



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Estrés oxidativo y respuestas fisiológicas a la
acumulación de metales pesados en
Betula celtiberica
micorrizada y no micorrizada cultivada en un
suelo contaminado**



Ester María Murube Torcida
21 de Julio de 2014

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Estrés oxidativo y respuestas fisiológicas a la
acumulación de metales pesados en *Betula
celtiberica*
micorrizada y no micorrizada cultivada en un
suelo contaminado**

Ester María Murube Torcida

Firma

María Aida González Díaz

Ana Bertrand Baschwitz

Firma

Firma

RESUMEN Los metales pesados no son biodegradables lo que hace que sean contaminantes muy persistentes en el medio ambiente, lo que supone un grave riesgo no sólo para la salud medioambiental sino también para la salud humana. La fitorremediación se presenta como una alternativa biológica sencilla y viable en la descontaminación de suelos; sin embargo, está influenciada por la biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo así como por su toxicidad y por las actividades microbianas de la rizosfera. La simbiosis entre hongos micorrícicos y plantas acumuladoras de metales puede ser una estrategia prometedora en el desarrollo de nuevos programas de fitorremediación. En este trabajo hemos caracterizado, mediante medidas de crecimiento y parámetros fisiológicos y bioquímicos, la respuesta de *Betula celtiberica* micorrizada y no micorrizada con el fin de estudiar su comportamiento para ser aplicada en futuros programas de fitorremediación.

La micorrización de *B.celtiberica* con *Paxillus ammoniavirescens* favoreció la acumulación de metales pesados en las raíces y promovió su retención en las paredes celulares actuando como una primera barrera de defensa frente a la toxicidad de los metales. La contaminación del suelo provocó un descenso en el contenido de pigmentos y en el rendimiento fotosintéticos y un aumento en los niveles de H₂O₂ y MDA especialmente importante en el caso de las plantas micorrizadas. Este aumento de ROS desencadenó diferentes respuestas antioxidantes mostrando un aumento de la actividad catalasa en las plantas micorrizadas mientras que en las no micorrizadas detectamos una mayor actividad guaiacol peroxidasa. La glutatión reductasa también se vio inhibida por la contaminación del suelo.

ABSTRACT. Heavy metals are a non biodegradable contaminants which makes them very persistent in the environment and supposes not only a serious environmental risk but also for human health. Phytoremediation is a promising approach for remediation of heavy metal- contaminated soils. The bioavailability of heavy metals and its toxicity is determined by exchange processes between the soil and the plant and aswell by rhizospheric microorganisms. Symbiotic associations between mycorrhizal fungi and plants may be a promising strategy in new phytoremediation programs development.

In this work we have characterized mycorrhized and non mycorrhized *Betula celtiberica* response by measures of growth and physiologic and biochemical parameters in order to study their behavior in future phytoremediation strategies. The symbiosis between *Betula celtiberica* and *Paxillus ammoniavirescens* enhanced heavy metal accumulation in roots and promoted its retention in cell walls acting as a first line of defense against metal toxicity. Metal accumulation in plant tissue resulted in a decrease in photosynthetic pigments and an increase in H₂O₂ and MDA content especially in the case of mycorrhized plants. This ROS accumulation provoques different antioxidant response. Non-mycorrhizal plants show an increased CAT enzymatic activity while the non-mycorrhizal POD detect increased activity in response to the presence of heavy metals in the culture substrate. Glutathion reductase activity showed an decrease in their levels in contaminated soil.

Agradecimientos.

La realización de este trabajo no habría sido posible sin ayuda de muchas personas a las que me gustaría expresar mi más sincera gratitud:

En primer lugar mis tutoras Aida González y Ana Bertrand por enseñarme y guiarme por el mundo de la fitorremediación, además de por su paciencia y colaboración durante todo este año.

A mi compi Javier Alfaro con el que he compartido todo este viaje y por estar siempre ahí pase lo que pase y a Daniel Fernández por prestarme su ayuda cuando la necesité, sobre todo en mis problemas con los ANOVAS bifactoriales.

Al resto de mis compañeros: Alex, Sara, Fran y a todo el personal del Departamento de Fisiología Vegetal por hacer de las largas jornadas de trabajo un placer.

A todos, Gracias.

Abreviaturas

CAT (EC1.11.1.6): Catalasa

DTNB 5-5': Ácido ditiobis-2- nitrobenzoico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

GR (EC 16.4.2): Glutación reductasa

GSH: Glutación

GSSG: Glutación oxidado

ICP-MS: Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo

M: Micorrizada

MDA: Malondialdehído

MSM: medio Murashige y Skoog modificado

NM: no micorrizada

PF: Peso fresco

POD (EC 1.11.1.7): Guaiacol peroxidasa

PS: Peso seco

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

Rh: Rodio

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SC: Suelo control

SCTM: suelo contaminado

SOD (EC 1.15.1.1): Supeóxido dismutasa

TCA: Ácido tricloroacético

1. Introducción	1
1.1. Estrés oxidativo inducido por metales pesados.	2
1.2. Micorrización y tolerancia a metales pesados.	3
1.3 Planteamiento y objetivos.....	3
2. Material y métodos	5
2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Betula celtiberica</i>	5
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Paxillus amoniavirescens</i> y micorrización.....	5
2.3. Aclimatación de las plantas	6
2.4. Cultivo de <i>B. celtiberica</i> en suelo contaminado	6
2.5. Análisis de metales pesados	6
2.5.1. Análisis de metales pesados en plantas	6
2.5.2. Extracción secuencial simple (BCR) de los metales pesados en el suelo.....	7
2.6. Extracción de paredes celulares.....	8
2.7. Medida de la eficiencia fotosintética y contenido en pigmentos	8
2.8. Análisis del contenido en clorofilas	8
2.9. Medida del contenido en H ₂ O ₂ y peroxidación lipídica.	9
2.10. Cuantificación de actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo	9
2.11. Tratamiento estadístico.	10
3. Resultados y discusión	11
3.1. Análisis del contenido en metales pesados del suelo.....	11
3.2. Crecimiento de <i>Betula celtiberica</i>	11
3.3. Análisis del contenido en metales pesados de la planta	14
3.3.1. Análisis del contenido en metales pesados de la pared celular.....	15
3.4. Análisis de pigmentos y rendimiento fotosintético.....	16
3.6. Análisis del contenido en H ₂ O ₂ y peroxidación lipídica.	18
3.7. Actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo.	19
4. Conclusiones	22
5. Bibliografía.....	23

1. Introducción

Una de las grandes consecuencias de la Revolución Industrial es el deterioro medioambiental derivado de la liberación de contaminantes al medio ambiente. A diferencia de las sustancias orgánicas, los metales pesados son un grupo de contaminantes muy persistentes ya que no son biodegradables y por tanto se acumulan en suelos y aguas terrestres lo que supone no sólo un grave riesgo para la salud ambiental sino también para la salud humana. Además, por lo general estos elementos se acumulan en los tejidos de organismos vivos y sus concentraciones tienden a aumentar a medida que avanzamos hacia los niveles superiores en la cadena trófica, fenómeno que se conoce como biomagnificación (Ali et al., 2013).

Todo esto se ha hecho mucho más latente en los últimos años lo que ha puesto en alerta a la comunidad científica de manera que, una gran parte de los esfuerzos en investigación hoy en día están orientados a la descontaminación de suelos.

Los métodos convencionales de eliminación de contaminantes incluyen técnicas como la excavación y relleno de suelos, estabilización, lavado o incineración entre otras. Sin embargo, generalmente este tipo de técnicas físico-químicas llevan asociadas una serie de limitaciones muy importantes como son el alto coste y cambios irreversibles en las propiedades del suelo y flora nativa (Ali et al., 2013), por lo que se hace necesario la búsqueda de nuevas técnicas más rentables, seguras e inocuas para el medio ambiente.

En la actualidad, se están desarrollando técnicas biológicas, alternativas a las convencionales de ingeniería civil, para la eliminación de contaminantes del suelo. Entre ellas destaca la fitorremediación que se define en términos generales como el uso de plantas y microorganismos del suelo asociados con el fin de reducir la concentración o efectos tóxicos de los contaminantes en el medio ambiente (Greipsson, 2011). La fitorremediación se presenta como una buena alternativa al tratamiento de zonas contaminadas debido a que se trata de un método de bajo coste, es menos destructivo que cualquier otra técnica ya que permite preservar el estado natural de ecosistemas en mayor medida y además no tiene ningún impacto negativo en la fertilidad del terreno.

Dentro de la fitorremediación se engloban distintas estrategias de descontaminación como la fitoestabilización que tiene como objetivo reducir la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el medio ambiente (Wuana y Okieimen, 2011), la fitovolatilización que implica la conversión de los contaminantes a su forma volátil y posterior liberación a la atmósfera o la fitoextracción, que consiste en la absorción de los contaminantes por las raíces de las plantas y su translocación y acumulación en su parte aérea (Rafati et al., 2011).

Esta última es la estrategia más prometedora en la eliminación de metales pesados de suelos contaminados si bien es cierto que la eficiencia de la fitoextracción depende de muchos factores como la biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo, la especiación de los mismos o la adecuación de las especies vegetales empleadas.

El potencial de fitoextracción de una especie está determinado por dos factores principalmente, su biomasa aérea y la capacidad de concentración de contaminantes en la misma. En la actualidad se emplean dos enfoques para abordar la fitoextracción de metales pesados. El primero de ellos implica el uso de especies capaces de acumular una gran cantidad de metal en sus tejidos pero, en general, estas plantas presentan una biomasa pequeña mientras que el segundo enfoque contempla el uso de especies con una menor capacidad de acumulación de metal pero una mayor biomasa. Además idealmente se establece que las plantas adecuadas para ser empleadas en fitoextracción tienen que ser especies vegetales con altas tasas de crecimiento, sistemas radicales extensos, tolerancia a los efectos tóxicos de los contaminantes así como resistencia a plagas y patógenos y buena adaptación a las condiciones edafo-climáticas de la zona donde se va a llevar a cabo el programa de fitoextracción (Ali et al., 2013).

