

Toxicidad de cadmio en plantas de pimiento y brócoli. Evaluación de tratamientos paliativos.



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**



RAFAEL PEREZ MILLAN

TESIS DOCTORAL

2022

DIRECTOR

DR. FRANCISCO GARCÍA SÁNCHEZ

CODIRECTORA

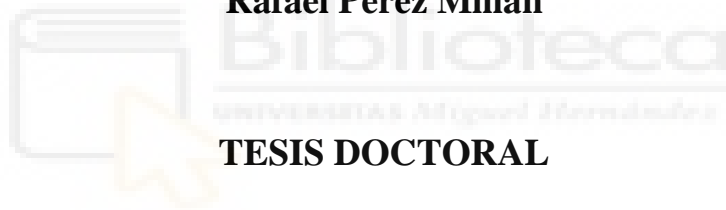
DRA. SILVIA SIMON GRAO



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**

**Toxicidad de Cd en plantas de pimiento y brócoli.
Evaluación de tratamientos paliativos.**

Rafael Pérez Millán



TESIS DOCTORAL

2022

DIRECTOR

DR. FRANCISCO GARCÍA SÁNCHEZ

CODIRECTORA

DRA. SILVIA SIMON GRAO



TOXICIDAD DE CD EN PLANTAS DE PIMIENTO Y BRÓCOLI. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS PALIATIVOS

CALIDAD DEL COMPENDIO DE CADA PUBLICACIÓN

Esta tesis se presenta **como compendio de las siguientes publicaciones:**

Perez-Millan, R.; Alfosea-Simon, M.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Camara-Zapata, J.M.; Martinez-Nicolas, J.J.; Lidon, V.; Simon, I.; Shahid, M.A.; Garcia-Sanchez, F.; Simon-Grao, S. The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions. *Agronomy* 2021, 11, 1905.

DOI: 10.3390/agronomy11101905



agronomy

Biblioteca
UNIVERSITAT MIGUEL HERNÁNDEZ



Article

The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions

Rafael Perez-Millan ^{1,2}, Marina Alfosea-Simon ³, Ernesto Alejandro Zavala-Gonzalez ², Jose Maria Camara-Zapata ³, Juan Jose Martinez-Nicolas ³, Vicente Lidon ³, Inma Simon ³, Muhammad Adnan Shahid ⁴, Francisco Garcia-Sanchez ^{3,*} and Silvia Simon-Grao ³

Editor: Byoung Ryong Jeong

ISSN: 0304-4238 1874-9380

Ámbito de la publicación: Agronomy

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Agronomy	Q1	3,949 (2021)	4.117 (2021)



TOXICIDAD DE CD EN PLANTAS DE PIMIENTO Y BRÓCOLI. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS PALIATIVOS

Pérez-Millán, R.; Alfosea-Simón, M.; Simón-Grao, S.; Cámara-Zapata, J.M.; Zavala-González, E.A.; Aranda-Martinez, A.; Shahid, M.A.; García-Sánchez, F. Effects of Se Application on Polyamines and Carbon–Nitrogen Metabolism of Pepper Plants Suffering from Cd Toxicity. *Agronomy* 2021, 11, 2535.

DOI: 10.3390/agronomy11122535





agronomy



Article

Effects of Se Application on Polyamines and Carbon–Nitrogen Metabolism of Pepper Plants Suffering from Cd Toxicity

Rafael Pérez-Millán ¹, Marina Alfosea-Simón ², Silvia Simón-Grao ², José María Cámara-Zapata ³ , Ernesto Alejandro Zavala-González ¹, Almudena Aranda-Martinez ¹, Muhammad Adnan Shahid ⁴ and Francisco García-Sánchez ^{2,*} 

Editor: Fuyong Wu

ISSN: 1573-9058

Ámbito de la publicación: Agronomy

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Agronomy	Q1	3,949 (2021)	4.117 (2021)



TOXICIDAD DE CD EN PLANTAS DE PIMIENTO Y BRÓCOLI. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS PALIATIVOS

Pérez-Millán, R.; Cámara-Zapata, J.M.; Fernández-Zapata, J.C.; Simón-Grao, S.; Alfosea-Simón, M.; Zavala-González, E.A.; Shahid, M.A.; García-Sánchez, F. Application of Biocat G, Selenium, and Chitosan to Counteract the Negative Effects of Cd in Broccoli Plants Grown in Soilless Culture. *Agronomy* 2022, 12, 1327.

DOI: 10.3390/agronomy12061327



agronomy



Article

Application of Biocat G, Selenium, and Chitosan to Counteract the Negative Effects of Cd in Broccoli Plants Grown in Soilless Culture

Rafael Pérez-Millán ¹, Jose Maria Cámara-Zapata ², Juan Carlos Fernández-Zapata ², Silvia Simón-Grao ³, Marina Alfosea-Simón ³, Ernesto Alejandro Zavala-González ¹, Muhammad Adnan Shahid ^{4*} and Francisco García-Sánchez ³

Editor: José David Flores-Félix

ISSN: 1573-9058

Ámbito de la publicación: Agronomy

Categoría JCR	Categoría del cuartil	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
Agronomy	Q1	3,949 (2021)	4.117 (2021)



Dr. Francisco García Sánchez, Científico Titular del Departamento de Nutrición Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) como director,

Dra. Silvia Simón Grao, Ayudante de Investigación del Departamento de Nutrición Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) como codirectora,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral Titulada “Toxicidad de cd en plantas de pimiento y brócoli. Evaluación de tratamientos paliativos” de la que es autor el Biólogo, D. Rafael Pérez Millán, ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Dr. Francisco García Sánchez

Dra. Silvia Simón Grao

Científico Titular

Ayudante de Investigación

Dpto. Nutrición Vegetal (CEBAS-CSIC) Dpto. Nutrición Vegetal (CEBAS-CSIC)

Murcia, diciembre de 2022

Dr. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Toxicidad de Cd en plantas de pimiento y brócoli. Evaluación de tratamientos paliativos” de la que es autor **D. Rafael Pérez Millán** ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Francisco García Sánchez** y la **Dra. Silvia Simón Grao**, actuando como tutor de esta el **Dr. Pablo Melgarejo Moreno**. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a 20 de diciembre de 2022.

Dra. Dña. Juana Fernández López

Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA

Coordinadora: Dra. Juana Fernández López

Agradecimientos

“Caminante, son tus huellas el camino y nada más; caminante, no hay camino, se hace camino al andar. Al andar se hace camino, y al volver la vista atrás se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar. Caminante no hay camino, sino estelas en el mar” (Antonio Machado).

“Una línea recta puede ser la distancia más corta entre dos puntos, pero de ninguna manera es la más interesante” (Doctor Who).

La vida esta repleta de jornadas y aventuras, somos senderistas emocionados por hacer cumbres en picos imposibles, a través de senderos inexistentes y paisajes salvajes. Afrontando peligros y descensos imposibles detrás de cada recodo, con tormentas o terremotos, pandemias o precipicios, que muchas veces te hacen pensar en renunciar. La vida está repleta de sendas por abrir. Con una observación importante, aunque la soledad pueda llegar a ser un obstáculo, la clave es que nunca estas solo. En todos y cada uno de los caminos se encuentran almas gemelas, eternas o temporales, que ayudan a hacer cada senda más especial, más importante.

El trayecto de esta tesis concluye una etapa que ha resultado ser una aventura de dimensiones memorables, desde su inicio ha significado un vuelco en la trayectoria de mi camino. En la cima de esta cumbre me gustaría agradecer a todos aquellos que me apoyaron desde el inicio.

Campo base 1

A toda la familia de Atlántica Agrícola por darme la oportunidad de participar en este proyecto, en especial a Wilbert por abrirme la primera puerta; a Antonio Navarro y a todos a los que bombardeé con mis “ideas” en el inicio del viaje.

Campo base 2

A todo el equipo del CEBAS, que me ha ayudado y guiado para hacer cumbre. Muchísimas gracias, Paco, Silvia y Marina, sin vosotros esto no habría sido posible.

Campo base 3

A todo el equipo de I+D+i por soportar las aventuras y agobios de mis fines de semana tecleando. Ernesto por haberme dado su confianza y amistad; a Paco Salguero por ayudarme en todo y ser un pozo de sabiduría y un amigo; Iván Navarro por la responsabilidad y confianza que me da y por los buenos momentos en el campo; a Almudena por sus consejos y correcciones de última hora; a Tino y a Andrés, simplemente por aportarme alegría continua en este viaje.

Inicio de ascenso

A Leti por su amistad y todos los momentos necesarios de desconexión.

Ascenso

A mi familia de vida: Carlos, Charly, Raquel y mi sister Elena por todo vuestro apoyo, comprensión, buenos y malos momentos, celebraciones... y correcciones o traducciones.

A Cris, por atreverte a reptar conmigo por debajo de vallas, dejarme hacer rapel con raíces o saltos locos, perdernos por campos o laberintos, en mar o montaña...

Cumbre y continuación

Mi mayor agradecimiento es para toda mi familia, en especial a mis padres José Pérez Novillo y Ana Millán Martínez por darme la vida, los valores, ser mi espejo, y por todo el amor que alguien puede llegar a desear tener.

A mis hermanos: Jesús, José, Mary, Félix, Carlos, Raquel y Pedro, por ser mi apoyo más valioso. No soy nada sin vosotros, lo sois TODO. Yo también quiero ser guerrero y llegar a conseguir lo que habéis conseguido vosotros: orgullo, humildad y amor.

Gracias FAMILIA.



El tiempo no se detiene

Ni se compra ni se vende

No se coge ni se agarra

Se le odia y se le quiere

El tiempo sopla cuando sopla el viento

El tiempo ladra cuando ladra el perro

El tiempo ríe si tú estás riendo

Curioso elemento, el tiempo

Pau Dones

“Vivir es Urgente”



INDICE

1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	1
2. ESTRUCTURA DE LA TESIS	5
3. RESUMEN	9
4. INTRODUCCIÓN	15
4.1. El cultivo del pimiento y brócoli	16
4.2. Uso para el riego en España de aguas no convencionales	21
4.3. Toxicidad de cadmio en la agricultura	24
4.4. El Selenio en las plantas	36
5. OBJETIVOS	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS	49
6.1. Ensayo en pimiento	50
6.2. Ensayo en brócoli	55
7. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	63
7.1. PUBLICACIÓN 1	64
7.1.1. Resumen de resultados y discusión	64
7.1.2. Conclusiones	66
7.2. PUBLICACIÓN 2	68
7.2.1. Resumen de resultados y discusión	68
7.2.2. Conclusiones	73
7.3. PUBLICACIÓN 3	74
7.3.1. Resumen de resultados y discusión	74
7.3.2. Conclusiones	77
8. CONCLUSIONES GENERALES	79
9. INVESTIGACIONES FUTURAS	82
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
11. ANEXO - PUBLICACIONES	103
11.1. PUBLICACIÓN 1	104
11.2. PUBLICACIÓN 2	125
11.3. PUBLICACIÓN 3	149

1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS



1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

APS	ATP-sulfurilasa
AB	Peso de alimento consumido
ACO₂	Asimilación neta de CO ₂
Ala	Alanina
APR	APS-reductasa
APX	Ascorbato peroxidasa
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BW	Peso corporal medio
Cad	Cadaverina
CAT	Catalasa
CCCP	m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona
CGA	Clorogenato
Ci/Ca	Ci: CO ₂ subestomático. Ca: CO ₂ externo
Cit	Citrato
CR	Factor de riesgo carcinogénico
DMDSe	Dimetil-diseleniuro
DMS_e	Dimetil-selenuro
DPPH	Método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DW	Peso seco
EDI	Ingesta diaria estimada
Eleaf	Transpiración foliar
For	Formiato
Fru	Fructosa
Fum	Fumarato
Fv'/Fm'	Eficiencia de las antenas en los centros de reacción del fotosistema II (PSII)
FW	Peso fresco
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Gln	Glutamina

Glu	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutación
gs	Conductancia estomática
GSHPx	Glutación peroxidasa
HMA	Transportadores ATPAsa de zinc y cadmio
IRT1	Transportador regulado por hierro
Iso	Isoleucina
LCT1	Transportador de cationes de baja afinidad
Mal	Malato
MDA	Malondialdehído
Me-SeCys	Methyl-SeCys
Me-SeMet	Metil-SeMet
MTs	Metalotioneínas
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
NRAMP	Transportadores de iones metálicos acoplados a protones
OAS	O-acetilserina
OPT	Transportadores de oligopéptidos
ORD	Dosis oral de referencia
PCs	Fitoquelatinas
Phe	Fenilalanina
POD	Peroxidasa
Pro	Prolina
Put	Putrescina
qP	Coefficiente de decaimiento fotoquímico o quenching fotoquímico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SeCys	Selenio-cisteína
Se-MeSeCys	Selenometilselenocisteína
SeMet	Selenio-metionina
SOD	Superóxido dismutasa

Spd	Espermidina
Spm	Espermina
Suc	Sacarosa
SULTR	Transportador de sulfato
THQ	Coefficiente de riesgo objetivo
TWI	Ingesta semanal tolerable
Tyr	Tirosina
Val	Valina
WUE	Eficiencia uso del agua
YLS	Transportadores Yellow Stripe-Like
ZRT1	Transportador regulado por zinc
ZRT2	Transportador regulado por zinc
ΦPSII	Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII)



2. ESTRUCTURA DE LA TESIS



2. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para la elaboración de la presente Tesis Doctoral se ha seguido la metodología basada en la publicación de un compendio de artículos de investigación siguiendo la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

La estructura de esta Tesis Doctoral consta de las siguientes partes:

- **Resumen.** Incluye una exposición abreviada de los resultados y conclusiones más relevantes.
- **Introducción.** Contiene una breve revisión bibliográfica sobre la importancia del cultivo del tomate y la problemática a la que se enfrenta la agricultura del levante español. Además, se describen los aminoácidos de las plantas y sus funciones, así como los mecanismos fisiológicos y metabólicos en los que está implicados estos compuestos.
- **Objetivos.** Se describen los objetivos generales de la tesis, así como los objetivos específicos.
- **Resumen de la metodología.** Se explican las condiciones experimentales de los ensayos llevados a cabo; así como las distintas determinaciones realizadas y los equipos y técnicas utilizadas para su medición.
- **Publicaciones científicas.** Artículos publicados que componen la base de la tesis doctoral, se detallan a continuación:
 - En la primera publicación (*Agronomy*, 11, 1905), se evaluó el efecto selenio aplicado de forma foliar y vía suelo sobre plantas de pimiento variedad Cristal crecidas en hidroponía en condiciones de fitotoxicidad por cadmio. Se determinaron los principales síntomas producidos a nivel fisiológico, iónico, oxidativo y fotosintético.
 - En la segunda publicación (*Agronomy*, 11, 2535), se analizaron los metabolitos y enzimas relacionados con el metabolismo del carbono y nitrógeno, en plantas crecidas en exceso de cadmio en condiciones hidropónicas y con aplicaciones de selenio vía foliar y radicular.
 - En la tercera publicación (*Agronomy*, 12, 1327), se hicieron crecer plantas de brócoli sobre sustrato inerte en condiciones de fitotoxicidad por cadmio, para evaluar aplicaciones de diferentes sustancias paliativas de la toxicidad de cadmio. Estas sustancias fueron granulados de materia orgánica, quitosano y selenio. Se analizaron parámetros fisiológicos, iónicos y fotosintéticos, para determinar qué sustancias ofrecían al cultivo mayor tolerancia y menor riesgo para la salud humana.

- **Resumen de los resultados, discusión y conclusiones.** Análisis y resumen de los resultados y conclusiones obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.
- **Conclusiones generales.** Conclusiones globales de los estudios que forman parte de la tesis doctoral.
- **Investigaciones futuras.** Posibles nuevas líneas de trabajo futuras





3. RESUMEN Y ABSTRACT



3. RESUMEN

La contaminación ambiental por cadmio (Cd) se ha incrementado drásticamente en la naturaleza debido principalmente a la intensificación de las actividades industriales, la aplicación de fertilizantes fosfatados y al uso de lodos de depuradora. Estas actividades han llevado a la contaminación a gran escala de los suelos agrícolas.

El cadmio es un metal pesado sin función biológica, que resulta tóxico a bajas concentraciones en humanos, animales y plantas. En cultivos agrícolas, el Cd se absorbe y transporta desde la raíz a la hoja fácilmente, pudiendo ser acumulado en los tejidos en concentraciones que afectan negativamente al crecimiento y desarrollo. El Cd provoca anomalías en la absorción de nutrientes y en el desarrollo vegetativo, afecta en el metabolismo celular a nivel enzimático, fotosintético, estomático e hídrico. Todo ello induce la producción de un elevado estrés oxidativo que impide y limita el crecimiento y disminuye el rendimiento en los cultivos agrícolas.

Actualmente, el uso de bioestimulantes ha sido objeto de estudio con el objetivo de disminuir el efecto del Cd en el desarrollo de plantas. Sin embargo, los resultados varían en función de diferentes factores, como son la composición de las moléculas evaluadas, la dosis utilizada, el modo y el momento de la aplicación.

Por tanto, bajo este contexto, se ha desarrollado esta tesis cuyo objetivo principal ha consistido en evaluar el efecto que tienen la aplicación de diferentes sustancias bioestimulantes en plantas crecidas en condiciones de estrés por Cd. Se han realizado 3 experimentos para dilucidar qué materias activas, en qué dosis y en qué forma de aplicación es la más eficaz para paliar la toxicidad del Cd y disminuir su daño en los cultivos.

Los cultivos seleccionados para los experimentos fueron pimiento y brócoli, debido a su importancia en agricultura. El pimiento tiene una tolerancia baja-media al Cd, ya que lo acumula en sus tejidos (raíz principalmente), observándose síntomas visuales rápidamente. El brócoli es un cultivo con tolerancia media, que acumula Cd en sus tejidos, principalmente en las hojas y en la inflorescencia.

En el primer experimento se evaluó si la aplicación de selenio (Se) inhibía la absorción, acumulación de Cd y su toxicidad en plantas de pimiento crecidas en condiciones hidropónicas con solución nutritiva enriquecida con Cd. Por esta razón, se realizaron cuatro tratamientos (-Cd/-Se, +Cd/-Se, +Cd/+SeF y +Cd/+SeR) para determinar el tipo de aplicación de Se más adecuada (vía foliar y/o vía radicular) en cuanto a la reducción de los efectos tóxicos del Cd en las plantas.

En el segundo experimento se analizó si el efecto beneficioso de la aplicación de Se en la disminución de toxicidad por Cd, en plantas de pimiento crecidas en hidroponía en condiciones de fitotoxicidad por Cd con cuatro tratamientos (-Cd/-Se, +Cd/-Se, +Cd/+SeF y +Cd/+SeR), fue consecuencia de que el Se mejora la eficacia del metabolismo del nitrógeno y del carbono. Para ello se analizaron: las concentraciones de aniones relacionados con este metabolismo, como nitratos, nitritos y amonio, las actividades de diferentes enzimas como nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamato sintasa, poliaminas en sus diferentes formas, ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares en los tejidos de las hojas y raíces.

Por último, en el tercer experimento se evaluó el efecto de las aplicaciones exógenas de Biocat G (ácidos fúlvicos/húmicos), selenio (Se) y quitosano en raíces y/o hojas de plantas de brócoli expuestas a estrés por Cd. Los tratamientos aplicados fueron: (i) T1: solución nutritiva Hoagland (NS), (ii) T2: NS + Cd a 3 mg L⁻¹ (NS + Cd), (iii) T3: NS + Cd + aplicación radicular de Biocat G (NS + Cd + BioG), (iv) T4: NS + Cd + aplicación foliar de Se (NS + Cd + Se1), (v) T5: NS + Cd + aplicación radicular de Se (NS + Cd + Se2), (vi) T6: NS + Cd + aplicación foliar de quitosano (NS + Cd + quitosano1), y (vii) T7: NS + Cd + aplicación radicular de quitosano (NS + Cd + quitosano2).

De estos experimentos las conclusiones más relevantes fueron las que se muestran a continuación:

- I. Primer experimento: Los resultados obtenidos mostraron que el exceso de Cd en la solución nutritiva resultó en una disminución de la biomasa total de las plantas cultivadas en estas condiciones (48% +Cd/-Se, 45 % +Cd/+SeF, y 38 % +Cd/+SeR, relativo a -Cd/-Se). Esta reducción del crecimiento se debió a: (i) la toxicidad del Cd y (ii) el desequilibrio nutricional que sufrían las plantas con la presencia de Cd en la solución nutritiva. Parece que, en condiciones hidropónicas, la adición de Se a la solución nutritiva, y por tanto su absorción a través de las raíces retrasó y redujo en gran medida los efectos tóxicos del Cd en las plantas de pimiento, a diferencia de la aplicación foliar de este elemento.
- II. Segundo experimento: Los resultados mostraron la superioridad del tratamiento +Cd/+SeR con respecto al tratamiento +Cd/+SeF, ya que el primero activa una serie de mecanismos relacionados con la síntesis poliaminas conjugadas, la asimilación de nitrógeno, el ciclo de Krebs, y, el aumento del ácido clorogénico. Los datos del estudio metabólico indicaron que el tratamiento foliar con Se provocó algunos daños en las plantas de pimiento o desencadenó una serie de respuestas metabólicas diferentes a las observadas en las plantas SeR que condujeron a que el SeF no fuera tan efectivo como el SeR. Los resultados indicaron que el SeR disminuyó la acumulación y toxicidad de Cd a

medida que mejoró la homeostasis de las poliaminas, se incrementaron los mecanismos de defensa como el fenilpropanoide y se bloqueó la entrada de Cd a las plantas.

- III. Tercer experimento: Los resultados mostraron que la aplicación exógena de Biocat G y Se mejoraron los efectos adversos causados por la toxicidad del Cd. Biocat G consiguió limitar el transporte de Cd desde las hojas a las inflorescencias, reduciendo el contenido de Cd en la parte comestible. Estos tratamientos dieron los mejores resultados ya que desactivaron la reactividad del Cd en los tejidos, pero no afectaron a su acumulación en la planta.

ABSTRACT

Environmental contamination by cadmium (Cd) has increased drastically in nature mainly due to the intensification of industrial activities, the application of phosphate fertilizers and the use of sewage sludge. These activities have led to large-scale contamination of agricultural soils.

Cadmium is a heavy metal with no biological function, which is toxic at low concentrations in humans, animals and plants. In agricultural crops, Cd is absorbed and transported from root to shoot efficiently, and can be accumulated in tissue, affecting growth and development. Cd causes abnormalities in the nutrient absorption and vegetative development, affects cellular metabolism at the enzymatic, photosynthetic, stomatic and hydric. All this induces the production of a high oxidative stress which prevents and limits growth and decreases agricultural crop yield.

In humans, the deposition of Cd in the body is a consequence of the consumption of foods with Cd accumulation that do not present apparent phytotoxic symptoms, being able to cause serious health problems, such as cancer. For all these reasons, it is necessary to develop simple and sustainable techniques for agriculture, which allow blocking the effect of Cd and decrease absorption, transport, accumulation and symptoms in crop plants in order to improve agricultural production and food security.

Currently, the use of biostimulants in order to reduce the effect of Cd on the plant development has been studied. However, the results vary depending on different factors, such as the composition of the molecules evaluated, the dose used, the manner and time of application.

Therefore, this thesis has been developed with the main objective to evaluate the effect of the application of different biostimulant substances on plants grown in Cd stress conditions. For this, 3 experiments have been carried out to elucidate what application form inhibited the toxicity of Cd more effectively and decreased its damage and accumulation in the plant. The crops selected

for the experiments were pepper and broccoli, due to their importance in agriculture. In addition, the pepper has a low-medium tolerance to Cd, since it accumulates in its tissues (mainly the root), showing fast visual symptoms. And the broccoli is a crop with medium tolerance, that accumulates Cd in its tissues, mainly in the leaves and in the inflorescence.

In the **first experiment**, it was evaluated if the application of selenium (Se) inhibited the absorption, accumulation and toxicity of Cd in pepper plants grown under hydroponic conditions with nutrient solution enriched with Cd. For this reason, four treatments were carried out (-Cd/-Se, +Cd/-Se, +Cd/+SeF and +Cd/+SeR) to determine the most adequate type of application of Se (foliar route and/or root route) in terms of reducing the toxic effects of Cd in the plants.

In the **second experiment**, it was analyzed whether the beneficial effect of the application of Se in the decrease of Cd toxicity, in pepper plants grown in hydroponics in Cd phytotoxicity conditions with four treatments (-Cd/-Se, +Cd/-Se, +Cd/+SeF and +Cd/+SeR), was a consequence of the fact that Se improves the efficiency of nitrogen metabolism and of carbon. For this purpose, the following parameters were analysed in the tissues of leaves and roots: the concentrations of anions related to this metabolism, such as nitrates, nitrites and ammonium; the activities of different enzymes such as nitrate reductase, nitrite reductase and glutamate synthase; polyamines in their different forms; salts of organic acids; amino acids and sugars.

Lastly, in the **third experiment**, the effect of exogenous applications of Biocat G (fulvic/humic acids), selenium (Se) and chitosan was evaluated in roots and leaves of broccoli plants exposed to Cd stress. The treatments applied were: (i) T1: nutrient solution Hoagland (NS), (ii) T2: NS + Cd at 3 mg L⁻¹ (NS + Cd), (iii) T3: NS + Cd + application root application of Biocat G (NS + Cd + BioG), (iv) T4: NS + Cd + foliar application of Se (NS + Cd + Se1), (v) T5: NS + Cd + root application of Se (NS + Cd + Se2), (vi) T6: NS + Cd + foliar application of chitosan (NS + Cd + chitosan1), and (vii) T7: NS + Cd + application root chitosan (NS + Cd + chitosan2).

From these experiments, the most relevant conclusions were:

- I. **First experiment:** The results obtained showed that the excess of Cd in the nutrient solution resulted in a decrease in the total dry biomass of the plants grown under these conditions, and that this decrease was due to the reduction in shoot growth (48% +Cd/-Se, 45% +Cd/+SeF, and 38% +Cd/+SeR, relative to -Cd/-Se). This growth reduction was due to: (i) the toxicity of Cd itself and (ii) the nutritional imbalance suffered by the plants. It seems that under hydroponic conditions, the addition of Se to the nutrient solution, and therefore its absorption through of the roots (lower antioxidant activity,

superoxide dismutase, H₂O₂ and higher catalase activity), delayed and greatly reduced the toxic effects of Cd on pepper plants, unlike the foliar application of this element.

- II. **Second experiment:** The results showed the superiority of the treatment +Cd/+SeR with respect to the +Cd/+SeF treatment, as shown by the increase in the conjugated polyamines, decreased glutamate and phenylalanine, and increased malate and chlorogenic acid. Data from the metabolic study indicated that the foliar treatment with Se caused some damage to pepper plants or triggered a series of metabolic responses different from those observed in SeR plants. The results indicated that the SeR decreased the accumulation and toxicity of Cd as polyamine homeostasis improved, defense mechanisms such as phenylpropanoid increased and the entry of Cd into the plants was blocked.

- III. **Third experiment:** The results showed that the exogenous application of Biocat G and Se (T3 and T5) ameliorated the adverse effects caused by Cd toxicity and the rate plant growth. In addition, Biocat G was able to limit the transport of Cd from the leaves to the inflorescences, reducing the content of Cd in the edible part. These treatments (T3 and T5) gave the best results, act on the plants deactivating Cd toxicity, but did not affect its accumulation in the plant tissue. In addition, Biocat G limits the transport of Cd from the non-edible part to the edible. Biocat G was able to limit the transport of Cd from the leaves to the inflorescences, reducing the Cd content in the edible part.

4. INTRODUCCION



4. INTRODUCCIÓN

4.1 El cultivo del pimiento y brócoli

4.1.1 El pimiento

Capsicum annuum es el nombre científico del pimiento que fue descrito por [Carlos Linneo](#) y publicado en [Species Plantarum](#), vol. 1, p. 188-189 en 1753. El pimiento pertenece al orden *Solanales*, dentro del cual hay comprendidas unas treinta familias, siendo las Solanáceas la que corresponde al pimiento (**figura 4.1**). Algunos autores sólo reconocen una especie (*C. annuum*), que engloba toda la variabilidad genética existente ([McCraw, 1977](#)). Sin embargo, otros autores distinguen dos especies: i) *Capsicum annuum* L. y ii) *Capsicum frutescens* L. que difieren fundamentalmente en el número y color de las flores, forma y tipo de frutos, duración vegetativa, etc. Se incluyen dentro de *C. annuum* siete variedades botánicas, en función principalmente de la forma y tamaño de los frutos: i) var. *Abreviatum* Fingerh, ii) var. *Acuminatum* Fingerh, iii) var. *Cerasiforme* Irish, iv) var. *Conoides* (Mill.) Irish, v) var. *fasciculatum* (Sturtev.) Iris, vi) var. *grossum* (L.) Sendtn y vii) var. *longum* (DC) Sendtn. Por su parte, en *C. frutescens* L. se distinguen la variedad *baccatum* plurianual y de aspecto arbustivo ([Purseglove, 1974](#)).

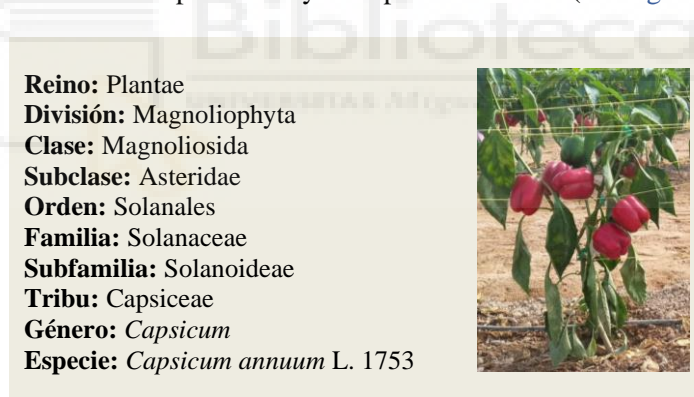


Figura 4.1. Descripción taxonómica del pimiento.

Desde un punto de vista práctico se distinguen tres grupos varietales ([Maroto, 1992](#)):

- Variedades dulces: suelen tener frutos de tamaño grande, se cultivan en invernaderos, y se utilizan para su consumo en fresco y la industria conservera.
- Variedades con sabor picante: muy cultivadas en Sudamérica, suelen ser variedades de fruto largo y delgado.
- Variedades para la obtención de pimentón, que se clasifican realmente como un subgrupo de las variedades dulces:

En cuanto a su descripción botánica, el pimiento se trata de una especie herbácea perenne, aunque suele cultivarse como anual o bianual, de porte arbustivo algunos alcanzan entre 80 y 100 cm de

alto, y otros 200 cm (**figura 4.2**). La raíz del pimiento es voluminosa y profunda, formada por una raíz principal pivotante, aunque en terrenos apelmazados o en suelos de textura pesada tiene escaso desarrollo. Dispone, asimismo, de numerosas raíces adventicias que en horizontal llegan a alcanzar el medio metro o incluso el metro de longitud. De tallos glabrescentes ramificados con hojas aovadas, pecioladas, solitarias o por pares, de 4-12 cm por 1,5-4 cm de ancho, también pubescentes, con márgenes enteros, base estrechada y ápice algo acuminado. Las flores pueden ser solitarias o formar grupos de muy escaso número, erectas o algo péndulas y nacen en la axila de las hojas con el tallo. El cáliz, persistente, es acampanado y entero, con 5-7 costillas principales redondeadas terminadas en un diente, generalmente romo, y unas cuantas costillas secundarias. La corola, más bien pequeña (1 cm), tiene 5-7 pétalos todos soldados anchamente en su base, de color blanco y finamente denticulados en sus bordes. Las anteras son generalmente purpúreas. El fruto, que puede tener una infinidad de formas, es una baya hueca con 2-4 tabiques incompletos donde se alojan, muy comprimidas, las semillas, de color amarillento y forma discoidal (3-5 mm). Florece de mayo a agosto, y fructifica desde julio hasta noviembre. Es una especie capaz de autopolinización.

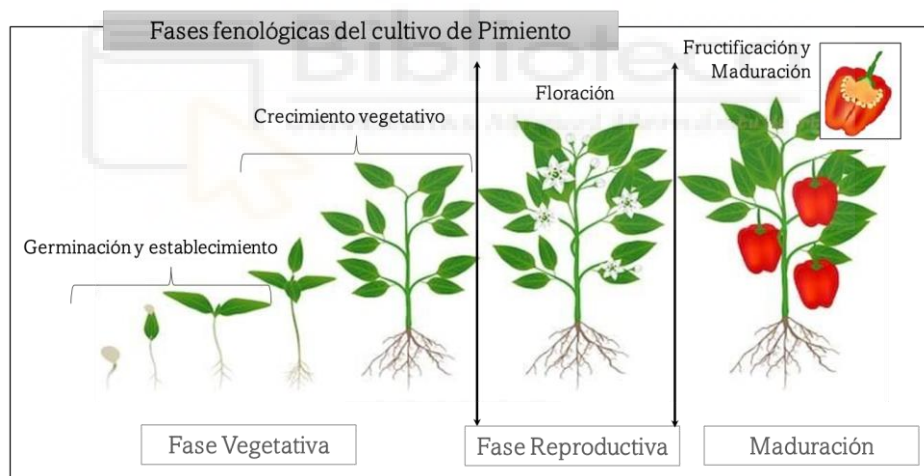


Figura 4.2. Desarrollo fenológico del cultivo de pimiento.

El pimiento llegó a España, de la mano de Cristóbal Colón, en 1493. La posibilidad de sustituir a la carísima pimienta (*Piper nigrum* L.) procedente de oriente, y la facilidad de cultivo en nuestras condiciones ecológicas, fueron las causas de su rápida expansión en España, a lo largo del siglo XVI. Desde España, junto con la colaboración de los portugueses, se distribuyó al resto de Europa y del mundo. Su introducción en Europa supuso un avance culinario, ya que vino a complementar e incluso sustituir a otro condimento muy empleado como era la pimienta negra (*Piper nigrum* L.), de gran importancia comercial entre Oriente y Occidente. El éxito del pimiento radica en que es un cultivo con tres destinos de consumo: i) pimiento en fresco, ii) para pimentón y iii) para

conserva. Las variedades dulces se consumen en crudo, enteras o troceadas en ensalada o cocinadas, tanto en verde o rojo, como ya maduras; mientras que las variedades picantes se utilizan principalmente para aperitivos, en crudo o encurtidos, en composición de linimentos y como condimento en forma de pimentón. La capsaicina es el alcaloide que produce el sabor amargo o picante, y se concreta en los tabiques divisorios, placenta y en las semillas.

El cultivo de pimiento está muy extendido en el mundo con más de 2 millones de hectáreas de superficie de cultivo para el año 2020 y una producción para ese año de más de 36 millones de toneladas. China es el mayor productor de pimiento con más de 16 millones de toneladas (16,8 millones), le siguen México (2,8 millones), Turquía (2,6 millones) e Indonesia (2,7 millones) (FAO, 2022). En España, gracias a que la demanda de los mercados europeos de pimientos fresco, su producción ha crecido exponencialmente, sobre todo en los invernaderos en todo el litoral mediterráneo español, convirtiéndose en uno de los cultivos hortícolas con más alta relación superficie/rendimiento. Esta producción se localiza principalmente en (**figura 4.3**): 1) Andalucía, con 13.718 ha (de las que 11.125 se concentran en los invernaderos y en parcelas al aire libre de Almería), 2) Murcia 1.531 ha, 3) Castilla-La Mancha 1.173 ha, 4) Galicia 1.119 ha, 5) Navarra 935 ha y 6) Comunidad Valenciana 809 ha (MAPA, 2022). Para la exportación se destinan frutos no excesivamente grandes, rectangulares y largos, de forma cuadrada o California en rojo (mercado francés, suizo y sueco), amarillo y verde (mercado alemán o portugués) y en envase de malla tricolor principalmente para todo el centro y norte europeo. España es actualmente el principal exportador de la Unión Europea y el quinto en el ámbito mundial reforzando su posición al registrar en 2021 un récord en producción de hortalizas (16,4 millones de toneladas), es decir, 1,21 millones más que en 2020.

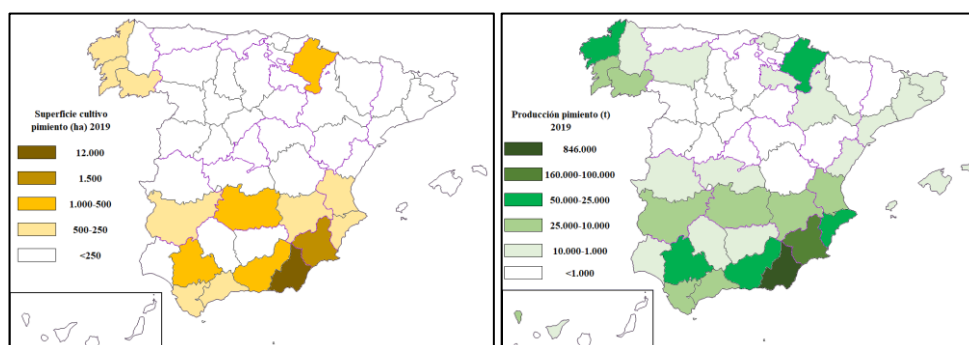


Figura 4.3. Izquierda superficie de plantación de pimiento (ha), derecha producción de pimiento(t) en España del año 2019 (editado de MAPA, 2022).

4.1.2 El brócoli

El origen del cultivo del brócoli proviene de una col salvaje originaria de países con clima templado del Mediterráneo Oriental y Oriente Próximo (Asia Menor, Líbano, Siria, etc.) hace aproximadamente 2.500 años (Martínez-Ballesta et al. 2008). Aparentemente esta col fue

domesticada hace miles de años por los romanos, pero su expansión se inicia a partir del siglo XVI. Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XX cuando su producción se desarrolló en Europa y Estados Unidos, dándose a conocer en América por los europeos en el año 1942.

Su nombre científico es *Brassica oleracea*, pertenece a la Familia de las Brassicaceae (Crucíferas; **figura 4.4**), que incluye un gran número de especies, siendo algunas de las más conocidas: *B. rapa* (nabo), *B. napus* (rábanos), *Sinapis* spp (mostazas), etc.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Dicotyledon Magnoliopsida

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae (crucíferas)

Género: *Brassica* L. 1753

Especie: *Brassica oleracea*

Subespecie: *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck 1794



Figura 4.4. Descripción taxonómica del brócoli.

En cuanto a su descripción botánica, el brócoli es una planta herbácea, anual, que posee una raíz pivotante de la que parte muchas raíces secundarias superficiales. Tiene un tallo corte erecto que termina en una masa globosa de yemas florales hipertrofiadas en los laterales y en las axilas de las hojas. Así mismo, puede desarrollar brotes de yemas florales, de tamaño menor que el de la cabeza principal, que aparecen de forma paulatina y escalonada; generalmente tras el corte del cogollo principal. Las hojas del brócoli poseen peciolo alargados, limbos con hojas lobuladas de color verde grisáceo, muy ondulados y con lóbulos profundos (Maroto et al. 2007; **figura 4.5**). Se consumen los floretes (inflorescencias) y parte de los tallos asociados a ellos ya que son las principales fuentes alimentarias de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud humana, además de su alto valor nutricional. El brócoli está emparentado con la coliflor; no obstante, se diferencia de esta porque sus cabezuelas florales son de color verde y los tallos de las inflorescencias poseen una textura más floja.



Figura 4.5. Fisiología del brócoli (Maroto et al., 2007)

Las distintas variedades cultivadas se pueden clasificar en: i) Ciclo corto, precoz o temprano, si se recolectan en menos de 90 días tras su siembra (recolección estival y otoñal); ii) Intermedias, si se recolectan entre 90 y 110 días tras su siembra. Estas son las más conocidas y ampliamente distribuidas; y iii) Ciclo largo o tardío, si se recolectan 110 días tras su siembra (recolección invernal y primaveral).

El brócoli se introdujo en España en los años 70 y también se le conoce con el nombre de brécol. Inicialmente se cultivó en la Comunidad Valenciana y Cataluña, posteriormente el cultivo se extendió a otras regiones españolas como Murcia y Andalucía; en fases más tardía es posible encontrarlo en regiones como Extremadura, Rioja, Navarra, Aragón y Castilla La Mancha (Maroto, 1995).

