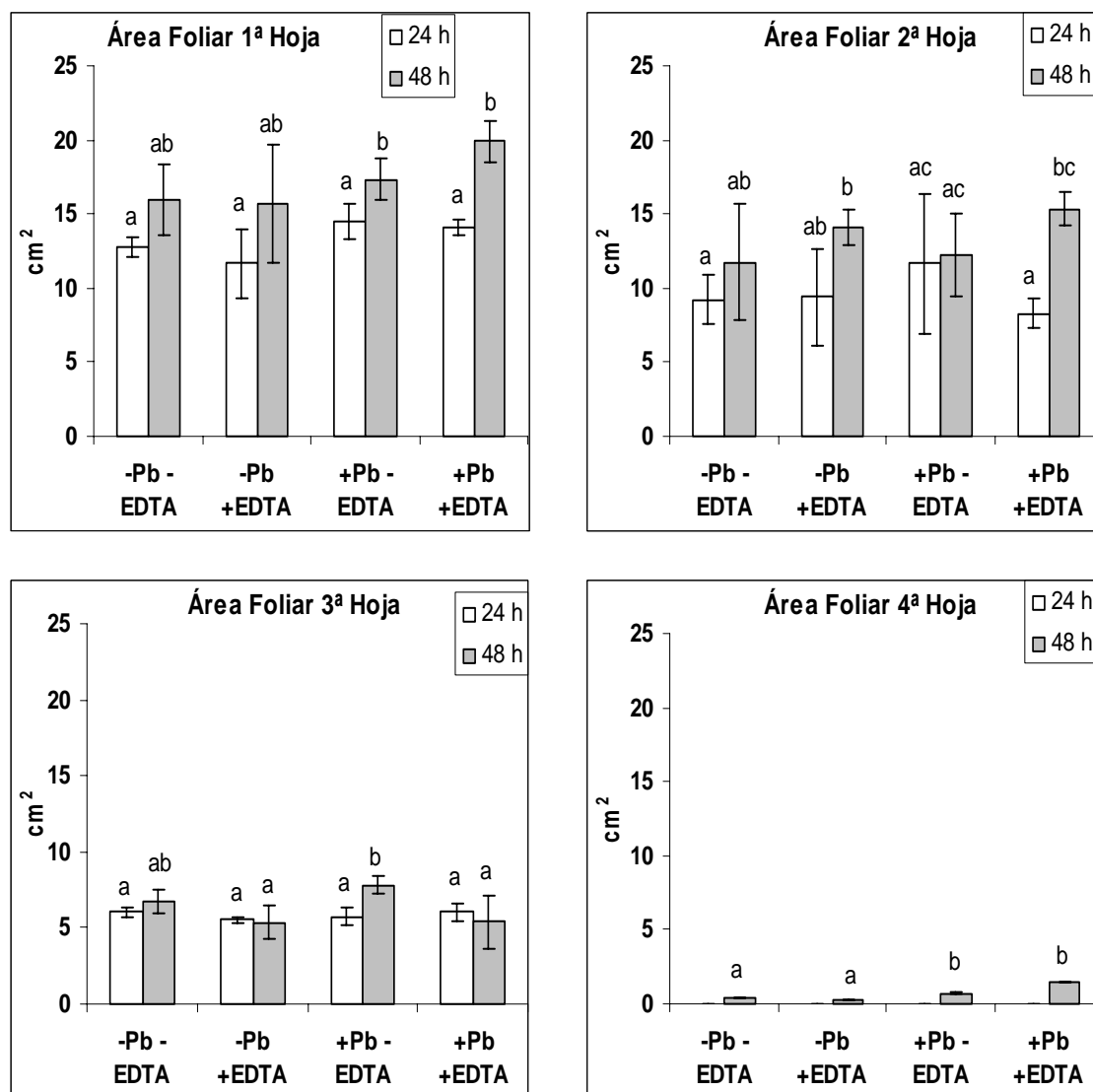


Gráfico 4. Áreas foliares de plantas de *Zea mays* L. crecidas en soluciones control y soluciones tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (medias \pm s.d.; $n=3$). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

contenido hídrico con el tiempo, se observa claramente que las diferencias más claras se manifiestan en las raíces de las plantas tratadas con Pb.

En la parte aérea las diferencias observadas son menores que en la raíz. Por un lado, es posible observar que el contenido hídrico presenta una clara tendencia a ser menor en este órgano que en las raíces, mientras que las diferencias observadas, tanto entre los tratamientos con Pb como comparando los diferentes tiempos de exposición para un mismo tratamiento, no son, en ningún caso, significativas (gráfico 3B).

4.2.2 Efectos sobre el área foliar

Por lo que respecta al área foliar (gráfico 4), su comportamiento es muy parecido al observado en el caso del peso fresco y peso seco de la parte aérea, especialmente en las hojas más tempranamente desarrolladas (1ª y 2ª) que, evidentemente, fueron las que más contribuyeron al peso de este órgano, tanto por lo que respecta al peso seco como al peso fresco. En el crecimiento de estas hojas no se observan diferencias significativas entre tratamientos, aunque sí por lo que respecta al tiempo, siendo generalmente mayor el crecimiento a las 48h de tratamiento en comparación con el obtenido a las 24 h, como sería de esperar si no se hubiera manifestado una inhibición del crecimiento.

Respecto a la 3ª y 4ª hojas, éstas son demasiado pequeñas para poder observarse un claro efecto, tanto entre el tiempo como en el tratamiento, especialmente por lo que respecta a la 4ª hoja, que únicamente apareció a las 48 h de tratamiento, aunque en esta hoja se presentó un mayor crecimiento en las plantas tratadas con Pb respecto a las plantas no expuestas al metal.

4.2.3 Efectos sobre la longitud radicular

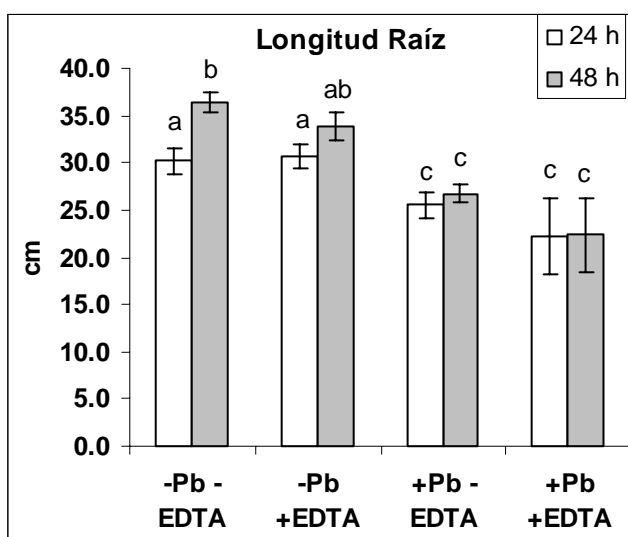


Gráfico 5. Longitud radicular de *Zea mays* L. en soluciones control y soluciones tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (medias \pm s.d.; $n=3$). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

El análisis de la longitud radicular muestra claramente que el Pb afectó al crecimiento de forma muy rápida, pues a las 24 h de tratamiento ya se observan claras diferencias entre los tratamientos con y sin Pb (gráfico 5). Esta tendencia se hace más acusada cuando comparamos los resultados a las 48 h de tratamiento. Así, es posible observar que, mientras que las raíces de las plantas no expuestas al Pb presentan una mayor longitud a las 48 h que a las

24 h, no ocurre lo mismo en las plantas expuestas al Pb, en las que el crecimiento

longitudinal se mantiene en los mismos niveles que a las 24 h, tanto en el tratamiento al que se añadió EDTA como al que no se le añadió este agente quelante, lo cual muestra claramente que el agente responsable de la inhibición del crecimiento es el Pb.

4.2.4 *Efectos sobre la extensibilidad, plasticidad y elasticidad*

La extensibilidad total, elástica y plástica de las paredes celulares se muestran en el gráfico 6. La medición de los diferentes componentes de la extensibilidad de la pared celular en coleótilos muestra pocas diferencias entre los tratamientos aplicados, salvo para la exposición a las mayores concentraciones de Pb en los tiempos más elevados, en donde aparecen diferencias significativas en los diferentes parámetros estudiados (gráfico 6).

El primer resultado a considerar es que el módulo de elasticidad tiende a ser mayor que el de plasticidad en todos los tratamientos estudiados, aunque las diferencias entre ambos no son, en la mayoría de los casos, significativas. Sin embargo, la combinación de ambas se refleja claramente en el comportamiento de la extensibilidad total, en donde las diferencias de comportamiento se suman y resultan en una imagen más clara del efecto del Pb sobre este parámetro (gráfico 6).

El efecto más claro que se desprende de la medición de estos parámetros es que únicamente se observan diferencias significativas a las mayores concentraciones de Pb empleadas (1000 μM), mientras que concentraciones más bajas no rindieron efectos significativos sobre los diferentes parámetros. Así, es posible observar que tanto la extensibilidad total como el módulo de elasticidad son significativamente disminuidos en el tratamiento con 1000 μM de Pb durante 120 minutos si lo comparamos con el efecto del metal a esta misma concentración durante 30 minutos, aunque no hay diferencias significativas con sus respectivos controles para los mismos tiempos (gráfico 6).

Por lo que respecta al módulo de plasticidad para estas mismas concentraciones y tiempo, aunque la tendencia es muy similar, no es posible observar diferencias significativas (gráfico 6) a pesar que la suma de ambas tendencias realza el efecto observado en la extensibilidad total, tal y como se observa al comparar los tres gráficos.

Es de destacar que a los 30 minutos de exposición al Pb parece existir una tendencia a incrementarse tanto la extensibilidad total como el módulo de elasticidad en todos los

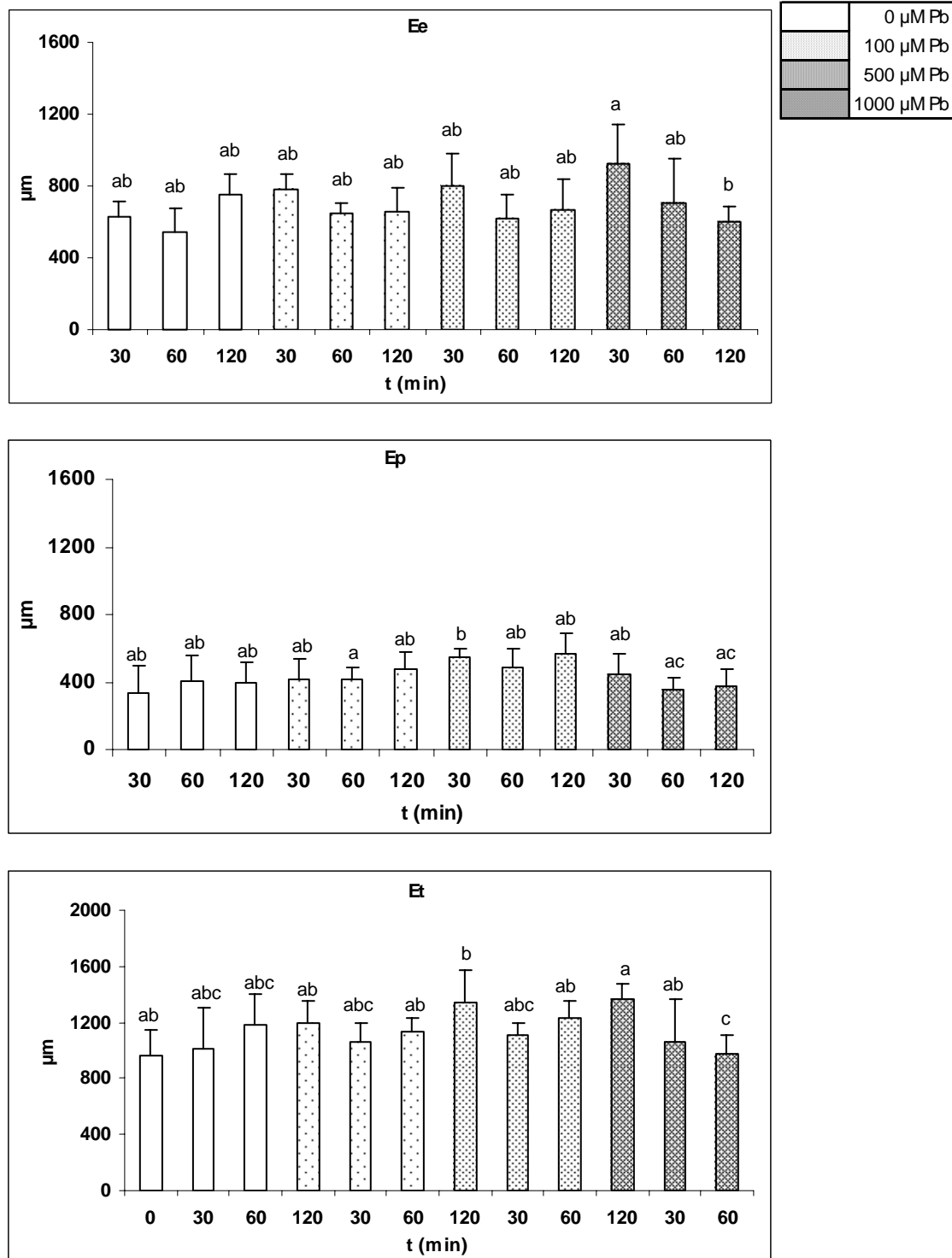


Gráfico 6. Extensibilidad elástica (Ee), Extensibilidad plástica (Ep), Extensibilidad total (Et) de coleótilos de *Zea mays* L. en soluciones control y en soluciones tratadas con diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ (ver leyenda) (medias \pm s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$). Tiempos por tratamiento (30, 60, 120 min).

tratamientos con Pb, efecto que no se manifiesta en los coleóptilos que no fueron expuestos al metal.

4.3 Efectos sobre relaciones hídricas y fotosíntesis

4.3.1 Efectos sobre el Ψ_{H_2O} de parte aérea, $\Psi\pi$ de raíz y parte aérea, y, $\Psi\pi$ de exudados

Como observación general en el gráfico 7 A y 7 B, se muestra que el potencial osmótico de la raíz muestra una tendencia a presentar valores menos negativos que el potencial osmótico de la parte aérea, aunque no se pueden establecer diferencias significativas entre los valores presentados por ambos órganos.

Por otra parte, tanto en raíz como en parte aérea se presenta una tendencia a presentar valores de $\Psi\pi$ menos negativos al aumentar el tiempo de toma de muestras, tanto en plantas crecidas con Pb en el medio como en plantas no expuestas al metal.

Los resultados obtenidos en raíz únicamente presentan diferencias significativas en los tratamientos -Pb-EDTA y +Pb+EDTA, sí se comparan los valores obtenidos a las 24 h y 48 h (gráfico 7 A). Por lo que respecta a la parte aérea, la tendencia a mostrar valores menos negativos de $\Psi\pi$ con el tiempo se hace más patente que en la raíz y, en este caso, las diferencias observadas sí que tienen relación con la exposición al Pb, pues se ve que el incremento es significativo a las 48 h tanto en el tratamiento +Pb-EDTA como en el tratamiento +Pb+EDTA (gráfico 7 B).

Por lo que respecta a los valores de $\Psi\pi$ de los exudados de xilema de raíz, éstos presentan unos valores de $\Psi\pi$ menos negativos que los de raíz entera y parte aérea, aunque, los valores son más similares a los presentados por la raíz entera que los presentados por la parte aérea.

Los valores de $\Psi\pi$ de estos exudados presentan una tendencia a mostrar valores más negativos al aumentar el tiempo de toma de muestras, siendo estos valores significativamente diferentes entre las 24 h y las 48 h en los tratamientos -Pb+EDTA y +Pb-EDTA (gráfico 7 D). Por otra parte, en estos exudados el comportamiento observado es justamente el contrario al observado en raíz entera. Efectivamente, en este caso la tendencia general es a que el potencial osmótico se haga más negativo con el tiempo, mientras que en la raíz entera los valores tienden a hacerse menos negativos con

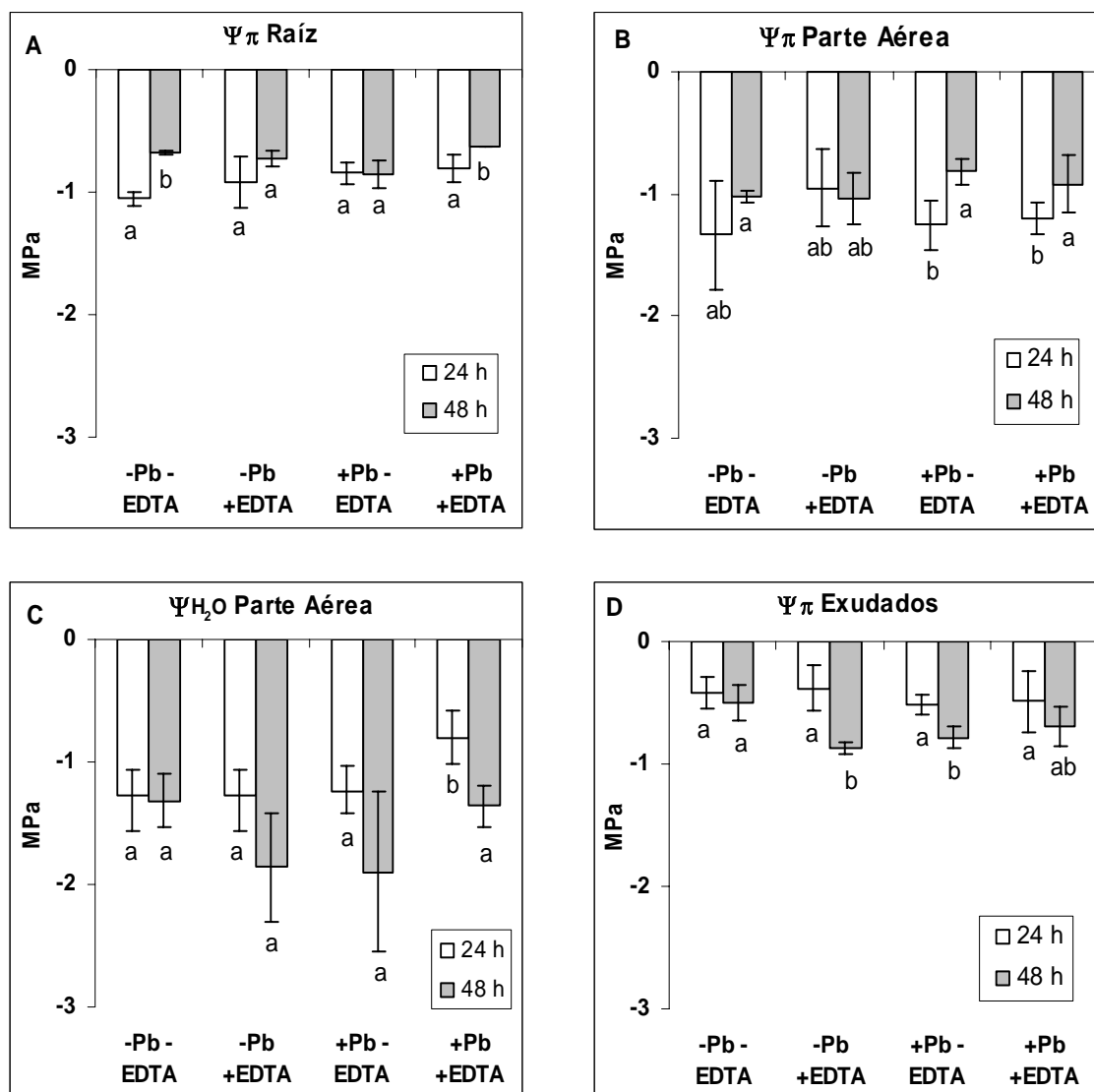


Gráfico 7. A, potencial osmótico de la raíz, B, potencial osmótico de la parte aérea, C, potencial hídrico de la parte aérea, y, D, potencial osmótico de exudados de plantas de *Zea mays* L. crecidas en soluciones control y soluciones tratadas con 100 μ M $Pb(NO_3)_2$ (medias \pm s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

el tiempo.