La biodisponibilidad de los metales pesados para las plantas así como su toxicidad está condicionada por la rizosfera de manera que intervienen no sólo procesos de intercambio entre el suelo y la planta sino también diversas actividades microbianas (Schützendübel y Polle, 2002).

En condiciones naturales, la mayoría de los sistemas radicales de los árboles en los bosques templados se encuentran micorrizados (Le Quéré et al., 2005; Fernandez et al., 2008). Las micorrizas son asociaciones mutualistas entre hongos del suelo y raíces de plantas leñosas (Le Quéré et al., 2005) en las cuales el hongo proporciona a la planta los nutrientes minerales requeridos y a su vez recibe carbohidratos fotoasimilados por parte de la planta (Smith y Read, 1997). Además se ha visto que estas estructuras aumentan en gran medida la capacidad de absorción de agua y nutrientes de la raíz y son vitales en la supervivencia y resistencia a patógenos tanto del árbol huésped como del hongo.

1.1. Estrés oxidativo inducido por metales pesados.

El cultivo en suelo contaminado es una situación de estrés para las plantas y una de las consecuencias más comunes de la mayoría de los estreses de tipo abiótico es un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Polle y Rennenberg, 1993) como consecuencia de la reducción secuencial del O_2 a H_2O . Las ROS son moléculas potencialmente tóxicas ya que provocan la oxidación inespecífica de proteínas y lípidos de membrana e incluso están relacionadas con daños a nivel de ADN. Como consecuencia de esto, se produce un aumento de proteínas carboniladas, malondialdehído (MDA) y un incremento en la producción en etileno (Schützendübel y Polle, 2002).

Con el fin de eliminar o reducir el exceso de ROS, las plantas poseen sistemas de detoxificación. Este sistema de defensa antioxidante incluye mecanismos no enzimáticos como síntesis de glutatión (GSH) o de ácido ascórbico y mecanismos enzimáticos como las actividades catalasa, (CAT, EC1.11.1.6), gualcol peroxidasa, (POD, EC 1.11.1.7), superóxido dismutasa, (SOD, EC 1.15.1.1), o glutatión reductasa (GR, EC 1.6.1.2) (Noctor y Foyer, 1998; Mittler et al., 2004; Halliwell, 2006; Moller et al., 2007 y Gil y Tuteja, 2010). La SOD, CAT y otras peroxidasas están involucradas en la detoxificación de peróxidos impidiendo la formación de radicales OH^\cdot mientras que la GR así como el glutatión (GSH) y el ascorbato son componentes esenciales en el ciclo del ascorbato-glutatión, implicados en la eliminación de H_2O_2 en diferentes compartimentos celulares (Sandalió et al., 2001).

Para llevar a cabo la repoblación y recuperación de suelos contaminados se requieren plantas tolerantes, entre otras cosas, al daño oxidativo que los metales provocan en los tejidos vegetales. La capacidad de las plantas para aumentar la respuesta antioxidante frente al estrés por metales parece ser dependiente de la especie, del tejido y del tipo y tiempo de exposición a los metales pesados (Schützendübel y Polle, 2002). Diversos ensayos biotecnológicos se han centrado en el estudio y mejora de la capacidad de tolerancia de las plantas con el fin de emplearlas en estrategias de descontaminación de suelos (Dankher et al., 2011).

1.2. Micorrización y tolerancia a metales pesados.

Por otro lado, El desarrollo de la micorrización entre plantas tolerantes y hongos resistentes y acumuladores de metales pesados puede ser una estrategia prometedora en el desarrollo de nuevos programas de fitorremediación.

Numerosos estudios se han centrado en investigar la posible reducción de la toxicidad de los metales pesados por la acción de hongos micorrícicos. Se ha sugerido que las ectomicorrizas reducen la absorción del metal por las raíces y esto permite a la planta huésped sobrevivir en suelos contaminados (Wilkins, 1991). Ensayos de inoculación con una cepa del hongo *Paxillus involtus*, aislado de un terreno contaminado, ha puesto de manifiesto que las plantas micorrizadas sufren una menor reducción en su biomasa como consecuencia de la exposición a Cd (Schützendübel y Polle, 2002). Sin embargo aún no está claro si esto es consecuencia de un mejor estado fisiológico de la planta o debido a que las hifas del hongo obstaculizan el acceso de los metales pesados a la superficie de la raíces de las plantas (Jentschke y Godbold, 2000).

1.3. Planteamiento y objetivos

La mayor parte de los estudios de fitorremediación y respuesta de las plantas a la presencia de metales pesados se han llevado a cabo en especies herbáceas. Sin embargo, el uso de especies leñosas, como *Betula celtiberica*, se muestra como una alternativa viable ya que presentan un buen sistema radical que les permite alcanzar o explorar mayor volumen de suelo y producir una gran cantidad de biomasa lo que supone que, potencialmente, pueden acumular una mayor cantidad de contaminantes y además ésta biomasa puede ser aprovechada por la industria maderera, papelera o en la producción de biocombustibles.

Además, la mayoría de los estudios, se centran en el efecto de un único metal, evaluando su acumulación en plantas modelo y cómo afecta a su fisiología pero uno de los mayores inconvenientes que nos encontramos a la hora de establecer un programa de fitorremediación es que en la naturaleza rara vez nos encontramos con un único compuesto como responsable de la contaminación de los sustratos, sino que existen múltiples elementos contaminantes y en diferentes concentraciones. Todo ello hace que la respuesta de las plantas en condiciones reales sea difícil de predecir a partir del comportamiento observado en el laboratorio y que los proyectos de fitorremediación no sean totalmente exitosos.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento de *Betula celtiberica* micorrizada y no micorrizada cultivada en un suelo contaminado con metales pesados,, con el fin de determinar su idoneidad para programas de fitorremediación. Para definir la adecuación de esta especie a los fines propuestos se caracterizará su respuesta mediante medidas de crecimiento, parámetros fisiológicos y bioquímicos. Para desarrollar este objetivo se abordaran los siguientes objetivos parciales:

- Análisis del contenido de metales pesados del suelo. En este apartado se cuantificará el contenido de metales del suelo y se realizará una extracción secuencial para determinar la concentración en la que los metales están disponibles para la planta.
- Análisis del contenido en metales pesados en la planta. Estudiaremos el contenido de metales pesados acumulados por la planta y también si estos quedan retenidos en la pared celular o por el contrario son incorporados al interior de la célula.
- Caracterización de las respuestas fisiológicas de *Betula celtiberica* micorrizada y no micorrizada y determinación de enzimas antioxidativos. Con este objetivo se evaluará cómo afecta la acumulación de metales pesados al crecimiento, fotosíntesis y contenido en pigmentos de la planta. También estudiaremos el papel de diversas actividades antioxidativas frente al estrés provocado por los metales pesados y si la micorrización mejora la tolerancia a este tipo de estrés.

2. Material y métodos

2.1. Cultivo *in vitro* de *Betula celtiberica*

Segmentos apicales de 2-3 cm de longitud del clon BC-K de *B. celtiberica* se transfirieron a un medio MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado (MSM) en el que los macronutrientes y el calcio fueron diluidos a la mitad y suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 6,5 g L⁻¹ de agar y pH 5,7. Como fuente de hierro se empleó sequestrene al 6% de Fe en forma de sal férrica. Las plantas se cultivaron durante 12 semanas en una cámara de crecimiento a 25 °C y con un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h oscuridad.

2.2. Cultivo *in vitro* de *Paxillus amoniavirescens* y micorrización

Inóculos de micelio fúngico de 1 cm de diámetro se cultivaron en medio MSM y se mantuvieron en oscuridad durante 20 días. Una vez crecido el hongo se procedió a la micorrización de las plantas de *B.celtiberica* como se especifica a continuación.

Tras seis semanas de cultivo *in vitro* se llevó a cabo la micorrización de las plantas de *B. celtiberica* con *P. ammoniavirescens*. Para ello se inocularon cada una de las 50 plantas con dos porciones de micelio del hongo y se mantuvieron en la cámara de cultivo a 25 °C con un fotoperiodo de 16h de luz / 8 oscuridad durante 6 semanas más. Otras 50 plantas no se micorrizaron y fueron empleadas como control.

2.3. Aclimatación de las plantas

Al cabo de 12 semanas se llevó a cabo la aclimatación de las plantas en túnel de niebla controlando la temperatura y reduciendo paulatinamente la humedad relativa hasta alcanzar el 65%. Tras 4 días en el túnel de niebla, se retiró el medio de cultivo y las plantas se pasaron a un sustrato de turba:perlita 1:1 con el fin de asegurar una mejor aclimatación al crecimiento de las plantas *ex vitro*. En estas condiciones se mantuvieron durante 3 semanas más hasta su posterior traslado a tierra contaminada.

2.4. Cultivo de *B. celtiberica* en suelo contaminado

A continuación, las plantas se trasladaron al invernadero con temperatura semicontrolada (10-25°C) y se cultivaron en macetas con tierra contaminada con metales pesados procedente de una antigua mina de mercurio, La Peña-El Terronal, localizada en el concejo Mieres (Principado de Asturias). Otras plantas se cultivaron en una mezcla de turba-perlita en la proporción 1:1 (v/v) y fueron utilizadas como control.