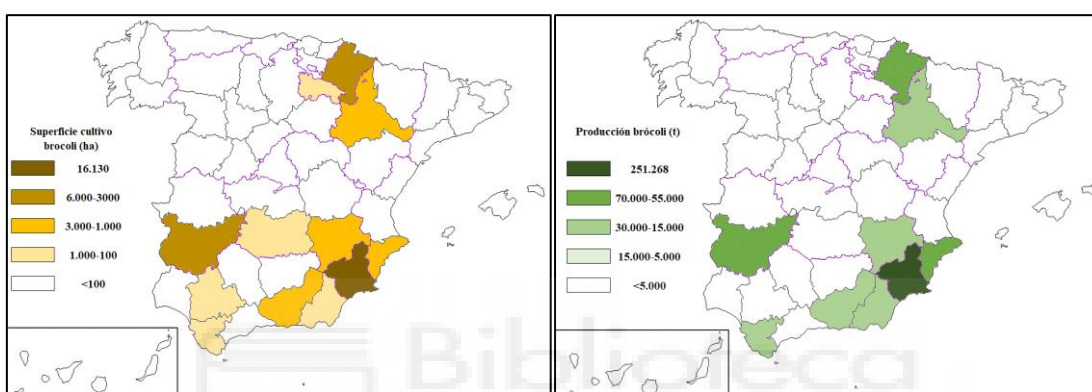


Figura 4.6. Izquierda superficie de plantación de brócoli (ha), izquierda producción de brócoli (t) en España del año 2021 (editado de MAPA, 2022).

El cultivo de brócoli y coliflor en el mundo consta de más de 1,3 millones de hectáreas de superficie de cultivo y una producción de más de 25,5 millones de toneladas, según los datos del 2020, siendo China e India los mayores países productores con más del 70% de la producción mundial (9,5 y 8,8 millones de toneladas respectivamente), seguidos de Estados Unidos (1,2 millones), España (0,75 millones), México (0,68 millones) e Italia (0,37 millones) (FAO, 2022). En los últimos años el brócoli es el cultivo hortícola que más ha crecido en España (figura 4.6), pasando de ser un desconocido a ser la hortaliza con una mayor tasa de crecimiento (principalmente en Murcia). La gran mayoría de la producción de brócoli se destina a la exportación, siendo todavía muy bajo su consumo interno; no obstante, esta tendencia está cambiando en los últimos años (Hernández, 2013). La producción de la principal área productora de coliflor (Murcia y Alicante) se destina sobre todo al mercado en fresco. Por el contrario, la producción de la segunda zona productora en importancia, Extremadura, se destina principalmente a la industria (alrededor del 70% de su producción de coliflor); de ahí la importancia de las congeladoras.

El principal destino de las exportaciones españolas de brócoli, coliflor, repollo, col china, etc., es la Unión Europea (95,3%), destacando Reino Unido como el principal país receptor, con 132.460 tm (31,09%) y con un importe que supera los 158,4 millones de euros. En segundo lugar, se encuentra Alemania, con 84.606 tm (19,8%) y 84,4 millones de euros, mientras que el tercer país de destino son los Países Bajos, con 62.297 tm (14,6%), que tuvo un valor en frontera de 63,6 millones de euros.

4.2 Uso para el riego en España de aguas no convencionales

Hoy en día, uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la agricultura en las zonas de clima árido es la escasez de agua producida por las bajas precipitaciones e intensificada por el cambio climático y la mala gestión histórica realizada de los recursos hídricos existentes. En la cuenca mediterránea el aumento de temperatura, la disminución de precipitaciones y el cambio en el régimen pluviométrico, conlleva periodos elevados de sequía (Morote et al., 2019). A su vez, la escasez hídrica se ve potenciada por el continuo aumento de la demanda de agua, tanto para uso municipal como para uso agrícola. Esta situación ha motivado que la Comisión Europea haya promovido iniciativas que reduzcan el consumo de agua y permitan el acceso a recursos de agua alternativos, como por ejemplo el uso de aguas residuales regeneradas (Erel et al., 2019; Truchado et al., 2021). En España existe la normativa del Real Decreto 1620/2007, en la que en su artículo 2, se define a las aguas regeneradas como aguas residuales depuradas, que, tras un tratamiento adicional en plantas de regeneración de agua depurada, cumplen los requisitos para ser utilizada como agua de servicio sin tener que ser diluidos por otros flujos de agua (figura 4.7). Actualmente el volumen de agua regenerada en España es de 268 hm³ por año lo que equivale a la reutilización del 10% de las aguas tratadas (Vecino et al., 2021). Del caudal de agua regenerada el 45% es utilizado en agricultura, 36% en parques y áreas recreativas, 10% en industria y el resto en otros usos urbanos (Jodar-Abellan et al., 2019).

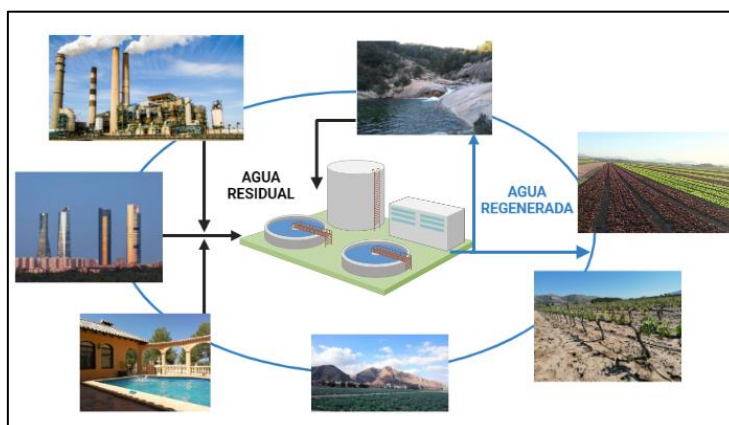


Figura 4.7. Esquema teórico para el aprovechamiento en el uso de aguas regeneradas.

En cuanto al uso agrícola de aguas regeneradas, la legislación española permite el riego de cultivos con sistema de aplicación del agua en contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco, siendo estos sometidos a un tratamiento industrial posterior antes de ser consumidos en crudo ([Real Decreto 1620/2007](#)). A su vez, se establecen las limitaciones en cuanto a los parámetros de contaminación de las aguas regeneradas tales como microorganismos, nitratos o fuentes de fósforo, contaminantes orgánicos y metales pesados (tablas 4.1a y 4.1b).

Tabla 4.1a. Criterios de calidad requerida para la reutilización de las aguas para uso agrícola (Real Decreto 1620/2007).

USO DEL AGUA PREVISTO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE				
	NEMÁTODOS INTESTINALES	<i>Escherichia coli</i>	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	TURBIDEZ	OTROS CRITERIOS
2- USOS AGRÍCOLAS ¹					
CALIDAD 2.12 a) Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco	1 huevo/10L	100 UFC/100 mL. Teniendo en cuenta un plan de muestreo a 3 clases con los siguientes valores: n=10 m=100 UFC/100 mL M=1.000 UFC/100 mL c=3	20 mg/l	10 UNT	OTROS CONTAMINANTES Contenidos en la autorización de vertido de aguas residuales: se deberá limitar la entrada de estos contaminantes al medio ambiente. En el caso de que se trate de sustancias peligrosas deberá asegurarse el respeto de las NCAs. <i>Legionella</i> spp. 1.000 UFC/L (si existe riesgo de aerosolización). Es obligatorio llevar a cabo la detección de patógenos Presencia/Ausencia (<i>Salmonella</i> sp., etc.) cuando se repita habitualmente que c=3 para M=1.000
¹ Características del agua regenerada que requieren información adicional: Conductividad 3,0 dS/m; Relación de Adsorción de Sodio (RAS): 6meq/L; Boro: 0,5 mg/L; Arsénico: 0,1 mg/L; Berilio: 0,1 mg/L; Cadmio: 0,01 mg/L; Cobalto: 0,05 mg/L; Cromo: 0,1 mg/L; Cobre: 0,2 mg/L; Manganeseo: 0,2 mg/L; Molibdeno: 0,01 mg/L; Selenio: 0,02 mg/L; Vanadio: 0,1 mg/L.					

Tabla 4.1b. Normas de Calidad Ambiental en el punto de entrega de las aguas regeneradas (Real Decreto 1620/2007).

PARÁMETRO	LÍMITE DE DESVIACIÓN MÁXIMA
Nemátodos intestinales	100% del VMA
<i>Escherichia coli</i>	1 unidad logarítmica
<i>Legionella</i> spp	1 unidad logarítmica
<i>Taenia saginata</i>	100% del VMA
<i>Taenia solium</i>	100% del VMA
Sólidos en suspensión	50% del VMA
Turbidez	100% del VMA
Nitratos	50% del VMA
Nitrógeno Total	50% del VMA
Fósforo Total	50% del VMA
*Se entiende por desviación máxima la diferencia entre el valor medio y el VMA	

Las ventajas que aporta la reutilización de aguas residuales tratadas son (Navarro, 2018; Jodar-Abellan et al., 2019; Maestre-Valero et al., 2019):

- Aumento de los recursos hídricos disponibles. Se pone a disposición de los usuarios un volumen de agua de menor calidad para el uso en actividades más restringidas, que no necesitan una elevada potabilidad, como son el riego, industria o uso urbano y recreativo.
- Disminución del coste de agua de riego, ya que es un recurso más económico que el uso de aguas de trasvase o desalinización.
- Disminución en la sobreexplotación de acuíferos.
- Disminución de vertidos de aguas residuales y su amenaza al medio ambiente.
- Reutilización de los nutrientes disponibles en las aguas reutilizadas. El uso agrícola de agua regenerada puede aportar un porcentaje importante de nutrientes en la programación final de fertirrigación de cultivos, teniendo este un impacto importante en el costo económico de la producción con un ahorro entre el 20% y el 80% en fertilización.

Las desventajas para el uso agrícola de agua reutilizada son (Real Decreto 1620/2007; Campos-Mañas et al., 2019; Maestre-Valero et al., 2019):

- La presencia de contaminantes microbiológicos tales como helmintos, *Escherichia coli*, sólidos suspendidos o turbidez.
- Alta concentración de elementos fitotóxicos tales como el cloro (Cl), el sodio (Na) o el boro (B) que exponen al cultivo a daños en tejidos y procesos metabólicos, reduciendo el rendimiento de la producción. Además, se puede poner en riesgo las propiedades del suelo por sodicidad y elevada conductividad eléctrica, aumentando la salinidad.
- Presencia de metales pesados que pueden contaminar el suelo y causar fitotoxicidad en cultivos, disminuyendo el rendimiento productivo y pudiendo llegar a ser un riesgo para la salud.
- Presencia de plaguicidas y otros productos de transformación de origen de la industria agroalimentaria o de residuos farmacéuticos.

La reutilización del agua, además de aumentar los medios disponibles, ofrece una gestión sostenible de los recursos hídricos. Sin embargo, el uso de agua regenerada en España está por debajo de lo proyectado para el año 2021 (35%) en el Plan Nacional de Reutilización de aguas. Es por eso por lo que la reglamentación europea y el Gobierno de España estudian nuevas normativas para potenciar la reutilización de aguas como fuente alternativa para el uso de agua potable, maximizando la seguridad en la calidad del agua regenerada para el riego agrícola.

4.3 Toxicidad de cadmio en la agricultura

4.3.1 Generalidades de los metales pesados

Los metales pesados son elementos o compuestos químicos con un alto peso atómico y una densidad muy superior a la del agua (cinco veces). Su naturaleza puede ser metálica o no, y pueden generar toxicidad en función de determinados factores, como la dosis, especie química o ruta de exposición (Tchounwou et al., 2012). La contaminación de metales pesados en suelo o en el agua riego con presencia de metales pesados provoca efectos perjudiciales en el suelo, lo que reduce la extensión de tierras aptas para la agricultura, penaliza el crecimiento de cultivos y pueden ser una amenaza en la sanidad alimentaria. Uno de los retos a los que se enfrenta la agricultura es usar eficazmente el riego de aguas regeneradas procedentes de plantas depuradoras de zonas urbanas o industriales que contienen en su composición compuestos que son perjudiciales para el desarrollo del cultivo. Entre estos compuestos se incluyen los metales níquel (Ni), manganeso (Mn), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdeno (Mo), hierro (Fe), plomo (Pb), zinc (Zn), aluminio (Al), arsénico (As), berilio (Be), talio (Tl), mercurio (Hg) y cadmio (Cd) (Shah y Daverey, 2020; Kumar et al., 2021). El Fe, Cu, Zn, Mn, Mo y Ni son microelementos necesarios para el desarrollo de las plantas que lo requieren a muy bajas concentraciones, pero que a elevadas concentraciones pueden provocar crecimientos irregulares o incluso la muerte por fitotoxicidad (Haider et al., 2021). Por el contrario, los metales pesados Hg, Cd, As y Pb no ofrecen ninguna funcionalidad como nutriente en el desarrollo de las plantas. La presencia de estos metales a muy bajas concentraciones afecta en su crecimiento a largo plazo y pueden resultar venenosos o tóxicos, debido a que son elementos bioacumulables que no se descomponen en el medio ambiente. El Cd es más soluble que el Hg, As y Pb, lo que hace que tenga una elevada movilidad en el sistema agua-suelo-planta (Hamid et al., 2020).

4.3.2 Aspectos generales del Cd

El Cd es un metal de transición del grupo XII, con número atómico 48 y peso atómico de 112,41, cuya composición química hace que sea similar al Zn y al Hg en sus propiedades fisicoquímicas. El principal estado de oxidación que presenta es de +2 y tiene un aspecto blanco cuyas propiedades físicas son ser maleable y dúctil. El Cd es insoluble en agua y es resistente a la corrosión, se quema en el aire y forma óxido de Cd. Es disuelto por diferentes ácidos, como el ácido sulfúrico, clorhídrico y nítrico, cuya reacción sulfato de cadmio, cloruro de cadmio y nitrato de cadmio, respectivamente (Sohail et al., 2019; Genchi et al., 2020).

El Cd es un metal de transición que se encuentra en la corteza terrestre entre 0,1 a 0,5 ppm y que por su elevada movilidad y solubilidad en agua ha llegado a contaminar reservas de agua subterráneas y suelo de todo el mundo. El Cd es un metal extremadamente tóxico y biopersistentes

cuyos efectos se mantienen durante décadas (Li et al., 2017; Haider et al., 2021). Esto supone que sea uno de los elementos más tóxicos que existen para los seres vivos. Es el único metal cuyo umbral de concentración tóxica es menor para los humanos que para las plantas; por lo que en ocasiones se consumen plantas sin ningún aparente síntoma fitotóxico, pero cuya concentración de Cd sí que puede ser dañina para los humanos (Shiyu et al., 2020). Los cultivos de hoja verde, el cacao, arroz, trigo, patatas, zanahorias y apio, son los cultivos con concentraciones de Cd más elevadas entre los alimentos consumidos (Genchi et al., 2020). El Cd es tóxico cuando su concentración en suelo supera los 8 mg kg⁻¹; en plantas es tóxico cuando la concentración en el tejido vegetal es igual o superior a 3 mg kg⁻¹ (Shahid et al., 2016; Shanying et al., 2017).

4.3.3 Origen y fuentes de contaminación de Cd

El Cd se almacena solo de modo temporal en el suelo ya que es un elemento muy móvil que se lixivia con mucha facilidad por las lluvias llegando a los acuíferos. Esto afecta a la concentración del Cd en las aguas subterráneas, siendo en los años lluviosos cuando más puede aumentar su contenido (Sprynskyy et al., 2011). De manera natural, el Cd se encuentra principalmente asociado al Zn, Pb y Cu en floraciones rocosas. También es un subproducto del reciclaje de metales como acero o hierro y aparece como impureza en los productos refinados del petróleo. Las principales fuentes antropogénicas de Cd para el medio ambiente son las emisiones derivadas de la refinación en minería, combustión, industria y agricultura (Aoshima, 2016; Shahid et al., 2016; Kubier y Pichler, 2019). Históricamente, el Cd se utilizó como pigmento en pinturas al óleo de la mano de algunos artistas del siglo XIX, los cuales utilizaban diferentes pigmentos como amarillo, naranja y rojo de Cd (Page y Bingham, 1973; Genchi et al., 2020).

En la actualidad, la demanda de Cd en la industria procede de su uso en la fabricación de baterías de Ni-Cd (80%) y la producción de productos de cloruro de polivinilo, pigmentos de color y agentes anticorrosivos (Khan et al., 2017; Riaz et al., 2021). Es por ello, por lo que las fuentes de contaminación de Cd en suelo se deben, por un lado, a los desechos industriales de la producción de baterías Ni-Cd que acaban en el suelo, a la aplicación a los cultivos de pesticidas a base de metales, y, al uso de lodos de depuradora usados como enmiendas orgánicas. Por otro lado, una de las fuentes principales de contaminación de Cd es la deposición atmosférica de fundiciones de metales de la industria metalúrgica, a través de la quema de desechos o combustibles fósiles y por el uso de fertilizantes fosfatados sintéticos que contienen Cd como impureza. El contenido de Cd en los fertilizantes fosfatados puede comprender desde 3,6 a 527 mg kg⁻¹, por lo que su aplicación es una causa importante de contaminación por Cd en los suelos agrícolas (Arenas-Lago et al., 2013; Kubier et al., 2019, Shiyu et al, 2020; El Rasafi et al., 2021).

Para determinar cómo se ha contaminado un recurso determinado por metales pesados es necesario llegar a la fuente que origina dicha contaminación. Sin embargo, la contaminación de

las aguas subterráneas puede ocurrir simultáneamente desde varias fuentes y diferentes rutas, lo que impide conocer la determinación del origen principal, las vías de dispersión y el control de los fenómenos geogénicos provocados (Sprynskyy et al., 2011). En el caso del Cd, las fuentes de cadmio pueden ser de carácter local y de carácter difuso. Las fuentes locales son aquellas de fácil seguimiento, como la industria, la minería y los desechos sólidos. En cuanto a las fuentes difusas son aquellas cuyo origen no es posible establecer y derivan del posible lixiviado de las fuentes locales y su posterior movilización. Entre las fuentes difusas están la reutilización de las aguas residuales, la combustión en los procesos de minería y fundición de metales, y las actividades agrícolas y ganaderas. Las fuentes difusas son el principal origen de dispersión de Cd en el medio ambiente y suponen en suelo un alto porcentaje del lixiviado a las aguas subterráneas: del 10-25% del estiércol del ganado, 15-50% de la deposición atmosférica, del 30-55% de los fertilizantes minerales y del 2-5% de los lodos y compost (Shiyu et al., 2020; Haider et al., 2021). Asimismo, la mayoría de las concentraciones de Cd mayores de 0,5 µg en acuíferos corresponden a cuencas hidrográficas con explotaciones intensivas de ganadería y agricultura. De lo que se deduce que, además de los fertilizantes fosfatados, las aportaciones excesivas de fertilizantes ricos en nitratos pueden provocar procesos de desnitrificación en aguas subterráneas, liberando Cd mineral lo que aumentaría la contaminación por deposición en los acuíferos (Taylor et al., 2016; Kubier et al., 2019; Sohail et al., 2019). El Cd se puede reabsorber a través de los cultivos y su posterior cosecha disminuyendo el contenido de Cd en suelo.

4.3.4 Propiedades del cadmio y movilidad en suelo

La concentración natural de Cd en el suelo es de 0,06-1,1 mg kg⁻¹, sin embargo, esta concentración varía en función del tipo de suelo. Así, en suelos formados por rocas sedimentarias se puede encontrar concentraciones más elevadas (0,3 a 15 mg kg⁻¹) junto con los suelos afectados por fertilizantes de fosfato de Cd (Shahid et al., 2016; Shanying et al., 2017). La toxicidad y efectos que produce el Cd no solo depende de la concentración de Cd que hay en el suelo, sino también de su concentración fitodisponible. Esta biodisponibilidad del Cd depende de las diferentes formas químicas presentes en el suelo (Shanying et al., 2017; Sohail et al., 2019; Riaz et al., 2021). En condiciones naturales el Cd se presenta en suelo como Cd²⁺ formando parte de complejos orgánicos e inorgánicos, de partículas de suelo asociadas a óxidos e hidróxidos de Fe y Mn, asociado a carbonatos, o unido a materia orgánica (Haider et al., 2021).

Los factores que influyen en la movilidad del Cd en suelo son (**figura 4.8**): el pH, el potencial redox del suelo, el contenido de materia orgánica, el contenido y la biodisponibilidad edáfica de nutrientes y los exudados de las raíces. De todos ellos, el factor que influye de modo más determinante en la solubilidad y movilidad del Cd es el pH (Sohail et al., 2019; El Rasafi et al., 2021). El pH afecta a la hidrólisis del Cd, que en soluciones acuosas se presenta como un catión

Cd^{2+} divalente. A pH menor de 6 y con oxigenación, el Cd permanece soluble en soluciones acuosas, y, en consecuencia, provoca un aumento en la absorción de Cd en las plantas. Sin embargo, su solubilidad se ve limitada por la formación de carbonato de cadmio (CdCO_3) o la adsorción de Cd en la fase sólida del suelo en suelos neutros a alcalinos (Kubier et al., 2019; El Rasafi et al., 2021). Al aumentar el pH, disminuye la disponibilidad del Cd en el suelo, esto a su vez aumenta la retención del Cd en la superficie mineral por medio de procesos de adsorción y precipitación (Shiyu et al., 2020; Haider et al., 2021).

El potencial redox afecta a la absorción y traslocación del Cd a las plantas, sin embargo, esta biodisponibilidad, es igualmente dependiente del pH. A pH ácidos y en condiciones oxidantes aumenta la absorción del Cd en las plantas, mientras que, en condiciones reductoras, esta disponibilidad del Cd se ve disminuida, esto puede ser debido a la formación de sulfuros y de complejos organominerales (Sohail et al., 2019; Riaz et al., 2021).

La materia orgánica induce cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo, al influir en el pH, conductividad, potencial redox y a la concentración de macro-micronutrientes. Es por ello por lo que el efecto de las materias húmicas en la biodisponibilidad del Cd depende de la naturaleza química del suelo (Shahid et al., 2016; Haider et al., 2021). En general, suelos con enmiendas orgánicas favorecen la retención del Cd en el suelo y disminuyen su absorción por las plantas. La materia orgánica forma complejos de Cd solubles e insolubles que afectan a su biodisponibilidad en suelo. Las sustancias húmicas de alto peso molecular favorecen la retención y posterior liberación del Cd al finalizar la mineralización de la materia orgánica. Por otro lado, los ácidos fúlvicos de bajo peso molecular son más reactivos y, favorecen la formación de quelatos. Además, las enmiendas orgánicas disminuyen la biodisponibilidad del Cd en el suelo, al promover reacciones de adsorción, la disolución reductora de Fe, Mn y el consumo de oxígeno y sulfatos (Kubier et al., 2019; Sohail et al., 2019; Riaz et al., 2021).

El estado mineral del suelo incide en la disponibilidad del Cd, así un exceso de aportes en nitratos induce una sobreactividad de los transportadores de la raíz, lo que puede provocar el aumento en la absorción de Cd por parte de la planta (Haider et al., 2021).

Los exudados de las raíces son subproductos del metabolismo de las plantas formados por compuestos de proteínas, péptidos, ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares que se liberan al suelo por medio de las raíces. Estas sustancias pueden inmovilizar el Cd en el suelo y proteger a las raíces disminuyendo su toxicidad y absorción por la planta y favorecer la absorción de nutrientes esenciales (Ismael et al., 2019; Haider et al., 2021).

La salinidad también afecta en la disponibilidad del Cd para las plantas. Los suelos salinos pueden aumentar la absorción del Cd si está asociado a sales de Na y K o formando complejos con aniones cloruro (Riaz et al., 2021).

La solubilidad del Cd y por lo tanto su movilidad a la planta, se ve favorecida en suelos ácidos, sin embargo, esta movilidad se puede ver limitada por la formación de complejos orgánicos e inorgánicos (Shahid et al., 2016). El Cd puede formar complejos hidrosolubles con aniones, como $CdCl^+$ o $CdSO_4^0$. Dependiendo de la composición del agua subterránea, del 55 al 90 % del Cd soluble total está presente como iones Cd^{2+} divalentes, mientras que el Cd restante está presente como complejos orgánicos e inorgánicos solubles como: $CdCl^+$, $CdCl_2^0$, $CdCl_3^-$, $Cd(SO_4)_2^{2-}$, $CdSO_4^0$, $CdHCO_3^-$, $CdCO_3^0$, $Cd(CO_3)_2^{2-}$, $CdOH^+$, $Cd(OH)_2^0$, $Cd(OH)_3^-$, $Cd_2OH_3^+$, $CdNO_3^+$ (Kubier et al., 2019). De entre estos compuestos, los óxidos, carbonatos e hidróxidos son insolubles lo que dificulta la disponibilidad del Cd en suelo. Además, la presencia de materia orgánica aumenta la capacidad de intercambio catiónico del suelo y promueve la formación de nuevos complejos orgánicos con el Cd que reducen su disponibilidad para la planta (Shiyu et al., 2020).

4.3.5 Mecanismo de absorción y translocación a la planta

El Cd es absorbido por la planta a través de la raíz, donde puede ser retenido en vacuolas, y transportado junto con la savia, en forma acomplejada al xilema o mediante transportadores en forma iónica hacia el floema, desde donde se transloca a brotes y semillas (figura 4.8). La distribución y transporte del Cd es un proceso dinámico de carga/descarga del xilema y carga/descarga del floema (Sohail et al., 2019; Haider et al., 2021). La absorción y transporte del Cd depende de su biodisponibilidad en el suelo, la cual depende de su concentración y de los factores que modulan su presencia en el suelo (pH, potencial redox, materia orgánica, exudados de raíces, etc.). A su vez, en otras ocasiones, el Cd puede ser absorbido de la atmósfera a través de las hojas. Otros factores que influyen en la disponibilidad del Cd para las plantas son el genotipo de las especies vegetales y su capacidad de acumulación. En general, el Cd se acumula en muy bajo contenido en tubérculos, semillas y frutos, mientras que su contenido aumenta según disminuye hacia la planta (brotes, hojas y raíces) (Ismael et al., 2019; Sohail et al., 2019).

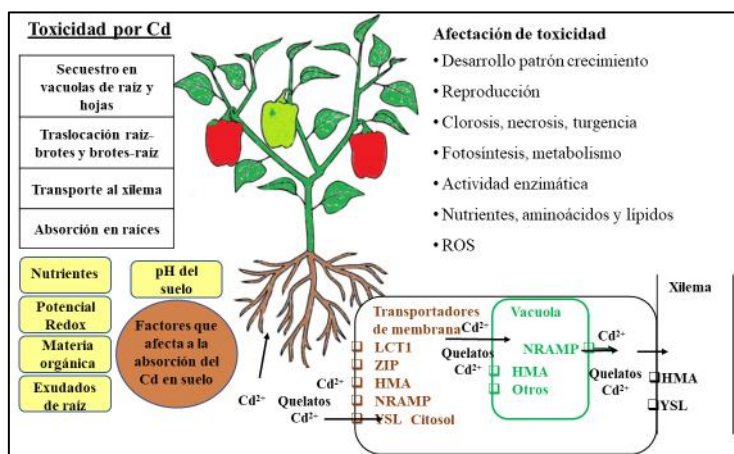


Figura 4.8. Resumen teórico para la absorción-transporte del Cd y efectos de su toxicidad (Editado de Ismael et al., 2019 y Haider et al., 2021).

El Cd se absorbe en el apoplasto de la raíz de forma rápida y pasiva, sin gasto de energía, debido a la interacción electrostática entre los cationes metálicos (carga +) y los grupos carboxilatos (carga -). A continuación, por vía simplástica, el Cd se absorbe a través de la membrana celular de la raíz a través de varios transportadores de metales no exclusivos del Cd cuya actividad varía en función del genotipo vegetal, el nivel de nutrientes y la biodisponibilidad del Cd (Ismael et al., 2019). Estos transportadores son (Ismael et al., 2019; Sohail et al., 2019; Songmei et al., 2019; Palusinska et al., 2020):

- LCT1: transportador de cationes de baja afinidad de Ca, Zn, Mg, Mn y Fe. Estos transportadores, en condiciones de estrés por Cd, aumentan la absorción de Ca^{2+} , acompañada de una absorción de alta afinidad por Cd^{2+} .
- ZIP (*IRT1*, *ZRT1*, *ZRT2*): transportadores de Zn y Fe. Pueden transportar metales pesados hacia el citoplasma. Estos transportadores pueden servir de vía de entrada para otros cationes divalentes como Mn, Zn, Ni, Co y Cd. En plantas hiperacumuladoras se sobre expresan estos genes en respuesta a la toxicidad por Cd.
- HMA: transportadores de la familia ATPasa que transportan el Zn y el Cd a través de los HMA2 y HMA4.
- NRAMP: transportadores de Fe, Mn y otros metales. Familia de proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural, conocidos como transportadores de iones metálicos acoplados a protones. Son capaces de transportar diferentes iones metálicos (Zn, Mn, Cu, Al, Fe, Cd, Ni, Pb y Co) y su actividad se sobre expresa en situaciones de estrés por Cd.
- YSL: captan Cd en forma complejada. Pertenecen a la familia de transportadores oligopéptidos (OPT) que transportan complejos de metal-nicotianamina, por lo que el Cd se transporta en forma quelatada con ácidos orgánicos. En plantas hiperacumuladoras se sobre expresan estos genes en respuesta a la toxicidad por Cd.

En la raíz, el Cd se transloca hacia el xilema mediante vía simplástica y/o apoplástica a través de transportadores específicos como las proteínas YSL o los AtHMA (2 y 4). A continuación, el Cd es conducido de la raíz a la parte aérea (hojas) gracias a la corriente de transpiración de modo unidireccional. Dentro de las células vegetales, el Cd se une a ligandos que contienen S, como las fitoquelatinas (PCs), el glutatión (GSH) y las metalotioneínas (MTs), estos complejos pueden ser transportados a vacuolas o al resto de los tejidos. (Rai et al., 2019; Haider et al., 2021). Los complejos de Cd con PC, GSH y MT se transportan a través del floema a larga distancia desde la fuente hacia el sumidero para desarrollar semillas (Ismael et al., 2019).

La cantidad de Cd que se transporta a las hojas dependerá de una serie de procesos complejos que involucran diferentes mecanismos: la forma y concentración del Cd en el xilema; la descarga de

Cd al xilema por parte de los transportadores de Cd y Zn HMA2 y HMA4; la capacidad de intercambio catiónico de las paredes celulares del xilema; el secuestro de Cd en vacuolas vegetales; los procesos de transporte y redistribución del Cd en el floema, hojas y nodos; y la extrusión de Cd fuera de la planta, (Huang et al., 2020; Riaz et al., 2021).

4.3.6 Toxicidad de Cd en las plantas

El cadmio afecta negativamente el crecimiento de las plantas y su toxicidad tanto a nivel morfológico como fisiológico. Sin embargo, el umbral de concentración fitotóxica de Cd varía significativamente entre las plantas en función de las especies, ecotipos, cultivares, etc. Así, las plantas hiperacumuladoras de Cd pueden tolerar y acumular Cd hasta 100 mg Cd kg⁻¹ (peso seco) en las hojas (0,01 g por 100 peso seco), que es 100 veces mayor que el acumulado por las plantas no hiperacumuladoras (Ismael et al., 2019; Haider et al., 2021). Para las plantas no hiperacumuladoras, el umbral de toxicidad de Cd en la solución nutritiva se ha establecido en 5–10 µM para cultivos hidropónicos y 5,0 mg kg⁻¹ en el suelo. En las plantas, este metal tiene un umbral de toxicidad de 3 a 30 mg kg⁻¹ de peso seco (Solís-Domínguez et al., 2007; Riaz et al., 2021). Las plantas no acumuladoras, cuando se exponen a concentraciones umbrales Cd, sufren varios síntomas de toxicidad. Estos fluctúan dentro de las plantas según varios factores, como el grado de contaminación del suelo, el período y el momento de la exposición, las especies de plantas, los cultivares y los ecotipos. A su vez, estos síntomas también dependen de la presencia de otros cationes y nutrientes, que pueden afectar la absorción o el transporte de Cd (Ismael et al., 2019). A continuación, se describen los síntomas y daños que produce el Cd en las plantas (**figura 4.8**).

Síntomas fisiológicos

En general los principales síntomas de toxicidad por Cd descritos son (Sohail et al., 2019; El Rasafi et al., 2021; Haider et al., 2021):

- Cambio en el patrón morfológico radicular: se produce una inhibición en el crecimiento, disminuye la longitud de la raíz y su masa seca, y aumenta su diámetro. Estos síntomas generan una disminución en la capacidad absorción y transporte de nutrientes al resto de la planta. La sintomatología morfológica en raíz se considera un indicador para evaluar la toxicidad por Cd.
- Síntomas parte aérea: se muestran cuando la concentración de Cd en el tejido alcanza 3–30 mg kg⁻¹ de peso seco. Como resultado del estrés por Cd en hojas aparece una serie de sintomatología variable como clorosis, desecación, necrosis, pérdida de turgencia. En el resto de la planta se observa inhibición de crecimiento, disminución en el desarrollo de la superficie foliar total y de la biomasa.

- Reproducción: el Cd disminuye la floración, cuajado de frutos y en la germinación de semillas. El Cd produce alteraciones de las funciones biológicas y de reproducción, que se pueden observar como una disminución en la floración, viabilidad del cuajado y tasas de germinación.

Daños en metabolismo, fotosíntesis y absorción de nutrientes

El retraso en el crecimiento de las plantas bajo estrés por Cd afecta negativamente a la absorción de agua y nutrientes debido al daño provocado a diferentes niveles celulares (Aoshima, 2016; Huybrechts et al., 2019; Shiyu et al., 2020):

- Deficiencia de nutrientes: el cadmio interfiere con los nutrientes minerales de las plantas, como el nitrógeno, fósforo, azufre (S), Fe, Ca, Mn, Mg, Cu, Si y K. Estas deficiencias pueden ser debidas a la competencia molecular entre el Cd y otros cationes en los canales para la absorción de metales esenciales desde el suelo hasta las raíces y los transportadores de metales dentro de las plantas. Esta competencia posteriormente puede conducir a una deficiencia en metales esenciales, lo que se denomina "deficiencia inducible".
- Inhibición de la fotosíntesis: el Cd provoca en primer lugar daños en el aparato fotosintético, particularmente en el complejo captador de luz II y en los dos fotosistemas (PSI y PSII). Este daño provoca la disminución en el contenido de carotenoides y clorofila, debido a su destrucción y a la afectación de su biosíntesis. Como consecuencia se hace visible el síntoma de clorosis en hojas jóvenes y viejas. El Cd también afecta a la transcripción de genes relacionados con la fotosíntesis.
- Asimilación de carbono: el Cd altera la actividad de varias enzimas claves del ciclo de Calvin, lo que incide en la disminución de la tasa fotosintética. También se ve afectada la ultraestructura del cloroplasto y reduce la conductancia estomática, que como resultado disminuye la tasa de transpiración de las hojas.

Daño oxidativo

El Cd causa estrés oxidativo en las plantas, ya sea directa o indirectamente a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Aoshima, 2016; Huybrechts et al., 2019; Sohail et al., 2019; Haider et al., 2021):

- El Cd contribuye indirectamente a la producción de ROS a través de la alteración de los cloroplastos de las hojas.
- El Cd puede estimular el desarrollo de ROS en la cadena de transferencia de electrones mitocondrial.

- Se produce una sobreproducción de NADPH en membrana plasmática al activar las actividades enzimáticas relacionadas con la acción oxidasa en peroxisomas, dando como resultado la generación de ROS, acumulación de NADPH-oxidasa y la sobreproducción de H₂O₂.
- El daño por ROS incluye la peroxidación de proteínas y lípidos, y daño en el ADN. El daño del ADN implica la destrucción de las membranas celulares y los ácidos nucleicos, pérdida de las funciones de las proteínas fotosintéticas y la disminución de la síntesis de proteínas, lo que influye en el crecimiento de todo el organismo.
- El Cd afecta a la transcripción de los genes de respuesta temprana inmediata, los genes de respuesta al estrés, los factores transcripcionales y los factores traduccionales.

4.3.7 Riesgo del cadmio en la salud

Según la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU (EPA), el Cd es el tercer contaminante principal de mayor peligro para el medio ambiente (después del mercurio y el plomo). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido una ingesta semanal tolerable (TWI) de Cd de 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, que es la cantidad máxima de cadmio que una persona puede ingerir semanalmente a lo largo de su vida sin manifestar efectos adversos. Según EFSA, la población europea tiene una ingesta media diaria de Cd del 35% del máximo recomendado, pudiendo llegar hasta el 135-208% en algunos grupos de población (EFSA, 2012). El Cd es un metal pesado altamente hepatotóxico, se considera el único metal que presenta riesgos para la salud en humanos a concentraciones que no son fitotóxicas para los vegetales. Esto significa que en muchas zonas que se consideran ligeramente contaminados con Cd, es posible que las plantas no muestren ningún síntoma de toxicidad. Sin embargo, pueden acumular Cd en sus partes comestibles por encima de los niveles permitidos para humanos (Genchi et al., 2020; Haider et al., 2021). Entonces, cuando estas plantas entran en la cadena alimenticia son altamente peligrosas y pueden causar varios problemas de salud. Por lo tanto, incluso en suelos con niveles permitidos de Cd, algunas plantas pueden acumular concentraciones más altas de Cd en sus semillas o partes comestibles que son peligrosas para la salud humana. En tales casos, es muy importante reemplazar los cultivares tolerantes a Cd con excluidores de Cd (Sohail et al., 2019; Haider et al., 2021).

La enfermedad por Cd en humanos se conoce de modo oficial desde el año 1912 en Japón, año en el cual hubo un gran brote de la enfermedad Itai-itai, como consecuencia de la contaminación por Cd del río Jinzu, debido al derrame de escorias desde una mina de Zn. Estas aguas regaban los arrozales circundantes y generó un gran impacto por metales pesados durante décadas en la prefectura de Toyama (Aoshima, 2016; Genchi et al., 2020)). Esta enfermedad es la más grave ocasionada por la exposición en humanos al Cd. Itai-itai muestra multitud de síntomas, desde

afectación en tejidos óseos (osteomalacia y la osteoporosis) y el aparato respiratorio (neumonía), hasta disfunción renal, acabando en muerte (Baba, et al., 2013; Aoshima, 2016; Nishijo et al., 2017). En los humanos, la exposición a niveles bajos de Cd puede provocar daños en los riñones, el hígado, el sistema óseo y el sistema cardiovascular, así como el deterioro de la vista y el oído. También genera trastornos del ciclo menstrual, afecta a las hormonas reproductivas y al retraso en la pubertad, al sistema cardiovascular, puede promover el desarrollo de enfermedades musculoesqueléticas, cáncer, etc. Junto con los fuertes efectos teratogénicos y mutagénicos relacionados con el Cd, también muestra efectos adversos en dosis bajas tanto en la reproducción como en la fertilidad (Aoshima, 2016; Nishijo et al., 2017; Kumar y Sharma, 2019; Genchi et al., 2020).

4.3.8 Distribución geográfica de la contaminación del cadmio en España

Las concentraciones de cadmio muestran un patrón diverso en los suelos de la Unión Europea. Solo el 5,5 % de superficie muestran concentraciones por encima del valor umbral (1 mg Cd por Kg de suelo). Las regiones con algunas de las concentraciones de cadmio más altas se pueden encontrar en Irlanda y Grecia. No obstante, podemos afirmar que las zonas agrícolas de Europa están a salvo de la contaminación por cadmio en la actualidad. Sin embargo, existen zonas agrícolas en Francia y España con concentraciones por encima de los valores de referencia establecidos para la tierra destinada a la producción de alimentos. Estas zonas suelen ser de origen minero o de actividades intensivas agrarias con aplicaciones elevadas de fertilizantes fosfatados (Tóth et al., 2016; Sakizadeh y Martín, 2021). En el caso de España (**figura 4.9**), los estudios realizados por Skizadeh y Martín (2021) muestran que son zonas con bajo contenido de Cd (menor a 0.2 mg kg^{-1}) en más de la mitad del territorio. Sin embargo, existen zonas aisladas que superan esa cantidad de Cd en el suelo. Así, en las provincias de Murcia, Alicante, Almería y Granada esta concentración podría deberse, además de a un origen minero de Pb-Zn, al uso de fertilizantes ya que son zonas de agricultura intensiva, al igual que sucede en el suroeste de España (Extremadura y Badajoz). En la zona de la cuenca del Ebro (Zaragoza, Huesca, Teruel, La Rioja, Tarragona y Castellón) el alto nivel de Cd disponible puede ser debido a la litología de origen calizo con suelos de pH elevados. Por otro lado, el contenido de Cd en la zona noroeste de España coincide con zonas pastizales de alta montaña, con elevado contenido de materia orgánica (Sakizadeh y Martín, 2021). Diversos modelos predictivos estiman un incremento de Cd en los suelos de España debido al descenso en el régimen de precipitaciones, lo que provocará un bajo nivel de lixiviación, un aumento del pH del suelo y a la acumulación de fertilizantes fosfatados con impurezas de Cd (Six y Smolders, 2014).