Los valores de Ψ_{H_2O} de la parte aérea (gráfico 7 C) presentan diferencias de comportamiento a las 24 y las 48 h. A las 24 h de exposición al metal se presenta un valor de potencial hídrico significativamente menos negativo en el tratamiento +Pb+EDTA, no presentándose diferencias significativas en ningún otro tratamiento. Por otra parte, a las 48 h de exposición al metal no se observan diferencias significativas en los valores de Ψ_{H_2O} en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, hay que destacar que la tendencia más claramente observada es mostrar valores de potencial hídrico más

negativos con el incremento en el tiempo de toma de muestras en todos los tratamientos, tanto si presentan Pb o EDTA como si no lo presentan.

4.3.2 Efectos sobre la conductividad hidráulica y la funcionalidad de las acuaporinas.

4.3.2.1 Efectos sobre la presión hidrostática de la raíz

La presión hidrostática de la raíz a las 24 h en las condiciones iniciales presentó una tendencia a la disminución en el tratamiento +Pb+EDTA si se compara con el resto de tratamientos (gráfico 8 A). Sin embargo, parece haber una recuperación significativa de dicha presión a las 48 h, aunque si se compara con el tratamiento -Pb-EDTA, el valor absoluto es significativamente menor. Así, pues, en conjunto puede señalarse que se establecieron diferencias significativas entre el tratamiento -Pb-EDTA y +Pb+EDTA.

Una vez tratadas las raíces con HgCl_2 puede observarse que los valores de la P_r en el tratamiento -Pb-EDTA se igualan entre 24 h y 48 h, disminuyéndose su valor de forma significativa en el tratamiento -Pb+EDTA respecto al anterior y respecto al valor medido inicialmente (gráfico 9 A y 10 A) y manteniéndose en los tratamientos -Pb+EDTA y +Pb-EDTA, aunque en estos tratamientos también se observa una tendencia a la disminución del valor de la P_r respecto a las condiciones iniciales.

Al ser lavadas las raíces con DTT (gráfico 10 A), se observa una cierta recuperación de la P_r en los tratamientos que más habían descendido sus valores (-Pb+EDTA y +Pb-EDTA), mientras que el tratamiento -Pb+EDTA mantiene el valor de P_r similar al mostrado bajo el efecto del HgCl_2 y el tratamiento +Pb+EDTA no presenta variación significativa alguna al igual que ocurrió en el caso anterior.

En resumen, puede establecerse que el tratamiento +Pb+EDTA no es afectado por el HgCl_2 , mientras que el resto de los tratamientos lo es en mayor o menor medida, pudiéndose resaltar que a las 48 h, el tratamiento -Pb-EDTA es afectado por el HgCl_2 sin que se manifieste recuperación posterior con DTT.

4.3.2.2 Efectos sobre el módulo β

A partir de este parámetro hay que distinguir entre experimentos endosmóticos y experimentos exosmóticos, pues si bien los parámetros utilizados son los mismos, la interpretación fisiológica derivada de los mismos puede ser distinta.

En el parámetro que nos ocupa es posible observar que en las condiciones iniciales los valores de β^+ y β^- son distintos, aunque del mismo orden de magnitud, sobretodo si comparamos los experimentos a 24 h y a 48 h (gráfico 8 B y C). El primer efecto observable es la mayor desviación típica de β^- comparada con β^+ y la tendencia a ser mayores los valores de β^- respecto a los de β^+ a las 24 h. Sin embargo, esta tendencia no se repite a las 48 h y, lo que es más significativo, es que tanto a las 24 h como a las 48 h, el valor de β^+ y β^- tiende a ser significativamente menor en el tratamiento +Pb+EDTA que en el resto de tratamientos.

Una vez expuestas las raíces a HgCl_2 (gráfico 9 B y C) esta tendencia se mantiene sin variaciones significativas y únicamente al ser expuestas las raíces a DTT (gráfico 10 B y C) se observa una acentuación de la tendencia de β^+ a ser menor en los tratamientos con Pb, sobretodo a las 48 h que en β^- únicamente puede observarse en el tratamiento +Pb+EDTA.

4.3.2.3 Efectos sobre $t_{1/2}$

En este parámetro es posible observar una muy clara tendencia a disminuir cuando las raíces son expuestas al Pb, ya incluso al tiempo inicial (gráfico 8 D y E), efecto que se muestra sobretodo claramente en $t_{1/2}^-$. Esta tendencia se mantiene al ser tratadas las raíces con HgCl_2 e incluso se acentúa en el caso de $t_{1/2}^+$, mientras que es de destacar que el $t_{1/2}^-$ para las raíces analizadas a las 48 h muestra un incremento significativo tanto respecto a su valor inicial como respecto al valor mostrado a las 24 h (gráfico 9 D y E).

Una vez eliminado el HgCl_2 con DTT (gráfico 10 D y E), los valores de $t_{1/2}^+$ y $t_{1/2}^-$ continuaron manteniéndose en las raíces expuestas al Pb (las cuales no fueron afectadas en este parámetro bajo ninguno de los tratamientos) y el valor de $t_{1/2}^+$ recuperó la tendencia que presentaba bajo las condiciones iniciales, aunque con valores significativamente menores, mientras que el $t_{1/2}^-$ mantuvo el comportamiento observado bajo el tratamiento con HgCl_2 , aunque también los valores son significativamente menores en este caso (gráficos 9 E y 10 E).

4.3.2.4 *Efectos sobre L_{Pr}*

El valor de L_{Pr} , como sería de esperar a partir de los datos observados a partir de los otros parámetros y dada la relación numérica con los mismos, presenta claros efectos relacionados con la exposición al Pb.

En primer lugar, puede observarse que, en las condiciones iniciales, tanto el L_{Pr}^+ como el L_{Pr}^- son significativamente mayores en las raíces expuestas al Pb comparados con los mostrados en las raíces no expuestas al metal (gráfico 8 F y G). Es de destacar que el L_{Pr}^+ del tratamiento +Pb-EDTA presenta los mayores valores de toda la serie (gráfico 8 F), siendo éstos significativamente distintos a los de cualquier otro valor observado, lo cual no se desdice con la tendencia general anteriormente descrita.

Una vez las raíces se trataron con $HgCl_2$, la tendencia anteriormente observada se acentuó a la vez que se igualaron los valores medidos, tanto a las 24 h como a las 48 h, y este fenómeno pudo ser observado tanto en L_{Pr}^+ como en L_{Pr}^- (gráfico 9 F y G).

Una vez eliminado el $HgCl_2$ con DTT, la tendencia continuó siendo la misma que en el caso anterior, pero se puede observar que hay diferencias entre 24 h y 48 h (gráfico 10 F y G). Así, los valores mostrados tanto por L_{Pr}^+ como por L_{Pr}^- a las 24 h se mantuvieron en niveles parecidos a los provocados por la exposición al $HgCl_2$, mientras que a las 48 h estos valores tendieron a disminuir respecto a los valores mostrados a las 24 h, aunque se mantuvieron más elevados que en las condiciones iniciales. Finalmente, es de destacar que en el caso de L_{Pr}^- esta disminución fue incluso significativamente menor respecto a las 24 h (gráfico 10 G).

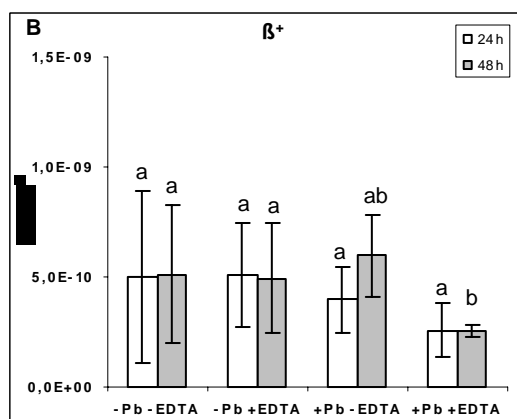
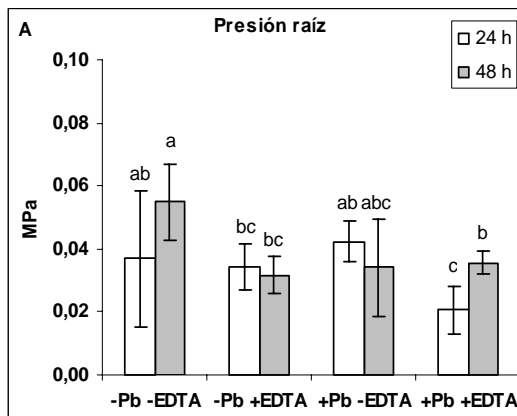
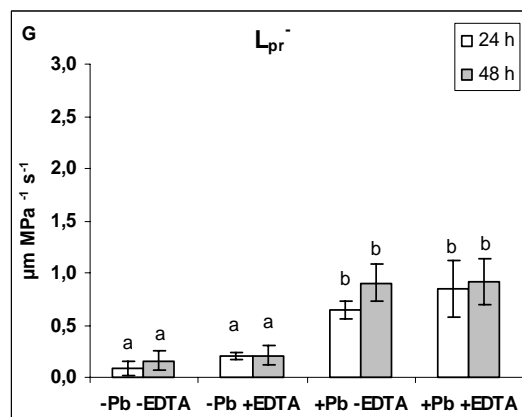
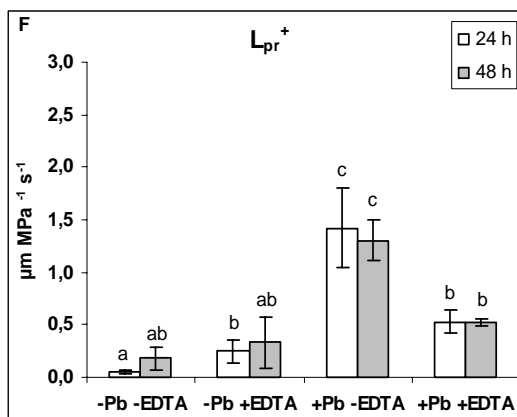
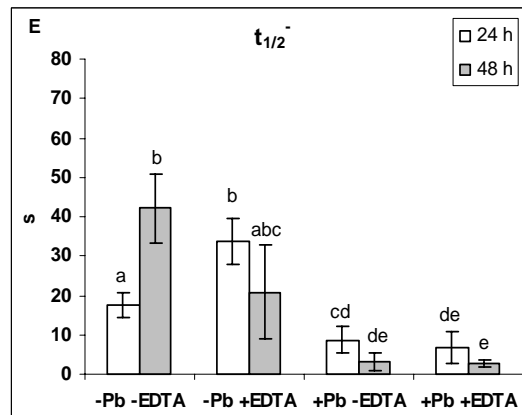
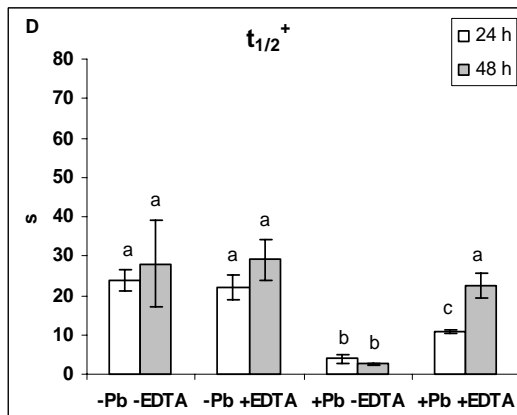
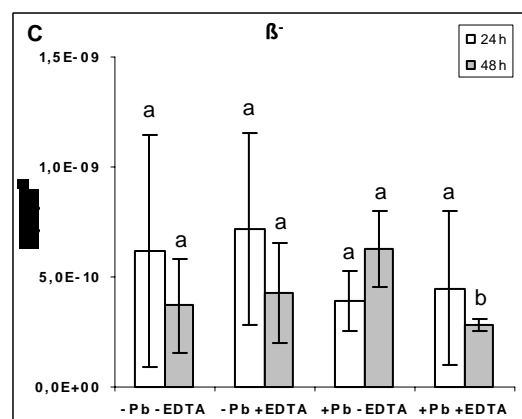


Gráfico 8. Parámetros de la sonda de presión inicial de la raíz de *Zea mays* L. en soluciones control y soluciones tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. De izquierda a derecha: presión de la raíz (A), módulo β^+ y β^- (B y C), tiempo medio $t_{1/2}^+$ y $t_{1/2}^-$ (D y E), y, conductividad hidráulica L_{pr}^+ y L_{pr}^- (F y G) (medias \pm s.d.; $n=3$). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).



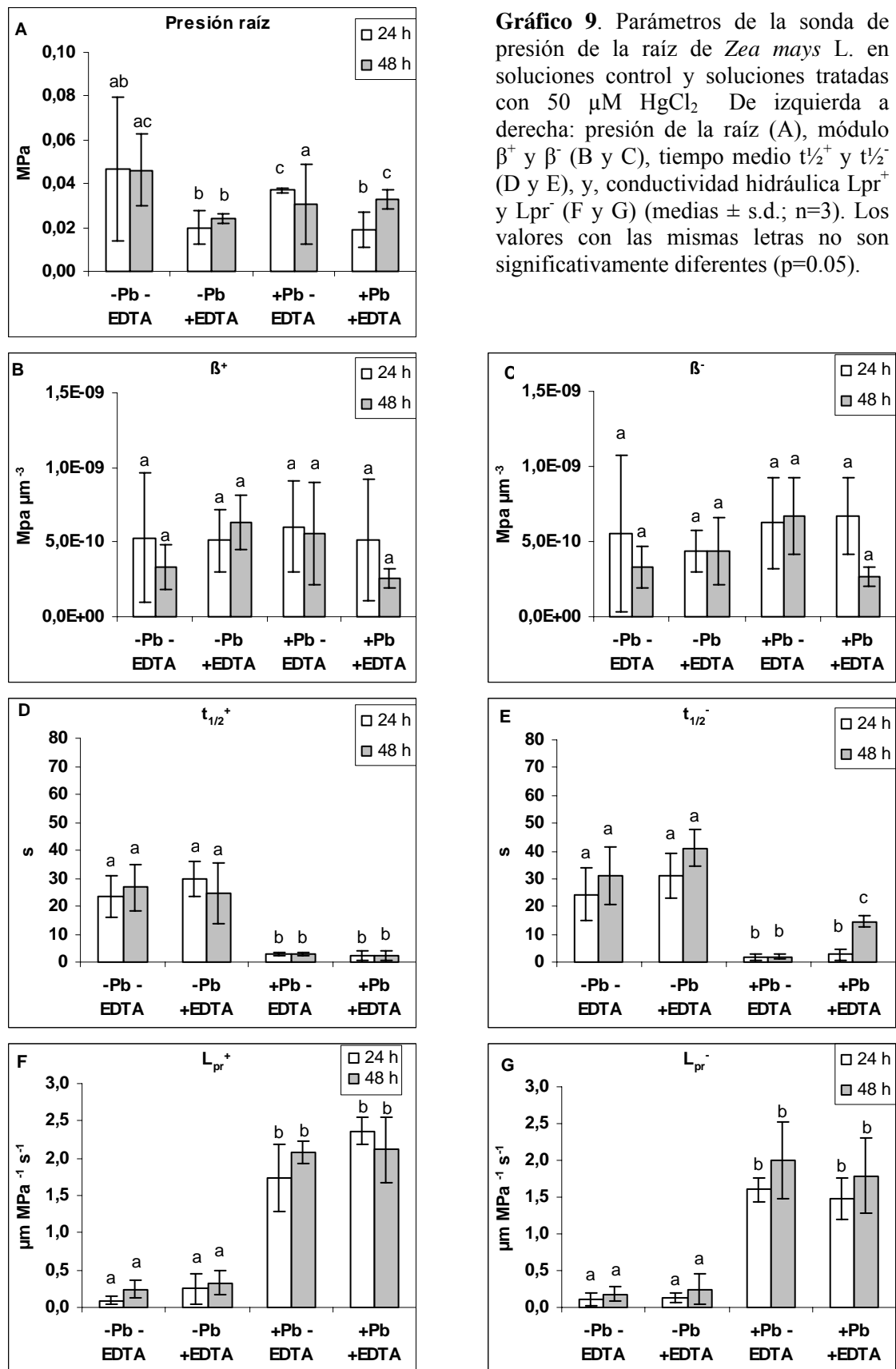


Gráfico 9. Parámetros de la sonda de presión de la raíz de *Zea mays* L. en soluciones control y soluciones tratadas con 50 μM HgCl_2 . De izquierda a derecha: presión de la raíz (A), módulo β^+ y β^- (B y C), tiempo medio $t_{1/2}^+$ y $t_{1/2}^-$ (D y E), y, conductividad hidráulica L_{pr}^+ y L_{pr}^- (F y G) (medias \pm s.d.; $n=3$). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

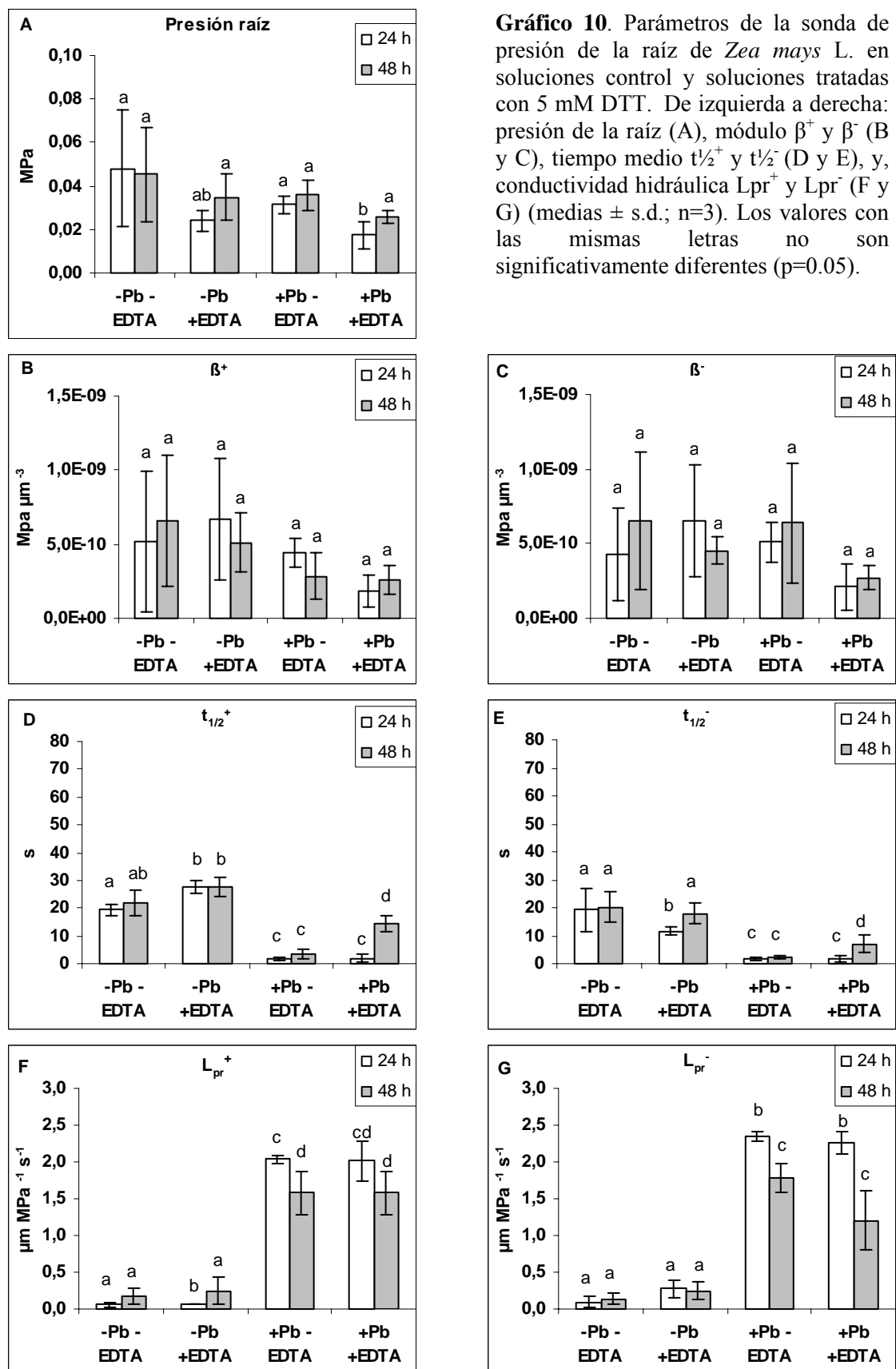


Gráfico 10. Parámetros de la sonda de presión de la raíz de *Zea mays* L. en soluciones control y soluciones tratadas con 5 mM DTT. De izquierda a derecha: presión de la raíz (A), módulo β^+ y β^- (B y C), tiempo medio $t_{1/2}^+$ y $t_{1/2}^-$ (D y E), y, conductividad hidráulica L_{pr}^+ y L_{pr}^- (F y G) (medias \pm s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