Al cabo de 3 meses de cultivo en tierra contaminada, las plantas se lavaron con abundante agua del grifo seguido de tres lavados con agua destilada de 5 min cada uno. Posteriormente se midió la longitud de la parte aérea y de la raíz y el número de hojas y se obtuvo el peso fresco y seco. Para obtener el peso seco (PS), como medida de la biomasa total de las plantas, las plantas, al final de cada tratamiento se secaron a 35 °C durante 72 horas.

Con el fin de reducir al mínimo la variabilidad que existe en el desarrollo de las plantas, los resultados se expresan según los siguientes índices:

- Índice peso fresco (PF): $(PF_{\text{final}} - PF_{\text{inicial}}) / (PF_{\text{inicial}})$
- Índice caulinar: $(\text{Longitud}_{\text{tallo final}} - \text{Longitud}_{\text{tallo inicial}}) / (\text{Longitud}_{\text{tallo inicial}})$
- Índice radical: $(\text{Longitud}_{\text{raíz final}} - \text{Longitud}_{\text{raíz inicial}}) / (\text{Longitud}_{\text{raíz inicial}})$
- Índice foliar: $(N^{\circ} \text{Hojas}_{\text{final}} - N^{\circ} \text{Hojas}_{\text{inicial}}) / (N^{\circ} \text{Hojas}_{\text{inicial}})$
- El contenido en agua (%) se calculó teniendo en cuenta la siguiente relación.

$$\text{Contenido}_{\text{H}_2\text{O}} (\%) = [(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}] \times 100$$

2.5. Análisis de metales pesados

2.5.1. Análisis de metales pesados en plantas

Con el fin de conocer la capacidad de extracción de metales por las plantas es necesario saber el contenido inicial en el suelo y la acumulación de los mismos en la planta.

Para ello, se tomaron 300 mg de las muestras vegetales (hojas y raíces) y se secaron a 35°C durante 72 h. Posteriormente, se sometieron a una digestión ácida con una mezcla de HNO₃ concentrado: H₂O₂: HF en la proporción 3: 1: 1 y se atacaron en horno microondas hasta conseguir el licuado total de la muestra (Montaser, 1998). Finalmente se llevó a cabo el análisis del contenido en metales por ICP-MS tipo cuadrupolo (HP-7500 cc) empleando rodio (Rh) como patrón interno.

2.5.2. Extracción secuencial simple (BCR) de los metales pesados en el suelo

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis del contenido total de metales pesados en el suelo en estudio. Las muestras se pesaron y tamizaron a 2 mm y posteriormente una muestra de 100 mg de suelo seco se procesó de igual manera que las muestras vegetales para posteriormente ser analizados por ICP-MS. A continuación, para conocer cuántos de estos metales presentes en el suelo están disponibles para la planta se realizó una extracción secuencial por el método BCR (*Community Bureau of Reference*) (Davidson et al., 1999). Este método nos permite caracterizar las fracciones intercambiable, reducible, oxidable y residual. De estas fracciones en las dos primeras es donde se localizan los elementos disponibles para la planta.

Este método consta de 3 pasos secuenciales:

- Paso A

Partimos de 1g de suelo al que se le añaden 40 ml de una solución de ácido acético glacial (C₂H₄O₂) 0,11 M. Se mantiene en agitación 16 h a 30 rpm y una temperatura de 22°C. Posteriormente se centrifuga a 3000 g durante 20 minutos y finalmente, se recoge el

sobrenadante y se almacena a 4°C para su posterior análisis. Este sobrenadante corresponde a la fracción intercambiable.

A continuación, se lava el residuo precipitado con 20 ml de agua destilada, se agita durante 15 minutos y se centrifuga de nuevo a 3000 g durante 20 minutos y finalmente se deja decantar para eliminar el sobrenadante sin perder nada del precipitado.

- Paso B

Al residuo resultante del paso anterior se le añaden 40 ml de clorhidrato de hidroxilamina NH_2OH 0,5 M, recién preparado. Como en el paso anterior, se mantiene en agitación durante 16 h a 22°C y se separa nuevamente por centrifugación a 3000 g. Este sobrenadante se corresponde con la fracción reducible. A continuación, se lava el residuo como en el paso A.

- Paso C

Al residuo procedente del paso B se le añaden 10 ml de H_2O_2 8,8 M en pequeñas alícuotas y se mantiene a temperatura ambiente durante 1h con agitación manual ocasional. Tras esto, se continúa la digestión en un baño caliente a 85°C agitando ocasionalmente durante los primeros 30 min y se deja reducir el volumen a menos de 3 ml calentando el tubo destapado.

Posteriormente se añade otra alícuota de 10 ml de la misma solución de H_2O_2 8,8 M y se repite el proceso calentando el tubo cubierto a 85°C durante 1 h con agitación manual ocasional durante los primeros 30 min. Transcurrido el tiempo se destapa el tubo y se deja reducir el volumen hasta 1 ml evitando que el residuo se seque completamente.

Por último, se añaden 50 ml de acetato de amonio 1 M al residuo frío y se agita durante 16 horas a 22°C. Finalmente, se separa el sobrenadante por centrifugación como en el paso A. El sobrenadante es la fracción oxidable y el residuo obtenido tras la centrifugación, la fracción residual.

Una vez obtenidas las fracciones del suelo, se diluyeron en la proporción 1:10 con HNO_3 al 1%, y se midieron en el ICP-MS utilizando Rh como patrón interno. La fracción residual, al tratarse de un sólido, se procesó de igual manera que el suelo en el que habíamos analizado el contenido total en metales.

2.6. Extracción de paredes celulares

Con el fin de determinar si los metales acumulados en la planta quedan retenidos en la pared celular o bien son transportados a la vacuola se llevó a cabo la extracción de paredes celulares según el procedimiento descrito por Fernández et al. 2014. Para ello se partió de 100 mg de raíces previamente secadas a 35°C durante 72 h. A continuación, se trituró y homogeneizó con 10 ml de etanol al 80% y se sometieron a tres ciclos de ultrasonidos de 5 minutos cada uno (Zornoza et al 2002). Tras esto, se incubó a 30 °C durante una hora en agitación constante a 100 rpm. Después se centrifugó a 14.000 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante (fracción soluble) que se almacenó para el posterior análisis por ICP-MS.

El pellet resultante, fracción que contiene las paredes celulares, se sometió a tres lavados con 5 ml de etanol al 80 %, un lavado con 5 ml de una solución de cloroformo: metanol 2:1 (v/v) y finalmente 3 lavados más con 5 ml de acetona. Tras cada uno de los lavados se centrifuga a 14.000 g durante 5 min y se descarta el sobrenadante. El pellet final se secó completamente a 35°C durante 72 h y se almacenó para su posterior análisis de metales pesados por ICP-MS.

2.7. Medida de la eficiencia fotosintética y contenido en pigmentos

Al final del período de cultivo (90 días) se midió la eficiencia fotosintética y el contenido en clorofilas tanto en las plantas, micorrizadas y no micorrizadas, crecidas en tierra control como en las crecidas en tierra contaminada.

La eficiencia fotosintética se midió utilizando un fluorímetro portátil modelo OS1-FL (Opti-Sciences) en la segunda hoja expandida, adaptada previamente a la oscuridad durante 20 min (fluorescencia inicial, F_0). Tras esto, se aplicó un pulso de luz hasta la saturación obteniendo así el valor de la fluorescencia máxima (F_m). F_v se define como la fluorescencia variable y se corresponde con la diferencia entre la fluorescencia inicial (F_0) y la máxima fluorescencia obtenida tras el periodo de adaptación a la oscuridad (F_m).

2.8. Análisis del contenido en clorofilas

Para la extracción y cuantificación de clorofilas se recogieron 100 mg de hojas frescas tras 3 meses de cultivo en suelo contaminado y control y se trituraron en N_2 líquido. Posteriormente se añadieron 2 mL de acetona al 80 % y tras centrifugarlo se recogió el sobrenadante (Fernández et al., 2013). Finalmente, se midió la absorbancia a 663, 645 y 470 nm para cuantificar el contenido en clorofila a, clorofila b y carotenoides respectivamente de acuerdo con las fórmulas descritas en Porra (2002) y Lichtenthaler y Wellburn (1983).

2.9. Medida del contenido en H_2O_2 y peroxidación lipídica

El contenido de H_2O_2 en las hojas se midió según el método descrito por Singh et al., (2006) con pequeñas modificaciones. En primer lugar, se homogeneizaron 300 mg de hojas frescas con 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1 %. Tras centrifugar a 10000 g durante 15 minutos se recogió el sobrenadante.

Para cuantificar el contenido en H_2O_2 , se añadió a una alícuota de 0,5 ml del sobrenadante 0,5 ml de tampón fosfato (pH 7,6) 100 mM y 1 mL de KI. Se midió la absorbancia a 390 nm.

El contenido en H_2O_2 se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$[H_2O_2] (\mu g/g \text{ PF}) = (Abs_{390} * V_{SN}) / (mg \text{ muestra} / V_{TCA})$$

donde V_{SN} es el volumen de sobrenadante añadido al pocillo de la placa y V_{TCA} se corresponde con el volumen de TCA empleado en la extracción.

La peroxidación lipídica se evaluó midiendo la formación de malondialdehído (MDA) (Demiral y Turkan, 2005). Para ello se añadió a una alícuota de 1 ml de sobrenadante, 4 ml de TCA al 20 % con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5 %. La mezcla se incubó a 95 °C durante 30 minutos. Transcurrido el periodo de incubación, las muestras se enfriaron rápidamente en hielo y se centrifugaron a 10000 g durante 15 min. Finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 y 600 nm.