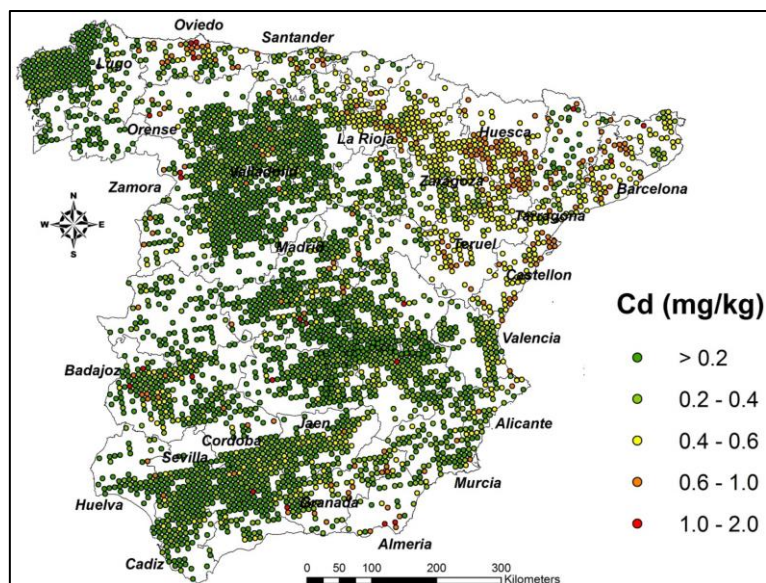


Figura 4.9. Contenido de Cd en muestras de suelo analizadas en España (*Fuente: Sakizadeh y Martín, 2021*).

4.3.9 Manejos para disminuir la toxicidad del cadmio en las plantas

La principal herramienta para reestablecer la calidad del suelo a las condiciones anteriores a su contaminación por Cd suele ser la restauración de ese suelo. Este es un proceso largo y sobre todo caro, que se realiza por medio de la limpieza de las áreas contaminadas a través de diferentes técnicas, como métodos físicos y químicos, incluidos procesos térmicos, separación física, métodos electroquímicos, lavado y estabilización/solidificación. Otra herramienta utilizada en la restauración de suelos es el uso de plantas hiperacumuladoras de metales pesados, las cuales pueden eliminar el Cd de una forma sencilla y rentable (colza o girasol) (Ismael et al., 2019; Haider et al., 2021).

Existe otra alternativa, la cual no está basada en la restauración del suelo, sino en minimizar el impacto de la toxicidad del Cd para las plantas y en extensión para el ser humano. Esta alternativa puede tener múltiples direcciones que conllevan tener una comprensión completa de cómo se moviliza el Cd dentro de las plantas, tanto a nivel fisiológico como genético. Algunas de estas acciones pueden ser (Aoshima, 2016; Ismael et al., 2019; Sohail et al., 2019; Hamid et al., 2020; Faizan et al., 2021; Haider et al., 2021; Riaz et al., 2021; Lu et al., 2022):

- El uso de cultivos cuyas partes comestibles no acumulen Cd y que pueden ser consumidas.

- Optimización de los fertilizantes. El uso de nutrientes esenciales tiene la capacidad de mitigar la toxicidad del Cd en las plantas y controlar la acumulación de Cd y otros metales pesados, particularmente en sus partes comestibles.
- La adición de biocarbón a los suelos agrícolas minimiza la disponibilidad del Cd y su acumulación y toxicidad en plantas.
- La aplicación de selenio (Se) en concentraciones muy bajas sobre plantas crecidas en suelo contaminado por Cd, mejora de forma beneficiosa el crecimiento y alivia el estrés por Cd.
- La aplicación exógena de ciertos reguladores hormonales (auxinas, ácido salicílico, citoquininas, epibrasinolida, etileno, melatonina o giberelinas) en condiciones de estrés por Cd, alivian sus síntomas al inducir la mejora de la actividad vegetativa y suprimir en cierto rango el efecto del daño oxidativo.
- El uso y mejora de las poblaciones de microorganismos en la rizosfera pueden ayudar a disminuir de modo eficiente la biodisponibilidad de Cd en el suelo para la planta. Bacterias aeróbicas (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp.) o ciertos hongos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus niger*, especies micorrícicas) son capaces de mejorar la calidad de la rizosfera, asociarse benéficamente a la planta, disminuir la biodisponibilidad del Cd y en consecuencia mejorar el desarrollo de los cultivos. Sin embargo, para la aplicación de microorganismos es necesario garantizar el enriquecimiento de alimento disponible y, principalmente, garantizar una excelente colonización de las raíces.
- El uso de enmiendas orgánicas aumenta la producción de los cultivos porque mejoran la calidad, la estructura y fertilidad del suelo. Los ácidos húmicos y fúlvicos, presentes en la materia orgánica, tienen el potencial de cambiar las propiedades fisicoquímicas del suelo. Mediante los grupos carboxilo y fenólico-OH, a los que se asocian, permiten que los ácidos interactúen con el Cd para formar complejos metálicos, lo que disminuye su solubilidad y transporte en el suelo, y en consecuencia disminuye la biodisponibilidad del Cd para las plantas.
- La aplicación de quitosano en el suelo reduce los síntomas producidos en condiciones de estrés por Cd. Esto es posible porque el quitosano es un precursor de quitina, sustancia que activa los mecanismos de defensa de las plantas y mejora la respuesta oxidativa, con lo que hace posible la mejora en el desarrollo y rendimiento de cultivos. El quitosano es un polímero ecológico convencional que actúa como un mediador antimicrobiano y puede ayudar en la absorción de nutrientes.

4.4 El Selenio en las plantas

4.4.1 Aspectos generales del Se

La investigación propiamente dicha del selenio (Se) comenzó en 1957, cuando los investigadores Schwartz y Foltz mostraron que la adición de este metaloide al forraje con él que se alimentaban las ratas prevenía la distrofia muscular y la cirrosis hepática (Rayman, 2000). Otro de los hitos importantes fue el descubrimiento de que el Se participa en las reacciones de estrés oxidativo en las que interviene la enzima glutatión peroxidasa (Rotruck et al., 1973; Behne y Kyriakopoulos, 2001). Después de estos descubrimientos, el Se pasó a considerarse esencial para los animales y los seres humanos (Hartikainen, 2005). Aunque, el Se realiza una gran multitud de funciones, sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas son las que más llaman la atención (Reid et al., 2008; Wallace et al., 2009; Hatfield et al., 2014), teniendo hoy en día una gran aplicación los compuestos de seleno-aminoácidos, selenio-cisteína (SeCys) y selenio-metionina (SeMet) desde el punto de vista biomédico (Dumont et al., 2006). El Se actúa como centro catalítico de varias enzimas como glutatión peroxidasa (GSHPx), tioredoxina reductasa y yodotironina-desyodasa, lo que hace que sea importante en la eliminación de los radicales libres, la protección contra el estrés oxidativo, el fortalecimiento del sistema inmunológico, etc. (Méplan, 2011; Kaur et al., 2014). Las deficiencias de Se en la dieta de los humanos causa retrasos del crecimiento, alteración del metabolismo óseo y anomalías en la función tiroidea (Reeves y Hoffmann, 2009). Ciertas regiones del mundo son deficientes en Se, mientras que en otras se está acumulando debido a la actividad antropogénica (Zhu et al., 2009). Diferentes agencias gubernamentales han recomendado un consumo de 25–34 $\mu\text{g día}^{-1}$ Se en adultos la dieta humana (EFSA, 2009; Malagoli et al., 2015; Wu et al., 2015; Vinceti et al., 2017). En humanos, la deficiencia de Se ocurre cuando la ingesta diaria es menor de 40 $\mu\text{g día}^{-1}$, mientras que la toxicidad crónica se da para valores de ingesta superiores a 400 $\mu\text{g día}^{-1}$ (Winkel et al., 2012).

En el forraje para alimentación animal, se considera un nivel bueno de Se las concentraciones de 0,05 a 0,10 mg kg^{-1} , mientras que la concentración tóxica estaría en torno a 2-5 mg kg^{-1} (Wu et al., 2015). Keshan y Kashin Beck son los nombres de las enfermedades que se producen por las deficiencias graves de Se en China y Serbia debido a la baja ingesta de Se en la dieta, producida por una ingesta de 7–11 $\mu\text{g Se día}^{-1}$ (Renwick et al., 2008; Wuet al., 2015). Síntomas tóxicos de Se se conocían mucho antes del descubrimiento de este elemento, cuando Marco Polo en el siglo XIII ya observó en la provincia de Shanxi, China, que el ganado moría al comer ciertas plantas que supuestamente son acumuladores de este metaloide (Bodnar et al., 2012). En las plantas, sin embargo, la esencialidad del Se es un tema actual de debate, aunque es indiscutible sus efectos beneficiosos cuando se aplica a bajas dosis, como ha sido mostrado por numerosos autores (Cartes et al., 2010; Hasanuzzaman et al., 2011; Saidi et al., 2014).

El Se fue descubierto accidentalmente por un químico sueco Jons Jacob Berzelius en 1817. La palabra selenio deriva de la palabra griega “selene” que significa luna (Reilly, 2006; Bodnar et al., 2012). El Se es un metaloide que pertenece al grupo 16 (Familia del Oxígeno) de la tabla periódica. Está situado en el mismo grupo de la tabla periódica que el S, por lo que su radio iónico es parecido y, por lo tanto, las propiedades físico-químicas de ambos elementos son similares entre sí (Bodnar et al., 2012). Debido a su capacidad semiconductora, el Se es ampliamente utilizado en la fabricación de componentes electrónicos y eléctricos. En la naturaleza, se puede encontrar como piritas de Cu, sulfuros de Pb, oro, y Cu. También es un subproducto de las operaciones metalúrgicas, y es ampliamente utilizado en la industria del vidrio, pinturas, aceite lubricante, pigmentos, suplementos alimenticios, productos agrícolas, etc. (Bodnar et al., 2012; Mehdi et al., 2013). Las plantas son la principal fuente de Se en la dieta de los seres humanos y los animales, por lo tanto, el conocimiento de los compuestos de Se en las plantas es crucial (Dumont et al., 2006). El Se comparte propiedades químicas similares al S, de tal manera que se introduce en las plantas a través de los transportadores de sulfato y se asimila en el interior de las plantas por la vía del metabolismo del S (Sors et al., 2005; Dumont et al., 2006).

4.4.2 Selenio en el medioambiente

El Se se encuentra de forma natural en rocas sedimentarias formadas durante el período carbonífero del cuaternario (White et al., 2004). En todo el mundo, la concentración promedio en el suelo es de $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$, sin embargo, en suelos seleníferos los niveles pueden alcanzar valores tan variables como $2\text{-}5000 \text{ mg kg}^{-1}$ (Hartikainen, 2005). Los países montañosos como Finlandia, Suecia y Escocia son generalmente deficientes en el contenido de Se en el suelo, mientras que los suelos de esquisto y las regiones áridas del mundo son regiones ricas en Se. Los países de Reino Unido, Francia, India, Bélgica, Brasil, Serbia, Eslovenia, España, Portugal, Turquía, Polonia, Alemania, Dinamarca, Eslovaquia, Austria, Irlanda, Grecia, Países Bajos, Italia, China, Nepal, Arabia Saudita, República Checa, Croacia, Egipto, Burundi y Nueva Guinea son deficientes en Se (Zhu et al., 2009; Yin et al., 2012), mientras que las regiones de noreste de Punjab India (Bajaj et al., 2011), el distrito de Enshi en la región de la provincia de Hubei en China (Feng et al., 2009), el estado de Para en Brasil (Lemire et al., 2009), Japón, Groenlandia (Fordyce, 2013), Estados Unidos, Venezuela y Canadá (Yin, et al., 2012) son ricas en Se. Alrededor del 80% de las reservas mundiales de este metaloide se encuentran en Perú, China, Chile, Estados Unidos, Canadá, Zambia, Filipinas, Zaire, Australia y Nueva Guinea (Liu et al., 2011). Aunque China está clasificada como el cuarto país con más reservas de Se del mundo, después de Canadá, Estados Unidos y Bélgica, existe una zona en la que se dan deficiencias. Esta zona se extiende desde la provincia de Heilongjiang en el noreste hasta la provincia de Yun-nan al suroeste del país, afectando al 71,2% de China (Zhu et al., 2009). Casi 40 países en el mundo tienen escasos recursos

naturales de Se. Ciertas áreas en países como Suiza, Corea, Australia, Nueva Zelanda y Finlandia también se identifican como regiones con bajo contenido en Se (Wu et al., 2015).

El nivel de Se recomendado por la OMS en el agua de consumo no debe tener más de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ como límite inferior (Gore et al., 2010; WHO, 2011; Mehdi et al., 2013). Actualmente, en aguas subterráneas, la concentración se está aumentando debido al uso excesivo de fertilizantes (Winkel et al., 2012) y ya ha alcanzado concentraciones de $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ en Bélgica, $2,4\text{--}40 \mu\text{g L}^{-1}$ en Francia (Mehdi et al., 2013) y $341 \mu\text{g L}^{-1}$ en Punjab, Pakistan, (Bajaj et al., 2011). En aguas continentales, y de mares y océanos, su concentración varía de 4.000 a $12.000 \mu\text{g L}^{-1}$. Las actividades naturales y antropogénicas vierten Se en la atmósfera, y juegan un papel importante en el ciclo biogeoquímico del Se en el medioambiente (Winkel et al., 2012). Las actividades antropogénicas causadas por el hombre como incendios forestales, erosión del suelo, quema de combustibles fósiles, llantas, y papel, etc. (Mehdi et al., 2013) también aumentan la concentración de Se en el aire. En la atmósfera, se presenta como compuestos de dimetil-diseleniuro (DMDS_e), metanoselenol y compuestos volátiles como el SeO_2 . Este último es inestable y se convierte en ácido selenioso. El contenido de Se en el aire es generalmente bajo, en comparación con al suelo o el agua, y oscila entre 1 y 10 ng m^{-3} (Mehdi et al., 2013).

El contenido de Se en los alimentos varía de una planta a otra. Depende de la capacidad de absorción y acumulación de la planta, contenido del suelo, que varía según las ubicaciones geográficas, y presencia de otros elementos en el suelo (Dumont et al., 2006; Bodnar et al., 2012; Mehdi et al., 2013). Las frutas generalmente contienen baja cantidad en comparación con las verduras. El contenido de selenio en los cereales oscila entre $0,01$ y $0,55 \mu\text{g g}^{-1}$, y en la leche y los productos lácteos varía entre $0,001$ y $0,17 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (FW) (Dumont et al., 2006). Las nueces de Brasil, las especies de *Brassica*, y, el ajo son acumuladoras de Se, y son fuentes naturales ricas de este elemento en la dieta (Dumont et al., 2006; Bodnar et al., 2012).

4.4.3 Selenio en plantas

4.4.3.1 Absorción de Se en las plantas

El Se existe en forma orgánica e inorgánica en la naturaleza. Las formas inorgánicas son selenato (SeO_4^{2-}), selenito (SeO_3^{2-}), seleniuro (Se^{2-}), y Se elemental. Las principales formas orgánicas son SeCys y SeMet (Sors et al., 2005; Bodnar et al., 2012; Wu et al., 2015). La absorción, translocación y distribución de Se en las plantas depende de su variedad y especie, estado fenológico, forma y concentración de Se en el suelo, condiciones fisiológicas del suelo (salinidad y pH del suelo) y presencia de otras sustancias (Zhao et al., 2005; Li et al., 2008; Renkema et al., 2012). El Se existe mayoritariamente como selenato en los suelos agrícolas de tipo ácido, y en las aguas de riego y de consumo humano (Sors et al., 2005; Missana et al., 2009), mientras que en los suelos ácidos la forma que más prevalece es el selenito.

Ambas formas de Se difieren en términos de su movilidad y absorción dentro de la planta y son metabolizados para formar compuestos orgánicos selenio (Li et al., 2008). La translocación de un ion o molécula hacia una parte en concreto de la planta depende de la tasa de carga en el xilema y la tasa de transpiración (Renkema et al., 2012). Kikkert y Berkelaar (2013) evaluaron la movilidad de las especies de Se en plantas de canola y trigo mediante el estudio del factor de translocación, llegando al siguiente orden: selenato > SeMet > selenito/SeCys. La absorción de Se en las plantas está mediada por transportadores presentes en las membranas de las células de la raíz. Se encuentra que el selenito es transportado por transportadores de fosfato (Liet al., 2008), mientras que el selenato se transporta por transportadores y canales de sulfato (Feist y Parker, 2001; Zhang et al., 2003). El estado nutricional dentro y fuera de la planta determina la preferencia de estos transportadores por el selenato o el sulfato. Bajo altas concentraciones externas de sulfato la selectividad de estos transportadores para el Se disminuye, y, los transportadores inducibles de sulfato mostraron una mayor selectividad para el sulfato que para el Se que los transportadores constitutivos de sulfato (White et al., 2004). En transportadores de sulfato de *Arabidopsis thaliana*, SULTR1;2 y SULTR1, se ha visto que transportan Se al interior de la planta (El Kassis et al., 2007). En plantas de *Triticum aestivum*, la inanición de S aumentó la absorción de Se (Li et al., 2008). Según varios investigadores, se sabe que la absorción de selenito se realiza a través de difusión pasiva (Terry et al., 2000; Ellis y Salt, 2003), sin embargo, en otros estudios se observó que la absorción se rige por un transporte activo ya que la absorción es inhibida por el inhibidor metabólico m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (CCCP) (Li et al., 2008). Terry et al., (2000) no observó ninguna participación de transportadores de membrana en la captación de selenito. Li et al. (2008) aumentó la absorción de selenito en plantas con deficiencia de fósforo, lo que indica que la absorción de selenito está mediada por transportadores de fosfato, y, estos resultados fueron apoyados por la disminución de la absorción de selenito cuando las concentraciones de fosfato son altas.

4.4.3.2 Acumulación de Se en las plantas y su metabolismo

En general, se ha encontrado que la concentración de Se es mayor en las hojas jóvenes que en las viejas durante el crecimiento de las plántulas (Cappa et al., 2014; Harris et al., 2014), y dentro de las células se acumula mayoritariamente en vacuolas (Ximénez-Embún et al., 2004; Mazej et al., 2008) pudiendo salir al citoplasma a través de los transportadores de sulfato presentes en el tonoplasto (Gigolashvili y Kopriva, 2014). En plantas del género *Fabaceae* se ha visto que se acumula el mayor número de especies de Se, catalogando a estas plantas como hiperacumuladoras de Se.

Las plantas son clasificadas como hiperacumuladoras, acumuladoras secundarias y no acumuladoras dependiendo de la concentración de Se acumulado dentro de sus células (Galeas et al., 2007; Bodnar et al., 2012). Las hiperacumuladoras acumulan cantidades altas de Se en sus

células en una concentración de 1.000 mg Se kg⁻¹ de peso seco (DW) y prosperan bien en las zonas del mundo ricas en Se. Estas plantas forman compuestos metilados de Se como SeCys y SeMet que confieren dicha tolerancia, y además lo pueden vaporizar adicionalmente como DMDS_e. Las plantas hiperacumuladoras incluyen al género *Stanleya*, especies de *Astragalus*, *Conopsis*, *Neptunia*, *Xylorhiza*, etc. Las plantas acumuladoras secundarias pueden acumular Se y no mostrar signos de toxicidad hasta 100–1000 mg Se kg⁻¹ DW. Un ejemplo son *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Brocoli*, *Helianthus*, *Aster*, *Camelina*, *Medicago sativa*, etc. Las no acumuladoras son aquellas plantas que acumulan menos de 100 mg Se kg⁻¹ DW, y si crecen en los suelos ricos en Se no pueden sobrevivir, ya que se da un crecimiento retardado e incluso la muerte. Estas normalmente son gramíneas y cultivos agrícolas (Galeas et al., 2007; Bodnar et al., 2012). Cuando en las plantas no acumuladoras se enriquecen con Se, este es secuestrado rápidamente por las vacuolas de las células del mesófilo de las hojas (Ximénez-Embún et al., 2004; Mazej et al., 2008).

Como el Se es químicamente similar al S, compite con este siendo transportado dentro de la planta (**figura 4.10**) a través de transportadores de sulfato presentes en la membrana plasmática de las células de la raíz (Sors et al., 2005; Li et al., 2008). Cuando entra en la planta, se transloca a las hojas y se metaboliza en los plastidios, a través de la bioquímica del sulfuro, a SeCys o SeMet. Estos, además, pueden metilarse y vaporizarse en la atmósfera en una forma no tóxica (Pilon-Smits y Quinn, 2010). El primer paso en la asimilación de Se es la conversión de Se inorgánico a selenito. Requiere la acción secuencial de dos enzimas como son la como ATP-sulfurilasa (APS) y APS-reductasa (APR). APS cataliza la hidrólisis de ATP a la forma de adenosina fosfoselenato, que se reduce en selenito por APR (Sors et al., 2005). El selenito se convierte luego en seleniuro mediante la enzima sulfito reductasa. En las plantas, este paso también puede ser reducido por el glutatión o glutaredoxina (Wallenberg et al., 2010). El selenito es entonces convertido en SeCys por acoplamiento con O-acetilserina (OAS) en la presencia de la enzima cisteína sintasa. Cisteína-sintasa tiene una mayor afinidad por los selénidos en comparación con el sulfuro. Dependiendo de la especie de la planta y condiciones medioambientales el SeCys puede luego ser convertido a Se elemental en presencia de la enzima SeCys-liasa o puede ser metilado a methyl-SeCys (Me-SeCys) por la enzima selenocisteína metiltransferasa o puede convertirse en selenometionina (SeMet) por una serie de enzimas. SeMet puede ser utilizado para formar seleno-proteínas o metilado para formar metil-SeMet (Me-SeMet). Me-SeCys o Me-SeMet pueden volatilizarse a la atmósfera como dimetil-selenuro no tóxico (DMSe) en plantas no hiperacumuladoras o en DMDS_e en plantas hiperacumuladoras (Pilon-Smits y Quinn, 2010).

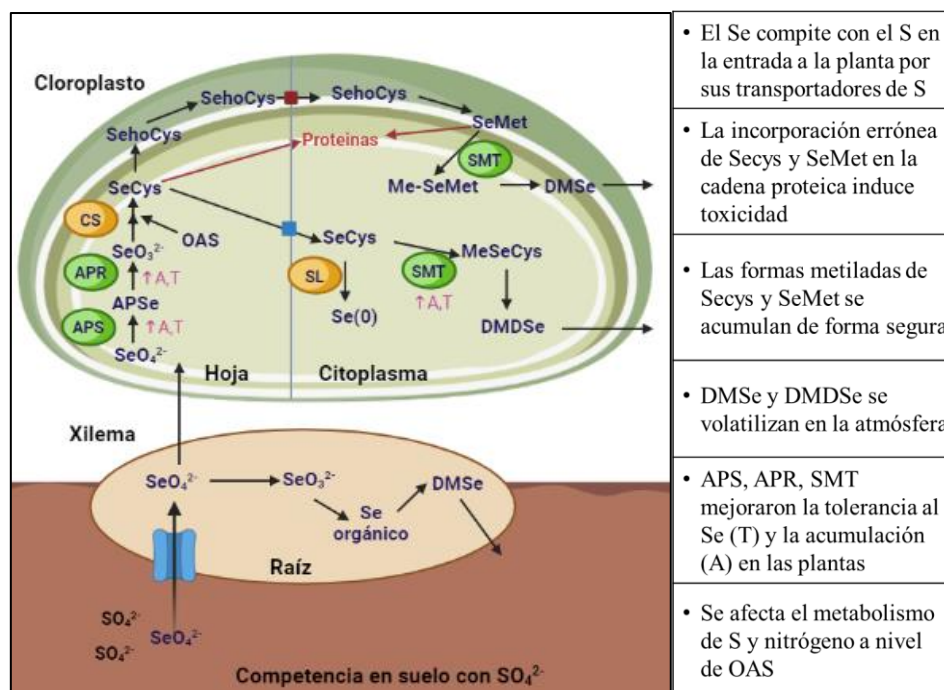


Figura 4.10. Representación esquemática del metabolismo del Se dentro de las células de las plantas (Editado de Gupta y Gupta, 2017).

4.4.3.3 Formas de acumulación de selenio en las plantas

Brassica juncea es una planta acumuladora secundaria de Se que muestra un patrón de acumulación que depende de la especie de Se absorbida. Los experimentos de cinética demostraron que el selenato se absorbe más eficiente que cualquier otra especie de Se. En plantas de *Brassicaceae* enriquecidas con SeMet, la especie que más se acumula es Se-MeSeCys (selenometilselenocisteína), seguida de Se-Homocisteína y Se-Cystationine. En plantas enriquecidas con selenato, los análisis realizados en un equipo de LC-ICP-MS mostraron que en las hojas y brotes las principales especies de Se fueron selenato, Se-MeSeCys y SeMet, mientras que en la raíz fueron selenato, selenito y SeMet. En plantas enriquecidas con selenito, en las hojas se encontraron una gran cantidad de SeMetSeOxido hidratado seguido de selenito y SeMet, mientras que en la raíz los metabolitos mayoritarios de Se fueron SeMet y Se-MeSeCys. Por la técnica de cromatografía de gases-masas también se ha confirmado que las plantas *Brassicaceae* pueden volatilizar Se en forma de DMSe y DDMS (Dumont et al., 2006).

En plantas de *Oryza sativa* la acumulación de Se se da principalmente en las formas orgánicas como SeMet, Se-MeSeCys y SeCys (Carey et al., 2012). Los estudios mostraron que en el grano de arroz el Se se concentró mayoritariamente en el salvado y su concentración dobla la de los niveles encontrados en granos limpios. El contenido de Se en arroz disminuyó siguiendo el siguiente orden: paja > salvado > grano integral > arroz pulido > cáscara (Sun H.-W. et al., 2010). En ajo, la forma más predominante de Se es Se-MeSeCys, que representa la mayoría de las propiedades anticancerígenas del ajo, seguido por SeMet y SeCys. En cebollas la forma

mayoritaria también es Se-MeSeCys (Zhu et al., 2009). En Brócoli, Se-MeSeCys, selenato, y selenito son las formas principales (Wu et al., 2015), mientras que en champiñones la forma en la que más se acumula el Se es SeMet (Dumont et al., 2006). En las plantas de *Astragalus bisulcatus*, Se-MeSeCys es la principal forma en la que se acumula el Se, mientras que en sus semillas se encuentra como g–glu–Se-MeSeCys (g–glutamil selenometilselenocisteína). En las nueces de Brasil, el SeMet es el compuesto de Se más relevante (Dumont et al., 2006; Zhu et al., 2009). En cereales como el trigo, el centeno y la cebada SeMet es el compuesto más dominante (Stadlober et al., 2001; Poblaciones et al., 2014). La planta hiperacumuladora de Se *Stanleya pinnata* acumula Se hasta el 90% del total como Me-SeCys en tejidos vegetales (Freeman et al., 2006).

4.4.3.4 Efectos beneficiosos del selenio en plantas

Aunque la esencialidad del Se en las plantas sigue siendo un tema de controversia, sin embargo, muchos investigadores han reportado los efectos beneficios que tiene el Se en las plantas (Cartes et al., 2010; Hasanuzzaman y Fujita, 2011; Pandey y Gupta, 2015). Todas las funciones del Se mencionadas a continuación están interrelacionadas entre sí y contribuyen al crecimiento general y desarrollo de la planta bajo estrés y sin estrés: mantienen las estructuras celulares y sus funciones, regula los sistemas antioxidantes, reduce la toxicidad por metales pesados, ayuda a la distribución de los nutrientes esenciales, participan en el crecimiento y desarrollo de las plantas, y, interviene en los procesos de fotosíntesis. Los estudios han demostrado que la aplicación de dosis bajas de Se protegen a las plantas a una gran variedad de estreses abióticos como el frío (Chu et al., 2010), sequía (Hasanuzzaman y Fujita, 2011), deshidratación (Pukacka et al., 2011) y metales pesados (Kumar et al., 2012; Pandey y Gupta, 2015). En condiciones de estrés se producen ROS que alteran las membranas celulares, las proteínas, etc. Así, Cartes et al. (2010) observó una reducción de la toxicidad de Al en el centeno al aplicar Se por la disminución de radicales superóxidos. También se dio una reducción en la acumulación de ROS en algas marinas estresadas por Cd después de la aplicación de 50 μM Se (Kumar et al., 2012) y en plántulas de *Brassicas* estresadas por Cd después de la aplicación de 2 μM Se (Filek et al., 2008). Del mismo modo, el Se disminuyó la acumulación de ROS en plantas de sorgo (Djanaguiraman et al., 2010), y de frijol sometidas a estrés por calor (Malik et al., 2012). Sin embargo, en dosis altas, el Se actuó como un prooxidante y provocó estrés oxidativo en plantas, por ejemplo, en raíces de *Vicia faba* estresadas por Pb la aplicación de 1,5 μM de Se redujo el ROS, pero una aplicación de 6 μM lo aumentó disminuyendo la viabilidad celular (Mroczek-Zdyrska y Wojcik, 2012). Filek et al. (2010) reportó un efecto positivo de 2 μM Se al mantener la estructura y la fluidez de las membranas de los cloroplastos en plántulas de colza estresadas por Cd. Un efecto similar se observó cuando las plantas de trigo se enfrentaron a la toxicidad por Cd (Filek et al., 2009). Estos efectos positivos se podrían atribuir a la reactivación de enzimas de las membranas o al transporte de metabolitos en los cloroplastos, debido, posiblemente, a que el Se es capaz de mediar en la

reducción de las fugas electrolíticas y la mejora de la integridad celular (Zembala et al., 2010; Pukacka et al., 2011; Malik et al., 2012). Djanaguiraman et al. (2010) notificó un efecto positivo de la dosis de Se en la fotosíntesis de plantas de sorgo, lo que podría deberse a la disminución de los niveles de ROS y a un aumento de la actividad antioxidante. Del mismo modo, Wang et al., (2012) encontró un aumento de la fotosíntesis en plántulas de arroz a dosis bajas de Se.

Hay estudios que han observado un papel beneficioso del Se en la protección de las plantas a la toxicidad por metales pesados, que podría atribuirse a que el Se reduce la absorción de metales pesados por las raíces, y, a la formación de compuestos Se-metal que no son tóxicos para las células (Belzile et al., 2006; Filek et al., 2008; Pedrero et al., 2008; SunG.-X. et al., 2010; Zembala et al., 2010; Feng et al., 2011). Además de la inhibición de la absorción de metales pesados por el Se, se ha observado que este tiene un papel activo en la captación de Fe (Feng R.W. et al., 2009; Feng y Wei, 2012), y podría considerarse como uno de los mecanismos mediados para reducir la toxicidad de los metales en las plantas, ya que el Fe es un componente importante de los cloroplastos y la cadena de transporte de electrones de los sistemas fotosintéticos (Heetal., 2004). Además de las funciones mencionadas anteriormente, se ha visto que el Se retrasa la senescencia (Xue et al., 2001), aumenta el rendimiento en *Cucurbitaceas* (Germ et al., 2005), aumenta el valor nutritivo de las patatas (Turakainen et al., 2006), aumenta el potencial respiratorio en *Pisum sativum* (Smrkolj et al., 2006), achicoria (Germ et al., 2007) y *Erucasativa* (Germ y Osvald, 2005), protege las plantas de patógenos, insectos y herbívoros (Freeman et al., 2006; Quinn et al., 2010), etc.

4.4.3.5 Toxicidad por selenio en plantas

La selenosis o la toxicidad de Se ocurren en las plantas cuando en las hojas o raíces se excede la concentración óptima. El Se causa toxicidad por dos mecanismos, uno de los cuales es la mala formación de las seleno-proteínas y otro mediante la inducción de estrés oxidativo. Ambos mecanismos son dañinos para las plantas de una u otra manera. La toxicidad debida a la mala formación de seleno-proteínas se debe a la incorporación incorrecta de SeCys o SeMet en lugar de Cys o Met en la cadena proteica. En la cadena de proteínas, los residuos de cisteína juegan un papel importante en la estructura y función de proteínas, y ayuda a la formación de puentes disulfuro, catálisis enzimática y unión a los metales. Por lo tanto, la sustitución de Cys por SeCys es perjudicial para la estructura y la función de la proteína, debido a que SeCys es una molécula más grande, reactiva y se desprotona con mayor facilidad que Cys (Hondal et al., 2012), como se observó en las pruebas de sustitución con SeCys de la enzima metionina sulfóxido reductasa (Châtelain et al., 2013). La presencia de SeCys distorsiona la estructura terciaria de las proteínas debido a formación de puentes de diselenuro más grandes y a su alto potencial redox (Hondal et al., 2012). Las estructuras Fe-S de las proteínas de la cadena de transporte de electrones de cloroplastos y mitocondrias (Balk y Pilon, 2011) son propensas a la sustitución de SeCys (Pilon-

Smits et al., 2002), debido a que las estructuras Fe-Se son de gran tamaño y no encajan correctamente en las apoproteínas. La actividad nitrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* disminuyó cinco veces después de la sustitución de Fe-S por Fe-Se (Hallenbeck et al., 2009). Sin embargo, en otro estudio este cambio demostró ser beneficiosa para las reacciones del glutatión peroxidasa en *Citrus sinensis* (Hazebrouck et al., 2000).

En dosis altas de Se también se ha visto que este actúa como un elemento prooxidante y genera cierta cantidad de ROS que causa estrés oxidativo en las plantas, lo que da lugar a una disminución del nivel de glutatión (Hugouvieux et al., 2009), excepto en plantas tolerantes a Se (Grant et al., 2011). En otro estudio realizado por Grant et al. (2011) en plantas mutantes cad2-1 defectuosas en la ruta sintética del glutatión se observó la disminución de la longitud de la raíz en comparación con plantas no mutantes cultivadas en 20 µM de selenato. En plantas de Inapr2-1 mutantes de Arabidopsis, la reducción del glutatión y la acumulación de ROS fue interrelacionada entre sí en condiciones de estrés por Se (Grant et al., 2011). También se observó un incremento de la peroxidación lipídica en plantas de trigo por la toxicidad de Se (Łabanowska et al., 2012). Varios estudios detectaron un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes que indican acumulación de ROS bajo estrés por Se (Gomes-Junior et al., 2007; Chen et al., 2008; Akbulut y Cakir, 2010; Schiavon et al., 2012). Tamaoki et al. (2008) encontraron mayor acumulación de ROS en los mutantes vtc1, que tienen defectos en la vía biosintética del ácido ascórbico, en comparación con plantas no mutantes bajo estrés. En otro estudio, se generaron mecanismos de defensa a ROS iniciado contra este tipo de estrés (De Pinto et al., 2012). Estudios posteriores informaron que la acumulación de ROS bajo Se aumentó por la peroxidación lipídica produciendo mortalidad celular en Arabidopsis y *Vicia faba* (Lehotai et al., 2012; Mroczek-Zdyrska y Wójcik, 2012).

5. OBJETIVOS



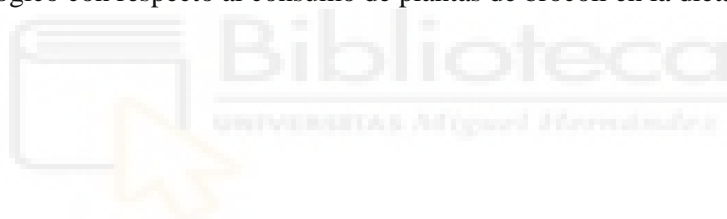
5. OBJETIVOS

Hoy en día existe una creciente preocupación por la contaminación ambiental por cadmio (Cd) ya que este es un metal pesado que cuando es consumido en la dieta humana o animal puede provocar enfermedades graves. Pero, además, su presencia en los sistemas agrícolas provoca la disminución y calidad de la cosecha. En plantas, esta toxicidad depende principalmente del genotipo y variedad de cada cultivo, y de la biodisponibilidad del Cd en el suelo. El Cd se puede encontrar disuelto en el agua, absorbido en la fracción orgánica y mineral del suelo, formando parte de la estructura química de los minerales, precipitado con otros compuestos del suelo y/o como parte de estructuras biológicas. En las plantas, su biodisponibilidad depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos. En plantas “no hiperacumuladoras”, el umbral de toxicidad de Cd en el agua de riego se ha establecido en valores de 5–10 μM Cd y en el suelo en 5,0 mg kg^{-1} . En las plantas, este umbral se sitúa entre 3–30 mg kg^{-1} de peso seco en hojas. Los efectos tóxicos del Cd en las plantas han sido ampliamente estudiados, y entre otros síntomas, afecta al desarrollo y crecimiento de la planta, a la absorción de nutrientes, limita la fotosíntesis, el metabolismo y el correcto funcionamiento enzimático y produce un elevado daño oxidativo.

Actualmente se investiga cómo reducir o mitigar los efectos negativos de este metal en plantas cultivadas en zonas agrícolas en las que el agua de riego tiene un alto contenido de Cd. Diferentes estudios han mostrado que la aplicación de sustancias bioestimulantes pueden disminuir la absorción y acumulación de Cd en las plantas, y en consecuencia disminuir su efecto tóxico. Los bioestimulantes son productos agroquímicos empleados actualmente en la agricultura con el fin de mejorar la productividad y la calidad de las plantas. Estos productos contienen sustancias que pueden mejorar la disponibilidad de los nutrientes del suelo, estimular la capacidad de las plantas para utilizar los nutrientes y, en algunos casos, para hacer frente a diferentes tipos de estrés abiótico/biótico. Además, al mejorar de manera eficiente la adquisición de nutrientes por parte de las plantas, los bioestimulantes podrían permitir reducciones en el uso de fertilizantes químicos convencionales, promoviendo la sostenibilidad ambiental en la agricultura. Las sustancias bioestimulantes, aplicadas en pequeñas cantidades a las plantas, semillas o en el suelo, pueden estimular la tolerancia del cultivo a condiciones ambientales adversas, como son el crecimiento en suelos contaminados por metales pesados, en salinidad, sequía, inundación, temperaturas extremas (frio o calor) y radiación ultravioleta. Estas sustancias bioestimulantes se agrupan en diferentes familias: sales inorgánicas, sustancias húmicas y fúlvicas, derivados de quitina y quitosano, materiales orgánicos complejos, extractos de botánicos y de algas, ácidos orgánicos, hidrolizados de proteínas y aminoácidos, proteína animal/vegetal y microorganismos beneficiosos. Hoy en día, es necesario continuar la búsqueda de sustancias que limiten la biodisponibilidad del Cd en suelo, bloqueando su entrada en la planta, disminuyendo su

acumulación en tejido y aliviando su toxicidad en el cultivo. Por lo tanto, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es obtener la base del conocimiento científico necesario para formular productos bioestimulantes con sustancias que limiten la acumulación de cadmio en los cultivos y que disminuya su toxicidad dentro de la planta. Para alcanzar este objetivo principal nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- a) Caracterizar los efectos de la toxicidad por Cd en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas de pimiento y brócoli.
- b) Evaluar los efectos que tienen la aplicación foliar o radicular de selenio en plantas de pimiento bajo estrés por Cd en el crecimiento vegetativo, procesos fisiológicos y bioquímicos, absorción, transporte y acumulación de Cd, y, metabolismo del nitrógeno y carbono.
- c) Evaluar los efectos que tienen la aplicación foliar y radicular de selenio, Biocat G (granulado de materia húmica y fúlvica) y quitosano en plantas de brócoli en la absorción, transporte y acumulación del Cd a los tejidos comestibles, crecimiento vegetativo, desarrollo vegetativo y rendimiento del cultivo, realizando, además, un estudio toxicológico con respecto al consumo de plantas de brócoli en la dieta humana.





6. MATERIALES Y MÉTODOS



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ensayo en pimiento

6.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para el experimento con plantas de pimiento estas se obtuvieron a partir de semillas (*Capsicum annuum* L.) de la variedad comercial ‘Cristal’ (adquirida en Ramiro Arnedo Seeds, Murcia), las cuales fueron germinadas en bandejas de plástico, rellenas de vermiculita estéril, en una cámara de germinación (**Imagen 6.1**). Las semillas fueron previamente esterilizadas con una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2% durante 5 minutos, y luego se lavaron con abundante agua desionizada. Una vez germinadas, se trasladaron a una cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas en las que se fijaron los siguientes parámetros: fotoperiodo de 16 h con un $PAR = 500 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura del aire de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y humedad relativa del 60%. Cuando las plántulas alcanzaron un tamaño de aproximadamente 10 cm de altura, se trasladaron a tres recipientes de 9 L para su aclimatación en dicha cámara, y, al alcanzar el tamaño adecuado, cada una fue trasplantada a envases hidropónicos individuales de 1L. Tanto en el periodo de aclimatación en substrato (recipientes de 9 L) como en los recipientes hidropónicos (1 L) se utilizó para el cultivo de las plantas la solución nutritiva compuesta por la siguiente concentración de macronutrientes (mM): 20 N, 0,75 P, 4,2 K y 6 Ca; y micronutrientes (μM): 23 B, 2 Mn, 2 Zn, 0,5 Cu, 0,5 Mo y 20 Fe. En el cultivo hidropónico se hacía pasar un flujo continuo de aire a través de la solución nutritiva para evitar condiciones de hipoxia (falta de oxígeno). En los envases de 1 L, la solución nutritiva se renovó semanalmente, y, el pH se ajustó cada tres días con NaOH (1 mM) en un rango entre 5,5–6,0.



Imagen 6.1. Plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de la variedad comercial ‘Cristal’ empleadas para el ensayo.