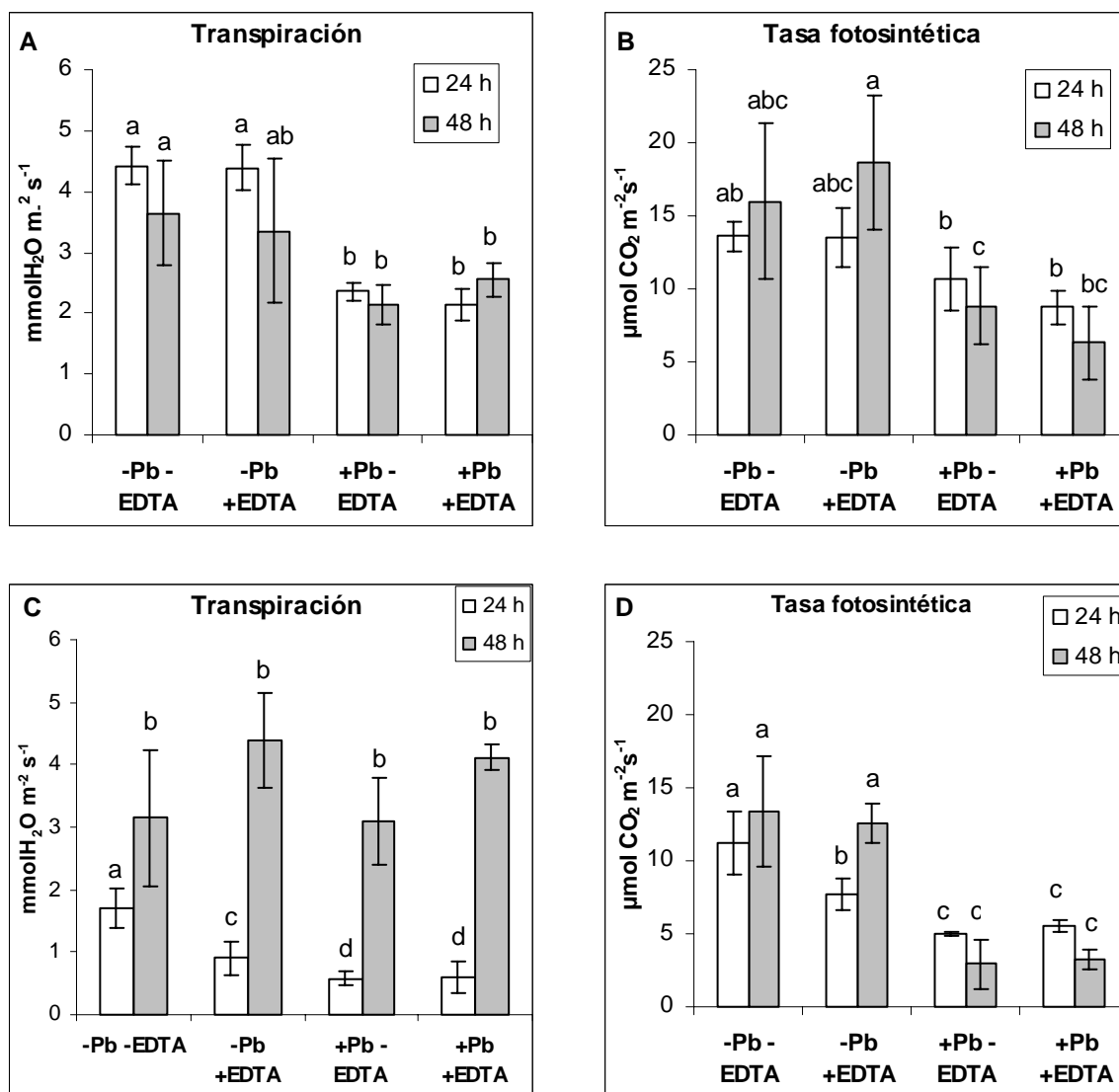


Gráfico 11. A, B, tasa de transpiración y tasa fotosintética de plantas de *Zea mays* L. crecidas en soluciones control y soluciones tratadas con 100 μM Pb(NO₃)₂ en condiciones de invernadero, y, C, D, en condiciones de cámara de cultivo (medias ± s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes (p=0.05).

4.3.3 Efectos sobre la tasa de transpiración y fotosíntesis

Los valores observados en las tasas de fotosíntesis y transpiración se analizaron en las condiciones de crecimiento en cámara de cultivo y también en condiciones de invernadero. El comportamiento de ambos parámetros, si bien es parecido, presentó algunas diferencias en las dos condiciones de cultivo.

En primer lugar, la tasa de transpiración de las plantas no expuestas al Pb en condiciones de invernadero decreció con el tiempo, mientras que su tasa fotosintética

mostró un incremento, aunque no significativo (gráfico 11 A y B). Sin embargo, las plantas expuestas al Pb mostraron una disminución significativa tanto en la tasa fotosintética como en la transpiración, siendo esta última disminución especialmente significativa en el caso de la tasa fotosintética de las plantas crecidas en el tratamiento +Pb+EDTA.

En estas condiciones de invernadero es de resaltar que la tendencia de la tasa fotosintética presenta un comportamiento opuesto en las plantas crecidas en presencia o ausencia de Pb en la solución nutritiva. Así pues, mientras que la tasa fotosintética de las plantas crecidas en ausencia de Pb tiende a incrementarse con el tiempo, la de las plantas crecidas en presencia de Pb tiende a disminuir tanto con el tiempo como en relación a las plantas crecidas en ausencia del metal (gráfico 11 B y D).

En cámara de cultivo la transpiración tendió a disminuir con la exposición al Pb a las 24 h de forma significativa, mientras que a las 48 h no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aunque sí al compararse la tasa de transpiración a las 48 h con la presentada a las 24 h. En todas ellas se produjo un incremento significativo y muy marcado en la tasa de transpiración con el tiempo (gráfico 11 C).

Si comparamos las tasas de transpiración en condiciones de invernadero y cámara de cultivo podemos observar que a las 24 h las tasas son menores en condiciones de cámara de cultivo respecto de las condiciones en invernadero, aunque la tendencia en ambos casos es la misma, es decir, a disminuir con la exposición al Pb, mientras que a las 48 h las tasas de transpiración en condiciones de cámara de cultivo tienden a igualar e incluso superar las tasas mostradas por las plantas crecidas en condiciones de invernadero (gráfico 11 A y C).

Por lo que respecta a las tasas fotosintéticas mostradas en cámara de cultivo, las tasas absolutas son ligeramente inferiores a las presentadas en invernadero, lo cual se justificaría por la menor intensidad de iluminación. Sin embargo, es posible observar que el comportamiento es similar en ambos casos al ser expuestas las plantas al Pb, mostrándose un comportamiento diferencial entre las plantas crecidas en presencia o ausencia de Pb con respecto al tiempo y observándose una disminución significativa de la tasa fotosintética en las plantas expuestas al Pb en ambas condiciones de cultivo. Cabe señalar que la disminución de la tasa fotosintética en las plantas expuestas al Pb se acentúa con el tiempo también en ambas condiciones de cultivo (gráfico 11 B y D).

4.4. Análisis de compartimentación

4.4.1 Contenido total de Pb en raíz y parte aérea

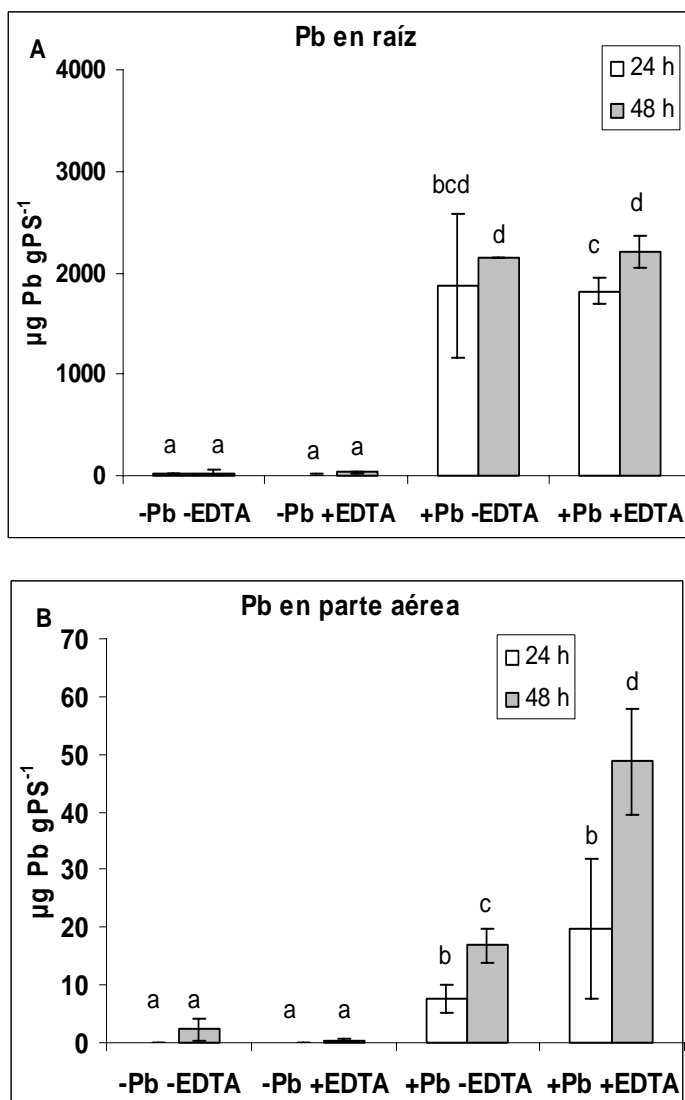


Gráfico 12. Contenido de plomo total en la raíz y en la parte aérea de plantas de *Zea mays* L. crecidas en soluciones control y soluciones tratadas con 100 µM Pb(NO₃)₂ (medias ± s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes (p=0.05).

El contenido en Pb en raíz y parte aérea fue diferente, presentando la raíz el mayor contenido. En ambos órganos se observó una tendencia al incremento en el contenido en Pb al incrementarse el tiempo de tratamiento, aunque donde se observaron las mayores diferencias fue en la parte aérea, a pesar de que el contenido absoluto en Pb fuera menor que en la raíz (gráfico 12 A y B).

Las plantas crecidas en solución nutritiva sin Pb presentaron ciertos niveles, aunque muy bajos de Pb, probablemente debidos a diferentes fuentes de contaminación, tanto de los reactivos utilizados como provenientes del medio en el que fueron cultivadas. Sin embargo, esta cantidad puede

considerarse totalmente negligible al ser comparada con el contenido hallado en las plantas crecidas en las soluciones conteniendo Pb.

Puede observarse un comportamiento diferencial entre la raíz y la parte aérea. En la raíz se observa que para un mismo tiempo de exposición al metal, los contenidos en Pb

son similares en los tratamientos +EDTA y -EDTA, y las diferencias observadas se deben a un ligero incremento en el contenido en Pb al incrementar el tiempo de exposición al metal. Es de resaltar que, aunque dicho incremento en el contenido en Pb con el tiempo de exposición al metal se presenta tanto en el tratamiento -EDTA como en el +EDTA, sin embargo, dicho incremento únicamente es significativo en el tratamiento al que se añadió EDTA juntamente con el Pb (gráfico 12 A).

En el caso de la parte aérea el comportamiento observado es más marcado que en la raíz. Se observan diferencias tanto de tratamiento (-EDTA frente a +EDTA), como en relación al tiempo de exposición al metal (gráfico 12 B). Así, es posible observar que el mayor contenido en Pb se halla en las plantas correspondientes al tratamiento +Pb+EDTA frente al tratamiento +Pb-EDTA. Además, es de destacar que, si bien ambos tratamientos presentan un incremento en el contenido en Pb a las 48 h respecto al contenido a las 24 h, el incremento producido es mucho mayor en las plantas correspondientes al tratamiento +Pb+EDTA que en el correspondiente a las plantas crecidas en el tratamiento +Pb-EDTA.

4.4.2 Análisis de exudados y contenido en Pb en exudados y solución nutritiva

Cuando se comparan los resultados de los volúmenes de exudados referidos al peso fresco y al peso seco, se observan diferencias de comportamiento claras (Gráfico 13 A y 13 B).

Respecto al peso fresco, existe una tendencia, aunque no significativa, a incrementarse los volúmenes de exudado obtenidos a las 24 h de exposición al metal respecto a los obtenidos en las plantas no expuestas al mismo. Esta tendencia se invierte a las 48 h y los exudados obtenidos en las plantas tratadas con Pb son menores, tanto con respecto a los obtenidos en las plantas no tratadas con Pb como a los obtenidos en las mismas plantas tratadas con el mismo durante 24 h. Por otra parte, las plantas no tratadas con Pb no mostraron diferencias significativas en el volumen de exudado obtenido a las 24 o 48 h (gráfico 13 A). Al referir estos mismos tratamientos con respecto al peso seco, se observa una tendencia a la disminución de los volúmenes en los exudados de las plantas tratadas con Pb respecto a las que no lo fueron, aunque esta disminución también puede ser observada en el caso de las plantas correspondientes al tratamiento -Pb+EDTA correspondientes a las 24 h (gráfico 13 B).

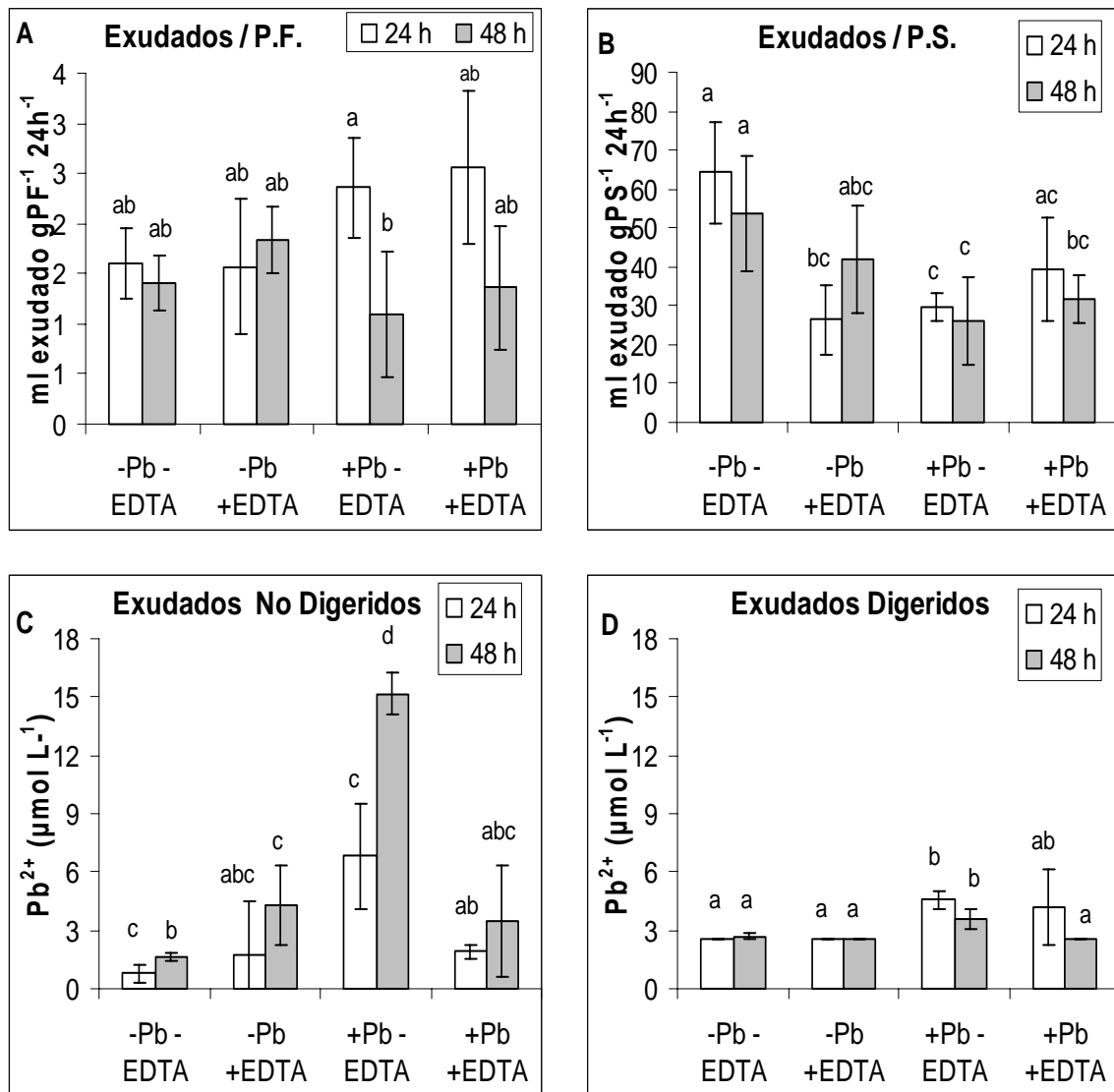


Gráfico 13. **A**, Volumen de exudados por gramo de peso fresco, **B**, volumen de exudados por gramo de peso seco, **C**, contenido de plomo en exudados no digeridos, y, **D**, contenido de plomo en exudados digeridos (medias \pm s.d.; n=3). Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

Respecto al contenido en Pb en los exudados queda patente un hecho que ya se observó al medir el contenido en Pb de la solución nutritiva, y es la gran diferencia entre las mediciones del contenido en Pb de los exudados digeridos y no digeridos (gráfico 13 C y D y gráfico 14 A y B). En concreto, se observa muy claramente en las plantas sometidas al tratamiento +Pb-EDTA, en las cuales los valores de Pb medidos en los exudados sin digerir se disparan a valores muy elevados, especialmente a las 48 horas de exposición al metal (gráfico 13 C). Una vez digeridos estos exudados y vuelto a analizar el contenido en Pb, se observa que los valores medidos son mucho más bajos y

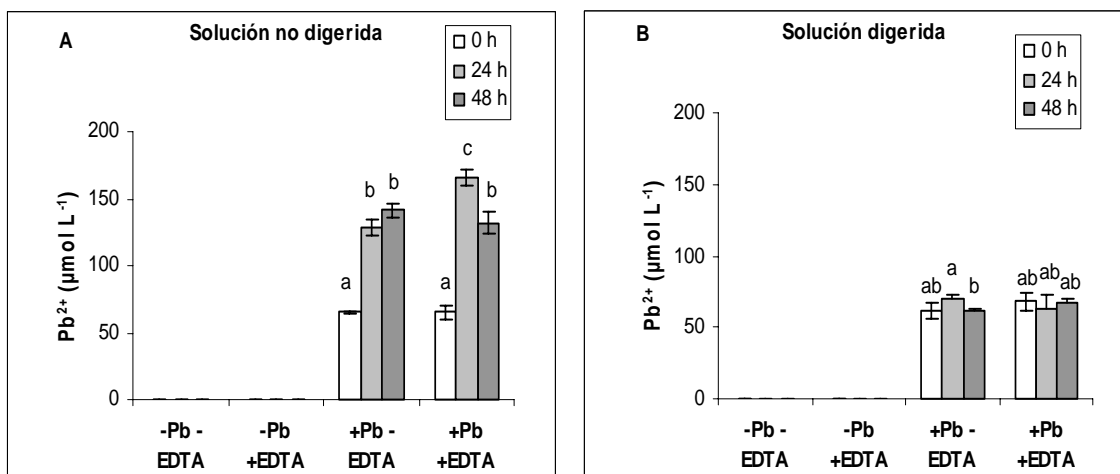


Gráfico 14. Contenido de Pb en soluciones nutritivas CEE II control y tratadas con 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a pH 4,5 (medias \pm s.d.; $n=3$). **A**, solución no digerida, **B**, solución digerida. Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p=0.05$).

que, si bien las plantas del tratamiento +Pb-EDTA presentan concentraciones de Pb más elevadas, las diferencias obtenidas no son tan grandes como en el caso anterior (gráfico 13 D).

Esta observación se repite en los análisis correspondientes al contenido en Pb^{2+} en las diferentes soluciones nutritivas empleadas.