La concentración en MDA se calculó en base a la siguiente fórmula.

$$[\text{MDA}] = (\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) / \epsilon$$

$$\epsilon \text{ (coeficiente de absortividad molar del MDA)} = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

2.10 Cuantificación de actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo

Todos los análisis se llevaron a cabo a 4°C. En primer lugar se obtuvieron los extractos crudos a partir de 125 mg de hojas frescas de las plantas micorrizadas y no micorrizadas crecidas en suelo control y contaminado. La extracción se llevó a cabo en 2 ml tampón Tris-HCL 100 mM (pH 7,8) que contiene ditioneitol (DTT) 3 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y 2% (p/p) de polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP). Una vez homogeneizado el material vegetal con el tampón de extracción, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos a 4 °C (Martins et al., 2010).

La actividad guaiacol peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) se determinó en base al procedimiento descrito por Martins et al., (2010). Para ello se empleó una reacción mixta con 200 µl 2-metoxifenol (guaicol) 30 mM y H₂O₂ 4 mM en tampón acetato de sodio 0,2 M (pH 6,0). La actividad enzimática en este caso, se define como el consumo de 1 µmol de guaicol min⁻¹ cm⁻³ a temperatura ambiente usando 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de absorbancia para el tetraguaiacol.

Para determinar la actividad actividad catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se midió el descenso de absorbancia medido a 240 nm durante 2 min del extracto crudo con una mezcla de reacción que contenía una solución de H₂O₂ 10 mM en tampón fosfato 50 mM (pH 7,0). En este caso la actividad enzimática se define como el consumo de 1 µmol H₂O₂ min⁻¹ cm⁻³. Considerando como coeficiente de extinción molar 39,4 mM⁻¹.

La actividad superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) se determinó midiendo el incremento de absorbancia a 550 nm en 100 µl de una solución que contiene xantina 0,5 mM, citocromoférrico-c 0,05 mM, EDTA 0,1 mM y xantina oxidasa 100 mM, en tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7, 6) (Martins et al., 2010). La actividad enzimática se determinará como la cantidad de enzima necesaria para inhibir la reducción del citocromoférrico-c al 50 % min⁻¹.

Por último para llevar a cabo el análisis de la actividad glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) se empleó el método descrito en Shanker et al., (2004) con pequeñas modificaciones. Para ello se midió el incremento de la absorbancia a 412 nm empleando una reacción mixta con 50 µl de una solución 3mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) en tampón fosfato, 10 µl de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)

2mM en tampón fosfato y 10 μ l de glutatión oxidado (GSSG) 20mM en tampón fosfato (pH= 7.6). La actividad enzimática se definió como el consumo de 1 μ mol de DTNB $\text{min}^{-1} \text{cm}^{-3}$ usando un coeficiente de absorbanza 6,2 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Todas las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro UV/Vis modelo Spectra MR.

2.11. Tratamiento estadístico

El trabajo se llevó a cabo como ensayos independientes en los que se tomaron muestras vegetales de las plantas incluidas dentro de cada tratamiento (sustrato control y contaminado, micorrizadas y no micorrizadas) en las que medimos los diferentes parámetros analizados. Para estudiar las diferencias entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas crecidas en el suelo control y contaminado, se realizó un análisis de varianza y un test ANOVA bifactorial considerando como factores la presencia o ausencia de metal en el suelo y la micorrización o no de las plantas y como variable dependiente los diferentes parámetros analizados, siendo el nivel de significación 0,05 en todos los casos. Los análisis se llevaron a cabo con el paquete informático SPSS18® (IBM®).

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis del contenido en metales pesados del suelo

El suelo empleado en este estudio mostró un alto contenido en As, Hg y Pb (Tabla 1). Son especialmente importantes las concentraciones de As y Hg que sobrepasan ampliamente los valores permitidos para un suelo agrícola o industrial estando fijado el nivel de intervención en 76 mg kg⁻¹ para el As y en 30 mg Kg⁻¹ para el Hg (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Además, recientemente se ha publicado en el Principado de Asturias, la legislación regional en la que los límites máximos permitidos de As y Hg en un suelo industrial no deben superar los 200 mg Kg⁻¹ para el As y los 100 mg kg⁻¹ para el Hg (BOPA, 21 de Abril 2014).

Tabla 1 Contenido total de metales pesados (mg Kg⁻¹ PS) en el suelo y en las distintas fracciones del análisis secuencial. A, fracción intercambiable; B, reducible; C, oxidable y D, residual, A+B, metales disponibles para la planta

Contenido de metales pesados (mg Kg ⁻¹ PS)							
Metal	Total	Fracciones					% Recuperación
		A	B	C	D	A+B	
Ni	31,86	3,09 ± 0,12	12,73 ± 0,33	1,159 ± 0,82	19,25 ± 3,68	15,82	113,75
Cd	-	0,03 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,025 ± 0,00	-	0,21	-
Hg	382,71	-	0,18 ± 0,03	135,30 ± 32,80	487,17 ± 85,93	0,18	162,70
Pb	101,84	0,01 ± 0,00	34,27 ± 0,88	-	44,71 ± 2,27	34,28	77,43
As	5801,70	330,63 ± 41,87	2934,24 ± 36,37	299,25 ± 20,20	2692,86 ± 6,97	3264,88	107,85

3.2. Crecimiento de *Betula celtiberica*

Tras 3 meses de cultivo observamos que no había diferencias en la longitud del tallo y el número de hojas entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas cultivadas en el sustrato control ni tampoco entre las crecidas en suelo contaminado (Fig. 1). Sin embargo sí había una reducción del crecimiento de las plantas no micorrizadas cuando se compara entre el suelo contaminado y control y lo mismo sucede con las micorrizadas (Fig. 1). Esta reducción oscila entre el 21 y el 31 % en el caso de la longitud del tallo de las no micorrizadas y micorrizadas respectivamente mientras que si analizamos el número de hojas observamos que se vió reducido entre un 63 y 77% respecto al control (Fig. 1).

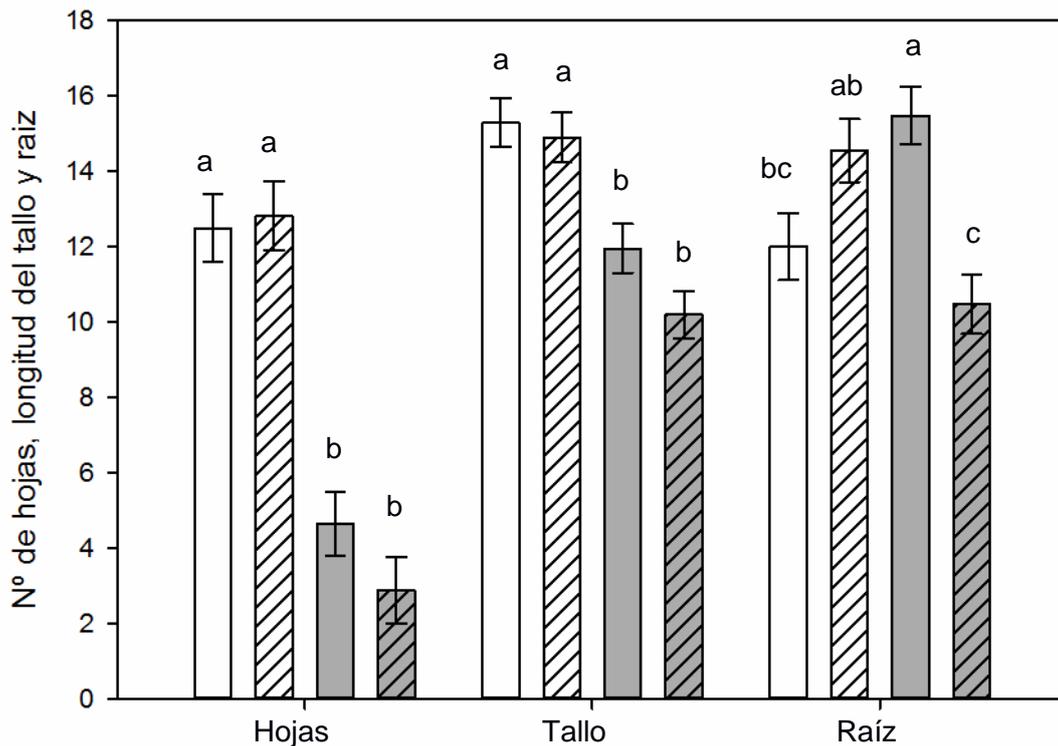


Figura 1. Número de hojas y longitud del tallo y de la raíz de plantas de *B. celtiberica* micorrizadas (M) y no micorrizadas (NM) cultivadas durante 3 meses en suelo control y contaminado. Barras marcadas con distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los índices analizados ($p < 0,05$). NM Suelo control M Suelo control, NM Suelo contaminado, M Suelo contaminado

La reducción del crecimiento es uno de los efectos directos de la toxicidad de los metales pesados sobre el desarrollo de la planta ya que estos pueden alterar diversos procesos del crecimiento vegetal (Milone et al., 2003). Resultados similares también fueron observados por Gultz (2002) en presencia de concentraciones superiores a 5 mg As kg^{-1} y por Fernández et al., (2012) trabajando con Pb.

En las plantas de *B.celtiberica* micorrizadas se observa una clara disminución en la longitud del sistema radical como consecuencia del cultivo en tierra contaminada, mientras que en el sustrato control no se aprecian estas diferencias (Fig 1.). La reducción de la raíz es lógica si tenemos en cuenta que es el primer órgano en contacto con los metales del medio de cultivo y que el crecimiento de la raíz primaria es uno de los marcadores de sensibilidad a la toxicidad de varios metales pesados (Khosravi et al., 2005).