6.1.2 Tratamientos con Cadmio y Selenio

Cuando las plantas empezaron a crecer regularmente en las condiciones de hidroponía se aplicaron los tratamientos de Cd y Se cuya duración fue de dos semanas. Con respecto al Cd se aplicaron dos tratamientos: i) control con ausencia de Cd en la solución nutritiva (-Cd/-Se) y ii) alta concentración de cadmio (+Cd) en la solución nutritiva a una concentración de 3 mg L^{-1} ($8,5 \text{ } \mu\text{M}$), aplicado como $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**Imagen 6.2**). Las plantas cultivadas con alta concentración de Cd se dividieron a su vez en tres subgrupos: (ii.1) plantas no tratadas con Se (+Cd/-Se), (ii.2) plantas tratadas con Se foliar (+Cd/+SeF), y (ii.3) plantas tratadas con Se aplicado a la solución nutritiva (+Cd/+SeR). La aplicación de Se foliar se aplicó al inicio y siete días después de iniciar el tratamiento con Cd pulverizando las plantas con una solución que contenía Se a una concentración de $10 \text{ } \mu\text{M}$ en forma de Na_2SeO_4 . El selenio para el tratamiento radicular se aplicó adicionando Na_2SeO_4 a la solución nutritiva hasta alcanzar una concentración final de $10 \text{ } \mu\text{M}$. Para cada tratamiento se disponía de 6 plantas que se distribuyeron aleatoriamente en la cámara de crecimiento.

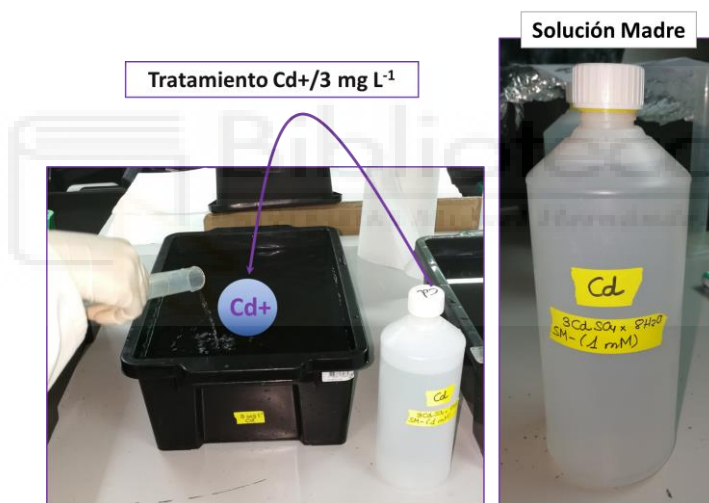


Imagen 6.2. Cadmio en la solución nutritiva a una concentración de 3 mg L^{-1} ($8,5 \text{ } \mu\text{M}$), aplicado como $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$.

6.1.3 Parámetros analizados

6.1.3.1 Parámetros de intercambio de gases, fluorescencia de clorofilas y contenido de clorofila

En las plantas, antes de su cosecha, se midió la tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{CO_2}) y la transpiración foliar (E_{leaf}) (**Imagen 6.3**). Se empleó un sistema portátil de fotosíntesis modelo CIRAS-2 (Sistema PP, Amesbury, MA, EE. UU.). Durante las mediciones, el equipo se configuró para mantener una intensidad de luz constante en la cámara de PAR $1000 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y concentración de CO_2 de 400 ppm. Los parámetros de fluorescencia de las clorofilas fueron también medidos en las hojas usando un fluorómetro de pulso modulado modelo FMS-2

(Hansatech, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido). Los parámetros medidos fueron: eficiencia cuántica de PSII, $\phi_{PSII} = F_m' - F_s / F_m'$; eficiencia de las antenas de PSII, $F_v' / F_m' = (F_m' - F') / F_m'$, y el coeficiente de extinción fotoquímica, $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$, donde F_s es el rendimiento de fluorescencia en el estado estacionario, F_m' es el valor máximo de fluorescencia cuando todos los centros de reacción se cierran después de un pulso de luz saturada ($12.000 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ durante 0,8 s) y F_0' es la fluorescencia mínima de las hojas adaptadas a la luz que se obtiene apagando la luz actínica y aplicando un pulso de luz roja lejana (735 nm) para drenar los electrones del PSII. Para la cuantificación del contenido de clorofilas (unidad SPAD) se usó el dispositivo de medición portátil CL-01 (Hansatech). Las medidas de intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofilas y clorofilas se realizaron usando hojas medianas totalmente expandidas sin síntomas visuales.

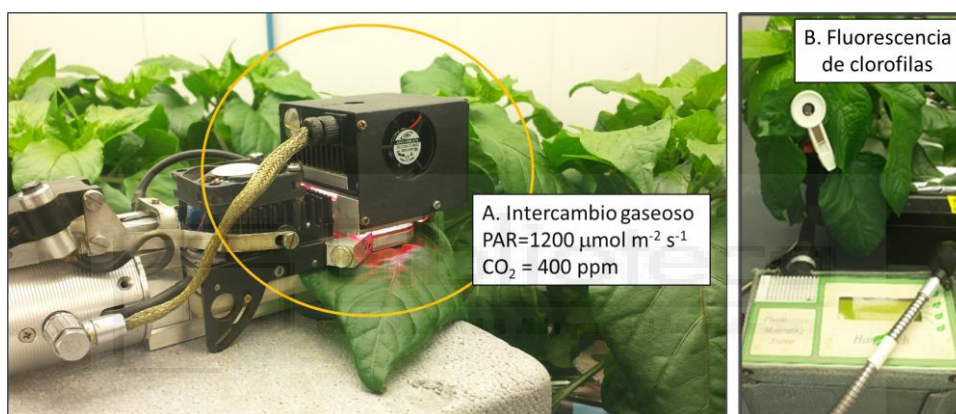


Imagen 6.3. Medidas de intercambio gaseosos con un sistema portátil de fotosíntesis modelo CIRAS-2 (A) y de fluorescencia de clorofilas con fluorómetro de pulso modulado (modelo FMS-2).

6.1.3.2 Parámetros de crecimiento

El mismo día que se midieron los parámetros de fotosíntesis, fluorescencia de clorofilas y las clorofilas, se cosecharon las plantas pesando en cada una de ellas por separado las hojas, tallo y raíz (gramos de peso fresco, g FW). Posteriormente, fueron lavadas con abundante agua desionizada y secadas en estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante al menos 48 h. Se pesaron nuevamente las partes de la planta para obtener los resultados en gramo de peso seco (g DW). Después se molieron hasta obtener un polvo fino que se utilizó para realizar los diferentes análisis químicos en el laboratorio.

6.1.3.3 Análisis mineral de hojas y raíces

En 100 mg de tejido vegetal seco y molido de cada una de las partes de la planta (hoja, tallo y raíz) se determinó la concentración de nutrientes minerales (K, Mg, Ca, P, Mn, Zn, Fe, Cd y Se) utilizando un equipo de espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP, Iris

Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, MA, USA) en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC (**Imagen 6.4**). Previamente se llevó a cabo una digestión de las muestras con $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (v:v 5:3 volumen), en un microondas (CERM Mars Xpress, Matthews, NC, EE. UU.) con una rampa de temperatura hasta alcanzar 200 °C (Alfosea-Simón et al., 2020a).



Imagen 6.4. Análisis mineral de las muestras de tejido foliar y radicular en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC.

6.1.3.4 Determinación de prolina en hojas y raíces

Al final del experimento, se extrajo la prolina en muestras secas y molidas de hoja de cada una de las plantas con ácido sulfosalicílico ácido (3%) y se cuantificaron por espectrofotometría según el protocolo descrito en Bates et al. (1973).

6.1.3.5 Determinación del daño oxidativo en hojas

Al final del experimento, antes de la cosecha completa de las plantas, se tomaron muestras de hoja de cada una de las plantas y fueron congeladas en nitrógeno líquido para el estudio del estrés oxidativo. La cuantificación de H_2O_2 fue realizada siguiendo el método descrito por Yang et al. (2007). Por su parte, la peroxidación lipídica se determinó midiendo el compuesto ‘malondialdehído’ (MDA) usando el método de Hodges et al. (1999).

6.1.3.6 Determinación de la actividad antioxidante

Para la actividad antioxidante se utilizaron 250 mg de material congelado en nitrógeno líquido, el cual se sometió a un proceso de extracción triturándolo con 2,5 mL de etanol (80%). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se utilizó para medir la actividad antioxidante con el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) descrito por Koleva et al. (2002).

6.1.3.7 Determinación de enzimas antioxidantes

Las muestras congeladas en nitrógeno líquido fueron extraídas en buffer 50 mM MES-KOH a pH 6.0 para medir la actividad enzimática de la catalasa (CAT), a través de mediciones espectrofotométricas, al igual que las actividades peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX), y superóxido dismutasa (SOD) (Chance, 1955; Chandlee y Scandalios, 1984; Nakano y Asada, 1987; McCord y Fridovich, 1969).

6.1.3.8 Metabolismo del nitrógeno en hojas y raíces

Para la cuantificación del nitrato (NO_3^-) se utilizaron 25 mg del tejido seco y molido a los que se adicionó 5 mL de agua ultrapura. Posteriormente, las muestras se agitaron durante 30 minutos en oscuridad y se filtraron con un filtro de 45 μm . Se pipetearon 200 μl de la muestra líquida filtrada para analizar los nitratos en el electrodo selectivo de nitratos LAQUAtwin (HORIBA, Irvine, CA, EE. UU.). La concentración se expresó como g de NO_3^- por 100 g DW. La medición de NO_2^- se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hageman y Hucklesby (1971), cuantificando el color rojo púrpura formado por la reacción entre la sulfanilamida y el dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina (dihidrocloruro de NED) a un pH entre 2.0 y 2.5. Paralelamente, se realizó una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones que oscilaban entre 0 y 17 mg L^{-1} de nitrato de potasio (KNO_3). La medición de NH_4^+ se realizó según el proceso descrito por Kempers (1974). A la muestra líquida obtenida anteriormente del proceso de extracción se les adicionó 100 μL de los reactivos 1 y 2 provenientes del KIT Test Amonio (EMD Millipore Corporación, Alemania). Las muestras se mantuvieron en la oscuridad a 37 °C durante 60 min. Después de esto, se leyó la absorbancia a 640 nm. Al mismo tiempo, se realizó una curva de calibración con cloruro de amonio (NH_4Cl) entre las concentraciones de 0 y 32 mg L^{-1} . La concentración de amonio en las hojas se expresó como g de $\text{NH}_4^+\text{g}^{-1}$ DW. Por otro lado, las muestras de hojas y raíces congeladas en nitrógeno líquido se utilizaron para el estudio de las actividades enzimáticas siguiendo los procedimientos que se pueden encontrar en la bibliografía: nitrato reductasa (NR; Groat y Vance, 1981), nitrato reductasa (NiR; Lillo, 1984), glutamato sintasa (GOGAT-NADH, EC 1.4.1.14; Singh y Srivastava, 1986) y glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2; Kanamori et al., 1982).

6.1.3.9 Análisis metabólico de tejido foliar y radicular

Las muestras congeladas en nitrógeno líquido de hojas y raíces se utilizaron para realizar un estudio metabólico "no dirigido" con la técnica H-NMR en muestras liofilizadas, como se describe en Alfosea-Simón et al., (2020b). Se midieron los siguientes compuestos que intervienen en los procesos primario y secundario del metabolismo de las plantas: los aminoácidos ácido gamma-aminobutírico (AB = GABA), alanina (Ala), asparagina (Asn), aspartato (Asp), glutamato (Glu), glutamina (Gln), isoleucina (Iso), prolina (Pro), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y valina

(Val); los ácidos orgánicos citrato (Cit), formiato (For), fumarato (Fum), malato (Mal) y clorogenato (CGA); y los azúcares fructosa (Fru), glucosa (Glu) y sacarosa (Suc).

6.1.3.10 Determinación de poliaminas libres, conjugadas solubles y unidas insolubles

Las poliaminas (PAs) se midieron con el procedimiento descrito en Flores y Galston (1982) mediante cromatografía en capa fina (TLC). El material foliar liofilizado fue homogeneizado en 3,2 mL de ácido perclórico frío (PCA) al 5 % (p/v) e incubado a 4 °C durante 60 min, mezclándose luego con el patrón interno 1, 6-hexanodiamina. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante media hora. El sobrenadante se utilizó para medir el contenido de las poliaminas putrescina (Put), espermina (Spm), espermidina (Spd) y cadaverina (Cad) en sus formas conjugadas, libres y solubles; mientras que el sedimento se utilizó para estimar las poliaminas insolubles. Las poliaminas obtenidas fueron medidas con una cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tándem (UPLC–MS/MS) utilizando UHPLC (Shimadzu, Nexera Series; Columbia, MD, EE. UU.) y un espectrómetro de masas (Orbitrap Exploris GC 240, Waltham, MA, EE. UU.). Estos análisis se hicieron en la Universidad de New Hampshire (Massachusetts, USA) gracias a una colaboración con el Dr. Adan M. Shahid.

6.1.3.11 Diseño experimental y análisis estadístico

El análisis estadístico incluyó un ANOVA para un factor realizado con el paquete estadístico SPSS versión 24 (Chicago, IL, EE. UU.). Los valores mostrados para cada variable y tratamiento son las medias de 6 repeticiones ($n=6$). A aquellas variables que fueron significativas ($p < 0,05$), se les realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para la separación de medias (Haynes, 2013). La aplicación de todas las pruebas paramétricas se realizó tras verificar la normalidad de los datos (prueba de Shapiro-Wilk).

6.2 Ensayo en brócoli

6.2.1 Condiciones de cultivo y material vegetal

Este estudio se realizó en plantas de brócoli (*Brassica oleracea* L.), obtenidas de un vivero comercial (Semilleros BabyPlant, Santomera, Murcia, España). Las plántulas se trasplantaron a un sistema sin suelo con lana de roca (Grodan Classic Forte, Almería, España) y se crecieron bajo invernadero (**Imagen 6.5**). La lana de roca es un sustrato inerte comúnmente utilizado en sistemas de cultivo sin suelo compuesto de 60% de diabasa, 20% de coque y 20% de caliza. Esta mezcla de componentes, cuando se trata adecuadamente, da como resultado fibras muy finas de 0,005 mm de ancho, inocuas y libres de patógenos. Una vez trasplantadas, las plantas de brócoli se regaron con solución nutritiva aplicada con goteros auto compensantes de 2 L h⁻¹. El volumen

aplicado en cada evento de riego fue calculado para producir un drenaje del 15% y evitar así la acumulación de sales. Durante la fase de emergencia de las plantas para el riego se utilizó la solución nutritiva Hoagland al 50%. La solución completa de Hoagland (100%) estaba compuesta, por 100 L de agua, de: 54 g KNO₃, 84 g Ca(NO₃)₂, 14 g KH₂PO₄, 25 g MgSO₄, 2 g Fe y 2 g de un producto comercial de micronutrientes. La equivalencia de los macronutrientes en mM fue: 14 N, P 1, K 6.30, Ca 4, Mg 1 y S 1. Esta composición al 100% se utilizó una vez que las plantas salieron de la fase de emergencia. El pH de la SN se ajustó a 6,5 con NaOH cada vez que se preparaba.



Imagen 6.5. Plantas de brócoli (*Brassica oleracea* L.) empleadas para el ensayo obtenidas en semillero y crecidas bajo invernadero sobre sustrato inerte.

El experimento se realizó en un invernadero multitúnel situado en la finca experimental del CEBAS “La Matanza”, localizado en Santomera (a 18 km de Murcia, España; 38°6'26,83" N; 1°2'8,57" O) (**Imagen 6.6**). Para el control de la temperatura se utilizó una unidad de refrigeración “Cooling-System”, junto con una malla de sombreado de aluminio (30%). El invernadero también incluía sensores de radiación, temperatura, y humedad relativa colocados a 1,5 m del suelo para monitorizar los parámetros ambientales. Durante el experimento, el interior del invernadero tenía las siguientes condiciones climáticas: fotoperíodo de 10–12 h con un PAR de luz solar entre 1.000–1.200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura del aire (día/noche) de 23/15 °C, y humedad relativa (día/noche) de 60/80%. El experimento tuvo lugar entre el 1 de octubre de 2020 cuando se trasplantaron las plántulas y el 1 de enero 2021 cuando se cosecharon. Los tratamientos con Cd y la aplicación de los productos paliativos se iniciaron simultáneamente dos semanas después del

trasplante. Para combatir las plagas, se colocaron trampas cromáticas por todo el invernadero, y se aplicaron diferentes insecticidas, fungicidas y acaricidas cuando era necesario y siempre siguiendo un manejo ecológico.

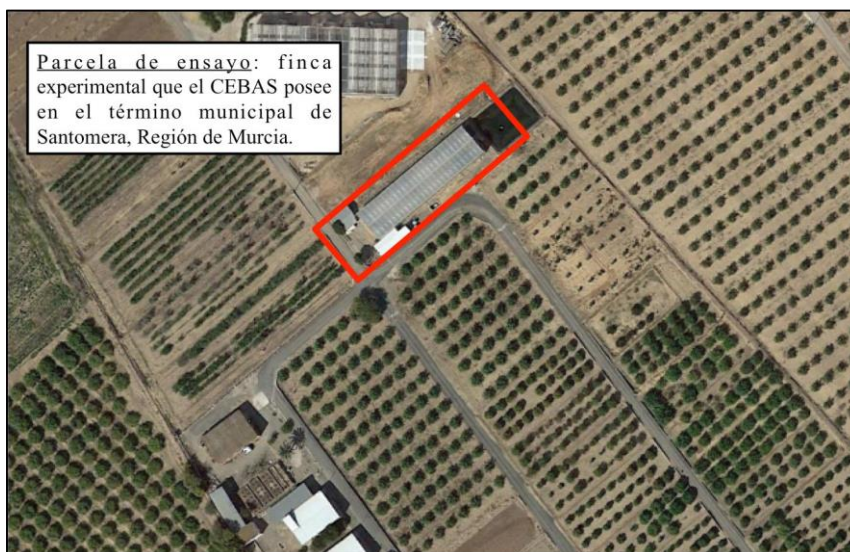


Imagen 6.6. Vista aérea del invernadero donde se llevó a cabo el ensayo.

6.2.2 Tratamiento con exceso de Cd y aplicación de productos mitigar su toxicidad

Después de dos semanas de ser trasplantadas al sistema sin suelo, las plantas de brócoli se dividieron en dos grupos. Uno de ellos fue regado con solución nutritiva Hoagland sin Cd (NS), y otro con solución Hoagland que contenía Cd (NS + Cd), aplicado en forma de $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, con una concentración final de Cd de 3 mg L^{-1} (concentración considerada tóxica para las plantas hortícolas (FAO, 1985)). Al grupo de plantas tratadas con Cd también se subdividió en 6 grupos, cada uno de ellos tratado con un producto diferente. Por lo tanto, los tratamientos ensayados fueron:

(i) T1: NS, sin aplicación de productos (NS) y sin Cd.

(ii) T2: NS + Cd a 3 mg/L^{-1} , sin aplicación de productos (NS + Cd).

(iii) T3: NS + Cd + aplicación radicular de Biocat G (NS + Cd + BioG). Biocat G es un producto formulado en base a ácidos fúlvicos/húmicos de la empresa Atlántica Agrícola S.A. Se aplicó en una única dosis de 4 g planta^{-1} manualmente sobre el sustrato, alrededor del tallo de las plantas. Biocat G es un bioactivador granulado altamente soluble en suelo, cuya formulación incluye aminoácidos específicos, N-K, ácidos fúlvicos/húmicos, polisacáridos y materia orgánica. Se aplicó al inicio del experimento.

(iv) T4: NS + Cd + aplicación foliar de Se (NS + Cd + Se1) en forma de Na_2SeO_4 a una concentración de $10 \text{ }\mu\text{M}$. Se aplicó los días 0, 15 y 30 después de iniciado el tratamiento con Cd.

(v) T5: NS + Cd + aplicación radicular de Se (NS + Cd + Se2) en forma de Na_2SeO_4 a una concentración de 10 μM . Se aplicó los días 0, 15 y 30 después de iniciado el tratamiento con Cd.

(vi) T6: NS + Cd + aplicación foliar de quitosano (NS + Cd + quitosano1), adquirido en Sigma-Aldrich (clorhidrato de quitosano, grado de desacetilación 87,4%, peso molecular 200–800 kDa), a una concentración de 0,5 g L^{-1} en agua. Dosis elegida según experimentos previos. Se aplicó los días 0, 15 y 30 después de iniciado el tratamiento con Cd.

(vii) T7: NS + Cd + aplicación de quitosano a la raíz (NS + Cd + quitosano2), adquirido en Sigma-Aldrich (clorhidrato de quitosano, grado de desacetilación 87,4%, peso molecular 200–800 kDa) a una concentración de 1,0 g L^{-1} en agua, según experimentos previos.

En las soluciones preparadas para la aplicación foliar el pH se ajustó a valores entre 5,5 y 6,0; y se añadió un tensioactivo (Tween-20 al 0,1%) para mejorar la adherencia de la solución pulverizada. Se utilizó agua desionizada para los tratamientos que no recibieron ningún tratamiento foliar. Las aplicaciones foliares se realizaron cada dos semanas. Por su parte, las aplicaciones radiculares también se realizaron cada dos semanas, pero en este caso de forma manual añadiendo el producto a 500 ml de la de solución nutritiva Hoagland.

6.2.3 Parámetros analíticos analizados

6.2.3.1 Parámetros de crecimiento y fitotoxicidad

Al final del experimento (45 días después de iniciado el tratamiento con Cd), se midió la altura (cm) y el diámetro del tallo de las plantas (cm). Después de estas medidas, cada una de las plantas de brócoli fueron cosechadas por separado pesando las inflorescencias, hojas y el tallo. Posteriormente, se lavaron con agua desionizada y se secaron en una estufa a 60 °C durante al menos 48 h. Tras este periodo de secado se volvieron a secar y se molieron obteniendo un polvo fino que se analizó posteriormente en el laboratorio. Con los valores del peso fresco (FW) y peso seco (DW) de las hojas se calculó el contenido de agua como: $(\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / (\text{peso seco}) \times 100$. El peso seco y fresco se determinó con una balanza digital Sartorius (Báscula digital Sartorius; Sartorius, Madrid, España). Los síntomas de fitotoxicidad se evaluaron comparando los síntomas visuales de plantas tratadas con Cd y plantas sin Cd, fotografías tomadas al final del experimento.



Imagen 6.7. Medidas realizadas en plantas de brócoli al final del ensayo.

6.2.3.2 Porcentaje de reducción de la parte área de las plantas y nivel de tolerancia a la toxicidad de Cd

Para determinar el nivel de tolerancia de las plantas de brócoli al exceso de Cd, se calculó para cada tratamiento (T2-T6) el porcentaje de reducción de la biomasa seca total de la parte aérea (hojas + tallo + inflorescencia) de las plantas, en comparación con las plantas del tratamiento T1 (sin Cd). La clasificación de la tolerancia según el porcentaje de reducción se estableció siguiendo los criterios: muy tolerante ($\leq -20\%$), tolerante (-20% a 10%), semitolerante (11% – 30%), sensible (31% – 50%) y muy sensible (51% – 100%) (clasificación definida por la experiencia de los autores).

6.2.3.3 Contenido relativo de clorofilas

Al final del experimento se midió el contenido relativo de clorofilas en todas las plantas usando el equipo portátil CL-01 (Hansatech), dando unidades relativas de clorofilas que son proporcionales a la cantidad de clorofilas presentes en las hojas. Este es un método de medición no destructivo y se basa en la medición indirecta del contenido de clorofila en luz roja (650 nm)

e infrarroja cercano (940 nm). Las mediciones se realizaron en el margen central de hojas viejas (OL), medianas (ML) y jóvenes (YL).

6.2.3.4 *Análisis mineral de hojas y raíces*

Para la caracterización del estado nutricional de las plantas se siguió el mismo procedimiento detallado en el experimento anterior. Se cosecharon muestras de hojas e inflorescencia de cada una de las plantas y se analizó el K, Mg, Ca, P, Mn, Zn, Fe, Cd y Se en el servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC.

6.2.3.5 *Evaluación del riesgo para la salud humana*

En este experimento se evaluó el riesgo para la salud humana al consumir brócoli cultivado con alta concentración de Cd. Para ello se calculó, la ingesta de Cd diaria estimada EDI ($\text{mg (kg BW día)}^{-1}$), el cociente de riesgo objetivo (THQ) y el factor de riesgo carcinogénico (CR) para adultos y niños. El EDI se calculó según Fan et al. (2018): $\text{EDI (mg (kg BW día)}^{-1}) = ((\text{Ccd} \times \text{AB})/(\text{BW}))/10^3$, donde Ccd es la concentración de Cd en la inflorescencia (mg kg^{-1}), AB es la cantidad de brócoli consumido cada día (g día^{-1}) por adultos (Zheng et al., 2020) o por niños (Dos Santos et al., 2021); BW es el peso corporal medio de la población, 70 y 30 kg, para adultos y niños, respectivamente (Dos Santos et al. 2021). Por su parte, el índice de evaluación de riesgos no relacionados con el cáncer (el cociente de riesgo objetivo) se calculó de acuerdo con Yaacob et al. (2018): $\text{THQ} = \text{EDI}/\text{ORD}$, donde ORD es la dosis oral de referencia ($\text{mg kg}^{-1} \text{ BW día}^{-1}$). En el caso del cadmio, ORD es $0,001 \text{ mg kg}^{-1} \text{ BW día}^{-1}$ (Cao et al., 2020). El factor de riesgo carcinogénico (CR) se calculó según Dos Santos (2021) como $\text{CR} = ((\text{EF} \times \text{ED} \times \text{Ccd} \times \text{AB} \times \text{SF})/(\text{BW} \times \text{AT}))/10^3$, donde EF es la frecuencia de exposición ($365 \text{ días año}^{-1}$), ED es el tiempo de exposición, considerado 70 años para adultos y 14 años para niños, SF es el factor de seguridad del contaminante oral, que para el Cd se define como $6,1 \text{ kg BW día mg}^{-1}$ (Mohammadi et al., 2019; Cao et al., 2020). AT es el tiempo promedio para carcinógenos ($365 \text{ días año}^{-1} \times \text{ED}$).

6.2.3.6 *Diseño experimental y análisis estadístico*

El diseño experimental fue unifactorial completamente al azar, en el cual se ensayaron en plantas de brócoli un tratamiento control (T1) cultivadas en condiciones sin Cd y seis tratamientos diferentes (T2, T3, T4, T5, T6 y T7) cultivados bajo un exceso de Cd (3 mg L^{-1}). Hubo un total de 28 unidades experimentales (7 tratamientos \times 4 repeticiones) en el experimento. Cada unidad experimental consistió en tres plantas que crecían en un mismo saco de cultivo. Las plantas en sus respectivos sacos de cultivo se distribuyeron de forma aleatoria en el invernadero. El análisis estadístico incluyó un análisis de la varianza (ANOVA), realizada con el paquete estadístico SPSS versión 24. Los valores para cada parámetro y tratamiento son medias aritméticas de 4 repeticiones ($n=4$), considerando cada repetición como las tres plantas colocadas en cada saco de cultivo. Cuando el ANOVA fue significativo ($p < 0.05$), se aplicó la prueba de rangos múltiples

de Tukey ($p \leq 0.05$) para separar las medias. La aplicación de todas las pruebas paramétricas se realizó después de verificar la normalidad de los datos (prueba de Shapiro-Wilk).





7. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



7.1 PUBLICACIÓN 1

The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions

Rafael Perez-Millan, Marina Alfosea-Simon, Ernesto Alejandro Zavala-Gonzalez, Jose Maria Camara-Zapata, Juan Jose Martinez-Nicolas, Vicente Lidon, Inma Simon, Muhammad Adnan Shahid, Francisco Garcia-Sanchez, and Silvia Simon-Grao

Agronomy 2021, 11, 1905

Factor de impacto: 3,949 Q1 (2021) (Categoría Agronomy y Plant Science)

El objetivo de este experimento fue conocer y entender los efectos que producen en las plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) la alta concentración de Cd en la solución nutritiva de riego; y determinar si la aplicación de Se foliar y/o radicular puede paliar los efectos tóxicos que produce este metal pesado, dilucidando qué mecanismos fisiológicos y bioquímicos podrían estar involucrados en la mejora de la tolerancia. Para ello, se realizó un estudio morfológico, nutricional, fisiológico (intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas) y bioquímico en cuanto al estrés oxidativo.

7.1.1 Resumen de resultados y discusión

El cadmio es uno de los metales pesados más tóxicos tanto para los humanos como para los animales y plantas. Su toxicidad produce una gran variedad de alteraciones genéticas, fisiológicas, bioquímicas y metabólicas. En el presente experimento se estudió los efectos de su toxicidad en plantas de pimiento, determinándose que una concentración de Cd en la solución nutritiva de 8,5 μM produce una disminución en la biomasa total de las plantas de pimiento al reducir el crecimiento de la parte aérea. Esta disminución pudo deberse a que el Cd en las hojas, con una concentración tan baja como 28 ppm, provocó una disminución de la A_{CO_2} y la conductancia estomática, y causó daños oxidativos según indicaron los estudios de intercambio gaseoso y estrés oxidativo llevados a cabo. Por otro lado, el crecimiento de la raíz prácticamente no se vió alterado por el exceso de Cd en la solución nutritiva a pesar de que este órgano acumuló altas concentraciones (del orden de 1500 ppm). Estos resultados nos permitieron plantear la siguiente hipótesis: las plantas de pimiento son capaces de acumular una gran cantidad de Cd en sus raíces sin que apenas se vea alterado su crecimiento; sin embargo, la poca cantidad que se transporta a la parte aérea es muy tóxica de tal manera que, con concentraciones muy bajas provoca graves efectos en sus procesos fisiológicos y bioquímicos. Por otro lado, el daño oxidativo causado por la toxicidad de Cd en las hojas de pimiento podría deberse a un desequilibrio en su respuesta

antioxidante ya que se observó una reducción de las actividades de SOD y CAT junto con el aumento de la actividad de POD y APX.

En cuanto a la aplicación de Se, ya sea a través de las hojas o la raíz (incluida en la solución nutritiva), esta tuvo efectos beneficiosos en las plantas que crecieron con exceso de Cd en la solución nutritiva. De estos dos tratamientos, el que mejor palió la toxicidad de Cd fue la aplicación de Se a través de la solución nutritiva. Uno de los efectos positivos que dio lugar la aplicación exógena de Se fue la reducción de la concentración de Cd en las plantas; aunque esto dependió de la forma en que se aplicó el Se: i) la aplicación de Se de forma foliar redujo el contenido de Cd tanto en hojas como en las raíces; mientras que la aplicación a través de las raíces, solo lo redujo en el tejido foliar. Algunos autores han indicado que la aplicación de Se a través de las hojas puede inducir la síntesis de compuestos orgánicos específicos que formen complejos/quelatos con el Cd en forma de metalotioneína (Sigel et al., 2009), facilitando así el movimiento de este metal en el floema y su posterior extrusión fuera de la planta. En el caso de la aplicación de Se a la solución nutritiva, que no se limitara la absorción de Cd por las raíces pudo deberse a que el Cd es absorbido, entre otros, por los transportadores YSL, LCT1, ZIP-IRT1 o NRAMP; mientras el Se se absorbe por los transportadores de sulfato (SULTR1; 1 SULTR1 2) o acuaporinas, de tal forma que su entrada tiene vías diferentes y no interfieren unas con otras. Sin embargo, el transporte de Cd desde la raíz a las hojas se pudo haber limitado debido a que el Se aumenta en las plantas la concentración de glutatión, prolina y fitoquelatinas, siendo esta última una sustancia que compleja al Cd y lo secuestra en vacuolas (Huang et al., 2017). Esto podría explicar que la concentración de Cd en la raíz de las plantas del tratamiento +Cd/+SeR fuera similar al tratamiento +Cd/-Se mientras que la concentración de Cd en la hoja fue menor en el tratamiento +Cd/+SeR que en el tratamiento +Cd/-Se.

Otro efecto positivo de la aplicación de Se fue con respecto a la acumulación de Se en los diferentes tejidos de las plantas, aunque su distribución dependió de la forma en la que este se aplicó. La aplicación foliar incrementó la concentración de Se solo en las hojas, mientras que la aplicación vía radicular incrementó su concentración en las hojas, tallo y raíz. Además, la concentración de Se en las hojas fue significativamente menor en las plantas tratadas con Se por vía foliar que por vía radicular, lo que indica que la aplicación a través de las raíces fue la más eficiente para la acumulación de este metaloide en las plantas y, por lo tanto, para reducir la toxicidad de Cd. En las células de las raíces de las plantas, los transportadores de sulfato y fosfato son capaces de tomar los iones selenato y selenito (Guignardi y Schiavon, 2017), mientras que, en las hojas, la absorción de Se parece depender específicamente de la especie vegetal como fue observado por Drahonovsky et al. (2016) en diferentes especies de plantas silvestres. Por lo tanto, en las plantas de pimiento de la variedad Cristal, la aplicación de Se a través de las raíces pareció ser más eficiente en la acumulación de este elemento en comparación con la aplicación foliar.

La alta concentración de Se en las plantas y, especialmente, en las hojas de las plantas donde se aplicó Se por vía radicular, marcó las diferencias encontradas entre estos tratamientos en cuanto a los procesos de intercambio gaseoso. A pesar de que las plantas de ambos tratamientos +Cd/+SeR y +Cd/+SeF tenían la misma concentración de Cd en las hojas, la A_{CO_2} y g_s fueron significativamente más altas en las plantas del tratamiento +Cd/+SeR y, de hecho, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control y este tratamiento. Sin embargo, la A_{CO_2} y g_s de las plantas de tratamiento +Cd/+SeF fueron muy bajas, en comparación con las plantas del tratamiento con Cd sin la aplicación de Se. Esto indica que la aplicación de Se a través de las raíces proporcionó una cantidad de Se a las hojas suficiente para mitigar la toxicidad por Cd. Muchos estudios han demostrado que el efecto negativo debido a la toxicidad de los metales pesados puede ser mitigado por el Se cuando se reduce el estrés oxidativo causado por estos metales (Ismael et al., 2019) y esto podría deberse a que el selenio inactiva la toxicidad del Cd o reduce por sí mismo el estrés oxidativo. La reducción del estrés oxidativo podría deberse tanto a la acción directa de este metaloide sobre el sistema antioxidante de las plantas como a la inhibición directa de los radicales libres de oxígeno. En nuestro experimento, las plantas de todos los tratamientos con Cd, independientemente de que se aplicara o no Se, mostraron la misma respuesta para las enzimas SOD, CAT y APX, lo que indica que la desactivación de las especies reactivas del oxígeno se debió a la acción directa del Se. En los datos de MDA y H_2O_2 en las hojas, se pudo observar que el único tratamiento donde sus niveles se mantuvieron similares a los de las plantas testigo fue +Cd/+SeR, lo que aporta una evidencia más de la potente acción del Se para desactivar especies reactivas de oxígeno. Entonces, con todos estos resultados se puede decir que la aplicación de Se en la solución nutritiva es la más eficaz, como demuestra los datos del crecimiento de las plantas. Y, esto fue así porque el Se aplicado vía radicular reduce el Cd que se acumula en las hojas y desactiva su toxicidad al disminuir el estrés oxidativo.

7.1.2 Conclusiones

Los datos de este experimento demostraron que las plantas de pimiento de la variedad 'Cristal' responden al exceso de Cd en la solución nutritiva, acumulándolo en la raíz y limitando su concentración en las hojas. Su toxicidad, sin embargo, sigue un patrón contrario, siendo el Cd más tóxico en las hojas que en las raíces. El presente experimento revela la importancia de la aplicación de Se en plantas de pimiento que sufren toxicidad por Cd, por lo que la aplicación foliar o radicular de Se tuvo efectos beneficiosos sobre las plantas. La aplicación de Se en la raíz brindó mejores resultados que la pulverización foliar ya que el Se se acumuló en altas concentraciones en la raíz, el tallo y las hojas. La presencia de esta alta concentración de Se podría haber desactivado la toxicidad por Cd, aunque aún se desconocen los mecanismos responsables de ello. Se deben realizar nuevos experimentos para probar la hipótesis de que el Se inactiva la

toxicidad del Cd al formar complejos Cd-Se, o que el Se es capaz de actuar por sí solo como un elemento que inhibe las especies reactivas de oxígeno.



7.2 PUBLICACIÓN 2

Effects of Se Application on Polyamines and Carbon–Nitrogen Metabolism of Pepper Plants Suffering from Cd Toxicity

Rafael Pérez-Millán, Marina Alfosea-Simón, Silvia Simón-Grao, José María Cámara-Zapata, Ernesto Alejandro Zavala-González, Almudena Aranda-Martinez, Muhammad Adnan Shahid and Francisco García-Sánchez

Agronomy 2021, 11, 2535

Factor de impacto: 3,949 Q1 (2021) (Categoría Agronomy y Plant Science)

El objetivo del presente trabajo fue conocer cómo afecta la toxicidad del Cd al metabolismo del nitrógeno y carbono de las plantas de pimiento con el fin de completar los estudios realizados en la publicación anterior; e identificar si, entre los mecanismos implicados en el incremento de tolerancia de las plantas de pimiento a Cd cuando se les aplica Se, hay alguna que se pueda relacionar con la síntesis y acumulación de poliaminas y aminoácidos.

7.2.1 Resumen de resultados y discusión

En la primera publicación de esta tesis se demostró que la presencia de Cd en la solución nutritiva (+Cd/-Se, +Cd/+SeF y +Cd/+SeR) disminuye drásticamente el crecimiento vegetativo de las plantas de pimiento de la variedad “Cristal” en relación con el tratamiento control sin Cd (+Cd/-Se). Y, que la aplicación de Se en la solución nutritiva disminuye el efecto negativo del Cd en las plantas. Como ya se ha comentado anteriormente en la publicación anterior se observó que las plantas de pimiento restringen el transporte del Cd desde la raíz hasta las hojas, a expensas de acumularlo en la raíz. Sin embargo, las bajas cantidades que llegan a la hoja (30 ppm Cd) son muy tóxicas, lo que causa la reducción del crecimiento. Por otra parte, la aplicación de Se foliarmente o en la solución nutritiva inhibe el transporte de Cd a las hojas y desactivan su toxicidad. En la presente publicación hemos querido profundizar en los mecanismos que hacen que el Se inhiba la toxicidad de Cd en relación con el metabolismo de C y N (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, poliaminas y asimilación de nitrógeno).

7.2.1.1. La aplicación de Selenio en la solución nutritiva induce cambios en la acumulación de poliaminas y su homeostasis lo que favorece la tolerancia de las plantas al exceso de Cd

Las poliaminas (PAs) son moléculas policatiónicas de bajo peso molecular fundamentales para el desarrollo y crecimiento de las células eucariotas y procariotas. En las células vegetales, Put, Spd y Spm son las más importantes y se pueden encontrar en tres formas: (i) libres, (ii) conjugadas con ácidos fenólicos y otros compuestos de bajo peso molecular, e (iii) insolubles, asociadas a

proteínas y paredes celulares. Estos compuestos están involucrados en una amplia gama de funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la senescencia, respuestas a hongos y virus y estrés ambiental (incluida la toxicidad debida a metales pesados). Su función en la tolerancia a estreses abióticos se debe, entre otras causas, a su capacidad para evitar la oxidación de las estructuras celulares y esto se logra porque las PAs (i) tienen una enorme capacidad para unirse con cationes y aniones de los fosfolípidos y ácidos nucleicos de las membranas, protegiéndolos del estrés oxidativo, y (ii) pueden unirse directamente a metales pesados como Co, Cu, Fe o Ni desactivando su reactividad y evitando así la formación de radicales libres de oxígeno.

En este experimento, se observó que las plantas de pimiento aumentaron la concentración de PAs cuando estas se cultivaron con una solución nutritiva que contenía Cd. Esta respuesta, sin embargo, no fue lo suficientemente intensa o eficiente para proteger las plantas de los efectos negativos del Cd y tampoco se modificó la relación Spm+Spd/Put, otro de los parámetros que pueden explicar la diferente tolerancia al Cd entre variedades y especies de plantas.