Por un lado, como cabría esperar, los valores de contenido en Pb^{2+} son negligibles en las soluciones a las que no se añadió Pb, mientras que en aquellas a las que se añadió el metal, aparecen valores elevados del mismo, (gráfico 14 A y B). Sin embargo, en este caso vuelven a aparecer diferencias de contenido en las soluciones digeridas y sin digerir, haciéndose más patentes con el tiempo. En este sentido, se observa que los niveles de Pb^{2+} medidos en las soluciones nutritivas a las que se acababa de añadir el Pb no difieren significativamente entre las soluciones digeridas y las no digeridas. Sin embargo, los análisis correspondientes a las soluciones a las 24 h y a las 48 h manifestaron diferencias claras entre las soluciones digeridas y no digeridas. En concreto, las soluciones no digeridas mostraron valores de Pb^{2+} mayores incluso que los que cabría esperar de la adición del metal al medio (100 μM). A su vez, y como en el caso de los exudados, cuando estas soluciones fueron digeridas, los valores de Pb^{2+} obtenidos bajaron a valores similares a los de la solución inicial y se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo que duró el experimento. Este efecto parece claramente ligado a la técnica utilizada en el análisis del contenido en plomo y será discutido en

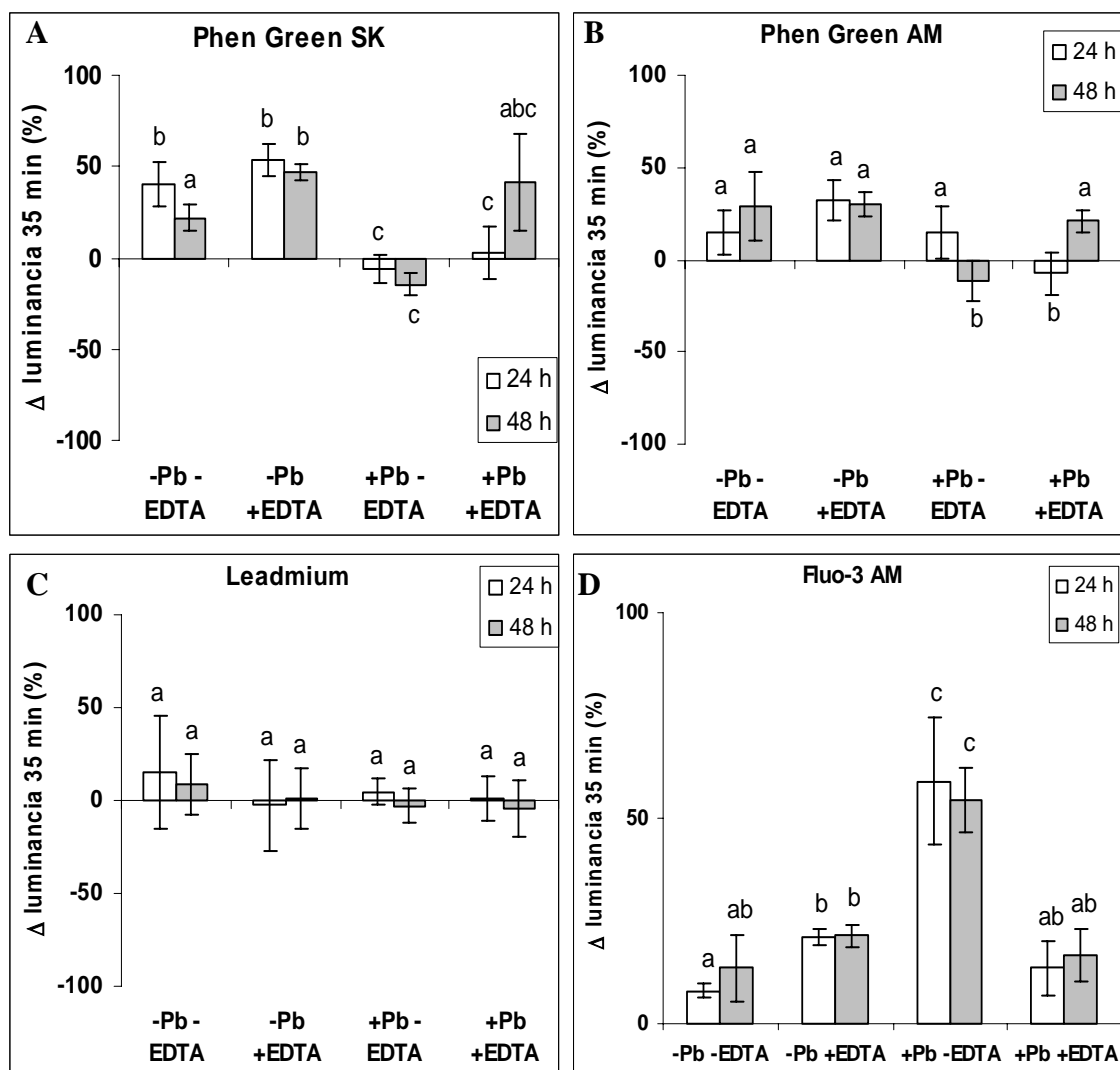


Gráfico 15. Variación porcentual de la luminancia emitida por fluoróforos en la caliptra del ápice radicular de *Zea mays* L. bajo diferentes tratamientos tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Valores con distintas letras dentro de un mismo gráfico presentan diferencias significativas ($p=0.05$).

detalle en el apartado correspondiente.

4.4.3 Efectos sobre la compartimentación de Pb

Tal y como se describe en el apartado de material y métodos, todas las medidas de epifluorescencia realizadas se hicieron dividiendo la raíz en cinco partes (caliptra, submeristemo, meristemo, postmeristemo y zona distal). Teniendo en cuenta esta división, se han agrupado todos los datos de fluorescencia siguiendo el mismo esquema. Así, en cada grupo de gráficos se presentan las medidas correspondientes a Fluo-3 AM, Phen green AM, Phen green SK y Leadmium, de forma que no tan solo aparecen en

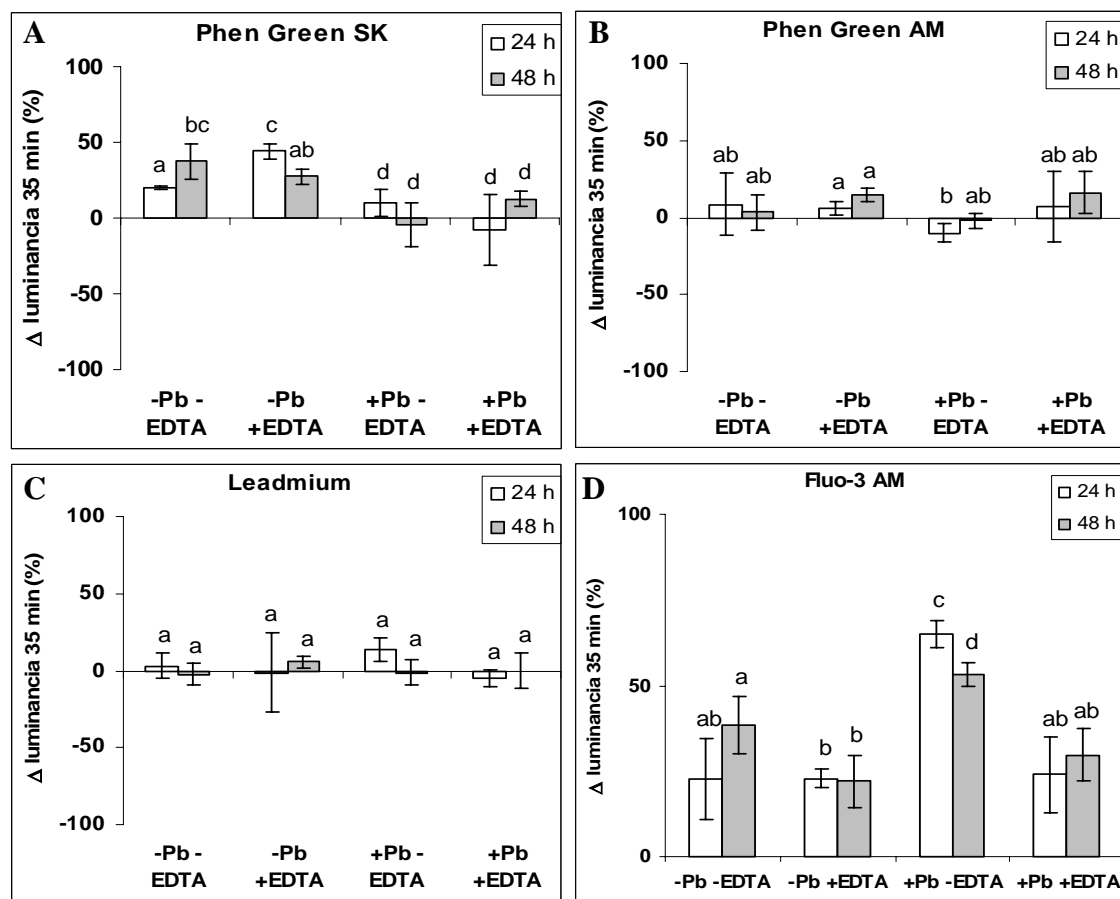


Gráfico 16. Variación porcentual de la luminancia emitida por fluoróforos en la zona submeristemática del ápice radicular de *Zea mays* L. bajo diferentes tratamientos tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Valores con distintas letras dentro de un mismo gráfico presentan diferencias significativas (p=0.05).

ellos los datos referentes a los distintos fluoróforos empleados para revelar la evolución del Pb, sino que también aparece en cada región estudiada, el gráfico correspondiente a la visualización de la evolución del Ca^{2+} citoplasmático. A lo largo del texto se hará referencia a cada gráfico según sea necesario.

4.4.3.1 *Pb* apoplástico

La variación de luminancia debida al Phen green SK es un indicador de la presencia de Pb además de otros metales. En este caso, el incremento de la concentración de Pb en contacto con el colorante provoca un desvanecimiento (quenching) de la fluorescencia emitida por el fluoróforo.

Se observa claramente que el comportamiento difiere, tanto entre los mismos

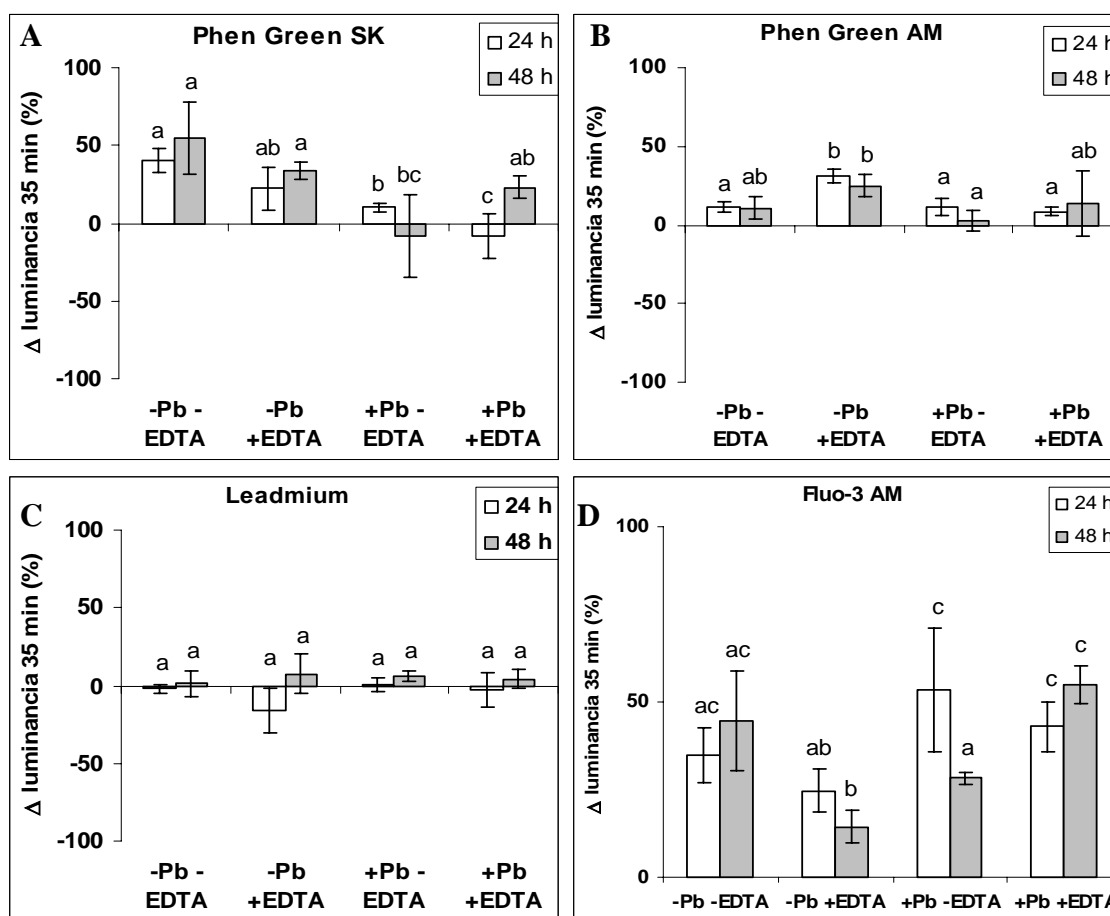


Gráfico 17. Variación porcentual de la luminancia emitida por fluoróforos en la zona meristemática del ápice radicular de *Zea mays* L. bajo diferentes tratamientos tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Valores con distintas letras dentro de un mismo gráfico presentan diferencias significativas (p=0.05).

tratamientos como en relación con la zona analizada. En concreto, es posible observar que en la mayoría de tratamientos y zonas se produce un incremento de la luminancia al cabo del tiempo de análisis (gráficos 15 A a 19 A). Este incremento se manifiesta especialmente en las puntas de raíz que no recibieron exposición al Pb, juntamente con aquéllas que recibieron Pb conjuntamente con EDTA (tratamiento +Pb+EDTA) tanto a las 24 h como a las 48 h. Por otra parte, se observa que hay una disminución efectiva de la luminancia o bien un incremento significativamente menor que en el resto de tratamientos en las raíces a las cuales se suministró el Pb sin que se administrara EDTA conjuntamente. Este efecto es marcadamente patente en la zona de la caliptra (gráfico 15 A) y va desvaneciéndose a medida que la zona de muestreo se aleja del ápice de la raíz, lo cual es compatible con las características anatómicas de la zona estudiada, como

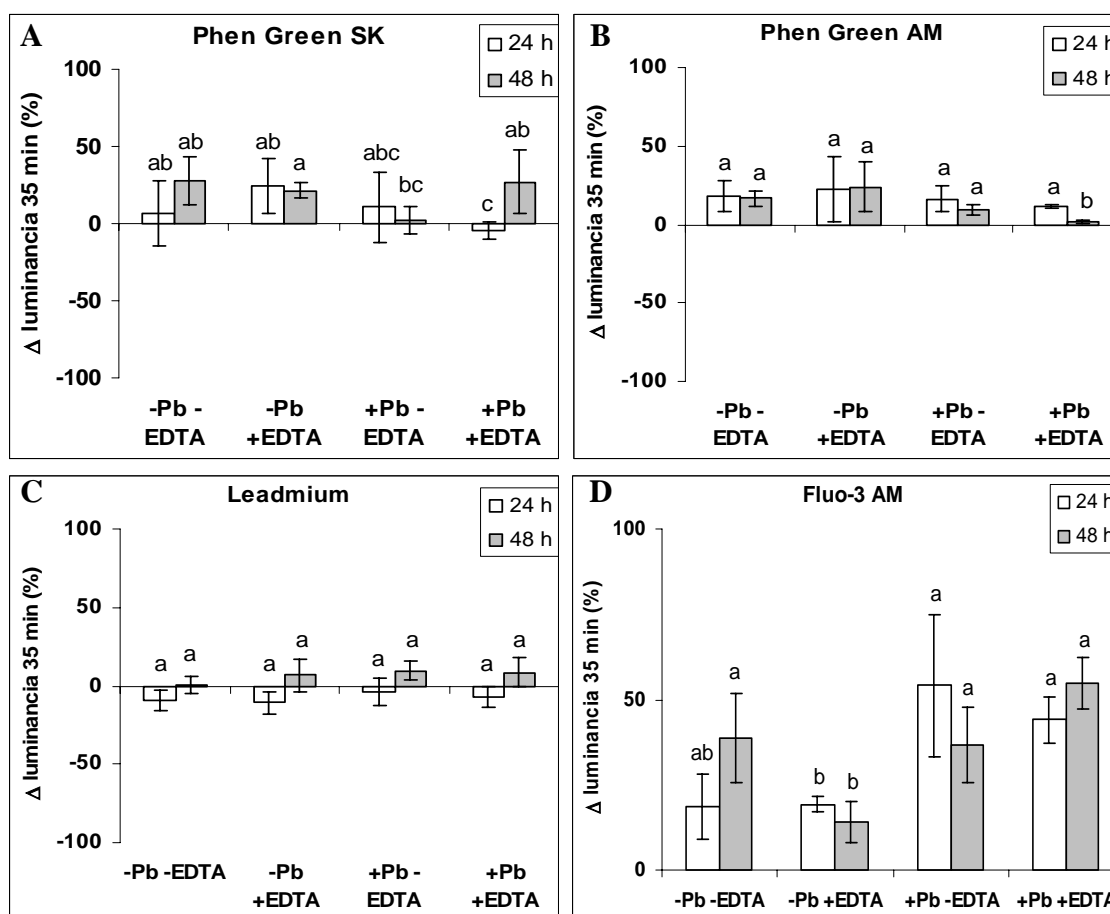


Gráfico 18. Variación porcentual de la luminancia emitida por fluoróforos en la zona postmeristemática del ápice radicular de *Zea mays* L. bajo diferentes tratamientos tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Valores con distintas letras dentro de un mismo gráfico presentan diferencias significativas (p=0.05).

se discutirá en el apartado correspondiente.

4.4.3.2 *Pb simplástico*

La evolución de la penetración del Pb en el simplasma se realizó mediante la utilización de dos colorantes distintos -Phen green FL(AM) y Leadmium-. Ambos difieren tanto en comportamiento frente al Pb como en su sensibilidad al metal. En el caso del Phen green FL, la respuesta de su luminancia se comporta de la misma forma que el Phen green SK, pero su capacidad de penetración a través de las membranas permite la observación de la penetración del metal, también mediante la observación del quenching de la luminancia emitida por el fluoróforo. El Leadmium, por el contrario, si bien también es permeable a la membrana plasmática, reacciona incrementando la

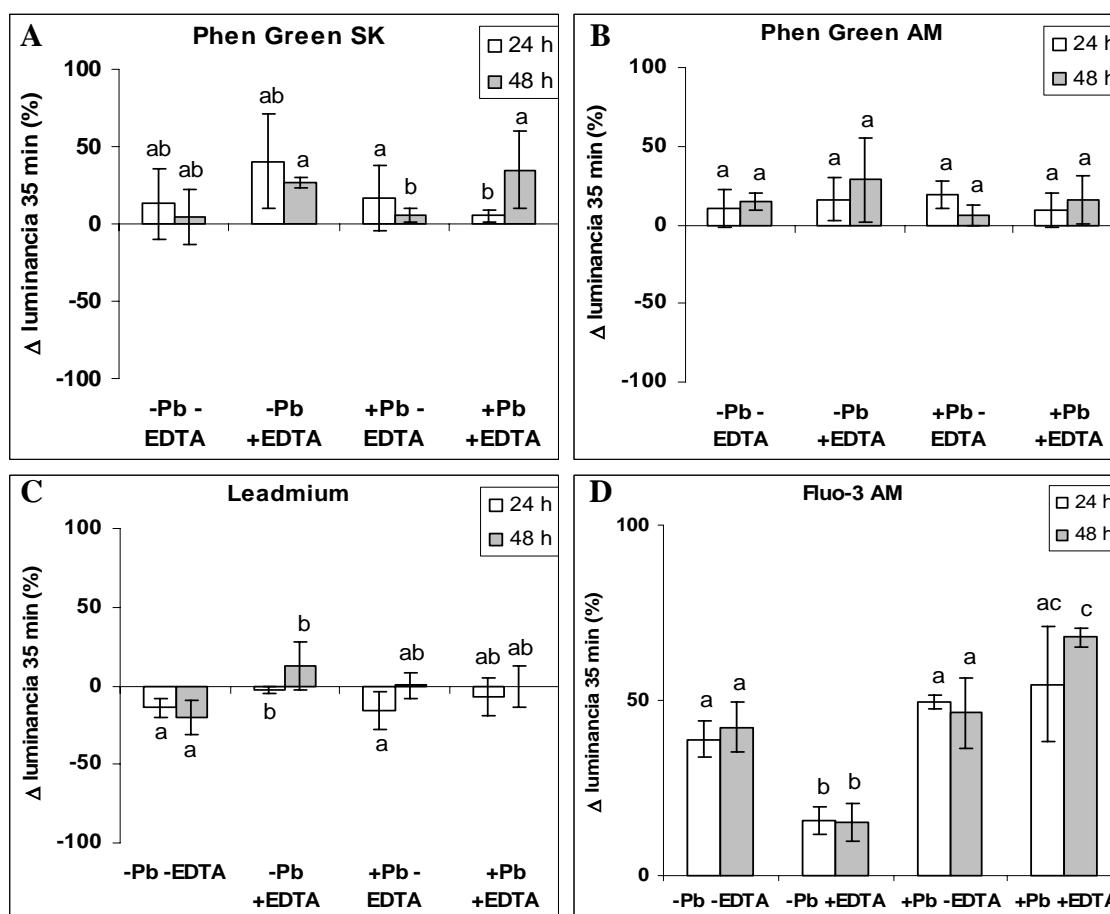


Gráfico 19. Variación porcentual de la luminancia emitida por fluoróforos en la zona distal del ápice radicular de *Zea mays* L. bajo diferentes tratamientos tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Valores con distintas letras dentro de un mismo gráfico presentan diferencias significativas ($p=0.05$).

luminancia al entrar en contacto con Pb^{2+} libre.