Algunos autores (Keller et al., 2003) han estudiado la relación entre el patrón de desarrollo del sistema radical y la eficiencia en la fitoextracción de metales pesados del suelo. Así se vio que *Thlaspi caerulescens* tenía un sistema de raíces poco profundas y por lo tanto era una planta más adecuada para el tratamiento de la contaminación superficial mientras que *Salix viminalis* y *Zea mays* tenían un sistema radical más eficiente en la colonización de la tierra en profundidad y por lo tanto eran especies potencialmente más adecuadas para el tratamiento de la contaminación en profundidad.

Teniendo en cuenta esta diferente distribución de las raíces a lo largo del perfil del suelo y en base a nuestros resultados parece que la micorrización de *B. celtiberica* permitiría el desarrollo superficial del sistema radical siendo por tanto más apta para la descontaminación de las primeras capas edáficas mientras que las plantas de *B. celtiberica* no micorrizadas desarrollan un sistema radical más profundo favoreciendo por tanto su aplicación en programas de fitoextracción a mayor profundidad.

En cuanto al peso fresco, observamos que las plantas micorrizadas y no micorrizadas, no mostraban diferencias entre ellas cuando crecían en el sustrato control ni tampoco cuando crecían en el suelo contaminado (Tabla 2). Sin embargo, sí había una gran reducción cuando comparamos las plantas micorrizadas del suelo contaminado con el control y lo mismo sucede en el caso de las no micorrizadas (Tabla 2). Esta reducción llegó a alcanzar el 75% en las no micorrizadas mientras que en las micorrizadas fue mayor (90%).

Tabla 2. Peso fresco y seco de la planta y porcentaje de contenido en agua en hojas y raíces de *B.celtiberica* micorrizadas (M) y no micorrizadas (NM) cultivadas durante 3 meses en suelo control y contaminado. Valores marcados con distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Suelo	Tratamiento	Índice PF	PS (g).	Contenido en H ₂ O	
				Hojas	Raíces
Control	NM	2,47± 0,19 a	7,00 ± 2,75 a	75,61 ± 0,83 a	82,31 ± 0,91 a
	M	2,58 ± 0,19 a	7,08 ± 0,48 a	74,49 ± 0,83 ab	83,52 ± 0,91 a
Contaminado	NM	0,61 ± 0,18 b	4,08 ± 0,811b	72,15 ± 0,83 b	74,79 ± 1,25 b
	M	0,23 ± 0,21 b	3,00 ± 0,29 b	67,96 ± 1,018 c	76,38 ± 1,11 b

Aunque se ha relacionado una menor reducción en el peso fresco de las plantas micorrizadas con una mayor tolerancia a los metales (Langer et al., 2012), esto no se observa en nuestro caso ya que no hemos detectado diferencias entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas, de manera que no podemos afirmar que la micorrización con *P. ammoniavirescens* aumente la tolerancia de *B. celtiberica* a los metales pesados.

En cuanto a su contenido en agua observamos que se reduce cuando las plantas crecen en suelo contaminado (Tabla 2), sobretudo en el caso de las hojas procedentes de plantas micorrizadas lo cual podría ser una consecuencia negativa de la toxicidad de los metales sobre los tejidos vegetales ya que se ha visto que estos afectan a la permeabilidad de la membrana plasmática causando una reducción en el contenido en agua (Benavides et al., 2005).

Desde el punto de vista de la fitorremediación es interesante el peso seco de la planta. Este parámetro es un reflejo de la biomasa de la planta y cuanto mayor sea ésta, más alto será su potencial en fitorremediación puesto que implicaría una mayor captación de metales. El peso seco de *B. celtibérica* micorrizada y no micorrizada cultivada en suelo contaminado fue menor que aquella crecida en el sustrato control (Tabla 2).

3.3. Análisis del contenido en metales pesados de la planta

El análisis del contenido en metales pesados nos permitió concluir que los metales se acumulan principalmente en la raíz y que la concentración siempre fue mayor en las raíces que en las hojas tanto de las plantas micorrizadas como no micorrizadas (Tablas 3 y 4). Los metales que se acumularon en mayor medida fueron As, Pb, Hg siendo el As el que detectamos en mayor concentración.

Tabla 3. Acumulación de metales pesados ($\text{mg Kg}^{-1}\text{PS}$) en hojas de plantas de *B. celtiberica* micorrizadas (M) y no micorrizadas (NM) cultivadas durante 3 meses en suelo control y contaminado. Valores marcados con distintas letras indican diferencias significativas en la acumulación de cada metal en los distintos tratamientos ($p < 0,05$).

Concentración de metales pesados ($\text{mg Kg}^{-1}\text{ PS}$)				
Metal	NM		M	
	Control	Contaminado	Control	Contaminado
Ni	0,52 \pm 0,03 c	1,45 \pm 0,03 a	0,467 \pm 0,0382 c	1,06 \pm 0,04 b
Cd	0,19 \pm 0,01 a	0,14 \pm 0,01b	0,143 \pm 0,012 b	0,03 \pm 0,01 c
Hg	0,14 \pm 0,03 b	0,24 \pm 0,03 b	0,127 \pm 0,032 b	0,71 \pm 0,03 a
Pb	0,28 \pm 0,06 b	2,15 \pm 0,06 b	0,426 \pm 0,0682 b	1,34 \pm 0,083 a
As	0,09 \pm 0,64 b	14,67 \pm 0,64 a	0,88 \pm 0,64 b	15,20 \pm 0,79 a

Hay que destacar que encontramos algunas diferencias en la acumulación de los diferentes elementos en las hojas y las raíces de las plantas micorrizadas y no micorrizadas (Tablas 3 y 4). Un ejemplo sería el Hg que se acumula hasta tres veces más en las hojas de plantas micorrizadas mientras que en las raíces los valores medidos son similares en ambos casos. En el caso del Pb, la concentración es más alta en las hojas de las plantas no micorrizadas mientras que en la raíz la acumulación es mayor en las plantas micorrizadas. El As se acumuló de forma similar en los 2 tratamientos tanto en hojas como en raíces (Tablas 3 y 4) y esta acumulación superó ampliamente los niveles considerados tóxicos para las plantas ($1- 20 \text{ mg As Kg}^{-1}$) (White y Brown, 2010) sin que mostrasen aparentes síntomas de toxicidad. Las concentraciones de Hg detectadas en la raíz, también triplicaron los niveles de toxicidad para las plantas ($2-5 \text{ mg Kg}^{-1}$) (White y Brown, 2010).

Tabla 4. Acumulación de metales pesados ($\text{mg Kg}^{-1}\text{PS}$) en raíces de plantas de *B. celtiberica* micorrizadas (M) y no micorrizadas (NM) cultivadas durante 3 meses en suelo control y contaminado. Valores marcados con distintas letras indican diferencias significativas en la acumulación de cada metal en los distintos tratamientos ($p < 0,05$).

Metal	Concentración de metales pesados ($\text{mg Kg}^{-1}\text{PS}$)			
	NM		M	
	Control	Contaminado	Control	Contaminado
Ni	0,63 \pm 0,02 c	4,44 \pm 0,21 b	0,461 \pm 0,0286 d	5,85 \pm 0,26 a
Cd	0,37 \pm 0,02 a	0,234 \pm 0,018 b	0,333 \pm 0,0171 a	0,21 \pm 0,012 b
Hg	0,64 \pm 0,01 b	14,36 \pm 1,37 a	0,136 \pm 0,0107 c	17,66 \pm 1.85 a
Pb	2,16 \pm 0,09 c	4,45 \pm 0,33 b	1,38 \pm 0,07 c	6,53 \pm 0,31 a
As	4,71 \pm 0,76 b	419,79 \pm 18,47 a	1,31 \pm 0,08 c	455,82 \pm 17,61 a

Diversos autores (Godbold et al., 1998; Hall, 2002; Sell et al., 2005) han estudiado el efecto de la micorrización sobre la tolerancia a los metales pesados. Así se ha observado que la micorrización de *Picea abies* y *Populus canadensis* con ciertas cepas de *Paxillus involtus* aumentaba la tolerancia al Pb y al Cd. En nuestro caso, no podemos afirmar que la micorrización mejore la tolerancia a los metales pesados ya que no hubo diferencias ni en el crecimiento del tallo ni en el número de hojas entre las micorrizadas y no micorrizadas y la longitud de la raíz fue menor en las micorrizadas. Sin embargo, en el caso del Hg, sí podemos afirmar que la micorrización aumentó el factor de traslocación de este metal desde la raíz a las hojas ya que la acumulación en las hojas micorrizadas fue mayor que en las no micorrizadas y que el Pb alcanzó una concentración más alta en las raíces micorrizadas, lo cual podría indicar que las hifas del hongo contribuyeron a una mejor captación del metal del suelo. Algunos autores (Galli et al., 1994; Turnau, 1998; Gadd, 2007; Langer et al., 2012) justifican la menor o igual acumulación de metales en las plantas micorrizadas afirmando que las hifas son capaces de absorber metales que en muchos casos no pasan a la planta sino que quedan retenidos en los diferentes componentes de la pared celular del hongo actuando como una barrera para evitar la toxicidad a la planta y de ahí que estas plantas micorrizadas puedan tolerar mejor estos terrenos contaminados.