La aplicación de Se, ya sea vía foliar o a través de la solución nutritiva, incrementó la concentración de las poliaminas Spm, Spd y Put. Por lo tanto, esta respuesta podría haber ayudado a las plantas para protegerse de la toxicidad del Cd reduciendo el daño oxidativo. De hecho, en la publicación anterior se observó que las plantas tratadas con +Cd/-Se tenían un contenido de MDA (compuesto que indica el nivel de peroxidación lipídica) de $10 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$, mientras que las plantas tratadas con Se, ya sea por vía foliar o a través de la raíz, obtuvieron un valor de MDA de $6 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$, al igual que las plantas testigo. Así, la aplicación de Se a plantas tratadas con Cd induce la acumulación de PAs, lo que ayuda a reducir el estrés oxidativo causado por este estrés. Además, de las tres poliaminas analizadas, la Put fue la que alcanzó una mayor concentración debido al tratamiento con Se. Se ha descrito que esta PA es muy eficiente a la hora de combatir el estrés oxidativo gracias a su estructura química (diamina) de bajo peso molecular que le permite translocarse rápidamente hacia las membranas celulares, uniéndose a ellas para ofrecer una protección rápida, en comparación a las PAs de Spd y Spm que son moléculas de triamina y tetramina, respectivamente (Rady y Hemida, 2015). Además, de la concentración absoluta de cada molécula de PAs también ha sido descrito que la relación entre ellas en la forma Spm+Spd/Put es otro factor que marca la tolerancia a los estreses, siendo favorable los valores altos. En este experimento, la relación Spm+Spd/Put fue más alta para plantas tratadas con +Cd/+SeR, 1,77, frente a 1,36 para el resto de los tratamientos; siendo otro factor más que demuestra los efectos beneficiosos del Se en la solución nutritiva. Por otro lado, en la concentración de Spm y Spd, se observó un aumento en sus formas conjugadas solubles a expensas de una disminución de su forma libre. Algunos autores han relacionado la tolerancia a los estreses de ciertas especies de plantas al aumento de la concentración de Put y la relación Spm+Spd/Put (Sánchez-Rodríguez et al., 2019), y a la conversión de las formas libres de las PAs a sus formas conjugadas (Yang et al.,

2013). Por lo tanto, los cambios en las poliaminas, tanto en su concentración como en la relación Spm+Spd/Put, y sus formas conjugadas, se relacionan con una mayor tolerancia al exceso de Cd con la aplicación de Se en la solución nutritiva.

7.2.1.2 *¿La aplicación Foliar de Se produce daños en las plantas?*

La aplicación foliar de Se (+Cd/+SeF), aunque mejoró el crecimiento vegetativo y desarrollo de las plantas, no evitó el daño fitotóxico causado por el Cd, como sí que se observó con la aplicación de Se en la solución nutritiva (+Cd/+SeR). En las plantas del tratamiento +Cd/+SeF se observó un aumento en las hojas de la concentración H₂O₂, Spm, Put, Cad y GABA; todo ello, con respecto a las plantas del tratamiento +Cd/+SeR. Además, también se observó una respuesta diferencial en la raíz, con respecto a los aminoácidos fenilalanina, prolina y glutamina, los ácidos orgánicos citrato y malato, y el azúcar sacarosa, ya que su concentración fue mayor en las plantas +Cd/+SeR que en la de los otros tratamientos. Estas respuestas en hojas y raíces podrían sugerir que la aplicación de Se a las hojas (+Cd/+SeF) podría haber activado una serie de respuestas diferentes a las que se dieron con la aplicación de Se en la solución nutritiva (+Cd/+SeR), y, que estas respuestas son o menos efectivas o que causan algunos daños en las plantas, aunque estos no son tan severos como los que causan el tratamiento de Cd sin Se (+Cd/-Se).

Así, el incremento de Put y Cd producido con la aplicación de Se a las hojas pudo haber potenciado en el apoplasto la actividad de las PAO (poliamina oxidasas que contienen flavina) y CuAO (amina oxidasas dependientes de cobre), lo que conduce a una mayor producción de H₂O₂ y que altera a la homeostasis redox de las células (Wang et al., 2019). Esta hipótesis podría estar justificada por la estrecha relación observada entre Put, Spm, Spd, GABA y H₂O₂ (ver representación esquemática de la biosíntesis, conversión inversa, y catabolismo de Put, Spd y Spm en plantas en Spormann et al., 2020). El exceso de H₂O₂ en las células de las hojas actúa como una señal de respuesta en las plantas contra los estreses abióticos, pero también puede afectar a otros procesos fisiológicos, resultando así en cambios en el metabolismo del C caracterizado por aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares. Por lo tanto, esta respuesta diferente observada en el tratamiento +Cd/+SeF con respecto al tratamiento +Cd/+SeR podría estar asociada con el catabolismo de las PAs, resultando en una acumulación de amonio y H₂O₂, además de la sobre producción de otras moléculas como el GABA (Spormann et al., 2021) en las plantas +Cd/+SeF. Todo ello hace que acumule alteraciones metabólicas que impiden que su efecto beneficioso no sea tan importante como el tratamiento +Cd/+SeR.

7.2.1.3 *Metabolismo del Nitrógeno en Hojas y Raíces*

Con respecto al metabolismo del nitrógeno, encontramos que todos los tratamientos de Cd aumentaron la concentración de amonio en las hojas y raíces, siendo mayor la concentración en las hojas de las plantas +Cd/+SeF y +Cd/+SeR, y en las raíces de las plantas +Cd/-Se. Esta

acumulación de amonio no lo podemos explicar en base a los parámetros medidos en este estudio, incluyendo la concentración de nitrato y nitrito, o las actividades enzimáticas de NR, NiR, GOGAT y GDH, que determinan la síntesis y el catabolismo del amonio. Por lo que, otros procesos como la absorción de nitrato por las raíces, el anabolismo/catabolismo de las poliaminas y/o la desaminación de aminoácidos libres y otras formas de N podrían afectar la concentración final de amonio.

En este estudio, sí que queda claro que hay una respuesta diferencial en el metabolismo del nitrógeno entre los tres tratamientos +Cd/-Se, +Cd/+SeR y +Cd/+SeF. En el tratamiento con Cd sin Se (+Cd/-Se), hubo una inhibición de NR y una sobreestimulación de NiR, mientras que en los tratamientos con Se hubo una estimulación global de GOGAT. Otros estudios en plantas de calabacín han demostrado que la presencia de Cd en la solución nutritiva lleva un aumento de nitrato y una disminución de amonio, y, que las actividades de las enzimas NR, GOGAT, GS y GDH son inhibidas (Feng et al., 2010). Estos resultados fueron similares en plantas de patata ya que el Cd disminuyó las actividades enzimáticas de NR, NiR, GS y GOGAT, con la consiguiente reducción de nitrato y nitrito, y el aumento de amonio. Estos efectos, sin embargo, fueron revertidos con la aplicación de Si y Se, para calabacín y patata, respectivamente (Feng et al., 2010). Aún no está claro por qué los metales pesados reducen estas actividades, aunque podría deberse a un efecto directo de estos en las enzimas o a los efectos que causan en los procesos fisiológicos, tales como la fotosíntesis o la biosíntesis de clorofilas (Hussain et al., 2020).

7.2.1.4 Otros Metabolitos Identificados y Cuantificados en Hojas y Raíz Relacionados con la Alta Tolerancia al Cd producida por la Aplicación de Se en la solución nutritiva

Una de las respuestas diferenciadoras producidas por el tratamiento +Cd/+SeR con respecto a los otros tratamientos (+Cd/-Se, +Cd/+SeF) es la disminución de la concentración de malato y el aumento de clorogenato en las hojas, y la disminución de fenilalanina y glutamato en raíces (Fig. 7.1). El malato es el único ácido orgánico que restringe la acumulación de Cd en las plantas, ya que bloquea los canales aniónicos en los que puede penetrar. En muchas plantas se ha observado que una segregación de malato a la zona de la raíz disminuye la acumulación de Cd (Guo et al., 2016). La fenilalanina interviene en importantes procesos metabólicos como biosíntesis de proteínas y la ruta fenilpropanoide, produciendo una amplia gama de metabolitos como flavonoides, antocianinas, ligninas o fenilpropanoides, que pueden paliar los efectos causados por la toxicidad a los metales pesados (Sanayama et al., 2011; Zemanová et al., 2017). El glutamato interviene en procesos de asimilación de nitrógeno. Más específicamente, reacciona con amonio para incorporar nitrógeno a las plantas (Qiu et al., 2020).

En el presente trabajo, la disminución de fenilalanina y glutamato en las plantas +Cd/+SeR podrían indicar que estos compuestos son utilizados/consumidos activamente por las plantas con

el objetivo de activar la ruta de los fenilpropanoides y la síntesis de moléculas elicitoras con el fin de protegerse contra la toxicidad de Cd (Sanayama et al., 2011). Esto también ocurre con los ácidos clorogénicos, ya que es un compuesto que actúa como intermediario en la biosíntesis de lignina (Sharma et al., 2019). A su vez, la disminución en la concentración de malato, sugiere que estas plantas también pueden poner en marcha mecanismos para evitar la acumulación del exceso de acumulación de Cd en los tejidos mediante segregación del malato desde la raíz al medio de cultivo, a expensas de su disminución en otros tejidos, con el fin de bloquear la entrada de Cd. Sin embargo, en este trabajo, no está claro por qué la aplicación de Se en la solución nutritiva activa todos estos procesos. Sería necesario realizar experimentos de biología molecular para aclarar por qué el Se puede iniciar todos estos procesos y cambios bioquímicos. En plantas de tomate, se ha observado que la aplicación de Se produce cambios en los factores de transcripción miR172, CRTISO, bZIP, DREB1A y en la expresión génica de HQT1, HCT1 y PAL lo que podría estar relacionado con la tolerancia al estrés abiótico (Neysanian et al., 2020; Abedi et al., 2021).

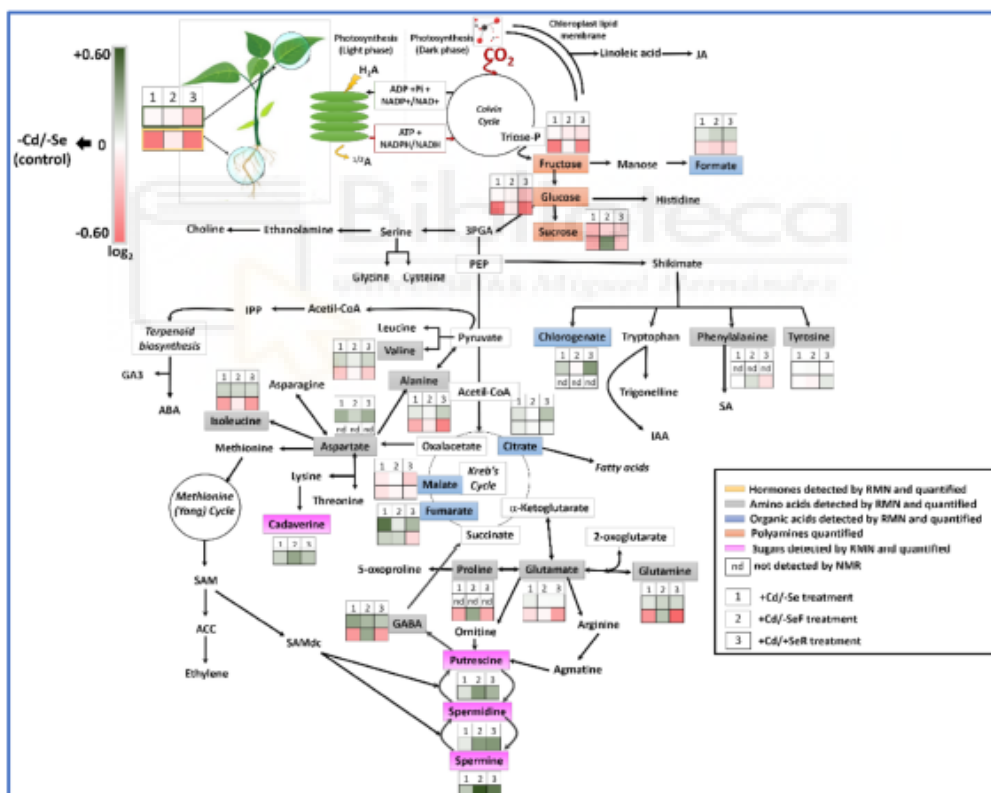


Figura 7.1. Diagrama propuesto de la distribución de los metabolitos cuantificados con RMN ('nd' indica que el metabolito no fue cuantificado por RMN). Para cada metabolito cuantificado por RMN, un calor se muestra un mapa para el tejido de la hoja (cuadrados superiores) y de la raíz (cuadrados inferiores) para cada tratamiento con exceso de Cd treatment (1: +Cd/-Se; 2: +Cd/+SeF; 3: +Cd/+SeR). En ambos tejidos, el color verde indica una concentración relativa mayor y el color rojo indica una concentración relativa más baja en comparación con el tratamiento control (-Cd/-Se)La escala es el log₂ de los valores medios de concentración después de la normalización (n = 6).

7.2.2 Conclusiones

En la publicación anterior se destacó que las plantas de pimiento son sensibles a la toxicidad de Cd cuando este metal se encuentra en altas concentraciones en la solución nutritiva, y que los efectos negativos podrían ser mitigados si las plantas se les aplica Se por vía foliar o a través de la solución nutritiva. En el presente trabajo desciframos los mecanismos a través de los cuales la aplicación de Se vía radicular podría disminuir la toxicidad de Cd con respecto al metabolismo de C y N, en el que las poliaminas juegan un papel importante.

La mayor tolerancia de las plantas del tratamiento +Cd/+SeR, con respecto a los demás tratamientos, podría deberse a que este tratamiento indujo un aumento de la concentración de las poliaminas Spm, Spd, Put y Cad e incrementó la relación Spm+Spd/Put y las formas conjugadas con respecto a las formas libres o insolubles. Esta respuesta hace que las plantas sean más tolerantes a Cd.

El estudio metabolómico de los ácidos orgánicos y aminoácidos reveló que estas plantas podrían poner en juego otras vías de protección en la presencia de Cd, como la vía fenilpropanoide, la activación de elicitores y segregación de ácido málico al medio para bloquear su entrada en la planta.

Aunque el tratamiento +Cd/+SeF también fue eficaz a la toxicidad de Cd, este no fue tan eficaz como +Cd/+SeR. Los datos del estudio metabólico indicaron que el tratamiento foliar con Se causó algunos daños a las plantas de pimiento o desencadenó una serie de respuestas metabólicas que fue diferente a las observadas en las plantas SeR las cuales fueron menos eficientes contra toxicidad por Cd. Estas respuestas desencadenaron una alta concentración de H₂O₂ con el daño que este conlleva.

7.3 PUBLICACIÓN 3

Application of Biocat G, Selenium, and Chitosan to Counteract the Negative Effects of Cd in Broccoli Plants Grown in Soilless Culture

Rafael Pérez-Millán, Jose Maria Cámara-Zapata, Juan Carlos Fernández-Zapata, Silvia Simón-Grao, Marina Alfosea-Simón, Ernesto Alejandro Zavala-González, Muhammad Adnan Shahid and Francisco García-Sánchez

Agronomy 2022, 12, 1327

Factor de impacto: 3,949 Q1 (2021) (Categoría Agronomy y Plant Science)

El objetivo de este ensayo fue estudiar diferentes tratamientos paliativos de la toxicidad del Cd como aplicación al suelo de Biocat G (producto granulado formulado con una mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos), y aplicaciones radiculares y foliares de Se y quitosano en plantas de brócoli. La hipótesis fue que estos productos pueden limitar la absorción de Cd por la raíz y su toxicidad en el tejido vegetal al ser ricos en compuestos que contienen grupos –OH como es el caso del Biocat G y quitosano, y, en la acción que tiene el Se sobre el Cd como ya vimos en el experimento anterior.

7.3.1 Resumen de resultados y discusión

El cadmio (Cd), además de ser un metal pesado sin funciones biológicas en las plantas, es tóxico en las hojas a bajas concentraciones. Puede llegar a los cultivos por el uso del agua y lodos (procedentes de plantas de depuradoras y de reciclaje urbanas e industriales) y de materiales orgánicos de diferentes industrias. Así, los agricultores se ven obligados a adoptar medidas específicas para impedir su acumulación en la parte comestible de las plantas; especialmente en plantas de brócoli, ya que este cultivo tiene una gran capacidad para extraer nutrientes y metales pesados de la rizosfera. De hecho, entre todos los metales pesados, es el Cd el que se acumula con mayor facilidad en estas plantas, seguido de Zn y Pb.

El gran reto de las empresas que producen bioestimulantes es la formulación de productos que pueden reducir la absorción de Cd por las raíces, para impedir su acumulación en la parte comestible de los cultivos, y, a la vez desactivar su toxicidad cuando entre en las plantas. Para tal fin, en este experimento se ensayaron cinco estrategias diferentes para reducir la absorción y toxicidad de Cd en las plantas. De ellos, los que mostraron los mejores resultados fueron la aplicación de Biocat G (ácidos fúlvicos/húmicos) y la aplicación de Se, ambos por vía radicular, ya que estos fueron capaces de mitigar la toxicidad de Cd. Además, Biocat G consiguió reducir

la concentración de Cd en la parte comestible de las plantas (inflorescencias). Aunque las hojas de las plantas de brócoli en este tratamiento acumularon la mayor cantidad de Cd, el transporte desde las hojas a la inflorescencia fue bajo como se puede ver en la concentración de Cd observado en esta parte de las plantas.

El cadmio en las plantas puede afectar negativamente a diferentes procesos, como la germinación de las semillas, el crecimiento y desarrollo vegetativo de las plantas, y, el rendimiento y la calidad de la cosecha; y esto se debe a la toxicidad que tiene el Cd en las plantas que afecta negativamente a diferentes procesos fisiológicos como la absorción de agua y nutrientes, sistemas antioxidantes, sistema fotosintético y síntesis de aminoácidos y proteínas, entre otros. En nuestro experimento, las plantas de brócoli mostraron una alta sensibilidad a la toxicidad de Cd con respecto al crecimiento de la inflorescencia (parte comercial del cultivo) ya que esta parte de la planta se redujo un 49%. Esto podría deberse a que se acumuló una alta concentración de Cd, incluso más que en las hojas. Rizwan et al. (2019) informó que las especies de *Brassica* son tolerantes a la toxicidad de Cd a través de diferentes mecanismos, incluido la estimulación del sistema de defensa antioxidante, quelación y compartimentación de Cd en las células, y acumulación de aminoácidos totales y osmoprotectores. Sin embargo, en el brócoli la alta acumulación de Cd y la reducción del crecimiento en las inflorescencias hace necesario aplicar estrategias agronómicas para reducir este problema y evitar así la pérdida de producción y calidad de la cosecha.

De las cinco estrategias aplicadas, el Biocat G vía radicular proporcionó los mejores resultados, ya que estimuló el crecimiento de la planta, aumentó el peso seco y la superficie foliar, y, no sólo relativo al tratamiento Cd (T2), sino también al tratamiento testigo (T1) sin Cd. Y, esto ocurrió a pesar de que la concentración foliar de Cd en las plantas de Biocat G fue un 46% mayor que las plantas del resto de tratamientos con Cd. Esto indica que los beneficios de este producto se deben a su capacidad para inactivar la toxicidad del Cd en las plantas, en lugar de restringir su absorción. Además, otros de los beneficios de este producto fue que limitó la acumulación de Cd en la parte comestible de las plantas (inflorescencias), reduciéndola en un 43% con respecto al resto de los tratamientos con Cd. La alta acumulación y la baja toxicidad de Cd en las plantas de Biocat G podría explicarse porque este producto está formulado con una alta concentración de ácidos orgánicos, entre ellos los ácidos fúlvicos y húmicos. Estos son de bajo peso molecular que contienen un gran número de grupos -OH por lo que forman complejos con los metales pesados reduciendo su reactividad. Cuando estos complejos ácidos orgánicos-Cd son absorbidos por las plantas, pueden almacenarse en los tejidos vegetales en grandes cantidades sin llegar a ser tóxicos (De Sousa et al., 2020; Bolan et al., 2014; Shahid et al., 2012), por lo tanto, aunque aumenta la concentración de Cd en las plantas estas no sufren daños por fitotoxicidad. En estas plantas, las inflorescencias presentaron menor concentración de Cd, por lo que la entrada de Cd en el floema y su transporte hacia las inflorescencias podría haber sido limitados, aunque los mecanismos que

rigen este fenómeno siguen siendo desconocidos. La formación de compuestos orgánicos-Cd o cambios en el pH del floema podrían ser algunas de las causas de la baja movilidad del Cd desde las hojas a las inflorescencias de las plantas de Biocat G (Shahid et al., 2012).

El selenio es un elemento beneficioso en las plantas para su crecimiento, desarrollo, rendimiento y resistencia contra enfermedades en una amplia variedad y especies de plantas, y también puede mejorar la tolerancia a la toxicidad por Cd como ya hemos visto en el primer experimento de esta tesis. En este experimento con plantas de brócoli también se observó que la aplicación radicular de Se tuvo efectos beneficiosos.

En relación con los tratamientos con quitosano (vía foliar o radicular), estos no cambiaron el patrón de respuesta a la toxicidad de Cd respecto a las plantas provenientes del tratamiento de Cd sin aplicación de tratamientos paliativos. En otro experimento, Zong et al. (2017) observó que la aplicación foliar de quitosano (peso molecular de 1 kDa) mostró una disminución de la concentración de Cd en brotes de colza comestible. Los autores indicaron que esto se debió a que el quitosano tiene la capacidad de formar complejos con metales pesados debido a la presencia de grupos amino e hidroxilo funcionales. La diferente respuesta entre nuestro experimento y el experimento de Zong podría ser debido a que el peso molecular del quitosano fue diferente. Por lo tanto, para cada cultivo, condición de crecimiento y concentración de Cd en la solución nutritiva, es necesario seleccionar el peso molecular óptimo de quitosano.

El reglamento (CE) N. 1881/2006 de la Comisión Europea de 19 de diciembre de 2006 establece el contenido máximo de contaminantes específicos en los productos alimenticios. Para el Cd da una concentración máxima de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ peso seco en vegetales y una ingesta diaria estimada (EDI) de $0,001 \text{ mg kg}^{-1} \text{ BW día}^{-1}$ (siendo BW el peso corporal medio). En nuestro ensayo, la concentración de Cd en la parte comestible osciló entre $1,34\text{-}4,64 \text{ mg kg}^{-1}$, por lo que fue superior a la recomendada por la Comisión Europea (EFSA, 2009). Y, en consecuencia, el cálculo de la ingesta diaria que se obtuvo, expresada en mg kg^{-1} de peso corporal por día tanto para adultos como niños también fue superior al EDI recomendado por dicho organismo. El único tratamiento que no superó el valor máximo recomendado fue para las plantas con Biocat G, cuyo valor EDI fue inferior a $0,001 \text{ mg kg}^{-1} \text{ BW día}^{-1}$.

Por otro lado, también se calculó la tasa de riesgo objetivo (THQ, por sus siglas en inglés) cuyos valores inferiores a uno son indicadores de un riesgo potencial para la salud (Melo, 2015). Al analizar los resultados obtenidos, encontramos que el tratamiento con Biocat G fue el único que eliminó el riesgo potencial para la salud, tanto para adultos como para niños. El cálculo del riesgo cancerígeno (CR) en función de la exposición a largo plazo a la contaminación por Cd osciló entre $3,6\text{-}8,9 \times 10^{-3}$ y $1,14\text{-}9,9 \times 10^{-3}$ para adultos y niños, respectivamente, siendo estos valores más altos que el valor umbral de $1,0 \times 10^{-6}$ y $1,0 \times 10^{-4}$ establecidos (Shaheen et al., 2016). Valores

de CR iguales a 10^{-6} y 10^{-4} equivalen a un caso de cáncer por cada 1.000.000 y 10.000 individuos respectivamente (De Sousa et al., 2020). Entre ellos el peor tratamiento ensayado fue la aplicación foliar de Se, que superó incluso al tratamiento con Cd sin ninguna aplicación de materias activas paliativas. Por lo tanto, ninguna de las cinco estrategias ensayadas consiguió hacer que la inflorescencia de las plantas de brócoli regadas con Cd fuera comestibles a largo plazo.

7.3.2 Conclusión

El riego con agua que contiene una concentración de Cd de 3 mg/L disminuyó el crecimiento de las inflorescencias en las plantas de brócoli y aumentó considerablemente la acumulación de este metal, tanto en las partes comestibles como no comestibles de la planta, superando los índices de riesgo para la salud humana tanto para adultos como para niños (EDI, CR). Entre las estrategias utilizadas para mitigar toxicidad de Cd, las mejores fueron las aplicaciones de Biocat G (ácidos fúlvicos/húmicos) y Se, ambos aplicados vía radicular. En relación con el índice de salud ORD, este índice indica que el uso de agua que contiene 3 mg L⁻¹ de Cd hace que el cultivo de brócoli sea inviable desde el punto de vista toxicológico para cualquiera de los productos aplicados. Por último, es importante destacar que la aplicación foliar de Se debe evitarse, ya que puede aumentar la toxicidad de Cd, como lo indica la alta acumulación de Cd y los altos valores de ORD encontrados en el presente estudio. En futuros experimentos se estudiará si los efectos beneficiosos de Biocat G (ácidos fúlvicos/húmicos) y Se, ambos vía radicular, se debe a que estos productos actúan sobre las plantas desactivando la toxicidad del Cd, pero sin afectar a su absorción y transporte en las plantas.



8. CONCLUSIONES GENERALES



8. CONCLUSIONES GENERALES

Para cada uno de los ensayos realizados en este Tesis se han obtenido una serie de conclusiones que fueron expuestas previamente en los correspondientes capítulos de esta memoria. En este apartado se exponen de forma muy resumida las conclusiones globales:

The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions

- Las plantas de pimiento de la variedad Cristal son sensibles al exceso de Cd en la solución nutritiva de cultivo. Una concentración de 8,5 μM de Cd produce una disminución de la biomasa al reducir el crecimiento de la parte aérea. Esta disminución se produce con una concentración de Cd tan baja como 28 ppm. Una particularidad de estas plantas se observó en la raíz, en las que se acumuló una gran cantidad de Cd (1500 ppm) sin que su crecimiento se viera alterado.
- La aplicación de Se de forma foliar o radicular a una concentración de 10 μM en forma de Na_2SeO_4 tiene efectos positivos en las plantas cultivadas con exceso de Cd, siendo la aplicación foliar la más eficaz. Este tratamiento disminuyó el contenido de Cd en las plantas a la vez que redujo su toxicidad bien desactivando su reactividad y/o disminuyendo sus efectos en cuanto al daño oxidativo.

Effects of Se Application on Polyamines and Carbon–Nitrogen Metabolism of Pepper Plants Suffering from Cd Toxicity

- La mayor tolerancia de las plantas del tratamiento +Cd/SeR, con respecto a los demás tratamientos, podría deberse a que este tratamiento indujo un aumento de la concentración de las poliaminas Spm, Spd, Put y Cad, e incrementó la relación Spm+Spd/Put y las formas conjugadas con respecto a las formas libres o insolubles. Esta respuesta hace que las plantas sean más tolerantes a Cd.
- El estudio metabólico de los ácidos orgánicos y aminoácidos reveló que las plantas +Cd/SeR podrían poner en juego diversas vías de protección en la presencia de Cd, como la vía fenilpropanoide, la activación de elicitores, y segregación de ácido málico al medio para bloquear su entrada en la planta.
- Aunque el tratamiento +Cd/+SeF también fue eficaz a la toxicidad de Cd, este no fue tan eficaz como +Cd/+SeR. Los datos del estudio metabólico indicaron que el tratamiento foliar con Se causó algunos daños a las plantas de pimiento o desencadenó una serie de respuestas metabólicas que fue diferente a las observadas en las plantas SeR las cuales fueron menos eficientes contra toxicidad por Cd. Estas respuestas desencadenaron una alta concentración de H_2O_2 con el daño que esto conlleva.

Application of Biocat G, Selenium, and Chitosan to Counteract the Negative Effects of Cd in Broccoli Plants Grown in Soilless Culture

- El riego con agua que contiene una concentración de Cd de 3 mg/L disminuye el crecimiento de las inflorescencias en las plantas de brócoli y aumentó considerablemente la acumulación de este metal tanto en las partes comestibles como no comestibles de la planta, superando los índices de riesgo para la salud humana tanto para adultos como para niños (EDI, CR).
- Entre las estrategias utilizadas para mitigar toxicidad de Cd, las mejores fueron las aplicaciones de Biocat G (ácidos fúlvicos/húmicos) y Se, ambos aplicados vía radicular. La primera de ellas redujo la toxicidad de Cd en la planta y disminuye su transporte desde las hojas a las inflorescencias.
- En relación con el estudio toxicológico, el índice de salud ORD, indica que el uso de agua que contiene 3 mg L⁻¹ de Cd hace que el cultivo de brócoli sea inviable desde el punto de vista de la salud humana para cualquiera de los productos de aplicados.
- Es importante también destacar que la aplicación foliar de Se debe evitarse, ya que puede aumentar la toxicidad de Cd, como indica la alta acumulación de Cd y los altos valores de ORD encontrados en el presente estudio.





9. INVESTIGACIONES FUTURAS



9. INVESTIGACIONES FUTURAS

Los estudios de investigación básica son necesarios para conocer las respuestas y efectos de los estreses abióticos en las plantas porque causan efectos adversos en las plantas, que afecta al rendimiento en los cultivos agrícolas. Los metales pesados, como el cadmio, son fitotóxicos a muy bajas concentraciones, tienen una elevada movilidad del suelo a la planta, se acumulan en diferentes tejidos celulares, ocasionando toxicidad y afectando al desarrollo del cultivo. Por último, estos cultivos se pueden introducir en la cadena alimentaria pudiendo generar enfermedades. En esta tesis se ha estudiado el crecimiento de cultivos en condiciones de toxicidad por cadmio, y evaluado la aplicación de diferentes tratamientos paliativos. Los experimentos se han realizado desde el punto de vista fisiológico, bioquímico, nutricional y morfológico intentado elucidar porque el cadmio es tóxico en los cultivos y qué mecanismos utilizan las plantas para reducir, en la medida de lo posible, esta toxicidad. Especialmente, se ha puesto especial atención el papel que juega el selenio y un producto comercial en base a materia orgánica, como el Biocat G, en la mitigación de los efectos negativos del cadmio. En función a los estudios realizados y los resultados obtenidos en esta tesis, futuros estudios podrían encaminarse hacia la elucidación de los aspectos moleculares que regulan la absorción y transporte del cadmio y selenio en las plantas, así como en el análisis bioquímico y metabólico de las vías por las cuales el selenio y productos comerciales como el Biocat G mitigan la toxicidad por cadmio. Los resultados obtenidos, han puesto de manifiesto el interés en investigar a futuro el efecto de la aplicación de selenio en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés, ya sea biótico (plagas por nemátodos, hongos o bacterias) y abióticos (temperaturas extremas, encharcamiento, salinidad y sequía). El selenio a bajas dosis es esencial para la salud humana, por ello, también se pretende evaluar la aplicación de Se en la biofortificación de cultivos, con el fin de mejorar la absorción del selenio en la dieta humana.

Asimismo, desde un punto de vista más aplicado en el contexto agronómico, esta información es de utilidad en la formulación de bioestimulantes específicos. Los bioestimulantes son productos agroquímicos que potencian la conversión de la agricultura convencional a un modelo de producción agraria más respetuosa con el medio ambiente al reducir el empleo de fertilizantes convencionales y otros productos de síntesis química, pero también hacia un modelo agronómico que genere un mayor rendimiento en tiempo y cosecha. No obstante, en el desarrollo y fabricación de un producto bioestimulante que contenga selenio es necesario resolver cuestiones como: - el comportamiento químico del selenio en interacción con otros compuestos coadyuvantes de formulación (antiapelmazantes, reguladores del pH, colorantes, antiespumantes, y, otras materias activas); - parámetros físico-químicos imprescindibles en la formulación y fabricación de estos productos, así como los parámetros técnicos de la maquinaria y equipos que se usan a escala industrial (tolvas, mezcladores, agitadores, etc.); -los efectos de estos nuevos productos

bioestimulantes a nivel de cultivo a fin de conocer la mejor forma de aplicación teniendo en cuenta el tipo de cultivo, las condiciones edafoclimáticas, el establecimiento de dosis, el momento de aplicación de acuerdo a los diferentes estados fenológicos de los cultivos, y, por último, la combinación de estos bioestimulantes con la de fertilizantes convencionales.





10. REFERENCIAS



10. REFERENCIAS

Abedi, S., Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z., Ebadi, M. 2021. Nitric oxide and selenium nanoparticles confer changes in growth, metabolism, antioxidant machinery, gene expression, and flowering in chicory (*Cichorium intybus* L.): Potential benefits and risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 3136–3148. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10706-2>

Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-Gonzalez, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., Lidón, V., García-Sánchez, F. 2020a. Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids Aspartic acid, Glutamic Acid and Alanine. *Front. Plant Sci.* 11, 581234. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581234>

Alfosea-Simón, M., Zavala-Gonzalez, E.A., Camara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, J.J., Simón, I., Simón-Grao, S., García-Sánchez, F. 2020b. Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Sci. Hortic.* 272, 10950. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109509>

Akbulut, M., Çakır, S. 2010. The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.11.001>

Aoshima, K. 2016. Itai-itai disease: renal tubular osteomalacia induced by environmental exposure to cadmium—historical review and perspectives. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62(4), 319-326. <https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1159116>

Arenas-Lago, D., Vega, F.A., Silva, L.F.O., Andrade, M.L. 2013. Soil interaction and fractionation of added cadmium in some Galician soils. *Microchemical journal*, 110, 681-690. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.08.003>

Baba, H., Tsuneyama, K., Yazaki, M., Nagata, K., Minamisaka, T., Tsuda, T., Nomoto, K., Hayashi, S., Miwa, S., Nakajima, T., Nakanishi, Y., Aoshima, K., Imura, J. 2013. The liver in itai-itai disease (chronic cadmium poisoning): pathological features and metallothionein expression. *Modern Pathology*, 26(9), 1228-1234. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.62>

Bajaj, M., Eiche, E., Neumann, T., Winter, J., Gallert, C. 2011. Hazardous concentrations of selenium in soil and groundwater in North-West India. *Journal of hazardous materials*, 189(3), 640-646. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.086>

Balk, J., Pilon, M. 2011. Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants. *Trends in plant science*, 16(4), 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.006>

Bates, L., Waldren, R., Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.* 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

Behne, D., Kyriakopoulos, A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annual review of nutrition*, 21, 453.

Belzile, N., Wu, G.J., Chen, Y.W., Appanna, V.D. 2006. Detoxification of selenite and mercury by reduction and mutual protection in the assimilation of both elements by *Pseudomonas fluorescens*. *Science of the Total Environment*, 367(2-3), 704-714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.03.008>

Bodnar, M., Konieczka, P., Namiesnik, J. 2012. The properties, functions, and use of selenium compounds in living organisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 30(3), 225-252. <https://doi.org/10.1080/10590501.2012.705164>

- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B., Scheckel, K. 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils—To mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* 266, 141–166. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>
- Campos-Mañas, M.C., Plaza-Bolaños, P., Martínez-Piernas, A.B., Sánchez-Pérez, J.A., Agüera, A. 2019. Determination of pesticide levels in wastewater from an agro-food industry: Target, suspect and transformation product analysis. *Chemosphere*, 232, 152-163. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.147>
- Cao, L., Lin, C., Gao, Y., Sun, C., Xu, L., Zheng, L., Zhang, Z. 2020. Health risk assessment of trace elements exposure through the soil-plant (maize)-human contamination pathway near a petrochemical industry complex, Northeast China. *Environ. Pollut.* 263, 114414. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114414>.
- Cappa, J.J., Cappa, P.J., El Mehdawi, A.F., McAleer, J.M., Simmons, M.P., Pilon-Smits, E.A. 2014. Characterization of selenium and sulfur accumulation across the genus *Stanleya* (*Brassicaceae*): A field survey and common-garden experiment. *American journal of botany*, 101(5), 830-839. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400041>
- Carey, A.M., Scheckel, K.G., Lombi, E., Newville, M., Choi, Y., Norton, G.J., Price, A., Meharg, A.A. 2012. Grain accumulation of selenium species in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental science & technology*, 46(10), 5557-5564. <https://doi.org/10.1021/es203871j>
- Cartes, P., Jara, A.A., Pinilla, L., Rosas, A., Mora, M.L. 2010. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Annals of Applied Biology*, 156(2), 297-307. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00387.x>
- Chance, B., Maehly, S.K. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol.* 2, 764–775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Chandlee, J.M., Scandalios, J.G. 1984. Analysis of variants affecting the catalase developmental program in maize scutellum. *Theor. Appl. Genet.* 69, 71–77. <https://doi.org/10.1007/BF00262543>
- Châtelain, E., Satour, P., Laugier, E., Ly Vu, B., Payet, N., Rey, P., Montrichard, F. 2013. Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3633-3638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220589110>
- Chen, T.F., Zheng, W.J., Wong, Y.S., Yang, F. 2008. Selenium induced changes in activities of antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments in *Spirulina platensis*. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 40–48. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00600.x>
- Chu, J., Yao, X., Zhang, Z. 2010. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 136, 355–363. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8542-3>
- De Pinto, M.C., Locato, V., De Gara, L. 2012. Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell Environ.* 35, 234–244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02387.x>
- De Sousa, F.F., Carmo, M.G.F.D., Lima, E.S.A., Souza, C.D.C.B.D., Sobrinho, N.M.B.D.A. 2020. Lead and Cadmium Transfer Factors and the Contamination of Tomato Fruits (*Solanum lycopersicum*) in a Tropical Mountain Agroecosystem. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 105, 325–331. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02930-w>
- Djanaguiraman, M., Prasad, P.V., Seppanen, M. 2010. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.09.009>

- Dos Santos, C.A., Sobrinho, N.M.B.D.A., Gonçalves, R.G.D.M., Costa, T.G.A., Carmo, M.G.F.D. 2021. Toxic Metals in Broccoli by Combined Use of Acidity Correctives and Poultry Litter Under Mountain Tropical Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 507–518. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00817-3>.
- Drahonovsky, J., Szakova, J., Mestek, O., Tremlova, J., Kana, A., Najmanova, J., Tlustos, P. 2016. Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. *Environ. Exp. Bot.* 125, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.01.006>
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1304–1323. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0529-8>
- El Kassis, E., Cathala, E., Rouached, H., Fourcroy, P., Berthomieu, P., Terry, N., Davidian, J.C. 2007. Characterization of a selenate-resistant Arabidopsis mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiol.* 143, 1231–1241. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091462>
- Ellis, D.R., Salt, D.E. 2003. Plants, selenium, and human health. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 273–279. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00030-X)
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E.E., Bolan, N., Filip, M., Sebastian, A., Prasad, M.N., Rinklebe, J. 2021. Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-52. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435>
- Erel, R., Eppel, A., Yermiyahu, U., Ben-Gal, A., Levy, G., Zipori, I., Schaumann, G.E., Mayer, O. Dag, A. 2019. Long-term irrigation with reclaimed wastewater: Implications on nutrient management, soil chemistry and olive (*Olea europaea* L.) performance. *Agricultural Water Management*, 213, 324-335. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.10.033>
- EFSA. European Food Safety Authority. 2009. Available online. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2009.980> (Último acceso 31/10/2022).
- EFSA. Scientific Report. 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10(1), 2551. *European Food Safety Authority*. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2012.2551> (consultado el 29 de septiembre de 2022).
- Faizan, M., Rajput, V., Al-Khuraif, A., Arshad, M., Minkina, T., Sushkova, S., Yu, F. 2021. Effect of Foliar Fertigation of Chitosan Nanoparticles on Cadmium Accumulation and Toxicity in *Solanum lycopersicum*. *Biology*, 10, 666. <https://doi.org/10.3390/biology10070666>
- Fan, Y., Li, Y., Li, H., Cheng, F. 2018. Evaluating heavy metal accumulation and potential risks in soil-plant systems applied with magnesium slag-based fertilizer. *Chemosphere*. 197, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.055>
- FAO. 1985. Water Quality for Agriculture, FAO Irrigation and Drainage Paper No. 29, FAO: Rome, Italy.
- FAO. 2022. Crops and livestock products. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Última visita 21 octubre 2022).
- Feist, L.J., Parker, D.R. 2001. Ecotypic variation in selenium accumulation among populations of *Stanleya pinnata*. *New Phytol.* 149, 61–69. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00004.x>