Los resultados obtenidos para los dos tipos de fluoróforos fueron completamente distintos. En primer lugar, el Phen green FL(AM) presentó un comportamiento muy parecido al del Phen green SK, manifestando una disminución de la luminancia en los mismos tratamientos y zonas que el anterior (gráficos 15 B a 19 B), mientras que en el caso del Leadmium, los incrementos esperados de luminancia no aparecieron o, en caso de hacerlo no siguen una pauta concordante con los tratamientos recibidos por las puntas de raíces sometidas a los distintos tratamientos (gráficos 15 C a 19 C). En los diferentes gráficos es posible observar que los incrementos de luminancia son muy débiles e incluso se observan incrementos negativos, aunque en ninguna de las zonas estudiadas las diferencias presentadas por los diferentes tratamientos fueron significativas.

4.4.4 Efectos sobre las variaciones de calcio citoplasmático

Los resultados del incremento de luminancia debidos a la presencia de Ca^{2+} citoplasmático libre siguen una pauta muy concordante con los resultados obtenidos tanto para el Pb apoplástico como para el Pb simplástico (gráficos 15 A, B y D a 19 A, B y D). Análogamente a lo obtenido con los dos fluoróforos anteriores, es posible observar un efecto muy marcado en la señal de calcio para el tratamiento +Pb-EDTA en caliptra y submeristemo (gráficos 15 D y 16 D). Al igual que en los dos fluoróforos anteriormente mencionados, el efecto diferencial mostrado por este tratamiento va desapareciendo gradualmente a medida que nos alejamos del ápice radicular pero, a diferencia de lo observado en la visualización de la evolución del Pb, aparecen unos efectos diferenciales que se hacen más patentes en la zona distal (gráfico 19 D). A partir de la zona correspondiente al meristemo apical, se observa que el tratamiento -Pb+EDTA comienza a manifestar un menor incremento de la luminancia debida al Ca^{2+} citoplasmático a la vez que el incremento de la luminancia en el tratamiento +Pb+EDTA se hace más intenso, llegando a ser significativamente mayor respecto al resto de los tratamientos en la zona distal.

4.5. Tinción vital

En la lámina 1 (ver final de esta sección) se muestran los efectos sobre la membrana del ápice radicular de *Zea mays* L. c.v. Bakero en plantas crecidas sometidas a los diferentes tratamientos con Pb. En esta lámina se presentan los diferentes tratamientos codificados mediante letras (ver leyenda) de forma que cada columna bajo una de las distintas letras muestra tres réplicas de tinción vital para un mismo tratamiento.

Puede observarse que la exposición al Pb afecta a las membranas tanto a las 24 h como a las 48 h. En efecto, se observa una intensa fluorescencia roja debida a la penetración del yoduro de propidio en las células cuya membrana se halla dañada en las columnas E, F, G, y H, correspondientes a plantas crecidas en presencia de Pb, sin o con EDTA, tanto para los tratamientos a 24 h como a 48 h.

Por el contrario, en los ápices radiculares de plantas no expuestas al Pb, sin o con EDTA, se visualiza algo de fluorescencia roja en las células epidérmicas. Aunque esta

coloración es normal dado el bajo valor de pH empleado y, como puede observarse en las columnas correspondientes (A, B, C y D), únicamente afecta a algunas de las células epidérmicas que, por otra parte, son las que presentan una tasa de recambio más elevada. En las mismas columnas puede observarse que no existe ningún efecto en las células más interiores, pertenecientes a los niveles más superficiales del córtex.

Es de destacar que las raíces de las plantas expuestas al Pb presentaron cambios manifiestos en la morfología, especialmente en las puntas de las raíces pertenecientes al tratamiento +Pb-EDTA, tanto a las 24 h como a las 48 h, como puede observarse claramente en las columnas E y F. Estos cambios, manifestados principalmente por un estrechamiento que afecta a la zona justo por debajo del meristemo apical, en la cual se incluyen las zonas submeristemática y la caliptra, podrían relacionarse con los efectos observados tanto para el Ca^{2+} citoplasmático como con los observados en la visualización del Pb, tanto apoplástico como simplástico.

Finalmente, observando las preparaciones a mayor aumento, pudo constatar que en la zona distal de las plantas tratadas con Pb existían daños en la estructura de la epidermis consistentes en descamaciones y desgarramientos de la misma que ponían al descubierto zonas relativamente grandes de la primera capa de células corticales (fotografías no mostradas).

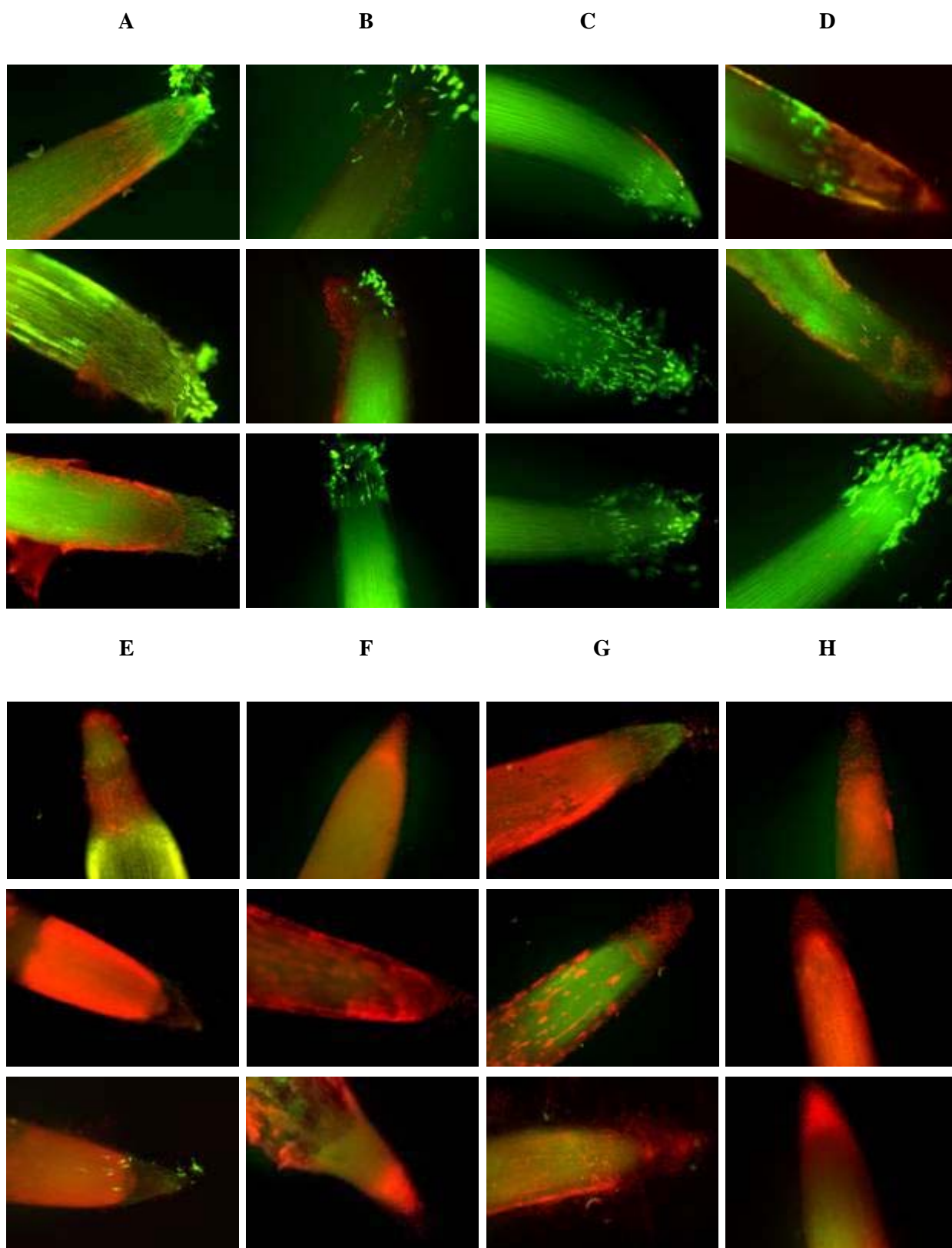


Lámina 1. Efectos directos sobre la membrana del ápice radicular de *Zea mays* L. c.v. Bakero observados con tinción vital al aplicar soluciones control y soluciones tratadas con Pb (NO₃)₂ 100 μM (n=3). **A)** -Pb-EDTA 24 h, **B)** -Pb-EDTA 48 h, **C)** -Pb+EDTA 24 h, **D)** -Pb+EDTA 48 h, **E)** +Pb-EDTA 24 h, **F)** +Pb-EDTA 48 h, **G)** +Pb+EDTA 24 h, **H)** +Pb+EDTA 48 h.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

A partir de los datos obtenidos en el primer experimento podemos concluir que el efecto que la supresión del Mo en la solución nutritiva es negligible, por cuanto ni a las 24 h ni a las 48 h puede observarse una reducción significativa de la actividad nitrato reductasa relacionada con la falta de molibdeno en la solución nutritiva (gráfico 1). Únicamente es posible observar un incremento significativo en la actividad de dicho enzima en el tratamiento +Mo+EDTA, pero dicho incremento no es significativamente diferente respecto al valor a las 24 h de tratamiento y, por otra parte, el tratamiento +Mo+EDTA, a pesar de presentar el metal en la solución nutritiva, presenta una actividad menor del enzima que el resto de tratamientos, especialmente a las 48 h. A partir de los datos obtenidos se desprende que la actividad del enzima nitrato reductasa no se ve afectada por la falta de Mo durante el tiempo de trabajo empleado en el experimento y que las variaciones debidas al tiempo de crecimiento de la planta, al no ser significativas, no alterarán los resultados por las diferencias que puedan presentarse en la solución nutritiva y, en todo caso, el escaso efecto de la supresión del Mo sobre las plántulas utilizadas en el experimento son compensados con creces por el efecto beneficioso de la no interferencia del Mo sobre la actividad del Pb libre. Así pues, los resultados obtenidos de estas mediciones han confirmado el planteamiento de suprimir el Mo para mantener la actividad del plomo lo más inalterada posible.

Por otra parte, las plántulas utilizadas mantuvieron las semillas con su endospermo intacto durante todas las fases del experimento, a la vez que en la solución nutritiva había presente una cierta cantidad de nitrógeno en forma de NH_4^+ , por lo que no es probable que incluso variaciones significativas en la actividad nitrato reductasa pudieran afectar mucho la nutrición nitrogenada y el metabolismo de dichas plántulas. Así pues, a partir de esta comprobación se procedió a realizar el resto de experimentos que constituyen este trabajo.

Una vez fijada la composición de la solución nutritiva y realizados los experimentos en las condiciones descritas en el correspondiente apartado de material y métodos, se procedió a la determinación de los diferentes parámetros objeto de este trabajo.

La reducción del crecimiento en longitud de la raíz en *Zea mays* L. c.v. Bakero fue el síntoma inmediato que pudo ser observado al añadir Pb^{+2} . Nuestra observación corresponde con la descripción de un síntoma visual no específico según Sharma y

Dubey (2004), que en nuestro caso se manifestó desde el primer intervalo de exposición a Pb, presentándose diferencias significativas con los controles en ambos tiempos de exposición al metal.

En el período de tiempo estudiado no se observó una clara reducción del crecimiento en peso, tanto fresco como seco, de la raíz como consecuencia de la exposición al plomo, salvo en el peso fresco del tratamiento correspondiente a +Pb-EDTA, aunque sí que fue posible observar un claro y significativo efecto del Pb sobre el crecimiento en longitud de la raíz primaria. Este efecto sobre la longitud de la raíz primaria sugiere que el Pb afecta directamente a las raíces en las zonas de crecimiento activo pero que dicho efecto no se manifiesta en la acumulación de materia seca, probablemente porque a los períodos de tiempo estudiados la disminución del crecimiento longitudinal no es suficiente para manifestarse en un menor incremento de la materia seca en la raíz.

Hasta el momento, existen estudios tanto sobre la reducción de la longitud radicular como de la parte aérea a altas concentraciones de Pb (500 μM y 1000 μM) en *Oryza sativa* L. realizadas por Verma y Dubey (2003) aunque en nuestro caso hemos encontrado reducción significativa de la longitud radicular de *Zea mays* L. a una menor concentración, en concreto 100 μM .

Existen datos aparentemente contradictorios sobre los efectos del Pb sobre el peso seco, pues mientras que Wierzbicka (1998) observó un aparente incremento que se correspondía con un incremento en la síntesis de polisacáridos, Kosobrukhov (2004) observó una disminución del mismo en plantas de *Plantago major* expuestas al Pb.

Nuestros datos se hallan a medio camino entre los observados por diversos autores trabajando en diferentes especies. Así, coinciden plenamente con los obtenidos por Obrucheva *et al.* (1998), quienes observaron una disminución de la longitud radicular de la raíz primaria de plantas de *Zea mays* tratadas con bajas concentraciones de Pb en el medio que no se tradujo en una disminución del peso seco del sistema radicular en conjunto. En este sentido, Eun *et al.* (2000) han propuesto como hipótesis que la inhibición del crecimiento radicular bajo toxicidad por plomo puede ser resultado de la inhibición de la división celular de las puntas de raíz. En este sentido, nuestras observaciones realizadas mediante la técnica de tinción vital muestran un claro efecto de la exposición al Pb sobre la morfología del ápice radicular. En ellas es posible observar

un marcado efecto del metal sobre la integridad de la membrana de las raíces expuestas al Pb, pero en el tratamiento +Pb-EDTA se observa un acusado efecto sobre la morfología del ápice que engloba a la región meristemática, la cual es más estrecha que en las puntas del resto de tratamientos.

Los efectos sobre el crecimiento pueden deberse a diferentes causas. En primer lugar, pueden existir efectos sobre la división celular que se traduzcan en una posterior disminución del crecimiento y, por otra, puede haber efectos directos e indirectos sobre la tasa de elongación.

De forma indirecta, la elongación celular puede quedar disminuida como consecuencia de un menor efecto sobre el transporte de auxinas, como es el caso de algunos metales, entre ellos el aluminio (Duncheva *et al.*, 2005). Por otra parte, la toxicidad podría manifestarse como consecuencia de cambios en los parámetros relacionados con la extensibilidad celular, bien directos o indirectos. En este sentido, se han realizado estudios sobre coleóptilos expuestos a diferentes concentraciones de metales tóxicos y los resultados parecen indicar un cierto efecto de dichos metales sobre los parámetros de extensibilidad (Tyree y Jarvis, 1982; Gunsé *et al.* 1992). En nuestro caso los resultados de las mediciones de los parámetros de extensibilidad de la pared celular obtenidos en el presente trabajo mostraron un bajo efecto del plomo sobre coleóptilos de maíz. Únicamente la mayor concentración de Pb utilizada (1000 μM) mostró indicios de disminución de la extensibilidad aunque, dadas las características de dichos coleóptilos (sobre todo debido a la presencia de ceras en su epidermis que impiden la fácil permeación de agua y solutos) era de esperar que se requirieran concentraciones elevadas para alcanzar efectos medibles. Sin embargo, los efectos observados no parecen concluyentes en el sentido de un efecto directo del plomo sobre los parámetros estudiados, de forma que a partir de nuestro estudio no podemos concluir que los efectos sobre la longitud radicular observados se deban a un efecto directo del plomo sobre las paredes celulares sino más bien parece que otros efectos deben jugar un papel importante en dicha reducción, no siendo el menos importante el daño sobre la membrana plasmática observado mediante la técnica de tinción vital.

Los datos de crecimiento de la parte aérea muestran un efecto menor del Pb sobre la misma. Al analizar los datos de crecimiento en área foliar y peso se observó que dicho órgano no presentaba efectos aparentes debidos al Pb. Tampoco se observaron síntomas

visuales sobre el mismo, aunque el contenido en Pb se incrementó grandemente en las plantas expuestas al metal, de forma proporcional al tiempo de exposición. En este sentido, es de destacar que el tratamiento en el que se acumuló más Pb en la parte aérea corresponde al tratamiento en el que se suministró Pb conjuntamente con EDTA al medio de crecimiento.

Nuestros resultados se pueden explicar con algunas teorías propuestas en otras investigaciones sobre la absorción de Pb en plantas. Así, Lane y Martin (1977) y Kumar *et al.* (1995), plantean que las raíces absorben cantidades significativas de Pb pero, simultáneamente, restringen su translocación a la parte aérea. Ello probablemente es debido a que la retención de Pb en las raíces se basa en la unión de Pb a sitios de intercambio de iones sobre la pared celular y en la precipitación extracelular, principalmente, en la forma de carbonato de plomo depositado en la pared celular. Por otra parte, Jarvis y Leung (2002), demostraron que con la adición de quelantes sintéticos como EDTA, en combinación con bajo pH, efectivamente se previene la retención de Pb en la pared celular, haciendo disponible el metal para su translocación a la parte aérea, aunque Piechalak *et al.* (2003), trabajando con *Pisum sativum* afirman que la adición del agente quelante EDTA resulta en un fitotoxicidad debida al metal más limitada que cuando no se suministra el agente quelante. Según dichos autores, la adición del quelante tuvo efectos sobre la tasa de translocación del Pb a las partes aéreas y sobre el patrón y contenido en compuestos tiónicos como glutatión, homoglutatión y fitoquelatinas, lo cual está más de acuerdo con nuestros resultados pues, como se verá a lo largo de esta discusión, los efectos más marcados se produjeron en el tratamiento +Pb-EDTA, es decir, aquél en el que el EDTA no se hallaba presente en el medio de cultivo juntamente con el Pb. A este respecto hay que tener en cuenta el papel que pueda tener el mucílago en la retención de cationes.

Los datos referentes a al translocación del Pb hacia la parte aérea están de acuerdo con los obtenidos por Rudakova *et al.* (1988), quienes hallaron que la localización de Pb es mayor en las raíces que en la parte aérea. Según estos autores, ello es debido a que el Pb se une fuertemente a los grupos carboxilo de los carbohidratos del ácido galacturónico y del ácido glucurónico en la pared celular, lo cual restringe su transporte vía apoplasto, a la vez que en su transporte radial a través del córtex la endodermis podría suponer una barrera parcial a su entrada en el cilindro vascular (Seregin e

Ivanov, 1997).

Una posible causa de la aparición de la barrera de translocación del Pb desde la raíz a la parte aérea puede asentarse en el hecho de que la pared celular y la vacuola pueden sumar juntas el 96% del Pb absorbido (Wierzbicka y Antosiewicz, 1993) lo cual, a bajas concentraciones podría hacer de la raíz un sumidero del metal de forma que el Pb se acumulara en estos compartimientos y así su disponibilidad para el transporte fuera baja. Este hecho se manifiesta claramente en los bajos valores de contenido en Pb en la parte aérea. Sin embargo, se observa una clara diferencia en cuanto al contenido en Pb en la parte aérea entre los tratamientos con EDTA y los que ni contenían el quelante. En los tratamientos en los cuales el Pb se añadió junto con EDTA se observa un mayor contenido en Pb que en los que no presentaban EDTA en la solución nutritiva, aunque los análisis de los exudados sin digerir mostraron un aparente mayor contenido en Pb en el tratamiento sin EDTA que en el tratamiento con EDTA. Este efecto puede ser consecuencia del tipo de transporte del Pb y se discutirá más adelante.