3.3.1. Análisis del contenido en metales pesados de la pared celular

Una vez extraídas las paredes de las células de la raíz y analizado el contenido de metales pesados observamos que la mayor parte de ellos, estaban localizados en la pared celular tanto en *B. celtiberica* micorrizada como no micorrizada (Tabla 5). Además también observamos que las plantas micorrizadas acumularon más metales en las paredes de las células de la raíz. Mientras que las concentraciones de metales detectadas en la fracción soluble fue prácticamente despreciable a excepción del As que alcanzó valores de 24,3 y 18,26 $\text{mg Kg}^{-1}\text{PS}$ mostrando diferencias entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas. (Tablas 5).

Estos resultados claramente indican que en esta estructura tiene lugar una gran acumulación de metales como también fue observado por otros autores (Ramos et al., 2002; Zornoza et al., 2002; Vázquez et al., 2006; Fernández et al., 2014) trabajando con distintas especies y diferentes metales. Todos ello indica que la pared celular puede representar la primera barrera para evitar la toxicidad del metal. Las células vegetales pueden incluso incrementar la capacidad de acumulación en sus paredes celulares para acumular más cationes en el apoplasto y por tanto proteger al protoplasto (Krzeslowska, 2010; Barceló et al., 2005) afirman que en las zonas apicales jóvenes, donde la banda de Caspary aún no está completamente desarrollada, los metales pasarían vía apoplasto hasta la zona vascular. Por tanto, esta retención en la pared celular puede ser considerada como una estrategia de detoxificación muy eficiente.

3.4 Análisis de pigmentos y rendimiento fotosintético

El contenido en pigmentos fotosintéticos, se vio reducido en las plantas cultivadas en suelo contaminado (Tabla 6). La clorofila a se redujo a la mitad mientras que la reducción de la clorofila b fue mayor llegando a alcanzar el 70% en el caso de las plantas micorrizadas (Tabla 6). En el caso de los carotenoides también se observó una reducción ligeramente mayor en las hojas de plantas micorrizadas.

Tabla 6. Contenido en pigmentos ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y eficiencia fotosintética en hojas de *B. celtiberica* micorrizada (M) y no micorrizada (NM) cultivadas durante 3 meses en suelo control y contaminado. Valores marcados con distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Suelo	Tratamiento	Concentración de pigmentos fotosintéticos ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)				
		Clorofila a	Clorofila b	Clorofilas totales	Carotenoides	Fv/Fm
Control	NM	305,67 \pm 25,47 a	209,83 \pm 8,46 a	409,16 \pm 16,57 a	114,66 \pm 8,33a	0,77 \pm 0,01 a
	M	236,27 \pm 9,13 b	147,34 \pm 3,69 b	299,49 \pm 3,88 b	88,62 \pm 2,79 b	0,78 \pm 0,01 a
Contaminado	NM	151,41 \pm 11,23 c	64,73 \pm 2,93 c	197,40 \pm 13,04 c	61,72 \pm 3,82 c	0,75 \pm 0,01 ab
	M	88,77 \pm 3,37 d	44,08 \pm 1,15 d	120,97 \pm 3,37 d	38,19 \pm 1,39 d	0,74 \pm 0,01 b

Esta disminución de pigmentos fotosintéticos ya ha sido descrita también en plantas de maíz (Ekmeççi et al., 2008) y en otras muchas especies (Sharma et al., 2010; Gill et al., 2012; Fernández et al., 2013) como consecuencia de la exposición a metales pesados. La clorosis es uno de los primeros síntomas de fitotoxicidad a los metales pesados que muestran las plantas y además se ha visto que esta reducción es mayor en el caso de las hojas en desarrollo que en las hojas completamente desarrolladas (Martins et al., 2010).

Tabla 5. Acumulación de metales pesados (mg Kg⁻¹PS) en las paredes celulares y fracción soluble de plantas de *B. celtiberica* micorrizadas (M) y no micorrizadas (NM) cultivadas durante 3 meses en suelo control y contaminado. Valores marcados con distintas letras para el mismo metal y la misma fracción indican diferencias significativas en la acumulación de cada metal en las paredes y en la fracción soluble en los distintos tratamientos (p < 0,05).

Concentración de metales pesados (mg Kg ⁻¹ PS)								
Metal	NM				M			
	Control		Contaminado		Control		Contaminado	
	Paredes celulares	Fracción soluble						
Ni	0,46 ± 0,04 d	0,00 ± 0,02 c	4,07 ± 0,29 c	0,00 ± 0,00 c	-	0,06 ± 0,00 a	5,86 ± 0,03b	0,04 ± 0,00 b
Cd	0,40 ± 0,04 a	0,00 ± 0,00 a	0,29 ± 0,04 b	0,00 ± 0,00 a	0,36 ± 0,03 a	0,00 ± 0,00 a	0,27 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 a
Hg	0,87 ± 0,02 c	0,02 ± 0,00 b	15,15 ± 1,29 b	0,02 ± 0,00 b	0,64 ± 0,08 c	0,03 ± 0,00 a	19,17 ± 0,10 a	0,02 ± 0,00 b
Pb	2,22 ± 0,05 c	0,00 ± 0,00 a	4,50 ± 0,49 b	0,00 ± 0,00 a	1,38 ± 0,149 c	0,00 ± 0,00 a	6,46 ± 0,07 a	0,00 ± 0,00 a
As	3,97 ± 1,11 c	0,228 ± 0,07 c	385,82±13,69b	0,06 ± 0,00 d	0,928 ± 0,10 c	24,30 ± 2,15 a	431,89 ±4,73 a	18,26 ± 1,95 b

Los resultados de eficiencia fotosintética muestran que no hay diferencias entre las plantas no micorrizadas crecidas en un suelo control o contaminado pero sí las hay entre las plantas micorrizadas control y las cultivadas en el suelo contaminado (Tabla 6). En el suelo contaminado tampoco se observan diferencias entre los 2 tratamientos.

Maxwell y Johnson (2000) establecen la medida del rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) como un parámetro muy útil para conocer el estado fisiológico del aparato fotosintético. De forma general se establece que las hojas de plantas que no están sometidas a ningún tipo de estrés poseen valores próximos a 0,8 (Anderson et al., 1997). Otros autores (Mallick y Mohn, 2003) establecen que el estrés por metales pesados reduce la tasa fotosintética de las hojas debido al daño que ocasionan sobre el fotosistema II disminuyendo el potencial de la reacción fotoquímica (Fv/Fm). En otros trabajos, también se encontraron diferencias en la relación Fv/Fm dependiendo del cultivar (Ci et al., 2009) o de la concentración de metal ensayada (Sharma et al., 2010).

Por otro lado también se ha visto que la micorrización puede aliviar los efectos negativos que producen los metales pesados sobre la fotosíntesis (Aloui et al., 2011). Sin embargo, en nuestro caso, las plantas micorrizadas cultivadas en el suelo contaminado presentaron el valor más bajo de eficiencia fotosintética lo cual podría indicar cierto grado de estrés que coincidiría con el aspecto bastante deteriorado que presentaban las plantas.

3.6. Análisis del contenido en H₂O₂ y peroxidación lipídica

Tanto el contenido en H₂O₂ como en MDA fue mayor en las plantas micorrizadas cultivadas en suelo contaminado; sin embargo, cabe destacar que la concentración de MDA casi se triplicó en el caso de las plantas micorrizadas cultivadas en suelo contaminado (comparado con las del suelo control) (Tabla7), reflejo fisiológico de la situación de estrés a las que estaban sometidas estas plantas. Resultados similares fueron obtenidos por Andrade et al. (2010) en plantas de café micorrizadas en las cuales se observó un aumento del contenido de MDA en los tejidos foliares como consecuencia de la exposición a Zn.

Tabla 7. Contenido de H₂O₂ (µg g⁻¹ PF) y peroxidación lipídica (MDA, µg g⁻¹ PF) en hojas de *B. celtiberica* micorrizada (M) y no micorrizada (NM) cultivada durante 90 días en suelo control y contaminado. Valores marcados con distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0.05).

Suelo	Tratamiento	H ₂ O ₂ (µg g ⁻¹ PF)	MDA (nmol g ⁻¹ PF)
Control	NM	0,171 ± 0,01 b	10,28 ± 0,64 bc
	M	0,147 ± 0,01 c	8,78 ± 0,58 c
Contaminado	NM	0,180 ± 0,01 ab	11,75 ± 0,52 b
	M	0,192 ± 0,01 a	24,46 ± 0,74 a

Estudios previos de Gallego et al. (2012) establecen que una de las respuestas generalizadas en las plantas sometidas a estrés por metales pesados, es un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de ROS como el anión

superóxido O_2^- , el radical hidroxilo OH^\cdot y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 son una consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico, especialmente durante la respiración y la fotosíntesis (Halliwell, 2006). Como se puede observar en la tabla 7 las plantas de *B. celtiberica* micorrizadas cultivadas en el suelo contaminado mostraron mayores niveles de producción de H_2O_2 que las plantas cultivadas en sustrato control. Teniendo en cuenta esto y a la vista de nuestros resultados, las plantas de *B. celtiberica* micorrizadas sufren mayor nivel de estrés cuando se cultivan en suelo contaminado con metales pesados.

La peroxidación lipídica inducida por metales pesados ha sido estudiado por varios autores (Martins et al., 2010; Sharma et al., 2010) puesto que las moléculas lipídicas y lípidos insaturados son sensibles a la oxidación por ROS y por tanto son indicadores del estrés oxidativo (Metwally et al., 2005). El MDA es uno de los principales productos finales resultado de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, componentes estructurales de las membranas celulares. En nuestro caso los niveles de MDA fueron significativamente mayores en el caso de las plantas micorrizadas que en el de las no micorrizadas.