- Feng, C.X., Liu, J.J., Liu, S., Hu, R.Z., Chi, G.X. 2009. Petrogenesis and sedimentary environment of the cherts from Yutangba, Western Hubei province: evidence from silicon, oxygen, carbon and sulfur isotopic compositions. *Acta Petrol. Sin.* 25, 1253–1259.
- Feng, J., Shi, Q., Wang, X., Wei, M., Yang, F., Xu, H. 2010. Silicon supplementation ameliorated the inhibition of photosynthesis and nitrate metabolism by cadmium (Cd) toxicity in *Cucumis sativus* L. *Sci. Hortic.* 123, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.10.013>
- Feng, R.W., Wei, C.Y., Tu, S.X., Wu, F.C. 2009. Effects of Se on the essential elements uptake in *Pteris vittata* L. *Plant Soil* 325, 123–132. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9961-9>
- Feng, R.W., Wei, C.Y., Tu, S.X., Tang, S.R., Wu, F.C. 2011. Detoxification of antimony by selenium and their interaction in paddy rice under hydroponic conditions. *Microchem. J.* 97, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.06.003>
- Feng, R.W., Wei, C.Y. 2012. Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* L., a potential selenium phytoremediation plant. *Plant Soil Environ.* 58, 105–110.
- Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z., Golda, A. 2008. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *J. Plant Physiol.* 165, 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.006>
- Filek, M., Zembala, M., Hartikainen, H., Miszalski, Z., Kornas, A., Wietecha-Posłuszny, R., Walas, P. 2009. Changes in wheat plastid membrane properties induced by cadmium and selenium in presence/absence of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 96, 19–28. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9455-0>
- Filek, M., Gzyl-Malcher, B., Zembala, M., Bednarska, E., Laggner, P., and Kriechbaum, M. 2010. Effect of selenium on characteristics of rape chloroplasts modified by cadmium. *J. Plant Physiol.* 167, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.003>
- Flores, H.E., Galston, A.W. 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69, 701–706. <https://doi.org/10.1104/pp.69.3.701>
- Fordyce, F.M. 2013. "Selenium deficiency and toxicity in the environment." *Essentials of medical geology*. Springer, Dordrecht. 375-416. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5_16
- Freeman, J.L., Quinn, C.F., Marcus, M.A., Fakra, S., Pilon-Smits, E.A. 2006. Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Current Biol.* 16, 2181–2192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.015>
- Galeas, M.L., Zhang, L.H., Freeman, J.L., Wegner, M., Pilon-Smits, E.A.H. 2007. Seasonal fluctuations of selenium and sulfur accumulation in seleniumhyperaccumulators and related non-accumulators. *New Phytol.* 173, 517–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01943.x>
- Genchi, G., Sinicropi, M.S., Lauria, G., Carocci, A., Catalano, A. 2020. The effects of cadmium toxicity. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3782. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Germ, M., Kreft, I., Osvald, J. 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 43, 445–448. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.03.004>
- Germ, M., Stibilj, V., Osvald, J., Kreft, I. 2007. Effect of selenium foliar application on chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55, 795–798. <https://doi.org/10.1021/jf0629888>

- Gigolashvili, T., Kopriva, S. 2014. Transporters in plant sulphur metabolism. *Front. Plant Sci.* 5:422. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00442>
- Gomes-Junior, R.A., Gratão, P.L., Gaziola, S.A., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R. A. 2007. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Funct. Plant Biol.* 34, 449–456. <https://doi.org/10.1071/FP07010>
- Gore, F., Fawell, J., Bartram, J. 2010. Too much or too little? A review of conundrum of selenium. *J. Water Health* 8, 405–416. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.060>
- Grant, K., Carey, N.M., Mendoza, M., Schulze, J., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H., Hoewyk, D. 2011. Adenosine 5-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in *Arabidopsis* implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. *Biochem. J.* 438, 325–335. <https://doi.org/10.1042/BJ20110025>
- Groat, R.G., Vance, C.P. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.): Developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiol.* 67, 1198–1203. <https://doi.org/10.1104/pp.67.6.1198>
- Guignardi, Z., Schiavon, M. 2017. Biochemistry of plant selenium uptake and metabolism. In *Selenium in Plants, Plant Ecophysiology*, Pilon-Smits, E., Winkel, L., Lin, Z.Q., Eds., Springer: Cham, The Netherlands, Volume 12, pp. 21–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0_2
- Guo, H., Hong, C., Chen, X., Xu, Y., Liu, Y., Jiang, D., Zheng, B. 2016. Different growth and physiological responses to cadmium of the three *Miscanthus* species. *PLoS ONE.* 11, e0153475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153475>
- Gupta, M., Gupta, S. 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 2074. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02074>
- Hageman, R.H., Hucklesby, D.P. 1971. [45] Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.* 23, 491–503. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(71\)23121-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(71)23121-9)
- Haider, F.U., Liqun, C., Coulter, J.A., Cheema, S.A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., Farooq, M. 2021. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- Hallenbeck, P.C., George, G.N., Prince, R.C., Thorneley, R.N. 2009. Characterization of a modified nitrogenase Fe protein from *Klebsiella pneumoniae* in which the 4Fe4S cluster has been replaced by a 4Fe4Se cluster. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14, 673–682. <https://doi.org/10.1007/s00775-009-0480-1>
- Hamid, Y., Tang, L., Hussain, B., Usman, M., Lin, Q., Rashid, M.S., He, Z., Yang, X. 2020. Organic soil additives for the remediation of cadmium contaminated soils and their impact on the soil-plant system: A review. *Science of the Total Environment*, 707, 136121. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136121>
- Harris, J., Schneberg, K.A., Pilon-Smits, E.A. 2014. Sulfur–selenium– molybdenum interactions distinguish selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* from non-hyperaccumulator *Brassica juncea* (Brassicaceae). *Planta* 239, 479–491. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1996-8>
- Hartikainen, H. 2005. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.009>
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M. 2011. Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in

- rapeseed seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* 143, 1758–1776. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-8998-9>
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M. 2011. Selenium-induced upregulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity induced damage in rapeseed seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* 43, 1704–1721. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-8958-4>
- Hatfield, D.L., Tsuji, P.A., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N. 2014. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends. Biochem. Sci.* 39, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.007>
- Haynes, W. 2013. Tukey's Test. In *Encyclopedia of Systems Biology*, Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.H., Yokota, H., Eds., Springer: Berlin/Heidelberg, Germany. 2303–2304.
- Hazebrouck, S., Camoin, L., Faltin, Z., Strosberg, A.D., Eshdat, Y. 2000. Substituting selenocysteine for catalytic cysteine 41 enhances enzymatic activity of plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 28715–28721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004985200>
- Hernández, M.D.C.R. 2013. Respuestas fisiológicas, moleculares y fitoquímicas de variedades de *Brassica oleracea* (Grupo italica) sometidas a estrés abiótico. *Tesis Doctoral Universidad de Murcia*.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* 207, 604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Hondal, R.J., Marino, S.M., Gladyshev, V.N. 2012. Selenocysteine in thiol/disulfide-like exchange reactions. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1675–1689. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5013>
- Hugouvieux, V., Dutilleul, C., Jourdain, A., Reynaud, F., Lopez, V., and Bourguignon, J. 2009. Arabidopsis putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. *Plant Physiol.* 151, 768–781. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144808>
- Huang, B., Xin, J., Dai, H., Zhou, W. 2017. Effects of interaction between cadmium (Cd) and selenium (Se) on grain yield and Cd and Se accumulation in a hybrid rice (*Oryza sativa*) system. *J. Agric. Food Chem.* 65, 9537–9546. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03316>
- Huang, X., Duan, S., Wu, Q., Yu, M., Shabala, S., 2020. Reducing Cadmium Accumulation in Plants: Structure–Function Relations and Tissue-Specific Operation of Transporters in the Spotlight. *Plants*, 9(2), 223. <https://doi.org/10.3390/plants9020223>
- Hui, C.Y., Guo, Y., Liu, L., Yi, J. 2022. Recent advances in bacterial biosensing and bioremediation of cadmium pollution: a mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03198-w>
- Hussain, S., Khaliq, A., Noor, M.A., Tanveer, M., Hussain, H.A., Hussain, S., Shah, T., Mehmood, T. 2020. Metal toxicity and nitrogen metabolism in plants: An overview. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil*, Springer: Singapore. 221–248. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7264-3_7

- Huybrechts, M., Cuypers, A., Deckers, J., Iven, V., Vandionant, S., Jozefczak, M., Hendrix, S. 2019. Cadmium and plant development: an agony from seed to seed. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3971. <https://doi.org/10.3390/ijms20163971>
- IBPGR, 1983. Genetic resources of Capsicum. vA global plan of action. International Board for *Plant Genetic Resources*. IBPGR Secretariat. Roma.
- Ismael, M.A., Elyamine, A.M., Moussa, M.G., Cai, M., Zhao, X., Hu, C., 2019. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics*, 11(2), 255-277. <https://doi.org/10.1039/C8MT00247A>
- Jodar-Abellan, A., López-Ortiz, M. I., & Melgarejo-Moreno, J. 2019. Wastewater treatment and water reuse in Spain. Current situation and perspectives. *Water*, 11(8), 1551. <https://doi.org/10.3390/w11081551>
- Kanamori, T., Konishi, S., Takahashi, E. 1972. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. *Physiol. Plant.* 26, 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1972.tb03536.x>
- Kaur, N., Sharma, S., Kaur, S. 2014. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? *Arch. Agron. Soil Sci.* 60, 1593–1624. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.918258>
- Kempers, A.J. 1974. Determination of sub-microquantities of ammonium and nitrates in soils with phenol, sodiumnitroprusside and hypochlorite. *Geoderma*. 12, 201–206. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(74\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0016-7061(74)90068-8)
- Khan, M.A., Khan, S., Khan, A., Alam, M. 2017. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the total environment*, 601, 1591-1605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>
- Kikkert, J., Berkelaar, E. 2013. Plant uptake and translocation of inorganic and organic forms of selenium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 458–465. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9926-0>
- Koleva, I.I., Vanbeek, T.A., Linssen, J.P.H., Degroot, A., Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity. A comparative study on 3 testing methods. *Int. J. Plant Chem. Biochem. Tech.* 13, 8–17. <https://doi.org/10.1002/pca.611>
- Kubier, A., Pichler, T. 2019. Cadmium in groundwater– A synopsis based on a large hydrogeochemical data set. *Science of the Total Environment*, 689, 831-842. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.499>
- Kubier, A., Wilkin, R.T., Pichler, T. 2019. Cadmium in soils and groundwater: a review. *Applied Geochemistry*, 108, 104388. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388>
- Kumar, M., Bijo, A.J., Baghel, R.S., Reddy, C.R.K., Jha, B. 2012. Selenium and spermine alleviates cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidant system and DNA methylation. *Plant Physiol. Biochem.* 51, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.10.016>
- Kumar, N., Kumar, V., Bose, B., Singhal, R.K. 2021. Cadmium toxicity in plants and alleviation through seed priming approach. *Plant Physiology Reports*, 26(4), 647-660. <https://doi.org/10.1007/s40502-021-00619-8>
- Kumar, S., Sharma, A. 2019. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. *Reviews on environmental health*, 34(4), 327-338. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0016>

- Łabanowska, M., Filek, M., Koscielniak, J., Kurdziel, M., Kulis, E., Hartikainen, H. 2012. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings-EPR, enzymatic and fluorescence studies. *J. Plant Physiol.* 169, 275–284 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.10.012>
- Lehotai, N., Kolbert, Z., Peto, A., Feigl, G., Ördög, A., Kumar, D., Tari, I., Erdei, L. 2012. Selenite-induced hormonal and signaling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *J. Exp. Bot.* 63, 5677–5687. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers222>
- Lemire, M., Mergler, D., Huel, G., Passos, C.J.S., Fillion, M., Philibert, A., Guimaraes, J.R., Rheault, I., Borduas, J., Normand, G. 2009. Biomarkers of selenium status in the amazonian context: blood, urine and sequential hair segments. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 19, 213–222. <https://doi.org/10.1038/jes.2008.14>
- Li, H.F., McGrath, S.P., Zhao, F.J. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol.* 178, 92–102. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02343.x>
- Li, H., Luo, N., Li, Y.W., Cai, Q.Y., Li, H.Y., Mo, C.H., Wong, M.H. 2017. Cadmium in rice: transport mechanisms, influencing factors, and minimizing measures. *Environmental pollution*, 224, 622-630. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.087>
- Lillo, C. 1984. Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.* 61, 214–218. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb05899.x>
- Liu, Y., Li, F., Yin, X.B., Lin, Z.Q. 2011. “Plant-based biofortification: from phytoremediation to Se-enriched agriculture products,” *Green Chemistry for Environmental Sustainability*, 341–356.
- Lu, Y., Cheng, J., Wang, J., Zhang, F., Tian, Y., Liu, C., Cao, L., Zhou, Y. 2022. Efficient Remediation of Cadmium Contamination in Soil by Functionalized Biochar: Recent Advances, Challenges, and Future Prospects. *Processes*, 10(8), 1627. <https://doi.org/10.3390/pr10081627>
- Maestre-Valero, J. F., González-Ortega, M. J., Martínez-Álvarez, V., & Martín-Gorriz, B. 2019. The role of reclaimed water for crop irrigation in southeast Spain. *Water Supply*, 19(5), 1555-1562. <https://doi.org/10.2166/ws.2019.024>
- Malagoli, M., Schiavon, M., dall’Acqua, S., Pilon-Smits, E.A. 2015. Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. *Front. Plant Sci.* 6:280. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00280>
- Malik, J.A., Goel, S., Kaur, N., Sharma, S., Singh, I., Nayyar, H. 2012. Selenium antagonizes the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* 77, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.12.001>
- MAPA. 2022. Anuario de estadística. *Superficies y producciones anuales de cultivos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> (Última visita 21 de octubre 2022)
- Maroto, J.V. 1992. Horticultura herbácea especial. *Mundi-Prensa*, 3ª Ed. Madrid.
- Maroto, J.V. 1995. El cultivo del brocoli en España. Evolución y principales problemáticas que plantea. *Hortoinformación*, 6(2), 27-37.

- Maroto Borrego J.V., Pomares García F., Baixauli Soria C. 2007. El cultivo de la coliflor y el brócoli. Fundación Rural Caja Valencia. Madrid. *Mundi-Prensa*, 335-347.
- Martínez-Ballesta, M.C., , López-Pérez, L., Pérez-Balibrea, S., Moreno DA, García-Viguera C., Carvajal, M. 2008. Cultivo del brócoli con aguas salinas. ¿Es posible algún beneficio? *Agrícola Vergel*, 315, 132-137.
- Mazej, D., Osvald, J., Stibilj, V. 2008. Selenium species in leaves of chicory, dandelion, lamb's lettuce and parsley. *Food Chem.* 107, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.036>
- McCraw, B. D. 1977. Physiological studies on fruit-set in pepper (*Capsicum annuum*, L.). Kansas State University.
- McCord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Mehdi, Y., Hornick, J.L., Istasse, L., Dufrasne, I. 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules* 18, 3292–3311. <https://doi.org/10.3390/molecules18033292>
- Melo, R.D.C. 2015. A cultura dos brócolis. Embrapa Hortaliças-Col Criar Plantar. BC 500P/500R Saber (INFOTECA-E).
- Méplan, C. 2011. Trace elements and ageing, a genomic perspective using selenium as an example. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25, S11–S16. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.10.002>
- Missana, T., Alonso, U., García-Gutiérrez, M. 2009. Experimental study and modeling of selenite sorption onto illite and smectite clays. *J. Colloid Interface Sci.* 334, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.02.059>
- Mohammadi, A.A., Zarei, A., Majidi, S., Ghaderpoury, A., Hashempour, Y., Saghi, M.H., Alinejad, A., Yousefi, M., Hosseingholizadeh, N., Ghaderpoori, M. 2019. Carcinogenic and non-carcinogenic health risk assessment of heavy metals in drinking water of Khorramabad, Iran. *MethodsX.* 6, 1642–1651. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.07.017>
- Morote, Á.F., Olcina, J., Hernández, M. 2019. The use of non-conventional water resources as a means of adaptation to drought and climate change in Semi-Arid Regions: South-Eastern Spain. *Water*, 11(1), 93. <https://doi.org/10.3390/w11010093>
- Mroczek-Zdyrska, M., Wójcik, M. 2012. The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. minor plants. *Biol. Trace Elem. Res.* 147, 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9292-6>
- Nakano, Y., Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in Ascorbate depleted médium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28, 131–140. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268>
- Navarro, T. 2018. Water reuse and desalination in Spain—challenges and opportunities. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 8(2), 153-168. <https://doi.org/10.2166/wrd.2018.043>
- Neysanian, M., Iranbakhsh, A., Ahmadvand, R., Oraghi Ardebili, Z., Ebadi, M. 2020. Comparative efficacy of selenate and selenium nanoparticles for improving growth, productivity, fruit quality, and postharvest longevity through modifying nutrition, metabolism, and gene expression in tomato, potential benefits and risk assessment. *PLoS ONE.*15, e0244207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244207>
- Nishijo, M., Nakagawa, H., Suwazono, Y., Nogawa, K., Kido, T. 2017. Causes of death in patients with Itai-itai disease suffering from severe chronic cadmium poisoning: a nested case–control

- analysis of a follow-up study in Japan. *BMJ open*, 7(7), e015694. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015694>
- Page, A., Bingham, F.T. 1973. Cadmium residues in the environment. *Residue reviews*, 1-44. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8498-8_1
- Pandey, C., Gupta, M. 2015. Selenium and auxin mitigates arsenic stress in rice (*Oryza sativa* L.) by combining the role of stress indicators, modulators and genotoxicity assays. *J. Hazard. Mater.* 287, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.01.044>
- Palusinska, M., Barabasz, A., Kozak, K., Papierniak, A., Maślińska, K., Antosiewicz, D.M. 2020. Zn/Cd status-dependent accumulation of Zn and Cd in root parts in tobacco is accompanied by specific expression of ZIP genes. *BMC plant biology*, 20(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2255-3>
- Pedrero, Z., Madrid, Y., Hartikainen, H., Cámara, C. 2008. Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *J. Agric. Food Chem.* 56, 266–271. <https://doi.org/10.1021/jf072266w>
- Pilon-Smits, E.A.H., Garifullina, G.F., Abdel-Ghany, S., Kato, S., Mihara, H., Hale, K.L., Jason, L., Esaki, N., Kurihara, T., Pilon, M. 2002. Characterization of a NifS-like chloroplast protein from Arabidopsis. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiol.* 139, 1309–1318. <https://doi.org/10.1104/pp.102.010280>
- Pilon-Smits, E.A.H., Quinn, C.F. 2010. “Selenium metabolism in plants,” in *Cell Biology of Metal and Nutrients*, Springer, Berlin, Heidelberg. 225-241. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10613-2_10
- Poblaciones, M.J., Rodrigo, S., Santamaría, O., Chen, Y., McGrath, S.P. 2014. Agronomic selenium biofortification in *Triticum durum* under Mediterranean conditions: from grain to cooked pasta. *Food Chem.* 146, 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.070>
- Pukacka, S., Ratajczak, E., and Kalemba, E. 2011. The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharium* L. seeds subjected to desiccation. *J. Plant Physiol.* 168, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.021>
- Purseglove, J. W. 1974. *Tropical Crops: Dicotyledons*. Singapore: Longman Singapore Publishers
- Qiu, X.M., Sun, Y.Y., Ye, X.Y., Li, Z.G. 2020. Signaling Role of Glutamate in Plants. *Front. Plant Sci.* 10, 1743. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01743>
- Quinn, C.F., Freeman, J.L., Reynolds, R.J., Cappa, J.J., Fakra, S.C., Marcus, M.A., et al. 2010. Selenium hyperaccumulation offers protection from cell disruptor herbivores. *BMC Ecol.* 10:19. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-10-19>
- Rady, M.M., Hemida, K.A. 2015. Modulation of cadmium toxicity and enhancing cadmium-tolerance in wheat seedlings by exogenous application of polyamines. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.008>
- Rai, P.K., Lee, S.S., Zhang, M., Tsang, Y.F., Kim, K.H. 2019. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment international*, 125, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>
- Rayman, M.P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 356, 233–241. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02490-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02490-9)

- Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *Boletín Oficial del Estado*, num. 294, de 8 de diciembre de 2007, pag. 50639 a 50666. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2007-21092>
- Reeves, M.A., Hoffman, P.R. 2009. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2457–2478. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0032-4>
- Reid, M.E., Duffield-Lillico, A.J., Slate, E., Natarajan, N., Turnbull, B., Jacobs, E., Alberts, D., Clark, L., Marshal, J. 2008. The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day Se treatment. *Nutr. Cancer* 60, 155–163. <https://doi.org/10.1080/01635580701684856>
- Reilly, C. 2006. *Selenium in Food and Health*, New York, NY: Springer Science Media. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33244-4_2
- Renkema, H., Koopmans, A., Kersbergen, L., Kikkert, J., Hale, B., Berkelaar, E. 2012. The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. *Plant Soil* 354, 239–250. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1069-3>
- Renwick, A.G., Dragsted, L.O., Fletcher, R.J. 2008. Minimising the population risk of micronutrient deficiency and over-consumption: a new approach using selenium as an example. *Eur. J. Nutr.* 47, 17–25. <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0691-6>
- Riaz, U., Aslam, A., uz Zaman, Q., Javeid, S., Gul, R., Iqbal, S., Javid, S., Murtaza, G., Jamil, M. 2021. Cadmium contamination, bioavailability, uptake mechanism and remediation strategies in soil-plant-environment system: a critical review. *Current Analytical Chemistry*, 17(1), 49-60. <https://doi.org/10.2174/1573411016999200817174311>
- Rizwan, M., Ali, S., Rehman, M.Z.U., Rinklebe, J., Tsang, D., Bashir, A., Maqbool, A., Tack, F.M.G., Ok, Y.S. 2018. Cadmium phytoremediation potential of Brassica crop species: A review. *Sci. Total Environ.* 631–632, 1175–1191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.104>
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588–590. <https://doi.org/10.1126/science.179.4073.588>
- Saidi, I., Chtourou, Y., Djebali, W. 2014. Selenium alleviates cadmium toxicity by preventing oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *J. Plant Physiol.* 171, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.024>
- Sanayama, Y., Nagasaka, H., Takayanagi, M., Ohura, T., Sakamoto, O., Ito, T., Ishige-Wada, M., Usui, H., Yoshino, M., Ohtake, A. 2011. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 103, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.03.019>
- Sánchez-Rodríguez, E., Romero, L., Ruiz, J.M. 2016. Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. *J. Plant Physiol.* 190, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.010>
- Sakizadeh, M., Martín, J.A.R. 2021. Spatial methods to analyze the relationship between Spanish soil properties and cadmium content. *Chemosphere*, 268, 129347. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129347>
- Schiavon, M., Moro, I., Pilon-Smits, E.A., Matozzo, V., Malagoli, M., Dalla Vecchia, F. 2012. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aqua. Toxicol.* 122–123, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.014>

- Shah, V., Daverey, A. 2020. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100774. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>
- Shaheen, N., Ahmed, K., Islam, S., Mamun, H.A., Tukun, A.B., Rahim, A.T.M. 2016. Health risk assessment of trace elements via dietary intake of 'non-piscine protein source' foodstuffs (meat, milk and egg) in Bangladesh. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 7794–7806. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6013-2>
- Shahid, M., Pinelli, E., Dumat, C. 2012. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation, role of synthetic and natural organic ligands. *J. Hazard. Mater.* 219–220, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.060>
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N.K., Antunes, P. 2016. Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume*, 241, 73-137. https://doi-org.publicaciones.umh.es/10.1007/398_2016_8
- Shanying, H.E., Xiaoe, Y.A.N.G., Zhenli, H.E., Baligar, V.C. 2017. Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: a review. *Pedosphere*, 27(3), 421-438. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B. 2019. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*. 24, 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Shiyu, Q.I.N., Hongen, L.I.U., Zhaojun, N.I.E., Rengel, Z., Wei, G.A.O., Chang, L.I., Peng, Z.H.A.O. 2020. Toxicity of cadmium and its competition with mineral nutrients for uptake by plants: A review. *Pedosphere*, 30(2), 168-180. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60002-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60002-9)
- Singh, R.D., Srivastava, H.S. 1986. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* 66, 413–416. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb05944.x>
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. 2009. Metallothioneins and related chelators. In *Metal Ions in Life Sciences*, Royal Society of Chemistry Publishing: Cambridge, UK, 2009,5. <https://doi.org/10.1002/anie.200903833>
- Six, L., Smolders, E. 2014. Future trends in soil cadmium concentration under current cadmium fluxes to European agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 485, 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.109>
- Smrkolj, P., Germ, M., Kreft, I., Stibilj, V. 2006. Respiratory potential and Se compounds in pea (*Pisum sativum* L.) plants grown from Se-enriched seeds. *J. Exp. Bot.* 57, 3595–3600. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl109>
- Sohail, M.I., Arif, M., Rauf, A., Rizwan, M., Ali, S., Saqib, M., Zia-ur-Rehman, M. 2019. Organic manures for cadmium tolerance and remediation. In *Cadmium Tolerance in Plants*, 19-67. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815794-7.00002-3>
- Solís-Domínguez, F.A., González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Rodríguez-Vázquez, R. 2007. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *J. Hazard Mater.* 141, 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.014>
- Songmei, L., Jie, J., Yang, L., Jun, M., Shouling, X., Yuanyuan, T., Youfa, L., Qingyao, S., Jianzhong, H. 2019. Characterization and evaluation of OsLCT1 and OsNramp5 mutants

- generated through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis for breeding low Cd rice. *Rice Science*, 26(2), 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.01.002>
- Sors, T.G., Ellis, D.R., Na, G.N., Lahner, B., Lee, S., Leustek, T., et al. 2005. Analysis of sulfur and selenium assimilation in Astragalus plants with varying capacities to accumulate selenium. *Plant J.* 42, 785–797. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02413.x>
- Spormann, S., Soares, C., Teixeira, J., Fidalgo, F. 2021. Polyamines as key regulatory players in plants under metal stress—A way for an enhanced tolerance. *Ann. Appl. Biol.* 178, 209–226. <https://doi.org/10.1111/aab.12660>
- Sprynskyy, M., Kowalkowski, T., Tutu, H., Cozmuta, L.M., Cukrowska, E.M., Buszewski, B. 2011. The adsorption properties of agricultural and forest soils towards heavy metal ions (Ni, Cu, Zn, and Cd). *Soil Sediment Contam.*, 20, 12-29. <https://doi.org/10.1080/15320383.2011.528467>
- Stadlober, M., Sager, M., Irgolic, K.J. 2001. Effects of selenate supplemented fertilization on the selenium level of cereals—identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS. *Food Chem.* 73, 357–366. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00115-7)
- Sun, G.-X., Liu, X., Williams, P.N., Zhu, Y.G. 2010. Distribution and translocation of selenium from soil to grain and its speciation in paddy rice (*Oryza sativa* L.). *Environ. Sci. Technol.* 44, 6706–6711. <https://doi.org/10.1021/es101843x>
- Sun, H.-W., Ha, J., Liang, S.X., Kang, W.J. 2010. Protective role of selenium on garlic growth under cadmium stress. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41, 1195–1204. <https://doi.org/10.1080/00103621003721395>
- Tamaoki, M., Freeman, J.L., and Pilon-Smits, E.A.H. 2008. Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenate resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146, 1219–1230. <https://doi.org/10.1104/pp.107.110742>
- Taylor, M., Kim, N., Smidt, G., Busby, C., McNally, S., Robinson, B., Kratz, S., Schnug, E. 2016. Trace element contaminants and radioactivity from phosphate fertiliser. In *Phosphorus in agriculture: 100% zero*, 231-266. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7612-7_12
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, clinical and environmental toxicology*, 133-164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., Tarun, A.S. 2000. Selenium in greater plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 51, 401–432. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.401>
- Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M.R., Montanarella, L.I. 2016. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment international*, 88, 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017>
- Truchado, P., Gil, M.I., López, C., Garre, A., López-Aragón, R.F., Böhme, K., Allende, A. 2021. New standards at European Union level on water reuse for agricultural irrigation: Are the Spanish wastewater treatment plants ready to produce and distribute reclaimed water within the minimum quality requirements? *International Journal of Food Microbiology*, 356, 109352. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109352>
- Turakainen, M., Hartikainen, H., Ekholm, P., Seppänen, M.M. 2006. Distribution of selenium in different biochemical fractions and raw darkening degree of potato (*Solanum tuberosum* L.)

- tubers supplemented with selenate. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8617–8622. <https://doi.org/10.1021/jf0613987>
- Vecino, J.B., Restoy, R.C., Expósito, A., Lorenzo, A., Pérez, E.M. 2021. El agua regenerada como fuente alternativa sostenible de riego en agricultura en Europa: el caso de Andalucía. In *XIII Congreso de Economía Agroalimentaria*, 53-56. Universidad Politécnica de Cartagena. <https://doi.org/10.31428/10317/10404>
- Vinceti, M., Filippini, T., Cilloni, S., Bargellini, A., Vergoni, A.V., Tsatsakis, A., Ferrante, M. 2017. Health risk assessment of environmental selenium: Emerging evidence and challenges. *Molecular medicine reports*, 15(5), 3323-3335. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6377>
- Wallace, K., Kelsey, K.T., Schned., A., Morris, J.S., Andrew, A.S., Karagas, M.R. 2009. Se and risk of bladder cancer: a population-based case-control study. *Cancer Prev. Res.* 2, 70–73. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0046>
- Wallenberg, M., Olm, E., Hebert, C., Björnstedt, M., Fernandes, A.P. 2010. Selenium compounds are substrates for glutaredoxins: a novel pathway for selenium metabolism and a potential mechanism for selenium-mediated cytotoxicity. *Biochem. J.* 429, 85–93. <https://doi.org/10.1042/BJ20100368>
- Wang, Y.D., Wang, X., Wong, Y.S. 2012. Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. *J. Proteomics* 75, 184–1866. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.030>
- Wang, Y., Ye, X., Yang, K., Shi, Z., Wang, N., Yang, L., Chen, J. 2019. Characterization, expression, and functional analysis of polyamine oxidases and their role in selenium-induced hydrogen peroxide production in *Brassica rapa*. *J. Sci. Food Agric.* 99, 4082–4093. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9638>
- White, P.J., Bowen, H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W.P., Spiby, R. E., Meacham, M., Mead, A., Harriman, M., Trueman, J.L., Smith, B., Thomas, B., Broadley, B.R. 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55, 1927–1937 <https://doi.org/10.1093/jxb/erh192>
- WHO. 2011. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition. https://www.who.int/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/selenium-fs-new.pdf?sfvrsn=5df74d1e_4 (Última visita 29/10/22).
- Winkel, L.H., Johnson, C.A., Lenz, M., Grundl, T., Leupin, O.X., Amini, M., Charlet, L. 2012. Environmental selenium research: From microscopic processes to global understanding. *Environ. Sci. Technol.* 46, 571–579. <https://doi.org/10.1021/es203434d>
- Wu, Z., Bañuelos, G.S., Lin, Z.Q., Liu, Y., Yuan, L., Yin, X., Miao, L. 2015. Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Front. Plant Sci.* 6:136. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00136>
- Ximénez-Embún, P., Alonso, I., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C. 2004. Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard, and sunflower plants. *J. Agric. Food Chem.* 52, 832–838. <https://doi.org/10.1021/jf034835f>
- Xue, T.L., Hartikainen, H., Piironen, V. 2001. Antioxidative and growthpromoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil* 237, 55–61. <https://doi.org/10.1023/A:1013369804867>
- Yaacob, A., Yap, C.K., Nulit, R., Omar, H., Al-Shami, S.A., Bakhtiari, A.R. 2018. Assessment of health risks of the toxic Cd and Pb between leafy and fruit vegetables collected from selected

- farming areas of peninsular Malaysia. *Integr. Food, Nutr. Metab.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.15761/ifnm.1000215>
- Yang, H.P., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C. 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel.* 86, 1781–1788. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>
- Yang, H.Y., Shi, G.X., Li, W.L., Wu, W.L. 2013. Exogenous spermidine enhances *Hydrocharis dubia* cadmium tolerance. *Russ. J. Plant Physiol.* 60, 770–775. <https://doi.org/10.1134/S1021443713060162>
- Yin, X., Yuan, L., Liu, Y., Lin, Z. 2012. “Phytoremediation and biofortification,” in *Two Sides of One Coin*. Springer, Dordrecht, 1-31. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1439-7_1
- Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D. 2017. Cadmium toxicity induced contrasting patterns of concentrations of free sarcosine, specific amino acids and selected microelements in two *Noccaea* species. *PLoS ONE.* 12, e0177963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177963>
- Zembala, M., Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Kornas, A., Miszalski, Z., Hartikainen, H. 2010. Effect of selenium on macro and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. *Plant Soil* 329, 457–468. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0171-2>
- Zhang, Y., Pan, G., Chen, J., Hu, Q. 2003. Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. *Plant Soil* 253, 437–443. <https://doi.org/10.1023/A:1024874529957>
- Zhao, C., Ren, J., Xue, C., Lin, E. 2005. Study on the relationship between soil selenium and plant selenium uptake. *Plant Soil.* 277, 197–206. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-7011-9>
- Zheng, S., Wang, Q., Yuan, Y., Sun, W. 2020. Human health risk assessment of heavy metals in soil and food crops in the Pearl River Delta urban agglomeration of China. *Food Chem.* 316, 126213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126213>
- Zhu, Y. G., Pilon-Smits, E.A.H., Zhao, F.J., Williams, P.N., Meharg, A.A. 2009. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci.* 19, 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.06.006>
- Zong, H., Li, K., Liu, S., Song, L., Xing, R., Chen, X., Li, P. 2017. Improvement in cadmium tolerance of edible rape (*Brassica rapa* L.) with exogenous application of chitoooligosaccharide. *Chemosphere.* 181, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.024>

11. ANEXO (PUBLICACIONES)



11.1. PUBLICACIÓN 1

The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions

Rafael Perez-Millan, Marina Alfosea-Simon, Ernesto Alejandro Zavala-Gonzalez, Jose Maria Camara-Zapata, Juan Jose Martinez-Nicolas, Vicente Lidon, Inma Simon, Muhammad Adnan Shahid, Francisco Garcia-Sanchez, and Silvia Simon-Grao

Agronomy 2021, 11, 1905

Factor de impacto: **3,949 Q1 (2021)** (Categoría Agronomy y Plant Science)

The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions

Rafael Perez-Millan^{1,2}, Marina Alfosea-Simon³, Ernesto Alejandro Zavala-Gonzalez², Jose Maria Camara-Zapata³, Juan Jose Martinez-Nicolas³, Vicente Lidon³, Inma Simon³, Muhammad Adnan Shahid⁴, Francisco Garcia-Sanchez^{3,*} and Silvia Simon-Grao³

¹ Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, 03312 Orihuela, Spain; jm.camara@goumh.umh.es (J.M.C.-Z.); juanjose.martinez@umh.es (J.J.M.-N.); vicente.lidon@alu.umh.es (V.L.); inma.simon@umh.es (I.S.)

² The R&D Department, Atlántica Agrícola S.L. Villena, 03400 Alicante, Spain; rperez@atlanticaagricola.com (RP-M); ezavala@atlanticaagricola.com (E.A.Z.-G)

³ Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 30100 Murcia, Spain; alfosea.simon@gmail.com (M.A.-S.); ssimon@cebas.csic.es (S.S.-G.); fgs@cebas.csic.es (F.G.-S.)

⁴ Department of Agriculture, Nutrition and Food Systems, University of New Hampshire, Durham, NH 03824, USA; Muhammad.Shahid@unh.edu (M.A.-S.)

* Correspondence: fgs@cebas.csic.es; Tel.: +34-968-396200 (ext. 6397)

Abstract: Cadmium is absorbed by plants rapidly and without control through the same channels as other essential metals, interfering with their transport and utilization. Many studies have shown that selenium could be utilized as a way to avoid this unwanted transport and other negative effects of Cd. For this reason, the present research study was conducted with four treatments (-Cd/-Se, +Cd/-Se, +Cd/+SeF, and +Cd/+SeR) to determine the type of application of Se that is best (foliarly and/or via the root) as regards the reduction of the toxic effects of Cd on plants. Our results showed that the Cd excess in the nutrient solution resulted in a decrease in the total dry biomass of the plants grown under these conditions, and this decrease was due to the reduction of the growth of the shoot (48% +Cd/-Se, 45% +Cd/+SeF, and 38% +Cd/+SeR,

relative to -Cd/-Se). This reduction in growth was due to: (i) the toxicity of Cd itself and (ii) the nutritional disequilibrium suffered by the plants. It seems that under hydroponic conditions, the addition of Se to the nutrient solution, and therefore its absorption through the roots (lower antioxidant activity, superoxide dismutase, H₂O₂ concentration and higher catalase activity), greatly delayed and reduced the toxic effects of Cd on the pepper plants, as opposed to the foliar application of this element.

Keywords: cadmium toxicity; selenium; oxidative stress; plant nutrition; health

1. Introduction

Environmental contamination due to cadmium (Cd) has drastically increased in nature due to the intensification of industrial activities at the end of the 20th century and the beginning of the 21st century, which have progressively affected different ecosystems including agriculture [1]. Cadmium is a heavy metal without a biological function, and in humans, animals, and plants, it is toxic in low concentrations [2]. In humans, one of the main sources of Cd toxicity is the consumption of products from contaminated agricultural areas [3], and this toxicity is due to Cd being the only metal whose toxicity threshold is less for humans than for plants. Thus, in many cases, plants without any apparent phytotoxic symptoms are consumed, but whose Cd concentration can be damaging to humans [4].

Cd in the soil solution can be found dissolved in the water or absorbed in the organic and mineral fractions, forming part of the chemical structure of minerals, precipitated with other soil compounds, and/or as part of biological structures. In plants, its bioavailability depends on numerous physical, chemical, and biological factors, which include [5]: (i) pH; in acidic soils, there is a greater liberation of Cd; (ii) potential redox; the oxidative state of the soil facilitates the solubility and availability of Cd; (iii) the mineral substance content of the soil; an excess of nitrates induces a greater activity of transporters in the root that provokes a greater absorption of Cd; and (iv) organic matter; soils rich in organic compounds makes Cd absorption by the plants difficult, as it is found as part of organic complexes. For non-hyperaccumulator plants, the threshold of toxicity has been established at 5–10 µM Cd in the nutrient solution for hydroponics-grown crops, and 5.0 mg kg⁻¹ in soil. In plants, this metal has a threshold of toxicity of 3–30 mg kg⁻¹ dry weight [6].

Different Cd entry mechanisms in plants have been previously described, such as: (i) entry through the plasma membrane of root epidermal cells, through the rapid Exchange of Cd²⁺ with H⁺ coming from plant metabolism, (ii) entry through plant cells through specific transporters, such as LCT1 (Ca, Zn, and Fe), ZIP (Zn and Fe), and NRAMP (Fe, Mn, and other metals) family transporters, and (iii) yellow-stripe 1-like (YSL) proteins, which uptake Cd in its

chelated form [7]. Once Cd is absorbed by the roots, it is transported to the aerial part (shoot) of the plant through the xylem, following a symplastic and/or apoplastic route, and driven by the transpiration stream [1]. The quantity of Cd that is transported to the shoot will depend on a series of complex processes which involve different mechanisms, as follows: the manner in which Cd encounters the xylem, the downloading of Cd into the xylem by AtHMA2 and AtHMA4 Cd and Zn transporters, the cationic exchange capacity of the cell walls of the xylem, Cd sequestration into plant vacuoles in different plant tissues, extrusion of Cd out of the plant, synthesis of phytochelatin, glutathione, and metallothioneins, as well as Cd transport and redistribution processes in the phloem, leaves, and nodes by OsLCT1 transporter (Cd, Ca, Mg, and Mn) [7,8].

In plants, cadmium has some of the following negative effects: (i) it interferes with the entry, transport, and use of the essential elements Ca, Mg, P, and K [5]; (ii) reduces the activity of ATPase of the plasma membrane, altering its biological functions [9]; (iii) reduces the net assimilation rate of CO₂ due to the reduction in the concentration of chlorophylls and carotenoids, the inactivation of the enzymes involved in the Calvin cycle, the damage to photosystems I and II, and the alteration of the control of the stomatal opening [10]; (iv) it alters nitrogen metabolism, as the absorption and transport of nitrates is reduced, and inhibits the nitrate reductase enzyme [11]; (v) it damages genes and alters the synthesis of proteins [12]; (vi) it inhibits the response of the plants to oxidative stress [1], etc. All of these alterations result in growth inhibition, loss of production, a low quality of the crop harvest, and in the most severe cases, the death of the plant. In agriculture, there are crops with different degrees of tolerance to Cd toxicity. Pepper has medium tolerance to Cd, as it accumulates it in its tissues, with visual symptoms rapidly observed [13]. This plant is a very important crop in agriculture. However, its cultivation in agricultural areas with high Cd concentration in the soils can cause negative repercussions on its growth, production, and fruit quality. One of the strategies utilized to decrease the concentration of Cd in the edible part of the crops is the application of selenium (Se). This metalloid has positive effects on plant growth at very low concentrations (0.1 mg kg⁻¹) and negative effects when present at higher concentrations (5 mg kg⁻¹) [14]. Plant roots uptake selenium as selenate (Se⁶⁺) through sulfate transporters (SULTR1; 1, SULTR1; 2), as selenite (Se⁴⁺) through aquaporins (NIP2; 1) and phosphate transporters (PT2 and PT8), while transporters of chelated-Se have not yet been described [15]. It has been reported that exogenous Se application decreases Cd concentrations and increases the growth, chlorophyll contents, and photosynthetic activity of Cd-stressed plants, as reported for the presence of Se in the nutrient solution of hydroponically grown cucumber seedlings, soil applications in pepper [14], and foliar application in tomato [16].

Selenium can be applied using four different techniques, namely seed dressing, seed soaking, soil, and foliar application. The last two techniques are the easiest to perform, but no scientific studies have been conducted to compare foliar versus soil application in identical conditions (plant varieties, growth condition, etc.), to understand which of them could be more beneficial and why. There are not enough comparative studies to clarify the effect and accumulation of Se depending on the application method. Assays carried out on rice plants showed that foliar applications increased the accumulation of inorganic Se, while soil applications of Se improved the response of the plant in terms of the accumulation of organic compounds of Se that are healthy for humans [17]. Therefore, the objective of the present work is (i) to understand how the presence of Cd in the nutrient solution affects pepper plants (*Capsicum annuum*), with respect to growth parameters, the concentration of Cd in the different parts of the plant, gas exchange processes, and oxidative stress systems, and (ii) to determine if the foliar or root application of Se can palliate the negative effects of Cd toxicity, elucidating which physiological and biochemical mechanisms could be involved.