Comparando la acumulación de Pb en raíces con la de partes aéreas se observa un efecto de saturación en las primeras que no se traduce en un efecto igual en las segundas. Por otra parte, la relación de Pb raíz / Pb parte aérea es muy elevada, a la vez que las partes aéreas continuaron acumulando Pb proporcionalmente al tiempo de exposición al metal. Este hecho es indicativo de la presencia de una barrera de translocación del Pb entre la raíz y la parte aérea, efecto ya observado por diversos autores en relación a diferentes metales pesados (Gunsé, 1987). En nuestro caso, la proporcionalidad del incremento en el contenido en Pb en la parte aérea es indicativa de que no se ha alcanzado la saturación del metal en la misma. En este sentido, cabría esperar que la tasa de transporte hacia las partes aéreas fuera constante. Para ello sería necesario que, o bien existiera un flujo constante de agua con una concentración de Pb constante hacia las partes aéreas, o bien que, si dicho flujo no fuera constante, debería existir una mayor concentración de Pb en las plantas que translocaran menor cantidad de agua hacia sus partes aéreas para mantener el aporte de Pb en niveles constantes. Así, es posible observar que a partir de los análisis de exudados del xilema parecen cumplirse ambas hipótesis aunque a tiempos distintos. Al estudiar el volumen de exudados es posible observar que, si bien a las 24 h el volumen de los mismos respecto al peso fresco no varía significativamente entre los controles y los tratamientos con Pb,

a las 48 h sí que lo hacen, pero al analizar la tasa de transporte de estos mismos exudados respecto al peso seco, se observa que no hay variaciones significativas entre los valores obtenidos a los distintos tiempos de exposición al metal. Por otra parte, los valores de Pb mostrados por dichos exudados digeridos parece caer en valores muy bajos que si bien presentan una cierta tendencia a ser mayores en los correspondientes a las plantas tratadas con Pb, no se diferencian significativamente de los presentes en las plantas no tratadas con el metal.

Una posible explicación podría residir en el hecho de que los niveles transportados fueran tan bajos que las diferencias queden enmascaradas por las impurezas o imprecisiones asociadas al método de análisis y/o a los reactivos empleados. En este sentido, cabe reseñar que incluso en los análisis de contenido en Pb de las plantas no expuestas al metal se detectaron pequeñas cantidades de Pb. Sin embargo, el análisis de contenido en Pb tanto de la solución nutritiva como de los exudados mostró datos interesantes cuando se analizaron mediante los niveles de Pb libre. En dichos análisis es posible observar cómo los valores de Pb libre parecen mayores que los suministrados en la solución nutritiva, lo cual cae fuera de toda lógica. Sin embargo, estos valores anómalos solamente empiezan a aparecer después de un tiempo de exposición al metal, siendo los valores obtenidos en la solución fresca a la que se acababa de añadir el Pb igual a los valores obtenidos una vez digerida la solución nutritiva. La aparición de dichos valores tan elevados parece una clara consecuencia de la exposición de las plantas al plomo, puesto que no aparece en ninguno de los tratamientos a los que no se añadió el metal. Es más, una vez digeridas las muestras, los valores de Pb obtenidos cayeron a niveles lógicos y no manifestaron variaciones significativas con el tiempo. Dichos resultados ponen de manifiesto dos efectos: el primero, inferido a partir de la no variación de la concentración de Pb en el medio a lo largo del tiempo que duró el experimento, es que las plantas no absorbieron una cantidad significativa de Pb del mismo, pudiéndose así afirmar que los valores del metal se mantuvieron constantes a lo largo del experimento. La segunda conclusión es que el Pb disparó algún mecanismo en las raíces que probablemente secretaron algún compuesto que se acomplejó con el metal resultando en un complejo que rindió un voltaje superior al del Pb mismo, siendo su potencial de oxidorreducción igual o muy similar al del Pb libre.

Por otra parte, un fenómeno similar se produjo al analizar los exudados de xilema.

En los análisis de los exudados sin digerir es posible observar también la aparición de un complejo en los exudados correspondientes al tratamiento +Pb-EDTA cuya presencia, a pesar de que ya se manifestó a las 24 h, se incrementó a las 48 h de exposición al Pb. En este sentido, se considera que los metales pesados viajan desde la raíz hasta el xilema de las hojas como iones libres o acomplejados con un ácido orgánico siguiendo la corriente de translocación (Lognecker y Robson, 1993) o, como sugieren Piechalak *et al.* (2003), dichas alteraciones en los potenciales podría deberse a la acumulación de complejos como el glutatión que ayudarían al transporte del Pb. De hecho, el potencial rédox del complejo Pb-glutatión es muy similar al del Pb^{2+} libre, lo cual estaría en acuerdo con nuestras observaciones.

El efecto de aparente incremento de la concentración de Pb, tanto en la solución nutritiva como en los exudados de xilema, es característico de la aparición de especies químicas que podrían actuar tanto en la detoxificación como en el transporte de Pb. De hecho, existen evidencias de transporte de Pb en raíces de cebolla (Wierzbicka, 1987) y se considera que los metales pesados viajan desde la raíz hasta el xilema de las hojas como iones libres o acomplejados con un ácido orgánico siguiendo la corriente de transpiración (Lognecker y Robson, 1993). También es conocido que el Pb^{2+} puede unirse a diferentes moléculas con cargas negativas, como el ácido galacturónico de la pared celular (Rudkova *et al.* 1998) y se considera la posible unión a péptidos de bajo peso molecular (fitoquelatinas) (Ernst, 1975), a pesar de que el Pb no es uno de los metales con mayor afinidad. Como precursor de dichas fitoquelatinas se encuentra el glutatión, que también presenta afinidad por el Pb, Este complejo podría ser un candidato a la formación de un complejo de transporte que apareciera en los exudados de xilema en las plantas expuestas al Pb (Piechalak *et al.*, 2003). Hasta el momento se ha reportado la producción de algunas especies químicas como respuesta a la exposición a metales pesados, aunque podría no ser el único pues, específicamente para el Pb, en raíces de arroz ha sido demostrada la síntesis de oxalato a partir de la oxidación de glicolato a glioxilato y luego oxidación de glioxilato a oxalato. Las variedades tolerantes autorregulan la síntesis y secreción de oxalato, un componente que precipita Pb y así, reduce su absorción por la raíz según Yang *et al.*, (2000). Otros trabajos han enfatizado en la importancia de la síntesis de componentes quelantes del metal tales como aminoácidos como la prolina. Dicho aminoácido tiene reconocidas facultades

protectoras frente a diversos tipos de estrés, actuando como osmoprotector (Paleg *et al.*, 1984), estabilizador de proteínas (Sharma y Dubey, 2004), reciclador de radicales libres (Alia *et al.*, 2001) y también podría acumularse para evitar la toxicidad del plomo (Alia y Saradho, 1991), actuando como un quelante del Pb según Farago y Mullen (1979). Adicionalmente, puede ser que se active algún mecanismo de defensa no-específico como la producción de poliaminas (putrescina) (Seregin e Ivaniov, 2001).

En relación con otros metales, también se ha observado que la planta sintetiza ácidos orgánicos, los cuales producen la quelación del Al^{+3} , como citrato liberado en mayor proporción en variedades tolerantes de *Phaseolus vulgaris* que en variedades sensibles (Miyasaka *et al.*, 1991) y, como malato en trigo (Delhaize *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995). A partir de la observación de la alta correlación entre la liberación de malato y la tolerancia a Al^{+3} , concluyó que la causa para la tolerancia al Al^{+3} parece ser debida más a la capacidad de exudación que a la formación *de novo* de malato debido a que no halló diferencias en las actividades enzimáticas tanto en plantas tolerantes como en plantas sensibles en la estimulación de la vía metabólica del malato. También el ácido cítrico ha sido observado en la planta tolerante *Cassia tora* según Ma, J.F., *et al.*, (1997a; 1997b), el oxalato en *Colocasia esculenta* (Ma, Z., 1998) y el ácido oxálico en trigo según Zheng *et al.*, (1998a; 1998b).

Por todo ello, nuestras observaciones, tanto en lo que respecta los contenidos en Pb en la solución nutritiva como en los referentes a los exudados de xilema, muestran claramente que la planta ha desencadenado algún mecanismo de posible defensa en respuesta a la exposición al plomo de sus raíces.

Respecto a las vías de movimiento del Pb en la raíz existe controversia. Así, mientras que Broyer *et al.* (1972) abogaron por un transporte eminentemente apoplástico, Lane y Martin (1997) consideran que el transporte del Pb hasta las zonas internas de la raíz es eminentemente simplástico, lo cual concuerda con los estudios realizados por Wierzbicka (1987) en los cuales se mostraron evidencias de transporte simplástico de Pb en raíces de cebolla. Actualmente, recientes investigaciones llevadas a cabo por Yo-Young *et al.* (2002) han puesto de manifiesto que el Pb^{2+} puede competir por otros metales divalentes en el transporte dentro de la raíz en plantas de arroz.

En nuestro caso, los resultados referentes a la utilización de fluoróforos específicos parecen mostrar que el Pb puede acogerse a ambas vías, por lo menos en lo que respecta

a las capas más externas de la epidermis y el córtex. De los fluoróforos utilizados para observar el comportamiento del Pb simplástico, uno de ellos ha mostrado evidencias de penetración del Pb en estos compartimientos. En concreto, se obtuvieron resultados muy coherentes en el caso del colorante Phen Green AM, mientras que en el caso del Leadmium no se observaron variaciones aparentes en los niveles de luminancia y, por ende, no pudo observarse penetración de Pb mediante este fluoróforo. Teniendo en cuenta que el colorante Phen Green AM sí que mostró claramente la presencia de Pb en el simplasto, de los datos obtenidos concluimos que probablemente la ausencia de resultados en el caso del Leadmium se deba a una falta de penetración de dicho fluoróforo más que a una falta de penetración del Pb en el simplasto.

Continuando con nuestras observaciones sobre la penetración del Pb en la raíz, se observa que el comportamiento varía según la zona estudiada. En concreto, se observa que la mayor penetración de Pb, tanto apoplástica como simplástica, se corresponde con las zonas más distales del ápice, especialmente la caliptra y hasta la zona meristemática, observándose un menor “quenching” de la luminancia a partir de dicha zona, siendo los efectos menos visibles cuanto más nos alejamos de la punta de la raíz hacia la zona distal.

Estos datos se corresponden con el hecho de que en las zonas apicales jóvenes la banda de Caspari no se ha formado y todo el metal puede pasar apoplásticamente hasta la zona vascular, lo que no sucede en porciones diferenciadas de la raíz, donde la diferenciación de tejidos y la formación de exodermis y endodermis obliga a abandonar la vía apoplástica y a utilizar la vía simplástica (Barceló *et al.* 2005). Este efecto sería claramente observable en la zona distal, en la cual se ha desarrollado una exodermis completamente diferenciada que podría dificultar la penetración de Pb de forma que los resultados concordarían con esta situación. Sin embargo, tal y como manifiesta Wierzbicka (1987), el Pb puede producir interrupción y lesiones en la membrana plasmática, afectando tanto al plasmalema como al tonoplasto, de forma que podría producirse una cierta penetración de Pb en el córtex incluso en las zonas de exodermis completamente desarrollada, como es nuestro caso. En este sentido, nuestras observaciones mediante tinción vital pusieron realmente de manifiesto que se habían producido lesiones en la epidermis de la zona distal de forma que aparecieron excoriaciones y, consecuentemente, exposición de zonas del córtex al exterior. Por otra

parte, los datos obtenidos mediante la utilización de dichos fluoróforos son coherentes con los obtenidos por Michalak y Wierzbicka (1998), quienes observaron un gradiente de concentración de Pb desde la punta hasta las zonas basales en raíces de cebolla.

Referente a estas observaciones, los datos de tinción vital concuerdan también con los datos obtenidos con los fluoróforos mencionados en el sentido de que una mayor precipitación de Pb en la pared celular, especialmente en el apoplasto de células epidérmicas o en el córtex exterior podría inducir a un efecto adverso sobre dichas células que se reflejaría en los datos de tinción vital. Así, Seregin *et al.* (2004) han observado que, a bajas concentraciones, el Pb se acumula preferentemente en el apoplasto, mientras que a altas concentraciones puede dañar el plasmalema y penetrar en las células dañadas, lo cual podría ir acompañado de la observación de la penetración del yoduro de propidio en la técnica de tinción vital, tal y como efectivamente hemos observado en este trabajo.

Por otra parte, la absorción del Pb parece estar ligada a la absorción del calcio mediante una posible interacción con un canal de Ca^{2+} operado por voltaje en la membrana plasmática. Evidencias de la existencia de dicha interacción han sido observadas en trigo y maíz por Marshall *et al.* (1994), Huang *et al.* (1996) y Huang y Cunningham (1996). Los cuales proponen que dicha interacción podría producirse mediante un bloqueo directo o transporte competitivo. En relación con esta competición, los estudios antes mencionados han mostrado que el Pb puede competir con otros metales divalentes en el transporte dentro de la raíz en plantas de arroz (Yo-Young *et al.*, 2002) y que el Ca^{2+} bloquea el transporte de Pb^{2+} hacia la raíz, pero que el Mg^{2+} no provoca dicho bloqueo, por lo que probablemente estén implicados múltiples mecanismos.

En nuestro caso, las observaciones del calcio apoplástico libre muestran una relación con los resultados obtenidos para el plomo, tanto apoplástico como simplástico. En concreto, se pudo observar una diferencia de comportamiento entre las diferentes zonas estudiadas, que se corresponden con las mismas que para el caso del plomo. Así, se observó que los mayores incrementos en los niveles de calcio libre se correspondían con las zonas más extremas de la raíz, mientras que los menores incrementos se observaron en las zonas más distales (post-meristemo y zona distal), y que los incrementos fueron especialmente significativos en el tratamiento que no contenía EDTA conjuntamente

con el Pb, lo cual podría estar relacionado con los posibles efectos detoxificadores beneficiosos del EDTA ya mencionados anteriormente en esta misma discusión..

Estos resultados muestran claramente que ha existido una clara relación entre la exposición al plomo y la reacción del Ca^{2+} . Dicha interacción puede estar ligada a muchos factores, pues el Ca^{2+} no tan solo interviene como elemento estructural sino que en el citoplasma se presenta a muy bajas concentraciones debido a su actuación como mensajero secundario.

Tal y como hemos mencionado anteriormente, uno de los daños descritos para el plomo y que pueden causar disminución del crecimiento radicular es el desplazamiento del calcio apoplástico por el plomo conjuntamente con la competición por la absorción del calcio. De hecho, la disminución de la absorción del calcio podría ser consecuencia directa de la interacción del plomo con el apoplasto sin necesidad que hubiera una penetración del mismo al interior celular, pero en nuestro caso ambos fenómenos parecen actuar a la vez, pues se observó que se produjo tanto penetración como acumulación de Pb en el apoplasto, lo cual puede traer consigo una compleja secuencia de efectos como los que han sido encontrados por diversos autores respecto a otros metales como el aluminio (Ma *et al.*, 2002 y Garzón, 2003) trabajando con el mismo colorante.

Estas observaciones muestran que la exposición al Pb produce una distorsión en los niveles de calcio independientemente de que se bloquee o no la absorción del mismo. Por otra parte, el transporte del calcio hacia el exterior del citoplasma a través de la membrana plasmática puede realizarse mediante una ATPasa (Evans *et al.* 1992) aunque también existen canales que pueden realizar transporte pasivo hacia el interior. La alteración o distorsión de los niveles de calcio puede afectar muchos procesos relacionados con la toxicidad por plomo ya que el calcio está implicado en muchos procesos, tanto por su actuación como mensajero secundario como en su papel más directo activando y desactivando enzimas (Trewavas y Gilroy, 1991) y teniendo en cuenta que la actividad del Ca^{2+} en el simplasma, a pesar de su baja concentración, es muy elevada. Por otra parte, el Ca^{2+} actúa coordinadamente con factores relacionados con la formación y organización del citoesqueleto (Jones *et al.*, 1998) y en el huso mitótico (Rengel *et al.*, 1992; Delhaize *et al.* 1995), especialmente interactuando con el proceso de despolimerización de los microtúbulos. En este sentido, podría existir una

relación entre los efectos sobre los niveles de Ca^{2+} provocados por la exposición al Pb y los cambios morfológicos observados en los ápices de las raíces. En cuanto a la calmodulina, pueden producirse alteraciones importantes debido a la inhibición de la actividad de ésta, que necesita unirse al calcio para activar otras enzimas. La calmodulina, entre otros procesos, controla la despolimerización de los microtúbulos, y la imposibilidad de muchas células afectadas de formar el huso profásico y metafásico puede deberse también al mal funcionamiento de la calmodulina (Fisher *et al.*, 1993).

Debido a que no se midió el contenido de calcio total en la raíz no se puede asegurar si se presenta un desequilibrio en la absorción de este nutriente bajo toxicidad con Pb. Sin embargo, en estudios con plantas jóvenes de maíz se encontró que disminuye la absorción de calcio y otros nutrientes, como K, Mg y P (Walker y Miller, 1977). En nuestro caso, podemos confirmar que la evolución de calcio citoplasmático en las raíces de las plantas expuestas al plomo parece ser un efecto indirecto de la toxicidad por plomo que conduce a la activación de sistemas calcio-dependientes.

Las distorsiones producidas en los niveles de calcio pueden atribuirse a una mayor y/o más eficaz utilización del calcio por parte del maíz o incluso a una ligera sustitución del calcio por el plomo en ciertos procesos metabólicos que impidan el correcto desarrollo. Es muy posible que la concentración de Pb empleada en nuestros experimentos no sea suficiente para bloquear la entrada de calcio en la raíz, aunque también, podría suceder que algún quelante enmascare la puerta operada por voltaje del canal de calcio facilitando la entrada del plomo por el canal.

Por lo que respecta a los parámetros hídricos, se observan diferencias entre los distintos tratamientos. En primer lugar, el Ψ_{π} de la raíz no presenta diferencias significativas entre tratamientos, aunque sí que parece presentar una tendencia a hacerse menos negativo con el tiempo. Dicha tendencia parece más acusada en el caso de la parte aérea y podría ser explicada como consecuencia de los efectos diferenciales sobre el crecimiento que se observaron en ambos órganos.

Las diferencias de Ψ_{π} , o tendencia a hacerse menos negativo con el tiempo, no se traducen en un menor contenido hídrico en ninguno de los órganos estudiados; es más, el contenido hídrico presenta en ambos una tendencia a la disminución relacionada con la exposición al plomo, con el tiempo, o con ambos factores. Este efecto parece eliminar la posibilidad que el incremento en Ψ_{π} sea debido a un efecto de dilución debido a

entrada de agua como consecuencia del crecimiento en extensión de las células, pues el efecto debería mostrarse al contrario. Por ello, la hipótesis más probable es que se haya producido una disminución del contenido de solutos a medida que avanzaba el tiempo, la cual puede haberse traducido en unos valores más elevados de Ψ_{π} . Este hecho parece ligado al crecimiento y no a la exposición al plomo puesto que se ha manifestado en la misma forma tanto en las plantas control como en plantas expuestas al metal. Por otra parte, el Ψ_{H_2O} de la parte aérea ha mostrado una clara tendencia a la disminución que también parece más relacionada con el tiempo que con la exposición al plomo. En este caso, una disminución del Ψ_{H_2O} conjuntamente con un incremento del Ψ_{π} deberían conllevar una disminución del Ψ_p , lo cual podría tener una relación con el crecimiento, especialmente en la parte aérea, puesto que las células jóvenes acostumbran a tener una mayor turgencia a la vez que una mayor elasticidad que las células adultas que han completado su crecimiento y diferenciación y presentan un mayor volumen celular (Tyree y Jarvis, 1982).