Los incrementos en el contenido de H_2O_2 y MDA en las plantas de *B. celtiberica* micorrizadas son un claro indicador del daño oxidativo provocado por la acumulación de metales pesados en los tejidos de la planta. Este incremento indica que los beneficios fisiológicos atribuibles a la asociación con *P. ammoniavirescens* se ven reducidos por la presencia de metales pesados, aumentando la producción de ROS y el daño oxidativo.

3.7. Actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo

La contaminación del suelo afecta a las actividades enzimáticas relacionadas con las respuestas antioxidativas de *B. celtibérica* (Fig. 2). La actividad catalasa (CAT) de plantas no micorrizadas cultivadas en un suelo contaminado se redujo algo más del 50 % mientras que la de las plantas micorrizadas se mantuvo en niveles similares al control (Fig. 2a.).

Un mecanismo común de afrontar el estrés de metales pesados es la función sincronizada de enzimas antioxidantes que ayudan a aliviar el daño celular mediante la limitación de ROS (Bhaduri y Fulekar, 2012). El exceso de ROS en los tejidos resulta en daño oxidativo y necrosis de los mismos (Baishnab y Ralf., 2012). Sin embargo, este proceso no se conoce totalmente y se observa una gran variación en la respuesta a los metales que podría ser debida a la variabilidad de radicales libres producidos. Esta variabilidad podría estar relacionada con el metal ensayado y con la especie estudiada (Mazhoudi et al., 1997). Uno de los enzimas requeridos para la detoxificación de ROS es la CAT, que es esencial para la correcta detoxificación de ROS ya que interviene en la conversión del H_2O_2 en O_2 y H_2O (Bhaduri y Fulekar, 2012). El hecho de que los niveles de actividad CAT se mantengan más altos en las micorrizadas que en las no micorrizadas podría indicar que este enzima se activaría para reducir los niveles de H_2O_2 que por otra parte son altos en este tratamiento (Tabla 7). Es decir, parece que *P. ammoniavirescens* combatiría de alguna forma el daño oxidativo provocado por la acumulación de H_2O_2 en los tejidos.

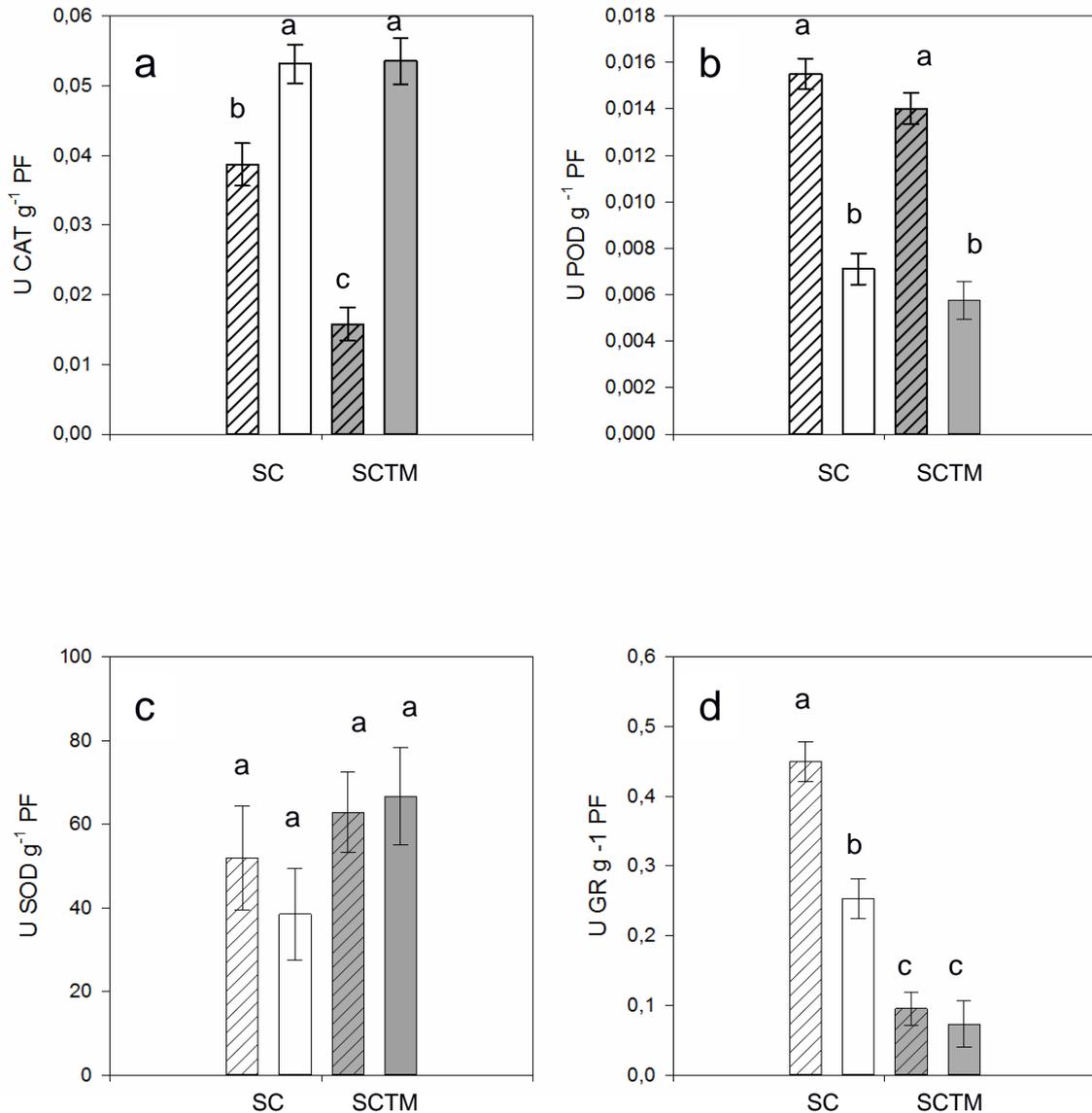


Figura 2. Actividades enzimáticas CAT (a), POD (b), SOD (c) y GR (d) en hojas de *B. celtiberica* micorrizada (M) y no micorrizada (NM) cultivadas durante 3 meses en un suelo control y contaminado. Barras marcadas con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). NM Suelo control M Suelo control, NM Suelo contaminado, M Suelo contaminado

La actividad POD es más baja en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas, no observándose diferencias entre las crecidas en el sustrato control y las contaminadas (Fig. 2b). Las POD son peroxidasas también implicadas en la detoxificación del H_2O_2 que emplea guaiacol como donador de electrones y participa en procesos de desarrollo como lignificación, defensa, heridas, etc (Bhaduri y Fulekar, 2012). A la vista de los resultados obtenidos, parece que la micorrización determina que la CAT sea usada preferentemente en la detoxificación del H_2O_2 mientras que las plantas no micorrizadas utilicen la vía de la POD como ruta de detoxificación.

No se observaron diferencias en la actividad SOD entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas crecidas en un suelo control o contaminado (Fig. 2c). La actividad enzimática SOD es la encargada de la eliminación de los radicales superóxido dando lugar a la formación de H_2O_2 que tiene efectos menos tóxicos en la célula y es degradada por los enzimas antioxidativos descritos previamente. De hecho, el balance entre las actividades SOD, POD y CAT en las células son cruciales para determinar el mantenimiento de niveles estables de los radicales superóxidos y H_2O_2 (Bhaduri y Fulekar, 2012).

La actividad SOD también ha sido relacionada con la capacidad de acumulación y tolerancia de las plantas a los metales pesados. Se ha visto que disminuyó en plantas no acumuladoras como el guisante (Sandalió et al. 2001), mientras que aumentó en plantas capaces de acumular metales pesados en sus tejidos como en la Brassicaceae, *Alyssum lesbiacum* (Schickler y Caspi 1999). Además, estudios con plantas transgénicas han demostrado que la sobreexpresión de SOD en plantas de *Festuca arundinaceae* confiere tolerancia frente a distintos tipos de estrés abiótico, entre ellos la exposición a metales pesados (Lee et al., 2007). En nuestro caso, no podemos asegurar que esta actividad esté relacionada con una mayor tolerancia de las plantas micorrizadas o no micorrizadas.

Otro enzima importante para combatir el estrés oxidativo es la GR. En nuestro caso, se observa una reducción clara en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas crecidas en suelo control (Fig. 2d). También se observa una reducción en las plantas crecidas en suelo contaminado no habiendo, en este caso, diferencias entre las micorrizadas y no micorrizadas (Fig. 2d). Este descenso de la actividad GR también fue observado en plantas de *Alyssum murale* tratadas con Ni (Babaoglu et al., 2009). Una posible causa para este descenso podría ser la falta de sustrato para la GR ya que este enzima está implicado en la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) el cual será posteriormente empleado en la reducción de peróxidos (Babaoglu et al., 2009). El punto clave estaría en la limitación de la cantidad de GSH puesto que es una molécula con múltiples funciones en la planta ya que además de su acción como antioxidante, es el sustrato para la síntesis de fitoquelatinas. En el caso de un estrés agudo por metales (como sería el cultivo en suelo contaminado), podría suceder que el consumo de GSH en la formación de compuestos tiólicos (implicados en la quelación de metales) reduciría la actividad GR.