2. Materials and Methods

2.1. Growing Conditions and Plant Material

For the experiments, pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds of the commercial variety 'Cristal', (acquired in Ramiro Arnedo Seeds, Murcia) were germinated in trays filled with sterile vermiculite in a germination chamber. The seeds were previously sterilized with a hydrogen peroxide solution (H₂O₂) at 2 % for 5 min, and then they were washed with abundant deionized water. Once germinated, they were moved to a growth chamber with controlled environmental conditions: photoperiod of 16 h with a PAR = 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, air temperature of 25 °C, and relative humidity of 60 %. When seedlings reached a size of approximately 10 cm in height, they were transplanted to containers of 9 L for acclimation in the growth chamber. Thus, upon reaching adequate size, each one was transplanted to 1L containers. Each treatment had six plants in each container. Both for the acclimatization period (9 L container) and once the plants were transferred to the 1 L containers, each container contained complete nutrient solution, with macronutrients (mM): 20 N, 0.75 P, 4.2 K, and 6 Ca; and micronutrients (μM): 23 B, 2 Mn, 2 Zn, 0.5 Cu, 0.5 Mo, and 20 Fe. A continuous airflow was passed through the solution to avoid hypoxia conditions during the experiment. For each 1 L container, the nutrient solution was renewed weekly, and the pH (5.5–6.0) and the electric conductivity (EC = 1.8–2.1 mS cm^{-1}) were adjusted every three days with NaOH (1 mM).

2.2. Treatment with Cadmium and Selenium

After the acclimatization phase (four weeks), pepper plants were moved from 9 L containers to 1 L individual containers and grown for two weeks under two different cadmium treatments: a

control without Cd or Se (-Cd/-Se) in the nutrient solution and another under conditions of excess cadmium (+Cd), where the nutrient solution contained a final concentration of Cd of 3 mg L⁻¹ (8.5 μM), applied as CdSO₄•8H₂O. The plants in the Cd treatment were divided into three subgroups: (i) plants not treated with Se (+Cd/-Se), (ii) plants treated with foliar Se (+Cd/+SeF), and (iii) plants treated with Se via the root (+Cd/+SeR). Foliar selenium was applied at the beginning and seven days after starting Cd treatment, spraying the plants with a concentration of 10 μM Se in the form of Na₂SeO₄. The selenium for the root treatment was applied by adding Na₂SeO₄ to the nutrient solution for a final concentration of 10 μM. For each treatment, 6 plants were available, which were distributed randomly in the growth chamber. Plants were under treatment for two weeks.

2.3. Parameters Analysed

2.3.1. Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence, and Chlorophyll Content Parameters

The net assimilation of CO₂ (A_{CO_2}) and leaf transpiration (E_{leaf}) were measured, after two weeks starting the Cd treatment, using a portable photosynthesis system (model CIRAS-2, PP-System, Amesbury, MA, USA). During the measurements, the machine was set to maintain a constant light intensity in the chamber (PAR: 1000 μmol m⁻² s⁻¹), and CO₂ concentration (400 mg kg⁻¹). The chlorophyll fluorescence parameters were also measured on leaves similar to those used for the gas exchange parameters, with a pulse-modulated fluorometer (model FMS-2; Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK).

The fluorescence chlorophyll parameters measured were the quantum efficiency of PSII, $FPSII = (Fm0 - Fs)/Fm0$, the antennae efficiency of PSII, $Fv0/Fm0 = (Fm0 - F00)/Fm0$, and the photochemical quenching coefficient, $qP = (Fm0 - Fs)/(Fm0 - F00)$, where Fs is the steady-state fluorescence yield, $Fm0$, is the maximal value when all reaction centers are closed after a pulse of saturating light (12,000 μmol m⁻² s⁻¹ for 0.8 s) and $F00$ is the minimal fluorescence in the light-adapted state that is obtained by turning off the actinic light temporarily and applying a pulse of far-red light (735 nm) to drain the electrons from PSII. For the quantification of chlorophyll content (SPAD unit) in the same leaves, the measurement was performed with the CL-01 portable measuring device (Hansatech).

2.3.2. Growth Parameters

The same day, after measuring the photosynthesis and fluorescence parameters of the chlorophylls, the pepper plants were harvested, separately weighing the leaves, stems, and roots (grams of fresh weight, g FW). Afterwards, these were lightly washed with deionized water and dried in an oven at 60 °C for at least 48 h. The plant parts were weighed again (grams of dry weight; g DW), after which they were ground to a fine powder for their posterior analysis in

the laboratory. The dry masses of the leaves, stem, and roots were used to calculate the total plant dry mass.

2.3.3. Mineral Analysis in Leaves and Root

In 100 mg of dry and ground plant tissue of leaf, stem, and root, per plant, the concentration of mineral nutrients was measured (K, Mg, Ca, P, Mn, Zn, Fe, and Cd) utilizing inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, MA, USA), after the samples' digestion with HNO₃:H₂O₂ (5:3 by volume), in a microwave (CERM Mars Xpress, Matthews, NC, USA) with a temperature ramp that reached 200 °C [18].

2.3.4. Determination of Proline in Leaves and Roots

At the end of the experiment, proline was extracted from dry leaf tissue with sulfosalicylic acid (3%) and quantified according to the protocol described by Bates et al. (1973) [19].

2.3.5. Determination of Oxidative Damage in Leaves

At the end of the experiment, before the complete harvest of the plants, leaves were frozen in liquid nitrogen for the oxidative stress study. The quantification of H₂O₂ was performed following the method described by Yang et al. (2007) [20]. Lipid peroxidation was determined by measuring malondialdehyde (MDA) using the method of Hodges et al. (1999) [21].

2.3.6. Determination of Antioxidant Activity

Briefly, two hundred fifty mg of frozen material were utilized for the extraction, with this tissue homogenized in 2.5 mL ethanol (80%). Posteriorly, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant was utilized to measure the antioxidant activity with the DPPH method described by Koleva et al. [22].

2.3.7. Determination of Antioxidant Enzymes

Leaves were frozen in liquid nitrogen for the study of the enzymatic activity of the enzymes catalase (CAT) through a direct spectrophotometric reading of this enzyme [23]; peroxidase (POD) through spectrophotometric measurements of the disappearance of the hydrogen donor [24], ascorbate peroxidase (APX) through the use of a reaction mixture containing 50 mM potassium phosphate, 0.1 mM hydrogen peroxide, and 0.5 mM ascorbate [25], and superoxide dismutase (SOD) [26].

2.4. Experimental Design and Statistical Analysis

The statistical analysis included a one-way ANOVA with the statistical package SPSS version 24 (Chicago, IL, USA). The values shown for each treatment are the means of 6 repetitions (n

= 6). When the variables were significant ($p < 0.05$), the treatment means were separated using Tukey's multiple range test [27].

3. Results

3.1. Growth Parameters

The pepper plants grown in +Cd conditions had a lower total dry biomass yield as compared to the control plants (-Cd/-Se), independently of the treatment with Se, while the treatment +Cd/+SeR did not any show significant effect if compared with the control plants (Figure 1A). The plants with the greatest decrease in dry leaf biomass yield were those from the +Cd/-Se treatment, with a 48% reduction, followed by the plants treated with +Cd/+SeF (with a 45% reduction) and those from the +Cd/+SeR treatment (with a 38% reduction), and showed significant differences with the control plants (Figure 1B). The reduction in the total dry mass yield was only due to the reduction in the leaf growth, as neither the stem nor the roots were affected by the excess of Cd in the nutrient solution (Figure 1A–D).

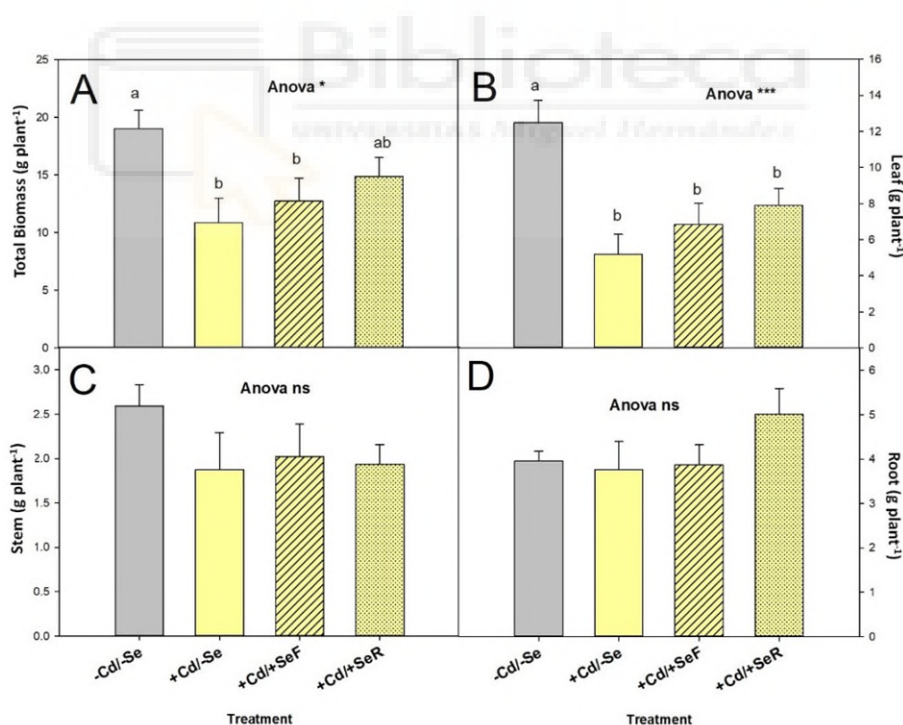


Figure 1. Total biomass (g DW; **(A)**), leaf (g DW; **(B)**), stem (g DW; **(C)**) and root (g DW; **(D)**) of pepper plants under four treatments of cadmium and selenium (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). In the ANOVA, * and *** indicate significant differences for $p < 0.05$ and 0.0001 . The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.05$ established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean.

3.2. Concentration of Cd and Se in the Different Tissues of the Plant

In the treatments with excess Cd, the pepper plants accumulated this metal mainly in the roots, followed by the leaves and stems. Although differences were hardly found between these two organs (Figure 2A–C). The application of Se to the plants significantly reduced the concentration of Cd in the leaves and stems, and this reduction was similar independently if the Se was applied via the leaves (foliar application) or via the roots. Thus, at the end of the experiment, the +Cd/+SeF, +Cd/+SeR, and +Cd/-Se plants had a concentration of Cd in the leaves of 17.5, 16.4, and 26.4 mg kg⁻¹, respectively, indicating a reduction in the Cd concentration in the leaves of 30% (+Cd/+SeF) and 40% (+Cd/+SeR), relative to +Cd/-Se treatment. In the roots, the application of Se decreased the concentration of Cd only for the treatment in which Se was applied foliarly. The reduction is significant and amounts to 60% relative to the other two Cd treatments. As for the concentration of Se in the different parts of the plant (Figure 2D–F), it was observed that the plants that were treated foliarly (+Cd/+SeF), accumulated less Se in the leaves than those that had Se added to their nutrient solution (+Cd/+SeR). In both cases, the leaves accumulated significantly more Se than in the other two combinations. Moreover, the plants which uptake Se from the nutrient solution (+Cd/+SeR) accumulated significantly more Se in the stems and the roots than those from the other three combinations. When Se was applied to the leaves (+Cd/+SeF), its contents in the roots and stems was the same as observed in the control plants or when Cd alone (+Cd/-Se) was applied.

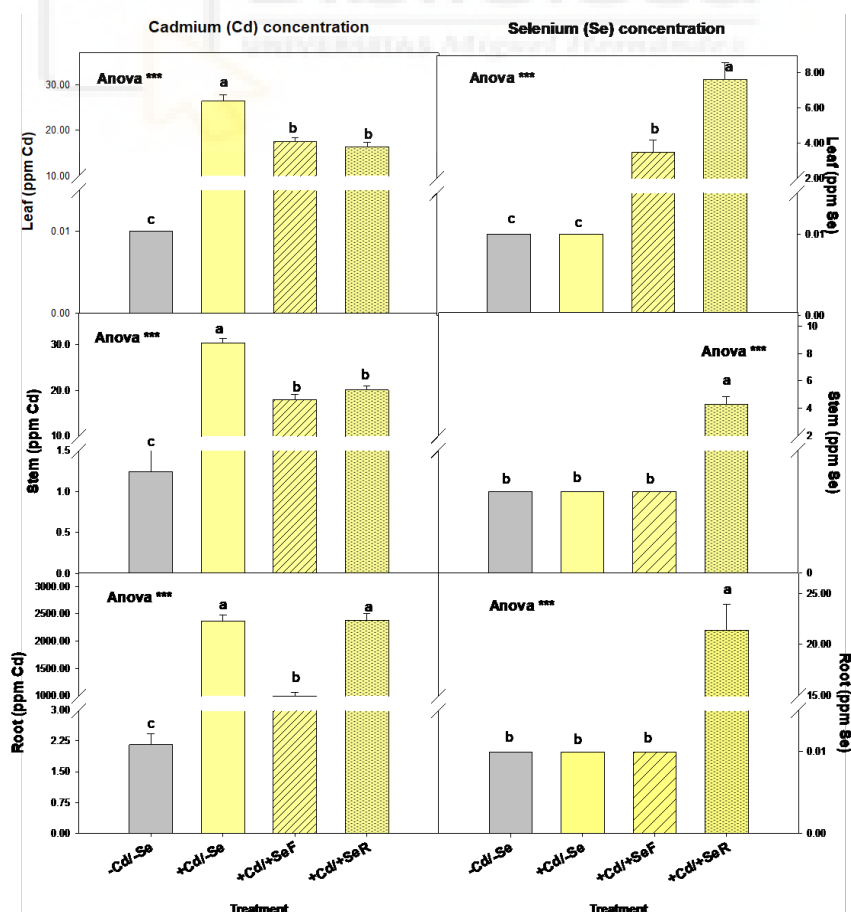


Figure 2. Concentration of cadmium (Cd; **(A–C)**) and selenium (Se; **(D–F)**) in the different tissues of the plant (leaf, stem, and root) of pepper plants under four treatments of cadmium and selenium (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). In the ANOVA, *** indicates significant differences for $p < 0.05$. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.001$ established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean.

3.3. Parameters of Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Chlorophyll Content

For the parameters of gas exchange, at the end of the experiment, it was observed that the +Cd/-Se and +Cd/+SeF treatments had a decreased net assimilation of CO_2 (A_{CO_2}) and stomatal conductance (g_s) (Figure 3A,B). This decrease was significant and similar for both treatments, with the A_{CO_2} decreasing by 78% and g_s by 65%, with respect to the control plants (-Cd/-Se). These two parameters, however, were not affected by the +Cd/+SeR treatment. The CO_2 substomatic (Figure 3C) tended to increase in all the plants subjected to excess Cd relative to the control treatment, although this increase was not significant in the treatments with Se as compared to the control plants. The water use efficiency (WUE; Figure 3D) decreased significantly in the second week for the +Cd/-Se and +Cd/+SeF treatments with respect to the control plants. The quantum efficiency of PSII (Figure 3E) did not show significant differences between the different treatments.

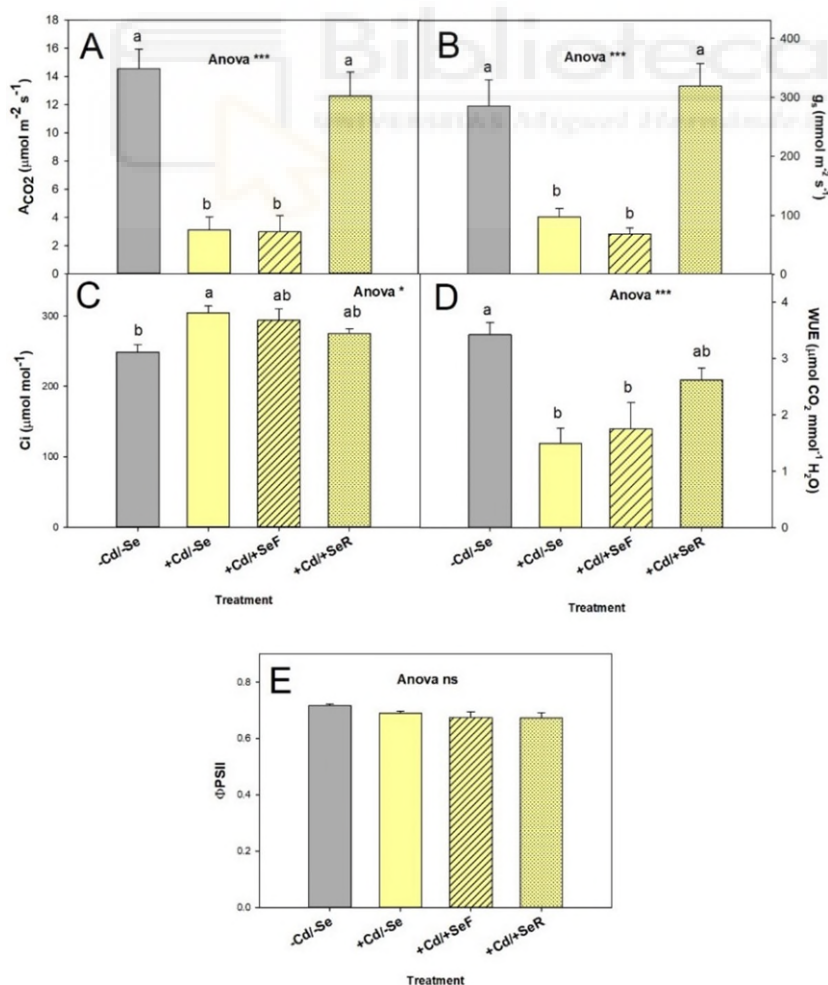


Figure 3. Net assimilation rate of CO₂ (ACO₂, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; **(A)**), stomatal conductance (gs, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; **(B)**), Ci (substomatic CO₂; **(C)**), water use efficiency (WUE, $\mu\text{mol CO}_2 \text{mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$; **(D)**) and PSII (photochemical quenching of PSII; **(E)**) of pepper plants under four treatments of cadmium and selenium (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). In the ANOVA: “ns” indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; Also, * and *** indicate significant differences for $p < 0.05$ and 0.001, respectively. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.001$ established by Tukey’s multiple range test. The standard error of the mean is also indicated.

The Cd toxicity also affected the SPAD units of the plants (Table 1). In the case of the apical leaves, only the use of Cd alone (+Cd/-Se) had a significant effect on this parameter value. The toxicity of Cd affected the mature leaves of the plants, significantly lowering the SPAD value in comparison to control plants, independently of the application or not of Se (Table 1), and the weakest plant response to the toxicity of Cd was observed when Se was foliar applied (+Cd/+SeF).

Table 1. Chlorophyll content in apical shoots (Apical) and fully expanded leaves (Medium), and proline in leaves and roots in pepper plants under four treatments of cadmium and selenium (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR).

Treatm.	Product	Apical Chl (SPAD)	Medium Chl (SPAD)	Leaf Proline (mg g ⁻¹ dw)	Root Proline (mg g ⁻¹ dw)
-Cd	-Se	28.8 ± 2.9 a	64.4 ± 3.9 a	1.54 ± 0.14 b	0.75 ± 0.05 b
	-Se	18.9 ± 2.2 b	29.2 ± 4.0 b	2.27 ± 0.09 a	0.80 ± 0.04 b
+Cd	+Se _F	23.5 ± 4.3 ab	41.9 ± 8.7 b	1.58 ± 0.09 b	1.27 ± 0.03 a
	+Se _R	26.9 ± 2.1 ab	30.5 ± 5.0 b	1.70 ± 0.12 b	0.72 ± 0.04 b
ANOVA		*	***	**	***

In the ANOVA: *, ** and *** indicate significant differences for $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.05$ established by Tukey’s multiple range test.

3.4. Proline in Leaves and Roots

The results of this assay showed that the pepper plants had a greater concentration of proline in the leaves as compared to the roots (Table 1). In the leaves, the excess of Cd in the nutrient solution in the +Cd/-Se treatment significantly increased the concentration of this osmolyte by 48% relative to -Cd/-Se treatment. In the rest of Cd treatments, the proline concentration was similar as in the control plants and maintained at an average value of 1.60 mg g⁻¹ DW. In the root tissue, the +Cd/+SeF treatment induced a significantly higher proline concentration (1.27 mg g⁻¹ DW) as compared to the plants of other treatments (containing on average 0.75 mg g⁻¹ DW).

3.5. Mineral Nutrition: Concentration of Macro and Micronutrients in Leaf and Roots

Table 2 shows the results of the analysis of macronutrient (g 100 g⁻¹ dw) and micronutrient (mg kg⁻¹) contents analyzed in the leaves and roots at the end of the experiments. In the leaves, the only elements that were affected by the excess of Cd in the nutrient solution were P, Cu, and Fe. The content of P significantly increased in the plants from the +Cd/-Se treatment, as

compared to the rest of the treatments. The significant difference in the concentration of Fe was observed as an increased concentration of this element in the +Cd/+SeF treatment (144.3 mg kg⁻¹) as compared to the +Cd/+SeR treatment (107.8 mg kg⁻¹). As for foliar Cu, the concentration significantly decreased in the plants from the +Cd/+SeF treatment as compared to the -Cd/-Se control. The excess of Cd in the nutrient solution produced more alterations in the concentration of the mineral nutrients (except for Mg and B) in the root tissue than in the leaves. With respect to the control plants, the following significant changes were observed: Ca content decreased with the +Cd/+SeR treatment and increased with +Cd/+SeF one; the content of K decreased with the +Cd/+SeR treatment; Na decreased in +Cd/-Se and +Cd/+SeF treatments; P increased in +Cd/+SeR treatment, and S increased in +Cd/-Se and +Cd/+SeF treatments. As for the micronutrients, it was observed that Fe, Mn, and Zn significantly increased in concentration while Cu decreased in the +Cd/+SeR treatment. Moreover, Fe and Zn content significantly increased in the roots of the plant of +Cd/-Se treatment.

Table 2. Concentration of macro and micronutrients in leaves and roots in pepper plants under four treatments of cadmium and selenium (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR).

		Macronutrients Leaf (g 100 g ⁻¹ dw)					
Cd Treat.	Se Treat	Ca	K	Mg	Na	P	S
-Cd	-Se	2.17 ± 0.24	5.14 ± 0.57	0.42 ± 0.05	0.03 ± 0.0001	0.50 ± 0.08 b	0.38 ± 0.05
	-Se	2.67 ± 0.49	6.94 ± 0.57	0.58 ± 0.10	0.04 ± 0.0002	0.98 ± 0.09 a	0.67 ± 0.12
+Cd	+SeFoliar	2.85 ± 0.18	5.94 ± 0.17	0.51 ± 0.04	0.03 ± 0.0003	0.59 ± 0.06 b	0.65 ± 0.13
	+SeRoot	2.85 ± 0.10	5.80 ± 0.19	0.53 ± 0.01	0.03 ± 0.0004	0.53 ± 0.08 b	0.81 ± 0.09
ANOVA		ns	ns	ns	ns	***	ns
		Macronutrients Root (g 100 g ⁻¹ dw)					
Cd Treat.	Se Treat	Ca	K	Mg	Na	P	S
-Cd	-Se	3.70 ± 0.09 b	4.49 ± 0.17 a	0.47 ± 0.02	0.07 ± 0.002 a	1.82 ± 0.13 bc	0.37 ± 0.01 c
	-Se	4.00 ± 0.31 ab	4.32 ± 0.21 a	0.48 ± 0.02	0.05 ± 0.001 b	2.20 ± 0.25 b	0.60 ± 0.03 a
+Cd	+SeFoliar	1.32 ± 0.27 c	3.83 ± 0.16 ab	0.50 ± 0.07	0.04 ± 0.002 b	1.13 ± 0.11 c	0.50 ± 0.02 ab
	+SeRoot	5.45 ± 0.72 a	3.52 ± 0.16 b	0.46 ± 0.02	0.06 ± 0.002 ab	3.19 ± 0.33 a	0.46 ± 0.03 bc
ANOVA		***	**	ns	***	***	***
		Micronutrients Leaf (mg kg ⁻¹ dw)					
Cd Treat.	Se Treat	B	Fe	Mn	Zn	Cu	
-Cd	-Se	25.7 ± 2.6	139.9 ± 8.1 ab	50.6 ± 5.7	21.9 ± 2.9	2.62 ± 0.28 a	
	-Se	33.5 ± 3.2	119.3 ± 13.6 ab	66.8 ± 10.5	15.1 ± 1.7	2.45 ± 0.25 ab	
+Cd	+SeFoliar	29.6 ± 3.3	144.3 ± 5.2 a	60.4 ± 3.4	17.9 ± 2.7	1.65 ± 0.22 b	
	+SeRoot	27.9 ± 2.0	107.8 ± 14.6 b	53.5 ± 2.1	21.2 ± 2.2	1.97 ± 0.13 ab	
ANOVA		ns	*	ns	ns	*	
		Micronutrients Roots (mg kg ⁻¹ dw)					
Cd Treat.	Se Treat	B	Fe	Mn	Zn	Cu	
-Cd	-Se	15.1 ± 1.3	723.9 ± 52.6 b	134.8 ± 4.5 b	120.8 ± 15.7 b	20.6 ± 1.4 a	
	-Se	17.3 ± 0.6	856.1 ± 78.5 a	128.1 ± 12.2 b	193.8 ± 7.8 a	19.8 ± 0.6 a	
+Cd	+SeFoliar	13.7 ± 0.7	667.1 ± 87.1 b	118.3 ± 20.6 b	120.6 ± 10.1 b	16.9 ± 0.7 ab	
	+SeRoot	15.7 ± 1.3	891.7 ± 61.2 a	218.9 ± 15.8 a	200.2 ± 17.9 a	15.7 ± 0.7 b	
ANOVA		ns	*	***	***	***	

In the ANOVA: “ns” indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; Also, *, ** and *** indicate significant differences for $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.05$ established by Tukey’s multiple range test.

3.6. Oxidative Damage and Antioxidant Activity

For the study of oxidative stress, the $ACO_2/\Phi PSII$ ratio was calculated, as it is often utilized to estimate if an excess of ROS is produced in situations of stress derived from the overstimulation of the Mehler reaction. In plants grown with excess Cd, the $ACO_2/\Phi PSII$ was reduced (Figure 4A) up to 75% in the +Cd/-Se and +Cd/+SeF treatments, while in +Cd/+SeR, this parameter was not inhibited, as shown by values that were similar to those noted in the control plants (-Cd/-Se).

The increase in antioxidant activity was as follows (Figure 4B): -Cd/-Se \leq +Cd/+SeR \leq +Cd/-Se < +Cd/+SeF. MDA was utilized to specifically estimate the level of lipid peroxidation, and indirectly, the damage of cell membranes (Figure 4D). Its values showed that the plants grown under +Cd/-Se had the highest MDA concentration (increase of 67% relative to -Cd/-Se), while significant differences were not found between the rest of the treatments. The H_2O_2 concentration increased significantly in the plants from the +Cd/+SeF treatment relative to the rest of the treatments that had similar values among them (Figure 4C). As for the antioxidant enzymes quantified (SOD, POD, APX, and CAT; Figure 5A–D), at the end of the experiment, a generalized response was observed for the enzymes POD and APX. In all the Cd treatments, activities of these enzymes increased, with respect to the control treatment, without significant differences being observed between them. For CAT, it was observed that the +Cd/+SeF treatment decreased its activity with respect to the control. SOD activity decreased in +Cd/-Se plants relative to +Cd/+SeF, but no significant difference was observed between the control plants and the Cd treated plants (+Cd/-Se, +Cd/+SeF, +Cd/+SeR).

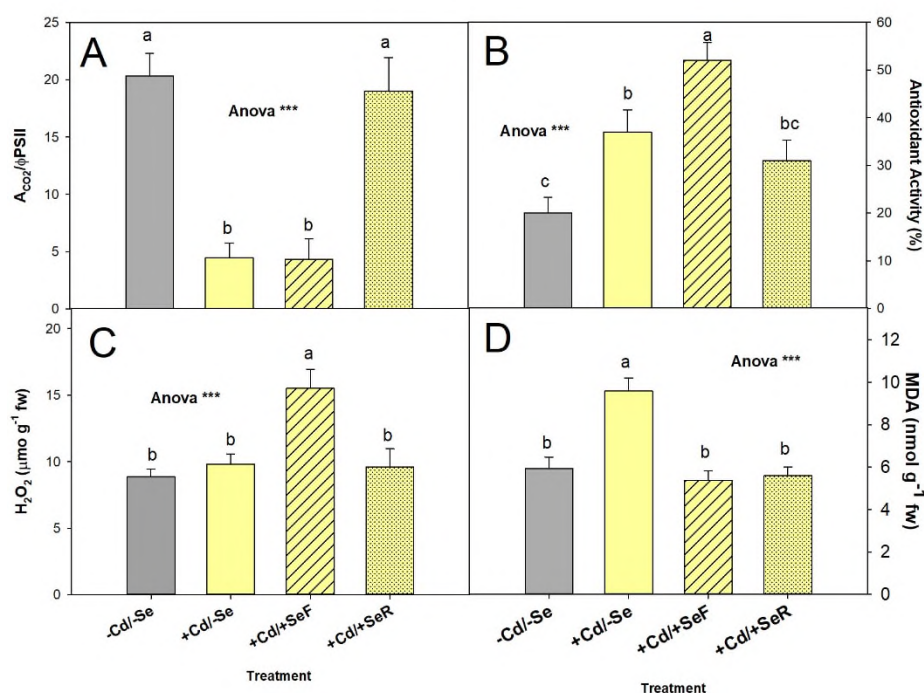


Figure 4. A_{CO_2}/F_{PSII} ratio (**A**), antioxidant activity (%; **B**), oxidative damage (concentration of H_2O_2 and MDA; **C**) and **(D)**, respectively) measured in leaves from pepper plants under four treatments of cadmium and selenium (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). In the ANOVA: *** indicates significant differences for $p < 0.001$. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.05$ established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean.

3.7. Visual Symptoms of Cd

The visual symptoms of Cd toxicity were evaluated every day during the experimental period. The results observed for each of the treatments with Cd are described below (Figure 6): (I) +Cd/-Se, the leaves began to show chlorosis about two days after the Cd stress began, and this chlorosis worsened as the experiment continued. At the end of the assay, this chlorosis was very severe in old leaves as well as developed leaves and was slight in the new shoots, while burns were also observed; (II) +Cd/+SeF, the leaves from this treatment began to show chlorosis at the end of the first week of the experiment. At the end of the experiment, the symptoms were more severe in the shoots, as opposed to the rest of the treatments with Cd; and (III) +Cd/+SeR, the plants from this treatment showed some chlorosis in the middle of the second week of the experiment. At the end of the experimental period, the symptoms were more noticeable in basal or developed leaves.

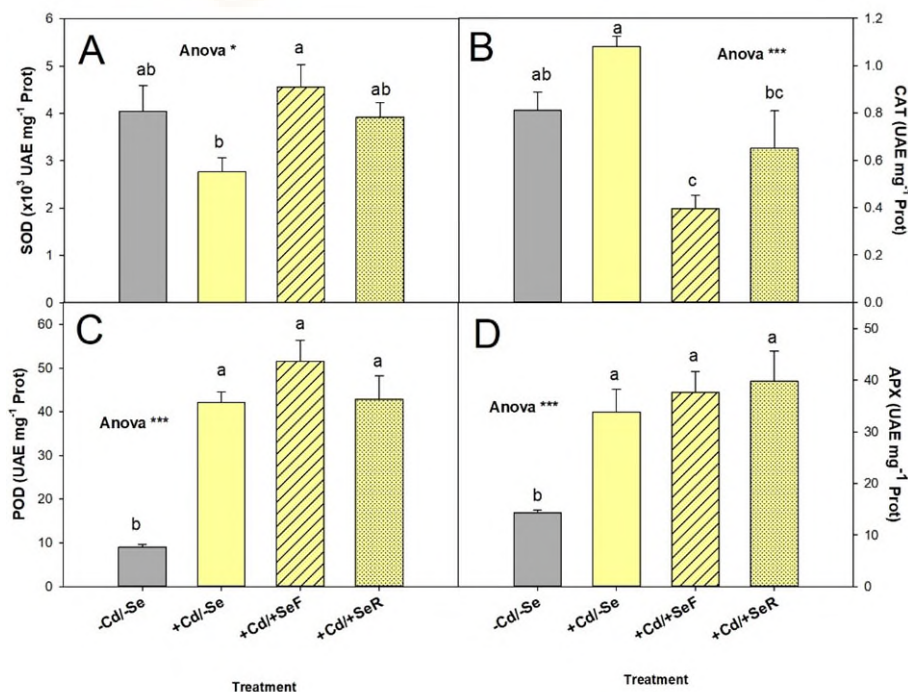


Figure 5. Antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD, **(A)**), catalase (CAT, **(B)**), peroxidase (POD, **(C)**) and ascorbate peroxidase (APX, **(D)**) quantified in leaves from pepper plants under four treatments of cadmium and selenium (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). In the ANOVA: * and *** indicates significant differences for $p < 0.05$ and

0.001, respectively. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.05$ established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean.

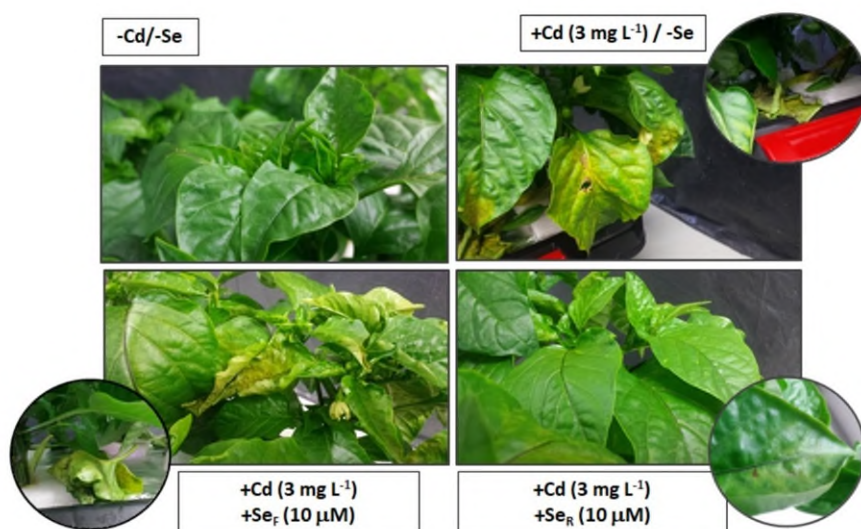


Figure 6. Image of the visual symptoms observed in the pepper leaves from the different treatments applied at the end of the experiment.

4. Discussion

4.1. Response of the Cristal Variety Pepper Plants to the Excess of Cd in the Nutrient Solution

Cadmium is one of the most toxic heavy metals known to humans, as well as animals or plants. Its toxicity produces a great variety of genetic, physiological, biochemical, and metabolic alterations. In the present study, it was observed that an excess of Cd in the nutrient solution ($8.5 \mu\text{M}$) produced a decrease in the total biomass of pepper plants by reducing aerial part rather than root growth. This decrease could be due in part to the fact that Cd in the leaves, with so low a concentration of 28 ppm (Figure 2), caused a decrease in A_{CO_2} and stomatal conductance, as well as oxidative damage quantified by high MDA values (Figure 4). These data, therefore, showed that pepper leaves, but not roots, are very sensitive to Cd toxicity and that pepper plants limit the accumulation of Cd in the aerial part, accumulating it in the roots where it is not toxic. This distribution of Cd in the different plant tissue seems to be generalized to the rest of pepper cultivars, not only the Cristal variety. These plants accumulate a higher concentration of this metal in the root than in the shoot. Its toxic effect, however, seems to be variety-dependent. So, some plants do not show alterations in the growth of their roots, such as the varieties Jinfuzhuangjiao, Zhoupijiao, or Yeshengchaotianjiao, (assayed in hydroponics with a concentration of 2 and $10 \mu\text{M}$ Cd [28]), while in others, such as the variety Zhongjiao 105 (cultivated in the soil in a greenhouse with 0.5 mM Cd [29]) or Demre (cultivated in hydroponics with 0.1, 0.2 and 0.4 mM Cd [30]), the growth of the root was also reduced. In our experiment, oxidative damage caused by Cd toxicity in pepper leaves could be due to an

imbalance in the response to scavenging ROS since a reduction of the activities of SOD and CAT was observed together with the increase in the activity of POD and APX. A similar response was observed in pepper plants of the variety Zhongjiao 105 [29]. The increase in these two activities could be due to a reduction of the other two as a mechanism to deactivate the oxidative power of H₂O₂, therefore impeding oxidative damage. Nevertheless, other studies with pepper varieties that are tolerant or sensitive to Cd toxicity have shown that the antioxidant response is not directly related with the degree in tolerance of the pepper varieties [31].

4.2. The Application of Se Reduces the Negative Effects of Cd in Pepper Plants of the Variety Cristal

The application of Se either through the leaves or the root had beneficial effects on plants grown with an excess of Cd in the nutrient solution. One of the positive effects was the reduction in the Cd concentration in the plants, although depending on how Se was applied, there were changes in the distribution of Cd in the plants. The application of Se through the leaves reduced the content of Cd in the leaves and the roots, while the application through the roots only reduced it in the leaves. Some authors have indicated that the application of Se through the leaves could have induced the synthesis of specific organic compounds that form complexes/chelate the Cd in the form of metallothionein [32], thus facilitating the movement of this metal in the phloem and its posterior extrusion from the plant. However, this hypothesis needs to be tested in horticultural crops. In the case of the application of Se through the root, the antagonism Se/Cd could have occurred by the effect of Se on the transport of Cd from the root to the shoot, as it is known that Se has a great capacity to combine with heavy metals, such as Cd, Hg, Ag, and Tl [33]. Cadmium is taken up, among others, by the transporters YSL, LCT1, ZIP-IRT1, or NRAMP. Furthermore, selenate is absorbed by sulfate transporters (SULTR1; 1 SULTR1 2) or aquaporins. As they have different uptake pathways, there is no competition between Cd and Se uptake in roots, and therefore Se does not block the Cd root uptake. However, in our experiment, the Cd transport from root to shoot was possibly limited due to the fact that Se increases the concentration of glutathione, proline, and phytochelatins in the plant, the latter being a substance that complexes Cd and sequesters it into vacuoles [34]. This could explain that the accumulation of Cd in the root in the +Cd/+SeR treatment was similar to the +Cd/-Se treatment while the leaf Cd concentration was lower in +Cd/+SeR than in +Cd/-Se treatment.

Another positive effect of the application of Se observed in this experiment was the accumulation of Se into the different plant tissues. In our experiment, it was observed that the distribution of Se in the plants was application-dependent. The foliar application increased the concentration of Se only in the leaves, while the application via root increased its concentration in the leaves, stems and roots. Moreover, the concentration of Se in the leaves was significantly

lower in the plants treated with Se via foliar application than via roots, thereby indicating that the application through the roots was the most efficient for the accumulation of this metal in the plants. In the root cells of the plants, the sulfate and phosphate transporters are able to take the selenate and selenite ions [35] and enhance their absorption, while in the leaves, the absorption of Se seemed to be dependent on the plant species, as observed by Drahonovsky et al. (2016) in different wild plant species [36]. Therefore, in the pepper plants of the variety Cristal, the application of Se through the roots seemed to be more efficient in the accumulation of this element as compared to the foliar application.

Cadmium is known to interfere in the plant's absorption of nutrients, such as Zn, Fe, Ca, Mn, Mg, Cu, Si, and K [37,38]. In our experiment, the presence of Cd in the nutrient solution increased the concentration of P in the leaves and the concentrations of Zn and Fe in the roots. However, these increases were not sufficiently important to result in some type of toxicity to the plants that could have influenced their vegetative growth. The application of Se through the leaves or roots also affected the concentration of other nutrients, e.g., the leaf Ca concentration was increased in plants that had Se applied through the roots, or the increase of S in the root when Se was applied via foliar, but these differences were not a limiting factor in the vegetative development of the plants. In our experiment, the alteration found by Cd or Se application could have been due to specific synergies with the nutrients rather than a dilution or compaction growth effect, as this effect was not generalized in all nutrients, so this requires future research. Other authors have reported that 0.1 and 1 μM Cd treatments increased Fe, Zn, and Cu concentrations of cotton plants, and indicated a potential synergistic effect of Cd on Fe and Zn uptake [39]. Wu et al. (2005) carried out a study on the effects of cadmium on microelement uptake and transport in cotton plants and reported that 0, 0.1, and 1 μM Cd treatments did not change leaf Fe, Zn, and Cu concentrations significantly, but 10 μM Cd treatment significantly increased leaf microelement concentrations [40].