Continuando con los efectos sobre las relaciones hídricas en la raíz, se observan diferencias claras entre los diferentes tratamientos. El comportamiento de los diferentes parámetros relacionados con la conductividad hidráulica de la raíz ha mostrado efectos curiosos. En concreto, el comportamiento endo- o exoosmótico ha sido ligeramente diferente en algunos parámetros. Por un lado, la presión radicular no ha variado en ninguno de los tratamientos, salvo por una tendencia a la disminución en el tratamiento +Pb+EDTA a pesar que, observados los datos en conjunto, no se puede hablar de diferencias claras entre los tratamientos con o sin plomo. Sin embargo, donde sí que se han observado diferencias es a nivel de los parámetros que definen la conductividad hidráulica, especialmente en lo referente a L_{Pr} . Dicho parámetro muestra diferencias claras y significativas entre los tratamientos sin plomo y los que contenían el metal. En todos los casos los tratamientos con el metal mostraron una mayor conductividad hidráulica de la raíz que los que no presentaban plomo, tanto a las 24 h como a las 48 h, sin que se observaran diferencias significativas entre los valores mostrados por ambos tiempos.

La aparición de dichas diferencias parece claramente ligada a la exposición al plomo y, dado que se produce tanto en experimentos exoosmóticos como endoosmóticos, podrían indicar que la raíz presentaría una menor resistencia al paso de agua a través de

ella. Es más, al exponer las raíces a HgCl_2 se observó que la conductividad hidráulica no tan solo decreció sino que incluso aumentó con el tratamiento. El Hg presenta elevada afinidad por los grupos -SH en membranas, puede provocar el cierre de acuaporinas y el flujo de K^+ (Ernst, 1988) y también puede provocar una posible inhibición competitiva de los canales iónicos como el canal de Ca^{2+} . A partir de estas premisas sería posible suponer que el tratamiento con HgCl_2 supondría una disminución en la conductividad hidráulica de la raíz, aunque nuestros resultados muestran exactamente lo contrario. Por otra parte, la eliminación del HgCl_2 mediante DTT haría suponer que los valores de L_{Pr} volverían a sus valores iniciales. Sin embargo, esto no es así; por un lado, el tratamiento con HgCl_2 ha incrementado la conductividad hidráulica en los tratamientos con Pb en lugar de disminuirla y, por otro, la eliminación del HgCl_2 mediante DTT no ha revertido los valores de la misma a los iniciales antes del tratamiento con HgCl_2 . Dado que los resultados obtenidos hasta el momento por diversos autores se basan principalmente en estudios a nivel celular, nuestros resultados bien pudieran obedecer a causas diferentes no relacionadas directamente con las acuaporinas. En concreto, el efecto del plomo sobre la conductividad hidráulica parece actuar a un nivel no necesariamente relacionado con la conductividad vía simplasto sino más bien vía apoplasto. En este sentido, pudiera ser que la exposición al Pb dañara la barrera de impermeabilidad situada a nivel de la exodermis, de la endodermis o, más probablemente, de ambas, Esta hipótesis recibe una cierta confirmación por el hecho de que el efecto del Pb parece haberse potenciado con la adición de otro metal divalente tóxico como es el Hg. Además, la posible lesión debe ser permanente puesto que una vez retirado el Hg no se recupera los valores iniciales sino que se mantienen los valores incrementados debidos al tratamiento con mercurio.

Nuestras observaciones no están pugnadas con las realizadas por otros autores pues en nuestro caso las mediciones se hicieron a nivel de órgano entero, mientras que en la mayoría de casos se hicieron a nivel celular en donde sí que juegan un papel muy importante las acuaporinas en el transporte de agua a través de la membrana celular. Por otra parte, las hipótesis de que en la raíz juegan factores diferentes en el transporte de agua que los estrictamente relacionados con las acuaporinas parecen confirmarse por el comportamiento de las raíces no sometidas al tratamiento con Pb. En dichas raíces se observa que los parámetros hídricos estudiados no son modificados por la presencia de

HgCl₂ ni tampoco al retirar éste con DTT, en clara evidencia de que los factores que controlan la conductividad hidráulica de la raíz son más complejos que los que controlan el paso de agua a través del plasmalema.

Finalmente, y a pesar del bajo contenido en Pb en la parte aérea ha sido posible observar acusados efectos sobre la fotosíntesis y la transpiración, tanto en condiciones de cámara de cultivo como en condiciones de invernadero.

Teniendo en cuenta los relativamente elevados requerimientos lumínicos de ésta planta, se realizaron mediciones tanto en invernadero como en cámara de cultivo. En ambos casos fue afectada la tasa fotosintética, tanto a las 24 h como a las 48 h en los tratamientos con Pb, aunque la transpiración se vio afectada de diferente forma.

Según Montero, Cabot, Poschenrieder y Barceló (1998) puede producirse una disminución de la asimilación de CO₂ por incremento de resistencia estomática y mesofilica como consecuencia del estrés por metales tóxicos, la cual es dependiente del tipo de metal. En concreto, el Zn, Pb y Cu comportan una drástica bajada en la eficiencia del uso del agua, por lo que puede haber otros factores implicados en los efectos sobre la fotosíntesis que los meramente debidos a un cierre estomático y consecuente disminución de la difusión de CO₂. En este sentido, la comparación entre los datos obtenidos en condiciones de cámara de cultivo e invernadero parecen apoyar esta hipótesis, pues la transpiración y la tasa fotosintética se vieron afectadas de distinta forma y, como se desprende de los datos, parecen actuar mecanismos independientes entre ambas, pues la fotosíntesis presentó valores menores en las plantas expuestas al plomo independientemente de que la tasa de transpiración aumentara, como fue el caso de las plantas tratadas con Pb²⁺ durante 48 h en condiciones de cámara de cultivo.

En resumen, el análisis en conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo confirma plenamente la elevada toxicidad del plomo para los vegetales. Dicha toxicidad se ha mostrado patente incluso a muy bajos contenidos tisulares del metal, como muestra el último experimento sobre los efectos sobre la fotosíntesis a la vez que los mecanismos de actuación del metal se han revelado múltiples y complejos, no pudiendo considerarse desde un único punto de vista sino que se han manifestado a diferentes niveles y actuando sobre diferentes procesos a la vez. Dichos efectos, probablemente actúan de forma simultánea y todos ellos configuran un síndrome debido a la toxicidad por plomo. Es por ello que los objetivos de este trabajo pueden considerarse plenamente

cumplidos a la vez que los resultados obtenidos abren un conjunto de posibilidades para obtener un mejor conocimiento de los mecanismos de toxicidad inducidos por metales pesados en las plantas.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. El plomo constituye un metal altamente tóxico incluso a bajas concentraciones.
 2. El efecto del plomo se manifiesta en la longitud radicular incluso antes de que el metal actúe sobre la acumulación de materia seca.
 3. Los efectos sobre la longitud radicular podrían probablemente ser consecuencia de los efectos sobre la división celular en combinación con efectos sobre la propia extensibilidad de la pared celular.
 4. Muchos de los trastornos provocados por el plomo pueden ser debidos a efectos sobre la integridad de la membrana plasmática.
 5. Al igual que en otros metales tóxicos, existe una barrera de translocación del plomo hacia las partes aéreas que puede atribuirse a múltiples causas.
 6. El agente quelante EDTA puede efectivamente disminuir la toxicidad por plomo.
 7. Probablemente el transporte de plomo desde las raíces hasta las partes aéreas se realice mediante la unión a complejos orgánicos y pudiera ser que este mismo mecanismo interviniera en la detoxificación del metal presente en la solución nutritiva por parte de las raíces.
 8. La penetración del plomo en la raíz puede realizarse tanto por la vía del apoplasto como por el simplasto, por lo menos en los niveles más exteriores de la misma.
 9. La utilización de colorantes selectivos constituye una técnica muy útil para la visualización del comportamiento del plomo en la raíz a la vez que permite la realización de experimentos *in vivo*, aunque no todos los posibles colorantes son útiles.
 10. Parte del efecto tóxico del plomo podría ir ligado a la distorsión de los niveles de calcio citoplasmático y su función como mensajero secundario.
 11. El plomo afecta los parámetros hídricos de la raíz por mecanismos diferentes a la acción sobre las acuaporinas, mostrando que los mecanismos que rigen el comportamiento hídrico de este órgano son complejos y obedecen a multitud de factores.
-

12. Los efectos del plomo sobre los parámetros hídricos hacen más sensible a la raíz frente al ataque por otros metales pesados, como se demuestra por los efectos añadidos al tratar las raíces con HgCl_2 .
 13. El plomo, a bajas concentraciones, puede afectar procesos fisiológicos importantes como la fotosíntesis, bien sea de forma directa o indirecta.
-

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, A.; TAJMIR-RIahi, H.A. (1993). Interaction of toxic metal ions Cd⁺², Hg⁺² and Pb with light-harvesting proteins of chloroplast thylakoid membranes. An FTIR spectroscopic study. *J. Inorg. Biochem.* **50**: 235–243.
- ALASTAIR, H.F.; ROBERT, K.M. HAY. (2002). Environmental physiology of plants. 3^a ed. pp. 91, 151, 161, 168, 242, 244, 249, 267, 270, 277.
- ALIA.; MOHANTY, P.; MATYSIK, J. (2001). Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids.* **21**: 195–200.
- ALIA.; SARADHI, P.P. (1991). Proline accumulation under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **138**: 554-558.
- ANTOSIEWICZ, D.M. (1992). Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals. *Acta Soc. Bot. Polon.* **61**: 281–299.
- ASADA, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C, Mullineaux PM (eds), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, pp. 77–100 - CRC Press, Boca Raton, London.
- AZAIZEH, H.; STEUDLE, E. (1991). Effects of salinity on water transport of excised maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Physiol.* **97**: 1136-1145.
- BAISAK R.; RANA D.; ACHARYA P.; KAR M. (1994). Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiol.* **35**: 489-495.
- BAKER, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J.Plant Nutr.* **3**: 643–654.
- BARCELÓ, J. (2003). Perspectivas actuales de la fitoremediación. Anuari Reial Academia de Farmacia de Catalunya. **47**: 13-45.
- BARCELÓ, J.; NICOLAS, G.; SABATER, B.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. (2001). Fisiología Vegetal, Ed.Pirámide, Madrid.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, Ch. (2003). Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to science.* **2**: 333-344.
- BARCELÓ, J.; LLUGANY, M.; LOMBINI, A.; POSCHENRIEDER, C. (2005). Glycine may contribute to the protection of *Silene armeria* against excess copper. In: C.J. Li (Eds). Plant nutrition for food security, human health and environmental protection. 634-635. Tsinghua University Press. Beijing (China).
-

- BAZZAS, F.A.; CARLSON, R.W.; ROLFE, G.L. (1975). The inhibition of corn and soybean photosynthesis by lead. *Physiol. Plant.* **34**: 326–329.
- BAZZAZ, F.A.; ROLFE, G.L.; WINDLE, P. (1974). Differing sensitivity of corn and soybean photosynthesis and transpiration to lead contamination. *J. Environ. Qual.* **3**: 156–158.
- BAZZAZ, MB.; GOVINDJEE (1974). Effect of lead chloride on chloroplast reactions. *Environ. Lett.* **6**: 175-191.
- BERRY, WL. (1986). Plant factors in influencing the use of plant analysis as a tool for biogeochemical prospecting. In: Carlisle D., Berry WL, Kaplan IR., Watterson JR, (eds), *Mineral Exploration: Biological Systems and Organic Matter*, pp. 13-32. Englewood Cliffs, USA.
- BLAYLOCK, M.J.; SALT, DE.; DUSHENKOV, S.; ZAKAROVA, O.; GUSSMAN, C.; KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B.D.; RASKIN, I. (1997). Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 860-865.
- BOTT, A.W. (1995). Voltammetric Determination of Trace Concentration of Metals in the Environment. Bioanalytical Systems. *Current Separations* **14**:1.
- BRECKLE, S.W. (1991). Growth under stress. Heavy metals. In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U (eds). *Plant Roots: The Hidden Half*, pp. 351–373. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- BROYER, R.; JOHNSON, C.M.; PAULL, R.E. (1972). Some aspects of lead in plant nutrition. *Plant Soil.* **36**: 301–313.
- BURTON, K.W.; MORGAN, E.; ROIG, A. (1984). The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in South Wales forests. II green house experiments. *Plant Soil.***78**: 271–282.
- BURZYNSKI, M. (1987). The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **9**: 229–238.
- BURZYNSKI, M.; GRABOWSKI, A. (1984). Influence of lead on nitrate uptake and reduction in cucumber seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.* **53**: 77–86.
- CHAITNYA, K.S.K.; NAITHANI, S.B. (1994). Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss in viability of seeds of *Shorea robusta* Gaertn. *F. New Phytol.* **126**: 63–627.
- CHANEY, RL.; RYAN, JA. (1994). Risk based standards for arsenic lead and cadmium in urban soils. Dechema, Frankfurt, Germany.
-

-
- CHEN, J.; ZHOU, J.; GOLDSBROUBH, P.B. (1997). Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant.* **101**: 165–172.
- COBBETT, C.S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 11–216.
- CUNNINGHAM, S.D.; BERTI, W.R.; HUANG, J.W. (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* **13**: 393–397.
- DAVIES, B.E. (1995). Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health of their inhabitants. In: Majumdar, S.K., Miller, E.W., Brenner, F.J. (eds), *Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health*, pp. 287–307. The Pennsylvania Academy of Science, Easton PA, USA.
- De KNECHT, J.A.; VAN DILLEN, M.; KOEVOETS, PLM.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, JAC.; ERNST WHO. (1994). Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.* **104**: 255–261.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. (1993) Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* **103**: 695–702.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. (1995). Aluminium toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology.* **107**: 315–321.
- DENNY, P.; WEEKS, DC. (1968). Electropotential gradients of ions in an aquatic angiosperm *Potamogeton schweinfurthii* (Benn). *New Phytol.* **67**: 875–882.
- DIETZ, K-J.; BAIRE, M.; KRAMER, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. En MNV Prasad, J. Hagemeyer, eds, *Heavy Metal Stress in Plants. From Molecules to Ecosystems*. Springer Verlag, Berlin, pp. 73–97.
- DONALD, W. (1999). Complex influence of the L-type calcium-channel agonist BayK8644 (+/-) on N-methyl-D-aspartate responses and neuronal survival. *Mar.* **89** (1): 101–8.
- DONCHEVA, S.; AMENÒS, M.; POSCHENRIEDER, Ch.; BARCELÓ, J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in Maite: *J. Exp. Bot.* **56**: 1213–1220.
- DRAZKIEWICZ, M. (1994). Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors. *Photosynthetica.* **30**: 321–331.
- DUSHENKOV, V.; KUMAR, P.; MOTTO, H.; RASKIN, I. (1995) Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous stream. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 1239–1245.
-

- EICK, MJ.; PEAK, JD.; BRADY, PV.; PESEK, JD. (1999). Kinetics of lead adsorption and desorption on goethite: Residence time effect. *Soil. Sci.* **164**: 28-39.
- ERNST, W. (1975). Physiology of heavy metal resistance in plants. *En Int. Conf. Heavy Metals in the Environment*. CEP Consultants, Edinburgh, pp 121-136.
- ERNST, W. (1980). Biochemical aspects of cadmium in plants. In: Nriagu JO. (ed), *Cadmium in the Environment*, pp. 639–653. J. Wiley and Sons, New York, USA.
- ERNST, W. (1998). Effects of heavy metals in plants at the cellular and organism level. In: G. Shüürmann, B. Markert, (ed), *Ecotoxicology; Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects*. John Wiley and Sons, Nueva York, pp 587–620. Heidelberg, Wiley.
- ERNST, W.; VERKLEIJ, JAC.; SCHAT, JAC. (1992). Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* **41**: 229-248.
- EUN, SO.; YOUN, HS.; LEE, Y. (2000). Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* **110**: 357–365.
- EVANS, D.E.; BRIARS, S.A.; WILLIAMS, L.E. (1992). Active calcium transport by plant cell membrane. *Journal of Experimental botany* **42**: 285-303.
- FARAGO, ME.; MULLEN, WA. (1979). Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorg. Chim. Acta* **32**: L93–L94.
- FISHER, D.; CYR, R.J. (1993). Calcium levels affect the ability to immunolocalize calmodulines to cortical microtubules. *Plant Physiol.* **103**: 543-551.
- FOYER, CH.; LÓPEZ-DELGADO, H.; DAT, JF.; SCOTT, IM. (1997). Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress and tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* **100**: 241-254.
- FRUGOLI, JA.; ZHANG, HH.; NUCCIO, ML.; McCOURT, P.; McPEAK, MA.; THOMAS, TI.; McCLUNG, CR. (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **112**: 327–336.
- GARZÓN, T., (2003). Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio. Unidad de Fisiología vegetal. Universidad Autónoma de Barcelona. España. <http://www.tdx.cbuc.es/TDX-1025104-171232>.
- GASPAR, T.; PENEL, C.; THROPE, T.; GREPPIN, H. (1982). Peroxidases (1970–1980). A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants, pp. 324-330. University of Geneva Press, Centre de Botanique, Geneva, Switzerland.
- GIRROTI, AW. (1990). Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* **51**: 497-509.
-

-
- GODBOLD, DL.; KETTNER, C. (1991) Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings. *J.Plant Physiol.* **139**: 95–99.
- GODZIK, B. (1993). Heavy metal contents in plants from zinc dumps and referent area. *Pol. Bot. Stud.* **5**: 113 –132.
- GRENINGER, D.; KOLLONITSCH, V.; KLINE, C.H. (1974). Lead Chemicals. International Lead Zinc Research Organisation, New York.
- GRILL, E.; WINNACKER, EL.; ZENK, MH. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides of plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **84**: 439–443.
- GUERINOT, ML. (2000). The ZIP family of metal transporters (review). *Biochem. Biophys. Acta.* **1465**: 190–198.
- GUNSE, B.; POSCHENREIDER, CH.; BARCELÓ, J. (1997). Water transport properties of roots and root cortical cells in proton-and Al-stressed maize varieties. *Plant Physiol.* **113**: 595–602.
- GUNSE, B. (1987). Efectos del cromo sobre la nutrición y relaciones hídricas de *Phaseolus vulgaris*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- GUNSE, B.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, Ch.; BARCELÓ, J. (1992). Growth, cell wall elasticity and plasticity in *Zea mays* L. coleoptiles exposed to Cadmium. *Suelo y Planta.* **2**: 485–493.
- GUNSE, B.; GARZÓN, T.; BARCELÓ, J. (2003). Study of aluminium toxicity by means of vital staining profiles in four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. Vo. 160; part **12**: 1447-1450.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edn. Oxford University Press, New York.
- HAUSSLING, M.; JORNS, CA.; LEHMBECKER, G.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; MARSCHNER, H. (1988). Ion and water uptake in relation to root development of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *J.Plant Physiol.* **133**: 486–491.
- HERTWIG, B.; STREB, P.; FEIERABEND, J. (1992). Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.* **100**: 1547–1553.
- HUANG, JW.; CHEN, J.; BERTI, WR.; CUNNINGHAM, SD. (1997). Phytoremediation of lead-contaminated soil: role of synthetic chelates in lead uptake and translocation. *New Phytol.* **134**: 75–84.
- HUANG, JW.; CUNNINGHAM, SD. (1996). Lead Phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* **134**: 75–84.
-

- HUANG, JW.; GRUNES, DL.; KOCHIAN, LV. (1994). Voltage dependent Ca^{+2} influx into right-side-out plasmamembrane vesicles isolated from wheat roots: characteristic of a putative Ca^{+2} channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3473–3477.
- IQBAL, J.; MUSHTAQ, S. (1987). Effect of lead on germination, early seedling growth, soluble protein and acid phosphatase content in *Zea mays*. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* **30**: 853-856.
- JANA, S.; CHOUDHARI, MA. (1982). Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals. *New Phytol.* **90**: 477–484.
- JARVIS, MD.; LEUNG, DWM. (2002). Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environ. Exp. Bot.* **48**: 21-32.
- JONES, D.L.; KOCHIAN, R.V.; GILROY, L.S. (1998). Aluminium induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cells culture. *Plant physiology* **116**: 81-99.
- JONES, LHP.; CLEMENT, CR.; HOPPER, MJ. (1973). Lead uptake from solution by perennial ryegrass and its transport from roots to shoots. *Plant Soil.* **38**: 403–414.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. (1992). Trace elements in soils and plants. 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, London.
- KINRAIDE, TB. (1994). Use of Gouy-Chapman-Stern model for membrane-surface electrical potential to interpret some features of mineral rhizotoxicity. *Plant Physiol.* **106**: 1583–1592.
- KOEPPE, D.E. (1977). The uptake, distribution and effect of cadmium and lead in plants. *Sci. Total Environ.* **7**: 197–205.
- KOEPPE, D.E.; MILLER R.J. (1970). Lead effects on corn mitochondrial respiration. *Science.* **167**: 1376–1377.
- KOSOBROUKHOV, A.; KNYAZEVA, I.; MUDRIK, V. (2004). *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. *Plant Growth Regul.* **42**: 145-151.
- KOYAMA, H.; YOKOTA, S.; DAWAIR, Z.; HARA, T. (1995). Effects of Aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain lansberg in hydroponic cultura. *Plant cell Physiology.* **36** (1): 201–205.
- KROCHWITZ, JI. (1995). Iron compounds. In: Kroschwitz, JI. (ed), Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Ed 4, pp. 887-8. Jhon Wiley and Sons, New York, USA.
-