4. Conclusiones

A la vista de los resultados, podemos concluir que:

- No podemos afirmar que la micorrización de *Betula celtiberica* con *Paxillus ammoniavirescens* aumente la tolerancia de las plantas a la contaminación por metales pesados ya que no hubo diferencias en el crecimiento excepto en la longitud de la raíz que fue menor en las plantas micorrizadas.
- Los metales pesados se acumulan principalmente en la raíz y las concentraciones más altas se detectaron en las plantas micorrizadas. Además hay que destacar que en estas plantas más del 95% de los metales están localizados en la pared lo cual podría indicar que esta estructura puede representar la primera barrera para combatir la toxicidad de los metales.
- En suelos control la micorrización reduce el estrés oxidativo mientras que en los contaminados aumenta tanto el contenido de H_2O_2 como la peroxidación lipídica. Estos resultados indican que la micorrización con *Paxillus ammoniavirescens* no es capaz de reducir el estrés oxidativo en *Betula celtiberica* cultivada en invernadero.
- En respuesta al estrés oxidativo se desencadenan cambios en las actividades antioxidativas. Parece que la micorrización determina que la actividad catalasa se use preferentemente en la detoxificación de H_2O_2 mientras que la guaiacol peroxidasa se utilizaría como vía de detoxificación en las plantas no micorrizadas. La glutatión reductasa se reduce drásticamente en presencia de la contaminación lo cual puede indicar que el sustrato de este enzima podría estar siendo utilizado para la síntesis de fitoquelatinas en detrimento de la actividad GR.

5. Bibliografía

Anderson, J.M., Park, Y.I., Chow, W.S., 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum* 100 (2): 214-223.

Andrade, S.A.L., Silveira, A.P.D., Mazzafera, P., 2010. Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. *Science of the total environment*. 408:5381- 5391.

Ali.H., Khan, E., Sajad. A.S.,2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869–88.

Aloui, A., Ghislaine, R., Robert, R., Schoefs, B., Bertrand, M., Henry, C., Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Aschi-Smiti, S., 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits shoot proteome changes that are modified during cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula*. *Biomed Central Plant Biology*. 11:75-92

Babaoglu, S., Kusvuran, S., Ellialtioglu, S., Acik, L., Adiguzel, N., 2009. Antioxidative enzyme response of heavy metal hyperaccumulator *Alyssum murale* to Ni₂ stress. *International Journal Agronomics and Biology*. 2(5): 194–197.

Baishnab C.T., Ralf, O., 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling Behaviour*. 7 (12): 1621-1633.

Barceló, J., Llugany, M., Lombini, A., Poschenrieder, C., 2005. Glycine may contribute to the protection of *Silene armeria* against excess of copper. En: *Plant protection for food security, human health and environmental protection*. Li, C.J. (Ed). Thisingua University Press. pp: 634-635. Beijing China

Benavides, M.P., Gallego S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium induced toxicity in plants, *Braz. Journal Plant Physiology*. 17: 21-34.

Bhaduri, A. M., Fulekar M. H., 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Review of Environmental Science Biotechnology*. 11(1): 55-69.

Boletín Oficial Principado de Asturias, 2014. Resolución de 20 de marzo de 2014, de la Consejería de Fomento, ordenación del Territorio y Medio Ambiente, por la que se establecen los niveles Genéricos de Referencia para metales pesados en suelos del Principado de Asturias. N° 91 de 21 de Abril de 2014.

Ci, D., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., Cao, W., 2009. Effects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. *Chemosphere*. 77: 1620-1625.

Dankher, O.P., Pilon-smits, E.A.H., Heagher, R.B., Doty, S., 2011. Biotechnological approaches for phytoremediation. En: *Plant biotechnology and agriculture: Prospects for the 21st century*. Altman, A., Hasegawa, M. (Eds.) Elsevier pp: 309-328.

Davidson, C.M., Ferreira, P.C.S., Ure, A.M., 1999. Some sources of variability in application of the three-stage sequential extraction procedure recommended by BCR to industrially-contaminated soil. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 363: 446-451

Demiral, T., Turkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental*

and Experimental Botany. 53(3): 247-257.

Ekmekçi, Y., Tanyolac, D., Ayhan, D., 2008. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. Journal Plant Physiology. 165:600 – 611.

Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., Tamés, R.S., 2008 Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. Environmental Pollution. 152: 522-529.

Fernández, R., Bertrand, A., García, J.I., Tamés, R.S., González, A., 2012. Lead accumulation and synthesis of non-protein thiolic peptides in selected clones of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*. Environmental and Experimental Botany 78: 18-24.

Fernández, R., Bertrand, A., Reis, R., Mourato, M.P., Martins, L.L., González, A., 2013. Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. Journal Hazardous Materials. 244-245: 555-562.

Fernández, R., Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., González, A., 2014. Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter : role of the cell wall, non- protein thiols and organic acids. Plant Physiology and Biochemistry. 78:63-70.

Gadd, G.M., 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycological Research. 11:3-49.

Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, E.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppaa, M.D., Benavides, M.P., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants. Insight into regulatory mechanisms. Environmental and Experimental Botany .83:33-46.

Galli, U., Schüepp, H., Brunhold, C., 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. Physiologia Plantarum. 92:364-368.

Gil, S.S., Khan, N.A., Tuteja, N., 2012. Cadmium at high dose perturbs growth photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L). Plant Science 182: 112-120.

Gil, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:909–930.

Godbold, D.L., Jentschke, G., Winter, S., Marschaner, P., 1998. Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees. Chemosphere 36: 757-762.

Greipsson, S., 2011. Phytoremediation. Nature Education Knowledge. 3(10): 7.

Gultz, P.A., 2002. Arsenic uptake of common crop plant from contaminated soils and interaction with phosphate. Plant Soil. 272: 337-347.

Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany. 53: 1-11.

Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology 141: 312–322.

- Jentschke, G., Godbold, D.L., 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum*. 109:107-109.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils. CRC Press.p. 413.
- Keller, C., Kayser, A., Richner, W., Brodbeck, M., Sennhauser, M., 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plants in the field. *Plant and Soil*. 249: 67-81.
- Khosravi, M., Ganji, T., Rakhshaei, R., 2005. Toxic effect of Pb, Cd, Ni and Zn on *Azolla filiculoides* in the International Anzali Wetland. *Int. Journal environmental Sciences and Technology* .2:35-40.
- Krzeslowska, M., 2010. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologia Plantarum* 33:35-51.
- Langer, I., Santner, J., Krapta, D., Fitz, W.J., Wenzel, W.W., Chweiger, P.F., 2012. Ectomycorrhizal impact on Zn accumulation of *Populus tremula* L. grown in metalliferous soil with increasing levels of Zn concentration plant soil. *Plant Soil*. 355: 283–297
- Le Quéré, A., Wright, D.P., Söderström, B., Tunlid, A., Johansson, T., 2005. Global Patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula*) and *Paxillus involutus* (Batsch). *Molecular Plant- Microbe Interactions*. 18:659-673
- Lee, S.H., Ahsan, N., Lee, K.W., Kim, D.H., Lee, D.G., Kwak, S.S., Kwon, S.Y., Kim, T. H., Lee, B.H. 2007. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses *Journal of Plant Physiology*. 164:1626-1638.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 603: 591-59.
- Mallick, N., Monh, F., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 64-69.
- Martins, L., Mourato, M., Cardoso, A.I., Pinto, A.P., Mota, A.M., Gonçalves, M.L.S., de Varennes, A., 2010. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologia Plantarum*. 33(4): 1375-1383.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal and Experimental Botany*. 51: 659-668.
- Mazhoudi, A., Chaoui, A., Habib Ghorbal, M., El Ferjani, E., 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), *Plant Science*. 127: 129–137
- Metwally, A., Safronova, V.I., Belimov, A.A., Dietz, K.J., 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativa* L. *Journal of Experimental Botany*. 56: 167-178.
- Milone, M.T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F., 2003. Antioxidative responses of

wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 50: 256-276.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490–498.

Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459–81.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–279.

Polle, A., Rennenberg, H., 1993. Significance of antioxidants in plants adaptation to environmental stress. *Plant adaptation to environmental stress*. London Chapman & Hall press. 263-273.

Porra, R.J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73: 149–156.

Rafati, M., Khorasani, N., Moattar, F., Shirvany, A., Moraghebi, F., Hosseinzadeh, S., 2011. Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*. Res. 5: 961–970.

Ramos, I., Esteban, E., Lucena, A., Gárate, A., 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca sp* Cd/Mn interaction. *Plant Science*. 162: 761-767.

Sandalio, L. M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero- Puertas, M.C., Del río, L.A., 2001. Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolites of pea plants. *Journal and Experimental Botany*. 52: 2115-2126.

Schickler, H., Caspi, H. 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiologia Plantarum* 105: 39–44

Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal and Experimental Botany*. 53:1351 – 1365.

Sell, J., Kayser, A., Schulin, R., Brunner, I., 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant Soil*. 277: 245-25.

Shanker, A. K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C.N., Pathmanabhan, G., 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science*. 166: 1035-1043.

Sharma. R.K., Agrawal, M., Agrawal, S.B., 2010. Physiological, biochemical and growth responses of lady's finger (*Abelmoschus esculentus* L.) plants as affected by Cd contaminated soil. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology*. 84: 765-770.

- Singh, N., Ma, L.Q., Srivastata, M., Rathinasabapathi, B., 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stresses in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*. 170: 274-282.
- Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis 2nd edition. Academic press, CA. U.S.A.
- Turnau, K., 1998. Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in Southern Poland. *Acta Soviet Botany*. 67:105-113.
- Vázquez, S., Goldsbrough, P., Carpena, R.O., 2006. Assessing the relative contributions of phytochelatins and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiologia Plantarum* 128:487-495.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 2011: 1-20.
- White, P. J., Brown, P. H., 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* 105 (7): 1073-1080.
- Wilkins, D.A., 1991. The influence of sheathing (ecto-)mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. *Agriculture and Ecosystems and Environment*. 35: 245-260.
- Zornoza, P., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., Carpena, R., 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiologic Biochemical*. 40: 1003-1009.