-
- KSIAZEK, M.; WOZNY, A.; MLODZIANOWSKI, F. (1984). Effect of $Pb(NO_3)_2$ on poplar tissue culture and the ultrastructural localization of lead in culture cells. *For. Ecol. Manag.* **8**: 95–105.
- KUMAR, NPBA.; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H.; RASKIN, I. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ.Sci.Technol.* **29**:1232–1238.
- KUTSCHERA, U.; SCHOPFER, P. (1986). In Vivo measurement of cell wall extensibility in maize coleoptiles: effects of auxin and ABA. *Plant.* **169**: 437.44.
- LAMOREAUX, RJ.; CHANEY, WR. (1978). The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol. Plant.* **43**: 231–236.
- LANE, SD.; MARTIN, ES. (1977). A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. *New Phytol.* **79**: 281–286.
- LAXEN, DPH.; HARRISON, RM. (1977). The highway as a source of water pollution: an appraisal of heavy metal lead. *Water Res.* **11**: 1-11.
- LEE, KC.; CUNNINGHAM, BA.; POULSEN, GM.; LIANG, JM.; MOORE, RB. (1976). Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. *Physiol. Plant.* **36**: 4–6.
- LEE, S-Z.; CHANG, L.; YANG, H-H.; CHEN, C-M.; LIU, M-C. (1998). Absorption characteristics of lead onto soils. *J. Haz. Mat.* **63**: 37-49.
- LEVINA, EN. (1972). Obshchaya tosikologiya metallov (General Metal toxicology). Leningrad, Meditsyna.
- LEVITT, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol. 2. Academic Press, Londres.
- LONGNECKER, N.; ROBSON, AD. (1993). Distribution and transport of zinc in plants. En AD Robson, ed, Zinc in Soils and Plants. Kluwer Acad Publ, Dordrecht, Holanda, pp. 79-91.
- LOZANO, R.; AZCON, R.; PALMA, JM. (1996). SOD and drought stress in *Lactua sativa*. *New Phytol.* **136**: 329–331.
- MA, J.F.; ZHENG, SJ.; MATSUMOTO, H. (1997a). Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia Tora* L. *Plant cell Physiology.* **38**: 1019-1025.
- MA, J.F.; ZHENG, SJ.; MATSUMOTO, H. (1997b). Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia Tora* L. *Plant cell Physiology.* **123**: 1537-1543.
-

- MA, Q.; RENGEL, Z.; KUO, J. (2002). Aluminum toxicity in rye (*Secale cereale*): Root growth and dynamics of cytoplasmic calcium in intact root tips. *Annals of Botany Company*.
- MA, Z.; MIYASAKA, S.C. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* **118**: 861-865.
- MAITRA, P.; MUKHERJI, S. (1977). Effect of lead on nucleic acid and protein contents of rice seedlings and its interaction with IAA and GA₃ in different plant systems. *Ind. J. Exp. Biol.* **17**: 29-31.
- MALKOWSKI, E.; KITA, A.; GALAS, W.; KAREZ, A.; MICHAEL, K. (2002). Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentration of potassium and calcium. *Plant Growth Regul.* **37**: 69-76.
- MARSCHNER, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. Ed 2. Academic Press, Londres.
- MARSCHNER, P.; GODBOLD, DL.; JUTSCHHE, G. (1996). Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies* (L.) karst.). *Plant Soil.* **178**: 239-245.
- MARSHALL, J.; CORZO, A.; LEIGH, RA.; STANDERS, D. (1994). Membrane potential-dependent calcium transport in right-side-out plasma membrane vesicles from *Zea mays* L. Roots. *Plant J.* **5**: 683-694.
- MEHTA, SK.; GAUR, JP. (1999). Heavy metal induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* **143**: 253-259.
- MÉNDEZ, J.R.; CELYMAR, R.; KHARYM, Z.; OTAOLA, V.A. (2004). Effect of oil concentration and contamination period on seed germination of corn (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *Revista Científica UDO Agrícola*. Vol. 4, No. 1: 66-71.
- MICHALAK, E.; WIERZBICKA, M. (1998). Differences in lead tolerance between *Allium cepa* plants developing from seeds and bulbs. *Plant Soil.* **199**: 251-260.
- MILES, CD.; BRANDLE, JR.; DANIEL, DJ.; CHU – DER, O.; SCHNARE, PD.; UHLIK, DJ. (1972). Inhibition of PS II in isolated chloroplast by lead. *Plant Physiol.* **49**: 820-825.
- MILLER, RJ.; BIUELL, JE. ; KOEPPE, DE. (1973). The effect of cadmium on electron and energy transfer reactions in corn mitochondria. *Physiol. Plant.* **28**: 166-171.
- MISHRA, A.; CHOUDHARI, MA. (1998). Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. *Biol. Plant.* **41**: 469-473.
-

-
- MIYASACA, S.C.; BUTA, J.G.; HOWEL, R.K.; FOY, C.D. (1991). Mechanism of aluminium tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* **96**: 737-743.
- MOHANTY, N.; VASS, I.; DEMETER, S. (1989). Copper toxicity affects Photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, Q_B. *Plant Physiol.* **90**: 175–179.
- MONTERO, E.; CABOT, C.; POSCHENRIEDER, Ch.; BARCELÓ, J. (1998). Relative importance of osmotic and ion specific effects on ABA mediated inhibition of leaf expansion growth in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environment.* **21**: 54-62.
- MOREL, J.L.; MENCH, M.; GUCKERT, A. (1986). A measurement of Pb, Cu, Cd binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fertil. Soils.* **2**: 29-34.
- MOUSTAKAS, M.; LANARAS, T.; SYMEONIDIS, L.; KARATAGLIS, S. (1994). Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. *Photosynthetica.* **30**: 389–396.
- MUKHERJI, S.; MAITRA, P. (1976). Toxic effects of lead on growth and metabolism of germinating rice (*Oryza sativa* L.) root tip cells. *Ind. J. Exp. Biol.* **14**: 519–521.
- NIKAZAR, M.; AFSHARI, N. (2005). Eliminación de metales pesados Pb(II), Cd(II), Cr(VI) de disoluciones acuosas por adsorción con residuos sólidos agrícolas (paja y salvado de trigo). En: Afinidad LXII, 518, julio–agosto.
- NICHOL, B.E.; OLIVEIRA, A.D.M.; GLASS M.; SIDDIQI. (1993) The effects of aluminium on the influx of calcium, potassium, ammonium nitrate and phosphate in an aluminium sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* **101**: 1262–1266.
- NRIAGU, J.O. (1978). In *The Biogeochemistry of Lead*. Ed. Nriagu, J.O. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 18–88.
- OBROUCHEVA, NV.; BYSTROVA, EI.; IVANOV, VB.; ANUPOVA, OV.; SEREGIN, IV. (1998). Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant Soil.* **200**: 55-61.
- PAIVOKA, AEA. (2002). Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*. *Environm. Exp. Bot.* **48**: 61–73.
- PALEG, LG.; STEWART, GR.; BRADBEER, JW. (1984). Proline and glycine betaine influence on protein solvation. *Plant Physiol.* **75**: 974–978.
- PARKER, D.R.; ZELAZNY, L.W, KINRAIDE, T.B. (1987). Improvements to the program GEOCHEM. *Soil. Sci. Am. J.* **51**: 488-491.
-

- PARKER, D.R.; NORWELL, W.A.; CHANEY, R.L. (1995). Geochem-PC a chemical speciation program for IBM and compatible personal computers. In: Loeppert R.H., *et al.* ed. Chemical equilibrium and reactions models. Madison, WI: SSSA and ASA, 1995: 253 – 269.
- PARYS, E.; ROMANOWASKA, E.; SIEDLECKA, M.; POSKUTA, J. (1998). The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplast of *Pisum sativum*. *Acta Physiol. Plant.* **20**: 313–322.
- PIECHALAK, A.; TOMASZEWSKA, B.; BARALKIEWICZ, D. (2003). Enhancing phytoremediative ability of *Pisum sativum* by EDTA application. *Phytochemistry.* **64**: 1239-1251.
- POSCHENRIEDER, CH.; BARCELÓ, J. (1999). Water relations in heavy metal stressed plants. *En MNV Prasad, J Hagemeyer, eds, Heavy Metal Stress in Plants; from Molecules to Ecosystems.* Springer, Berlin, pp 207-229.
- POSCHENRIEDER, CH.; BARCELÓ, J. (2003). Estrés por metales pesados. *En M.J.Reigosa, N.Pedro y A. Sánchez-Moreiras, eds. La ecofisiología vegetal: Una Ciencia de Síntesis,* 413-442. Paraninfo S.A. Madrid, España.
- POSCHENRIEDER, CH.; DONCHEVA, S.; SONBOL, F.; AMENÒS, M.; RIGAU, J.; BARCELÓ, J. (2004). Microtubule organization but not α Tub1 and α Tub3 expressions are primary targets of aluminium toxicity in maize root tips. In: *Nutrição mineral. Causas e consequências da dependência da fertilização.* M.A. (Martins Lonção, C.Cruz edits). Facultad de ciencias. Universidad de Lisboa. pp. 5-9.
- PRASSAD, DDK.; PRASSAD, ARK. (1987). Altered δ -aminolaevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating of Barjra (*Pennisetum typhoideum*). *J.Plant Physiol.* **127**: 241–249.
- PRZYMUSINSKI, R.; RUCINSKA, R.; GWOZDZ, EA. (1995). The stress stimulated 16 Kda polypeptide from Lupin roots has properties of cytosolic Cu: Zn-superoxide dismutase. *Environ. Exp. Bot.* **35**: 485-495.
- QUERESHI, JA.; HARDWICK, K.; COLLIN, HA. (1986). Intracellular localization of lead in a lead tolerant and sensitive clone of *Anthoxanthu odoratum*. *J.Plant Physiol.* **122**: 357–364.
- RASHID, A.; BERNIER, M.; PAZDERNICK, L.; CARPENTIER, L. (1991). Interaction of Zn^{+2} with the donor side of Photosystem II. *Photosynth. Res.* **30**: 123–130.
- RASHID, A.; CAMM, EL.; EKRAMODDOULLAH, KM. (1994). Molecular mechanism of action of Pb and Zn^{+2} on water oxidizing complex of photosystem II. *FEBS Lett.* **350**: 296–298.
-

-
- RASHID, P.; MUKHERJI, S. (1991). Changes in catalase and ascorbic oxidase activities in response to lead nitrate treatments in mungbean. *Ind. J. Plant Physiol.* **34**: 143–146.
- RASKIN, I.; KUMAR, NPBA.; DUSHENKOV, S.; SALT, DE. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotech.* **5**: 285–290.
- RAVEN, JA.; EVANS, MCW.; KORB, RE. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* **60**: 111– 149.
- REBECHINI, HM.; HANZELY, L. (1974). Lead-induced ultrastructural changes in chloroplasts of the hydrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **73**: 377–386.
- REESE, RN.; ROBERTS, LW. (1985). Effects of cadmium on whole cell and mitochondrial respiration in tobacco cell suspension cultures (*Nicotiana tabacum* L. Var. Xanthi). *J. Plant Physiol.* **120**: 123–130.
- REEVES, RD.; BROOKS, RR. (1983). European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. *J. Geochem. Explor.* **18**: 275–283.
- RENGEL, Z.; ZHANG, W.H. (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist* **159**: 295-314.
- RENGEL, Z. (1992). Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* **121**: 491-513.
- RENGEL, Z. (1997). Mechanisms of plant resistance to toxicity of aluminium and heavy metals. *En AS Basra, RK Basra, eds, Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants. Harword Acad. Publ., Amsterdam, pp 241-276.*
- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. (1995). Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. *Austr. J. Plant. Physiol.* **22**: 531-536.
- ROMANOWSKA, E.; IGAMBERDIEV, AU.; PARYS, E.; GARDESTRÖM, P. (2002). Stimulation of respiration by Pb in detached leaves and mitochondrial of C₃ and C₄ plants. *Physiol. Plant.* **116**: 148–154.
- RUDAKOVA, EV.; KARAKIS, KD.; SIDORSHINA, ET. (1988) The role of plant cell walls in the uptake and accumulation of metal ions. *Fiziol. Biochim. KultRast.* **20**: 3–12.
- SALT, DE.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, PBAN.; DUSHENKOV, V.; ENSLEY, BD.; CHET, I.; RASKIN, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology.* **13**: 468–475.
-

- SAMARDAKIEWICZ, S.; WOZNY, A. (2000). The distribution of lead in duckweed (*Lemma minor* L.) root tip. *Plant Soil*. **226**: 107–111.
- SANCHEZ, M.; AGUIRREOLA, J. (1993). Relaciones hídricas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcón-Bieto, J. M. Talon., (eds). Interamericana-McGrawHill. pp.49–90.
- SENGAR, RS.; PANDEY, M. (1996). Inhibition of chlorophyll biosynthesis by lead in greening *Pisum sativum* leaf segments. *Biol. Plant*. **38**: 459–462.
- SEREGIN, IV.; IVANIOV, VB. (1997). Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. *Fiziol. Rast*. **44**: 915-921.
- SEREGIN, IV.; IVANIOV, VB. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol*. **48**: 606–630.
- SEREGIN, IV.; SHPIGUN, LK.; IVANIOV, VB. (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russ. J. Plant Physiol*. **51**: 525–533.
- SERSEN, F.; KRALOVA, K.; BUMBALOVA, A. (1998). Action of mercury on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts. *Photosynthetica*. **35**: 551–559.
- SHARMA, P.; DUBEY, R.S. (2004). Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci*. **167**: 541–550.
- SHARMA, P.; DUBEY, R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol*. **17**: 5-52.
- SHMAESFSKY, BRIAN R. Heavy Metal Tolerant Transgenic Plants. (2003). Nov. ISB News Reports. Department of Biology and Environmental Sciences. King Wood college, Kingwood.
- SCHOLANDER, P.F., HAMMEL., H.T., BRADSTREET, ED. (1964). Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **52**: 119-25.
- SCHOLANDER, P.F., HAMMEL., H.T., BRADSTREET, ED., HEMINGSSEN, E.A. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science* **148**: 339-46.
- SCHOLANDER, P.F., HAMMEL., H.T., BRADSTREET, ED., HEMMINGTON, E.A. (1966). Sap concentration in halophytes and other plants. *Plant Physiol*. **41**: 529-32.
- SILVERBERG, BA. (1975). Ultrastructural localization of lead in *Stigeoclonium tenue* (Chlorophyceae Ulotrichales) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis. *Phycologia*. **14**: 265–274.
-

-
- STEFANOV, K.; POPOVA, I.; KAMBUROVA, E.; PANCHEVA, T.; KIMENOV, G.; KULEVA, L.; POPOV, S. (1993). Lipid and sterol changes in *Zea mays* caused by lead ions. *Phytochemistry*. **33**: 47–51.
- STEFANOV, K.; SEIZOVA, K.; POPOVA, I.; PETKOV, VL.; KIMENOV, G.; POPOV, S. (1995). Effects of lead ions on the phospholipid composition in leaves of *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *J. Plant Physiol.* **147**: 243-246.
- SUBHASHINI, K.; REDDY, GM. (1990). Effect of salt stress on enzyme activities in callus cultures of tolerant and susceptible rice cultivars. *Ind. J. Exp. Biol.* **28**: 277–279.
- SUCHODOLLER, A. (1967). Untersuchungen ubre den Bleigehatt von Pflanzen in der Nane von Strassen und ubre die Aufnahme and Translocation von Blei durch Pflazen. *Berichteder Schweizerischen Botanischem Gesellschaft* **77**: 266-308.
- STEUDLE, E.; JESCHKE, WD. (1983) Water transport in barley roots. Measurements of root pressure and hydraulic conductivity of roots in parallel with turgor and hydraulic conductivity of root cells. *Plant* **158**: 237 – 248.
- TOMSIG, JL.; SUSZKIW, JB. (1991). Permeation of Pb through calcium channels: fura-2 measurements of voltage-and dihydropyridine-sensitive Pb entry in isolated bovine chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1069**: 197–200.
- TREWAVAS, A.; GILROY, S. (1991). Signal transduction in plant cells. *Trends in genetics* **7**: 356-361.
- TU SHU, I.; BROUILLETTE, JN. (1987). Metal ion inhibition of corn root plasmamembrane ATPase. *Phytochemistry*. **26**: 65–69.
- TUDELA, D.; TADEO, FR. (1993). Respuestas y adaptaciones de las plantas al estrés. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcón-Vieto J y Talón M (Eds), pp 537-553. Interamericana/McGraw-Hill. ISBN 84-486-0033-9.
- TUNG, G.; TEMPLE, PJ. (1996). Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings: a study by histochemical and electron microscopy. *Sci. Total Environ.* **188**: 71-85.
- VALLEE, BL.; ULMER, DD. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.* **41**: 91–128.
- VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Envir.* **13**: 195-206.
- VASSIL, AD.; KAPULNIK, Y.; RASKIN, I.; SALT, DE. (1998). The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiol.* **117**: 447–453.
- VERMA, S.; DUBEY, RS. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* **164**: 645-655.
-

- VODNIK, D.; JENTSCHKE, G.; FRITZ, E.; GOGALA, N.; GODBOLD, DL. (1999). Root-applied cytokinin reduces lead uptake and effects its distribution in Norway spruce seedlings. *Physiol. Plant.* **106**: 75–81.
- VOJTECHOVA, M.; LEBLOVA, S. (1991). Uptake of lead and cadmium by maize seedlings and the effect of heavy metal on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize. *Biol. Plant.* **33**: 386–394.
- WALKER, WM.; MILLER, JE.; HASSETT, JJ. (1977). Effect of lead and cadmium upon the calcium, magnesium, potassium and phosphorus concentration in young corn plants. *Soil Sci.* **124**: 145–151.
- WIERZBICKA, M. (1987). Lead accumulation and its translocation in roots of *Allium cepa* L. –autoradiographic and ultrastructural studies. *Plant Cell Environ.* **10**: 17–26.
- WIERZBICKA, M. (1994). Resumption of mitotic activity in *Allium cepa* root tips during treatment with lead salts. *Environ. Exp. Bot.* **34**: 173–180.
- WIERZBICKA, M. (1998). Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips-ultrastructural studies. *Plant Sci.* **133**: 105–119.
- WIERZBICKA, M.; ANTOSIEWICZ, D. (1993). How lead can easily enter the food chain—a study of plant roots. *Sci. Total Environ. Suppl.* **1**: 423–429.
- WIXSON, N.G.; DAVIES, B.E., (1994). *Environ. Sci. Technol.*, **28**: 26A-31A
- WOOLHOUSE; WALKER (1983). Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. *En OL Lange, PS Nobel, CB Osmond, H Ziegler, eds, Physiological Plant Ecology III. Responses to the Chemical and Biological Environment. Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Vol 12 C. Springer Verlag, Berlin, pp 245-300.*
- WOZNY, A.; ZATORSKA, B.; MLODZIANOWSKI, F. (1982). Influence of lead on the development of lupin seedlings and ultrastructural localization of this metal in the roots. *Acta Soc. Bot. Pol.* **51**: 345–351.
- YANG, Y-Y.; JUNG, J-Y.; SONG, W-Y.; SUH, HS.; LEE, Y. (2000). Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiol.* **124**: 1019–1026.
- YE, ZH.; BAKER, AJM.; WONG, MH.; WILLIS, AJ. (1997). Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation in populations of *Typha latifolia* L. *New Phytol.* **136**: 469–480.
- YO-YOUNG, KIM.; YOUNG-YELL, YANG.; YOUNG-SOOK, LEE. (2002). Pb and Cu uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum. Nov. V.116. p. 368.*
- ZENK, MH. (1996). Heavy metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 211–216.
-

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. (1998a). Continuous secretion of organic is related to aluminium resistance in relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiol. Plant.* **103**: 209-214.

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. (1998b). High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* **117**: 745-751.