The high concentration of Se in the plants, and with special emphasis on the leaves of plants where Se was applied through the root with respect to the foliar application marked the differences found between these treatments regarding gas exchange processes. Despite the fact that plants from both +Cd/+SeR and +Cd/+SeF had the same concentration of Cd in the leaves, A_{CO_2} and g_s were significantly higher in the plants from the +Cd/+SeR treatment, and in fact, no significant difference was found between the control treatment and this treatment. However, A_{CO_2} and g_s from the +Cd/+SeF treatment plants were very low, as compared to that reached for the Cd treatment without the application of Se. This indicates that the application of Se through the roots provided a quantity of Se to the leaves that was sufficient to mitigate Cd toxicity. Many studies have shown that the negative effect due to the toxicity of heavy metals can be mitigated by Se when the oxidative stress caused by these metals is reduced [7], and this

could be due to selenium either inactivating the toxicity of Cd or reducing oxidative stress. The reduction of oxidative stress could either be due to the direct action of this metalloid on the antioxidant system of plants or to the direct inhibition of the free oxygen radicals. In our experiment, the plants from every Cd treatment, independently of whether Se was applied or not, showed the same response for the enzymes SOD, CAT, and APX, and this indicates that the deactivation of the reactive oxygen species was due to the direct action of Se. In the MDA and H₂O₂ data in the leaves, it could be observed that the only treatment where their levels were kept similar to those in the control plants was +Cd/+SeR, which provides further evidence of the potent action of Se for deactivating reactive oxygen species in the leaves grown with Cd.

It is known that for mitigating the negative effects of Cd in plants, they can be treated with Se. Many methods exist for the application of Se via the leaves or the soil, or by seed pre-soaking. However, no experiments have been found where these are assayed under the same conditions (plants, cultivation method, and concentration of Cd) to find the best manner of application. In our experiment, it was observed that the best manner was via the root. The plants treated in this manner had a low concentration of Cd and a high concentration of Se in leaves, stems, and roots. Thus, the toxicity of this metal was avoided, impeding its negative effects on the gas exchange parameters, and averting a reduction in the vegetative development, as observed in the present study, which shows that the total dry biomass yield of the control plants was similar to those of plants treated with +Cd/+SeR.

5. Conclusions

The data of this experiment reported that pepper plants of the 'Cristal' variety respond to Cd excess in the nutrient solution, accumulating it in the root and limiting its concentration in leaves. Its toxicity, however, follows a contrary pattern, with the Cd being more toxic in leaves than in roots. The present experiment reveals the importance of applying Se in pepper plants suffering Cd toxicity, so foliar or root application of Se had beneficial effects on the plants grown. Root Se application provided better results than via foliar since, in the first experiment, Se was accumulated in high concentrations in the root, stem, and leaves. The presence of this high Se concentration could have deactivated Cd toxicity, although the mechanisms responsible for this are still unknown. New experiments should be conducted to test the hypothesis that Se inactivates Cd toxicity when forming Cd-Se complexes, or that Se is able to act alone as an element that inhibits reactive oxygen species.

Author Contributions: Conceptualization, E.A.Z.-G. and F.G.-S.; methodology, R.P.-M., M.A.-S., I.S., M.A.S. and V.L.; software, J.J.M.-N.; formal analysis, M.A.-S., I.S. and J.M.C.-Z.; investigation, R.P.-M. and F.G.-S.; resources, E.A.Z.-G.; writing—original draft preparation, R.P.-M., S.S.-G. and F.G.-S.; writing—review and editing, E.A.Z.-G., S.S.-G. and

F.G.-S.; visualization, S.S.-G.; supervision, E.A.Z.- G. and F.G.-S.; funding acquisition, E.A.Z.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors want to acknowledge the support given by Atlantica Agrícola S.A., which contribute with technical support and donations of materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest and Atlantica Agrícola S.A had not role in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Rai, P.K.; Lee, S.S.; Zhang, M.; Tsang, Y.F.; Kim, K.H. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environ. Int.* **2019**, *125*, 365–385. [CrossRef]
2. United States Environmental Protection Agency (EPA). Available online: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/cadmium-compounds.pdf> (accessed on 26 July 2021).
3. Franic, M.; Galic, V. As, Cd, Cr, Cu, Hg: Physiological Implications and Toxicity in Plants. In *Plant Metallomics and Functional Omics*; Springer: Cham, The Netherlands, 2019; pp. 209–251.
4. Kumar, S.; Sharma, A. Cadmium toxicity: Effects on human reproduction and fertility. *Rev. Environ. Health* **2019**, *34*, 327–338. [CrossRef]
5. Shiyu, N.; Hongen, U.; Zhaojun, E.; Rengel, Z.; Wei, O.; Chang, I.; Peng, Z.H.A. Toxicity of cadmium and its competition with mineral nutrients for uptake by plants: A review. *Pedosphere* **2020**, *30*, 168–180. [CrossRef]
6. Solís-Domínguez, F.A.; González-Chávez, M.C.; Carrillo-González, R.; Rodríguez-Vázquez, R. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *J. Hazard Mater.* **2007**, *141*, 630–636. [CrossRef] [PubMed]
7. Ismael, M.A.; Elyamine, A.M.; Moussa, M.G.; Cai, M.; Zhao, X.; Hu, C. Cadmium in plants: Uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics* **2019**, *11*, 255–277. [CrossRef] [PubMed]
8. Huang, X.; Duan, S.; Wu, Q.; Yu, M.; Shabala, S. Reducing Cadmium Accumulation in Plants: Structure–Function Relations and Tissue-Specific Operation of Transporters in the Spotlight. *Plants* **2020**, *9*, 223. [CrossRef] [PubMed]
9. Astolfi, S.; Zuchi, S.; Passera, C. Effect of cadmium on H⁺/ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Sci.* **2005**, *169*, 361–368. [CrossRef]

10. Parmar, P.; Kumari, N.; Sharma, V. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Bot. Stud.* **2013**, *54*, 45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Sánchez-Pardo, B.; Carpena, R.O.; Zornoza, P. Cadmium in white lupin nodules: Impact on nitrogen and carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* **2013**, *170*, 265–271. [[CrossRef](#)]
12. Irfan, M.; Hayat, S.; Ahmad, A.; Alyemeni, M.N. Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J. Biol. Sci.* **2013**, *20*, 1–10. [[CrossRef](#)]
13. Murillo-Amador, B.; Rueda-Puente, E.O.; Troyo-Diéguez, E.; Córdoba-Matson, M.V.; Hernández-Montiel, L.G.; Nieto-Garibay, A. Baseline study of morphometric traits of wild *Capsicum annuum* growing near two biosphere reserves in the Peninsula of Baja California for future conservation management. *BMC Plant Biol.* **2015**, *15*, 118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rizwan, M.; Ali, S.; Rehman, M.; Rinklebe, J.; Tsang, D.; Tack, F.; Abbasi, G.; Hussain, A.; Igalavithana, A.; Lee, B.; et al. Effects of selenium on the uptake of toxic trace elements by crop plants: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2020**, 1–36. [[CrossRef](#)]
15. Chauhan, R.; Awasthi, S.; Srivastava, S.; Dwivedi, S.; Pilon-Smits, E.A.; Dhankher, O.P.; Tripathi, R.D. Understanding selenium metabolism in plants and its role as a beneficial element. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 1937–1958. [[CrossRef](#)]
16. Abd_Allahef, A.; Abeer, H.; Alqarawi, A. Mitigation of cadmium induced stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by selenium. *Pak. J. Bot.* **2016**, *48*, 953–961.
17. Yin, H.; Qi, Z.; Li, M.; Ahammed, G.; Chu, X.; Zhou, J. Selenium forms and methods of application differentially modulate plant growth, photosynthesis, stress tolerance, selenium content and speciation in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *169*, 911–917. [[CrossRef](#)]
18. Alfosea-Simón, M.; Simón-Grao, S.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Cámara-Zapata, J.M.; Simón, I.; Martínez-Nicolás, J.J.; Lidón, V.; García-Sánchez, F. Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids Aspartic acid, Glutamic Acid and Alanine. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 581234. [[CrossRef](#)]
19. Bates, L.; Waldren, R.; Teare, I. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* **1973**, *39*, 205–207. [[CrossRef](#)]
20. Yang, H.P.; Yan, R.; Chen, H.; Lee, D.H.; Zheng, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* **2007**, *86*, 1781–1788. [[CrossRef](#)]
21. Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **1999**, *207*, 604–611. [[CrossRef](#)]
22. Koleva, I.I.; Vanbeek, T.A.; Linszen, J.P.H.; Degroot, A.; Evstatieva, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity. A comparative study on 3 testing methods. *Int. J. Plant Chem. Biochem. Tech.* **2002**, *13*, 8–17. [[CrossRef](#)]
23. Chance, B.; Maehly, S.K. Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol.* **1955**, *2*, 764–775. [[CrossRef](#)]
24. Chandlee, J.M.; Scandalios, J.G. Analysis of variants affecting the catalase developmental program in maize *scutellum*. *Theor. Appl. Genet.* **1984**, *69*, 71–77. [[CrossRef](#)]
25. Nakano, Y.; Asada, K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in Ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* **1987**, *28*, 131–140. [[CrossRef](#)]
26. McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–6055. [[CrossRef](#)]

27. Haynes, W. Tukey's Test. In Encyclopedia of Systems Biology; Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.H., Yokota, H., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 2303–2304. [[CrossRef](#)]
28. Huang, B.; Xin, J.; Dai, H.; Liu, A.; Zhou, W.; Yi, Y.; Liao, K. Root morphological responses of three hot pepper cultivars to Cd exposure and their correlations with Cd accumulation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 1151–1159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Latef, A. Growth and some physiological activities of pepper (*Capsicum annuum* L.) in response to cadmium stress and mycorrhizal symbiosis. *J. Agric. Sci. Technol.* **2013**, *15*, 1437–1448.
30. Uzal, O.; Yasar, F. Effects of GA3 hormone treatments on ion uptake and growth of pepper plants under cadmium stress. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2017**, *15*, 1347–1357. [[CrossRef](#)]
31. León, A.M.; Palma, J.M.; Corpas, F.J.; Gómez, M.; Romero-Puertas, M.C.; Chatterjee, D.; Mateos, R.M.; Del Río, L.A.; Sandalio, L.M. Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40*, 813–820. [[CrossRef](#)]
32. Sigel, A.; Sigel, H.; Sigel, R. Metallothioneins and related chelators. In Metal Ions in Life Sciences; Royal Society of Chemistry Publishing: Cambridge, UK, 2009; Volume 5. [[CrossRef](#)]
33. Shanker, K.; Mishra, S.; Srivastava, S.; Srivastava, R.; Dass, S.; Prakash, S.; Srivastava, M.M. Effect of Selenite and Selenate on Plant Uptake of Cadmium by Maize (*Zea mays*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, *56*, 419–424. [[CrossRef](#)]
34. Huang, B.; Xin, J.; Dai, H.; Zhou, W. Effects of interaction between cadmium (Cd) and selenium (Se) on grain yield and Cd and Se accumulation in a hybrid rice (*Oryza sativa*) system. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 9537–9546. [[CrossRef](#)]
35. Guignardi, Z.; Schiavon, M. Biochemistry of plant selenium uptake and metabolism. In Selenium in Plants; Plant Ecophysiology; Pilon-Smits, E., Winkel, L., Lin, Z.Q., Eds.; Springer: Cham, The Netherlands, 2017; Volume 12, pp. 21–34. [[CrossRef](#)]
36. Drahonovsky, J.; Szakova, J.; Mestek, O.; Tremlova, J.; Kana, A.; Najmanova, J.; Tlustos, P. Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *125*, 12–19. [[CrossRef](#)]
37. Bertoli, A.C.; Cannata, M.G.; Carvalho, R.; Bastos, A.R.R.; Freitas, M.P.; Dos Santos, A.A. *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *86*, 176–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Khan, A.; Khan, S.; Khan, M.A.; Qamar, Z.; Waqas, M. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 13772–13799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bachir, L.D.M.; Wu, F.; Zhang, G.; Wu, H. Genotypic difference in effect of cadmium on development and mineral concentrations of cotton. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2004**, *35*, 285–299. [[CrossRef](#)]
40. Wu, H.; Wu, F.B.; Zhang, G.; Bachir, D.M. Effect of cadmium on uptake and translocation of three microelements in cotton. *J. Plant Nutr.* **2005**, *27*, 2019–2032. [[CrossRef](#)]



11.2. PUBLICACIÓN 2

Effects of Se Application on Polyamines and Carbon–Nitrogen Metabolism of Pepper Plants Suffering from Cd Toxicity

Rafael Pérez-Millán, Marina Alfosea-Simón, Silvia Simón-Grao, José María Cámara-Zapata, Ernesto Alejandro Zavala-González, Almudena Aranda-Martinez, Muhammad Adnan Shahid and Francisco García-Sánchez

Agronomy 2021, 11, 2535.

Factor de impacto: 3,949 Q1 (2021) (Categoría Agronomy y Plant Science)

Effects of Se Application on Polyamines and Carbon–Nitrogen Metabolism of Pepper Plants Suffering from Cd Toxicity

Rafael Pérez-Millán¹, Marina Alfosea-Simón², Silvia Simón-Grao², José María Cámara-Zapata³, Ernesto Alejandro Zavala-González¹, Almudena Aranda-Martinez¹, Muhammad Adnan Shahid⁴ and Francisco García-Sánchez^{2,*}

¹ Atlántica Agrícola S.L., 03400 Villena, Spain; rperez@atlanticaagricola.com (R.P.-M.); ezavala@atlanticaagricola.com (E.A.Z.-G.); aaranda@atlanticaagricola.com (A.A.-M.)

² Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 30100 Murcia, Spain; alfosea.simon@gmail.com (M.A.-S.); ssimon@cebas.csic.es (S.S.-G.)

³ Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernandez University, 03312 Orihuela, Spain; jm.camara@umh.es

⁴ Horticultural Sciences, University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, North Florida Research and Education Center, Quincy, FL 32351, USA; Muhammad.Shahid@unh.edu

* Correspondence: fgs@cebas.csic.es; Tel.: +34-968-396200 (ext. 6397)

Abstract: Previous studies have shown that the application of selenium (Se) can efficiently mitigate the toxic effects of cadmium (Cd) on various crops. The objective of the present work is to decipher the mechanisms responsible for the efficiency of Se against the effects of Cd in pepper plants, with respect to the carbon and nitrogen metabolism. The following were analyzed: the concentrations of anions related with this metabolism, such as nitrates, nitrites, and ammonium, the activities of different enzymes such as nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamate synthase, polyamines in their different forms, organic acid salts, amino acids, and sugars in the leaf and root tissues of the pepper plants grown in a hydroponics system. Four different treatments were applied: plants without Cd or Se applied (-Cd/-Se); plants grown with Cd added to the nutrient solution (NS) but without Se (+Cd/-Se); plants grown with Cd in the NS, and with the foliar application of Se(+Cd/+SeF); and lastly, plants grown with Cd in the

NS, and with Se applied to the root (+Cd/+SeR). The metabolites and enzymes related with carbon and nitrogen metabolism were analyzed 15 days after the application. The results showed the superiority of the +Cd/+SeR treatment with respect to the +Cd/+SeF treatment, as shown by an increase in the conjugated polyamines, the decrease in glutamate and phenylalanine, and the increase of malate and chlorogenic acid. The results indicated that SeR decreased the accumulation and toxicity of Se as polyamine homeostasis improved, defense mechanisms such as the phenylpropanoid increased, and the entry of Cd into the plants was blocked.

Keywords: cadmium toxicity; selenium; nitrogen metabolism; polyamines; metabolites

1. Introduction

The concern for environmental contamination due to cadmium (Cd) has increased in the last few years, due to the toxicity of this metal to crops at low concentrations [1]. For plants defined as “not hyperaccumulators”, the Cd toxicity threshold in the irrigation water has been set at 5–10 μM Cd and 5.0 mg kg^{-1} in the soil. As for the leaf concentration, a toxicity threshold of 3–30 mg kg^{-1} dry weight has been established [2]. The toxic effects of Cd in plants has been widely studied [3], and research is presently being conducted on how to reduce or mitigate the negative effects of this metal on plants grown in agricultural areas in which the irrigation water has a high content of Cd, due to the industrial sources of the water. Among these strategies, several studies have reported that Se application can decrease Cd uptake and/or alleviate the toxic effects of Cd on vegetables [4–6], such as in the cultivation of pepper [7]. In a previous study with these plants [8], it was observed that Se applied to the root had beneficial effects due to the decrease in the foliar concentration of Cd, and the increase in the concentration of Se in every plant part, thus reducing the toxicity of Cd in the leaves, and maintaining the vegetative growth of the plants.

Plants have developed many strategies to avoid heavy metal toxicity in their tissues. These tolerance mechanisms are multi-factorial, and include the expression of specific groups of genes, the synthesis of proteins related to stress, and the accumulation of compatible solutes (such as sugars, amino acids, organic acid salts, betaines, and polyamines (PAs)), all of which are involved in the protection of cellular structures, the maintenance of ionic homeostasis, and osmotic adjustment [9–16]. Different studies have confirmed that the tolerance responses to Cd stress involve the synthesis of amino acids such as proline, glycine betaine, glutamic acid, gamma-aminobutyric acid (GABA), asparagine, and glutamine [17,18]. The role played by these amino acids on the tolerance to Cd excess has also been confirmed by the application of

proline and glycine in tobacco [19] and wheat [20], GABA in corn [21], and glutamic acid in lentils [22].

In general, tolerance to heavy metals is determined by the reduction of the transport of the metal to the inside of the cell and/or a greater capacity to sequester these metals. The root is one of the main defense barriers, through the immobilization of Cd by the pectins found in the cell wall. The extracellular carbohydrates (mucilage and callose) of the root can also intervene in the immobilization of the metal [23,24]. The accumulation of the metal in the trichomes found on the surface of the leaf is also a mechanism of immobilization and cell defense [25,26]. Lastly, another mechanism consists of the reduction of the transport or increase in the extrusion of Cd by cation transporters found in the plasma membrane [27,28].

Once inside the cell, Cd and other heavy metals are sequestered by organic acid salts, amino acids, phytochelatins, and metallothioneins, and are afterwards compartmentalized in the vacuole to prevent toxicity. Phytochelatins are the main defense mechanisms against heavy metals. They are synthesized starting with glutathione, and their synthesis is induced by the presence of heavy metals [29,30]. Presently, the function of polyamines (PAs) as a response to biotic and abiotic stress in plants has become a new and interesting field in the regulation and involvement of these compounds. It has been suggested that their properties of free-radical capture, stabilization of membranes, protection of nucleic acids, and regulation of gene expression, are some of the mechanisms through which they can confer tolerance to these stresses [30,31]. Polyamines are aliphatic nitrogenous compounds with two or more amino groups found in every living cell. In plants, polyamines are mainly found in their free form and/or covalently conjugated with small size molecules (phenolic compounds), with macromolecules (nucleic acids, proteins, etc.), and with lignin through hydrogen and ionic bonds. Each form is associated with a multitude of regulation and cell signaling processes, which encompass a great range of biological functions [11,30].

Cd stress also affects nitrogen metabolism, and recent studies have shown that it increases the concentration of nitrates and decreases the quantity of ammonium in leaves, provoking alterations in N metabolism and their relationship with C metabolism [32]. Other studies have stated that Cd phytotoxicity increases the content of organic acid salts in plant tissues, which can be secreted by the root and bound to Cd, forming chelatingorganometallic compounds that decrease the bioavailability of free toxic Cd [33]. This increase in organic acid salts can mitigate the phytotoxicity of Cd in plants and improve their tolerance, as they induce and increase the activity and respiration of the roots, which improves the absorption of nutrients and the antioxidant response [34]. Likewise, it has been observed that plants grown in soils with a high content of Cd increase their contents of sugars (glucose, sucrose, and fructose), to maintain the osmotic equilibrium in shoot and root cells [35].

The objective of the present work is to discover how Cd toxicity affects nitrogen and carbon metabolism of pepper plants, and to identify if, among the mechanisms involved in the tolerance of pepper plants to Cd when Se is applied, they are related with the synthesis and accumulation of polyamines and amino acids. This work is part of another publication by Pérez-Millán et al. (2021) [8], which demonstrated that the application of Se reduces the concentration and toxicity of Cd in pepper plants.

2. Materials and Methods

2.1. Growing Conditions and Plant Material

For this study, pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds from the commercial variety 'Cristal' were germinated in sterile vermiculite trays inside a controlled-environment growth chamber. The information related to the germination and crop management have previously been described in Pérez-Millán et al. (2021) [8].

2.2. Cd and Se Treatments Applied to the Plants

The pepper plants were grown in two different Cd conditions: (i) control treatment in which the nutrient solution did not contain cadmium (-Cd/-Se); and (ii) under an excess of cadmium (+Cd), in which the nutrient solution contained a final concentration of 3 mg L⁻¹ of cadmium, applied as CdSO₄•8H₂O (considered severe stress; [36]). This group of plants was divided into three sub-groups: plants grown without the application of Se (+Cd/-Se), plants treated with a foliar application of Se (+Cd/+SeF), and plants to which Se was applied to the root (+Cd/+SeR). The Se was applied as Na₂SeO₄ to a final concentration of 10 μM in both the foliar and root treatments. The details of the experimental design can be found in Pérez-Millán et al. (2021) [8]. The sampling began 15 days from the start of the Cd treatment for the corresponding analytical studies.

2.3. Analytical Parameters Measured during the Assay

2.3.1. Nitrogen Metabolism in Leaves and Root

For the quantification of NO³⁻, 25 mg of the dry and ground tissue was used to which 5 mL of ultrapure water were added. Afterwards, the samples were agitated for 30 min in the dark. Then, the contents were filtered through a 45 μm filter. Two-hundred microliters of the filtered sample were taken to measure the concentration with a NO³⁻ 11 LAQUAtwin nitrate meter (HORIBA, Irvine, CA, USA). The concentration of NO³⁻ was expressed as g of NO³⁻ 100 g⁻¹. The measurement of NO²⁻ was performed by following the protocol described by Hageman and Hucklesby (1971) [37], which quantified the formation of a purple-red color due to the diazotization-coupling reaction between sulfanilamide and N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED dihydrochloride) at pH between 2.0 and 2.5. In parallel, a calibration

curve using different concentrations was made, which ranged from 0 to 17 mg L⁻¹ of potassium nitrite (KNO₂). On its part, the measurement of NH⁴⁺ was performed according to the process described by Kempers (1974) [38]. For this, 205 mg of dried and ground leaf material was used to which 5 mL of ultrapure water were added. Afterwards, the sample was agitated in the dark for 30 min. Then, the mixture was filtered through a 45 µm syringe filter. One hundred µL of the sample were mixed with 100 µL of reagents 1 and 2 coming from part of the KIT Ammonium Test (EMD Millipore Corporation, Germany). The samples were kept in the dark at 37 °C for 60 min. After this, the absorbance was read at 640 nm. At the same time, a calibration curve was made with ammonium chloride (NH₄Cl) at concentrations ranging from 0 to 32 mg L⁻¹. The NH⁴⁺ concentration in the leaves was expressed as µg of NH⁴⁺ g⁻¹ DW. In addition, leaves and roots were frozen in liquid nitrogen for the study of enzymatic activities of nitrate reductase (NR; [39]), nitrite reductase (NiR; [40]), glutamate synthase GOGAT-NADH, EC 1.4.1.14; [41]) and glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2; [42]).

2.3.2. Metabolic Analysis of Leaf and Root Tissue

The frozen leaf and root samples were utilized for a “non-targeted” metabolic study with the H-NMR technique in lyophilized leaf tissue, as described in Alfosea-Simón et al., (2020) [43]. The following compounds, which are involved in the primary and secondary metabolism of plants, were measured: (1) amino acids: 4-aminobutyrate (AB = GABA), alanine (Ala), asparagine (Asn), aspartate (Asp), glutamate (Glu), glutamine (Gln), isoleucine (Iso), proline (Pro), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), and valine (Val); (2) organic acid salts: -citrate (Cit), formate (For), fumarate (Fum), malate (Mal), and chlorogenate (CGA); and (3) sugars: -fructose (Fru), glucose (Glu), and sucrose (Suc).

2.3.3. Determination of Free, Soluble-Conjugated, and Insoluble-Bound Polyamines

Polyamines were measured with the procedure described in Flores and Galston (1982) [44] through thin layer chromatography (TLC). The leaf material (frozen leaves) was homogenized in 3.2 mL of 5% (w/v) cold perchloric acid (PCA) and incubated at 4 °C for 60 min, and then 1, 6-hexanediamine was mixed with the homogenate as the internal standard. Afterwards, the homogenate was centrifuged at 12,000 g at 4 °C for half an hour. The supernatant was used to measure free and soluble conjugated polyamine contents, whereas the pellet was used to estimate insoluble-bound polyamines. The polyamines were measured with a ultraperformance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) by using UHPLC (Shimadzu, Nexera Series; Columbia, MD, USA) and mass spectrometer (Orbitrap Exploris GC 240 mass spectrometer, Waltham, MA, USA).

2.4. *Experimental Design and Statistical Analysis*

The statistical analysis included a one-way ANOVA, performed with the SPSS v.24 statistical package (Chicago, IL, USA). The measurements shown are the means of six repetitions ($n = 6$). When the variables were significant ($p < 0.05$), the treatment means were separated using Tukey's multiple range test.

3. Results

3.1. *Nitrogen Metabolism Study in Leaves and Root*

The concentrations of nitrate, nitrite, and ammonium in leaves and roots of the plants were significantly affected by the treatments applied. The presence of Cd in the nutrient solutions without the added Se (+Cd/-Se) produced an increase in the concentration of nitrate and ammonium in the root and nitrite in the leaves, while in the other cases, no differences were found between -Cd/-Se and +Cd/+Se.

The behavior described previously was different in some cases with the presence of Se. Thus, the application of Se, in both leaves and roots (+Cd/+SeR; +Cd/+SeF), increased the leaf concentration of nitrate and ammonium, while the concentration of nitrite only increased in the +Cd/+SeR treatment, as compared to the -Cd/-Se treatment (Figure 1). In the root, the concentration of nitrate was similar in the +Cd/+SeR and +Cd/+SeF treatments, and significant differences were not found with respect to -Cd/-Se. The concentration of nitrite increased with the +Cd/+SeF treatment with respect to the rest of the treatments, and the concentration of ammonium increased in the plants treated with Se, independently of the manner of application, with respect to -Cd/-Se.

The results from the enzymatic activity assays (Figure 2) showed that the Cd in the nutrient solution (+Cd/-Se) decreased the activity of NR and increased the activity of NiR in the leaves, while in the root, the NiR activity was affected, decreasing it with respect to -Cd/-Se. The application of Se changed this type of response, with an increase observed in NR in the leaves from the +Cd/+SeF treatment, and an increase of GOGAT activity in plant leaves treated with +Cd/+SeF and +Cd/+SeR. In the root, a significant increase was observed in NR and NiR activities with the +Cd/+SeR treatment, and that of GOGAT in both Se treatments, as compared to the control (-Cd/-Se).

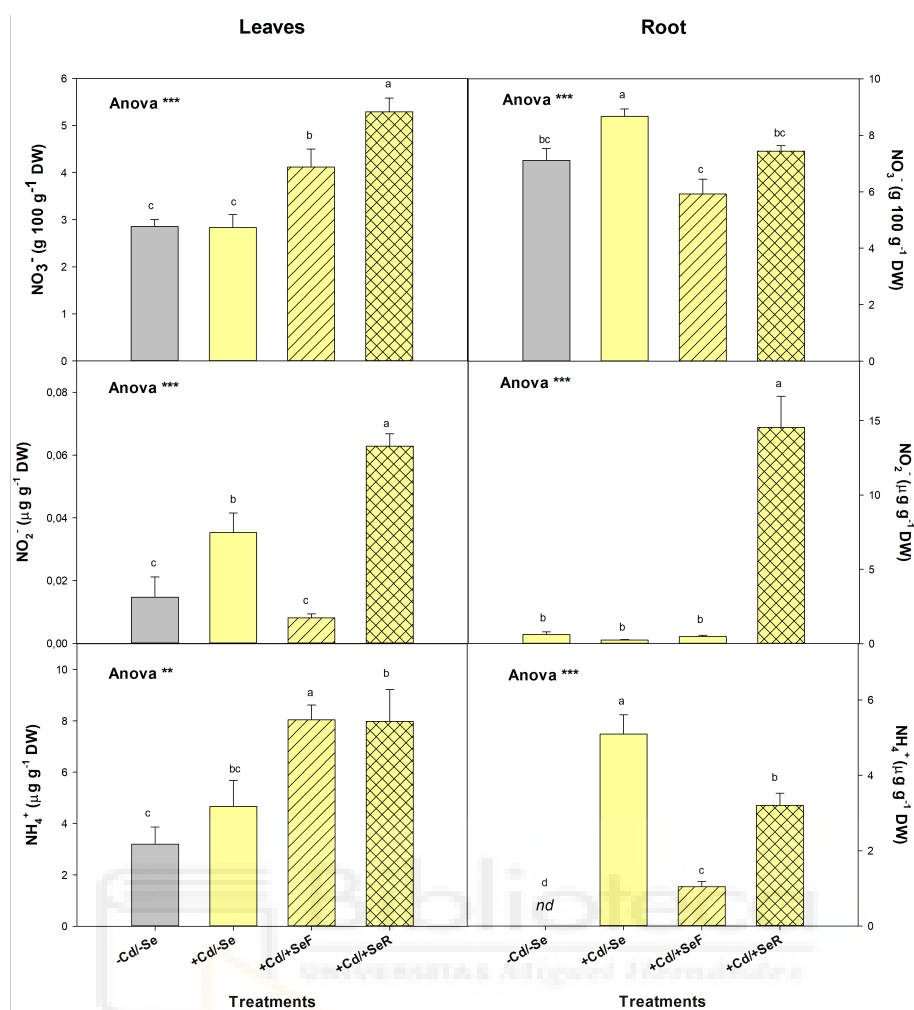


Figure 1. Concentration of nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) and ammonium (NH_4^+) in leaves and roots from the pepper plant var. 'Cristal' grown in a hydroponic system under four different treatments which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results come from samples harvested two weeks after the start of the treatments. In the ANOVA: ** and *** indicate significant differences at $p < 0.01$ and 0.001 , respectively. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey's test. The bars indicate the SE of the mean ($n = 6$).

3.2. Free, Soluble-Conjugated, and Insoluble-Bound Polyamines in Leaves

In the polyamine study, the following were found in the pepper leaves: spermine (Spm), spermidine (Spd), putrescine (Put), and cadaverine (Cad) in their three forms; free, soluble-conjugated, and insoluble-bound. In the Cd toxicity treatment without Se, +Cd/-Se, an increase of 56%, 18%, 26%, and 38% was observed in Spm, Spd, Put, and Cad, respectively, with respect to -Cd/-Se (Figure 3). The application of Se, either foliarly or through the root, also increased the concentrations of each of these polyamines, but this increase was greater than for the +Cd/-Se treatment, with increases of 309%, 126%, 130%, and 108% observed for the +Cd/+SeF treatment, and 204%, 136%, 85%, and 57% for the +Cd/+SeR treatment for Spm, Spd, Put, and Cad, respectively, relative to -Cd/-Se.

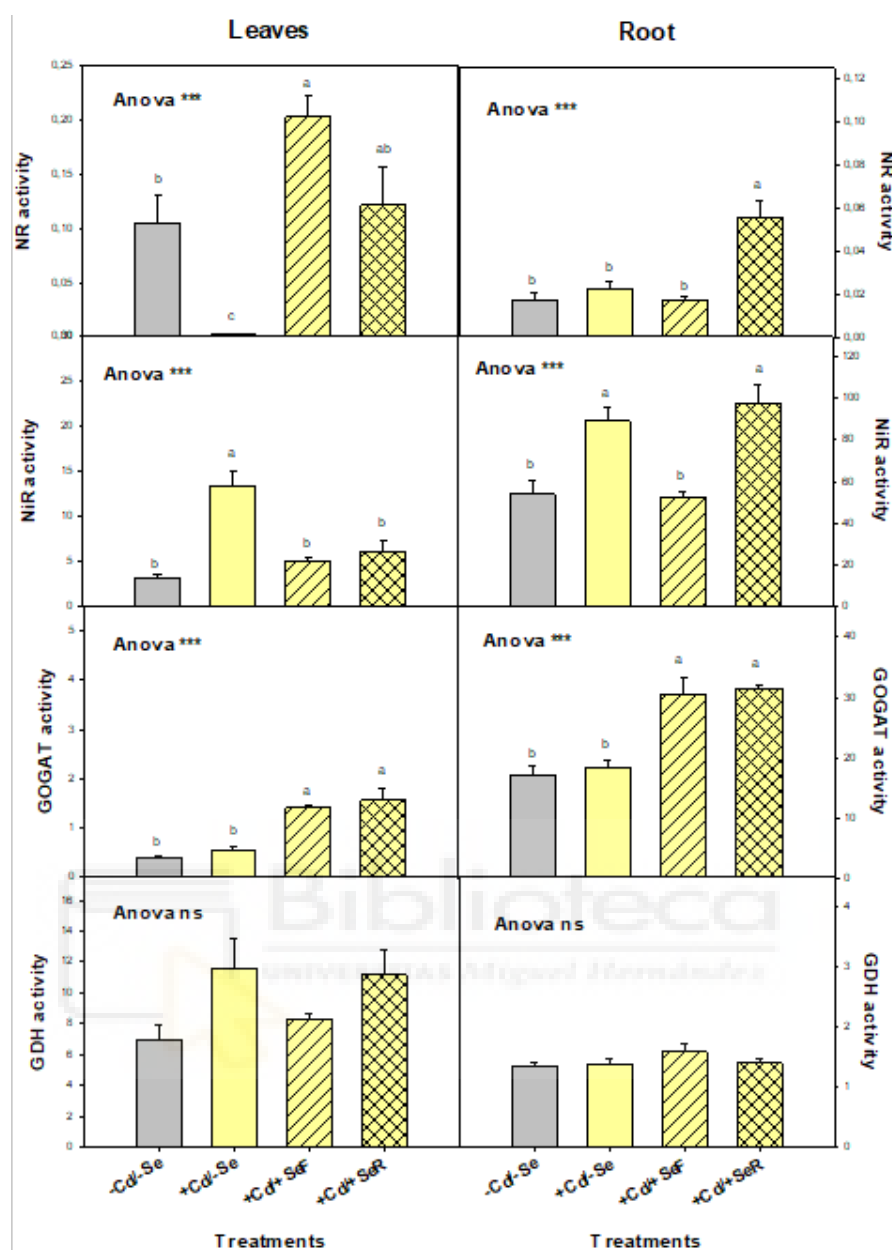


Figure 2. Activity of the enzymes nitrate reductase (NR activity; expressed in mM NO_2^- formed mg^{-1} protein min^{-1}), nitrite reductase (NiR activity; expressed in mM NO_2^- transformed mg^{-1} protein min^{-1}), glutamate synthase (GOGAT activity; expressed in mM NADH oxidized mg^{-1} protein min^{-1}), and glutamate dehydrogenase (GDH activity; expressed in mM NADH oxidized mg^{-1} protein min^{-1}) quantified in leaf and root tissue from pepper plants from the var. 'Cristal' grown in a hydroponic system under four different treatments which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: 'ns' indicates non-significant differences for a 95% confidence interval, and *** indicate significant differences at $p < 0.001$. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey's test. The bars indicate the SE of the mean ($n = 6$).

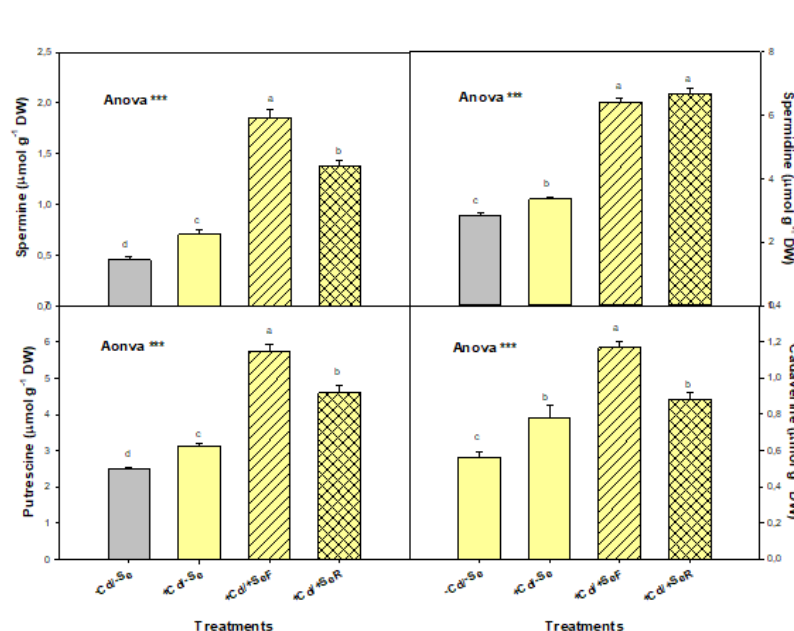


Figure 3. Concentration of total polyamines (spermine, spermidine, putrescine, and cadaverine) quantifies in leaf tissue from pepper plants of the var. 'Cristal' grown in a hydroponic system under four different treatments which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: *** indicate significant differences at $p < 0.001$. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey's test. The bars indicate the SE of the mean ($n = 6$).

As for the polyamine forms, free, soluble-conjugated, and insoluble, in the case of PAs Spm and Cad, the most common one was free, followed by soluble conjugated, with the insoluble one having the lowest concentration. While for Spd, the concentrations increased in the following order: soluble-conjugated = free > insoluble, and for Put, free > insoluble > soluble conjugated (Table 1). The +Cd/-Se treatment maintained this distribution in each of the polyamines, while the +Cd/+SeR treatment increased the percentage of the soluble-conjugate form at the expense of a decrease in the insoluble form in the case of Spd and Cad. In the case of +Cd/+SeF, an increase in the soluble-conjugated form was observed, to the expense of a decrease in the free form of Put. Table 2 shows the $(\text{Spm}+\text{Spd})/\text{Put}$ and $\text{Put}/(\text{Spm}+\text{Spmd})$ ratios. Significant differences were found in these ratios according to the treatments. Thus, the +Cd/+SeR treatment had the highest $(\text{Spm}+\text{Spd})/\text{Put}$ ratio and the lowest $\text{Put}/(\text{Spm}+\text{Spmd})$ ratio with respect to the rest of the treatments, which obtained very similar values.

Table 1. Polyamines quantified according to its form (free, soluble-conjugated, and insoluble-bound) in leaf and root tissue from pepper plants of the var. 'Cristal' grown in a hydroponic system under four different treatments which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: *, **, and *** indicate significant differences at $p < 0.05$, 0.01 , and 0.001 , respectively. 'ns' indicates non-significant differences for a 95% confidence level. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey's test. The bars indicate the SE of the mean ($n = 6$).

Polyamines	Form ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	Treatments				ANOVA
		-Cd/-Se	+Cd/-Se	+Cd/+SeF	+Cd/+SeR	
Spermine	Free	0.324 c	0.508 c	1.438 a	1.098 b	***
	Soluble-conjugated	0.096 c	0.152 c	0.349 a	0.226 b	***
	Insoluble-bound	0.033 c	0.048 c	0.072 a	0.055 bc	***
Spermidine	Free	1.272 c	1.408 c	2.768 a	2.000 b	***
	Soluble-conjugated	1.376 d	1.610 c	3.010 b	4.210 a	***
	Insoluble-bound	0.190 c	0.338 bc	0.640 a	0.480 ab	***
Putrescine	Free	1.958 c	2.370 c	3.746 a	3.124 b	***
	Soluble-conjugated	0.154 c	0.274 c	1.218 a	0.844 b	***
	Insoluble-bound	0.378 c	0.496 bc	0.784 a	0.632 ab	***
Cadaverine	Free	0.360 c	0.562 b	0.732 a	0.584 ab	***
	Soluble-conjugated	0.178 b	0.184 b	0.356 a	0.234 b	***
	Insoluble-bound	0.025 c	0.036 c	0.081 a	0.064 b	***
Polyamines (% total polyamines)						
Polyamines	Form	-Cd/-Se	+Cd/-Se	+Cd/+SeF	+Cd/+SeR	ANOVA
Spermine	Free	71.3 b	71.2 b	77.4 ab	79.7 a	*
	Soluble-conjugated	21.4	22.0	18.7	16.4	Ns
	Insoluble-bound	7.4 a	6.8 a	3.9 b	4.0 b	***
Spermidine	Free	44.8 a	41.9 a	43.1 a	29.8 b	***
	Soluble-conjugated	48.6 b	48.0 b	46.9 b	63.0 a	***
	Insoluble-bound	6.6 b	10.1 a	10.0 ab	7.2 ab	*
Putrescine	Free	78.6 a	75.6 a	65.1 b	68.0 b	***
	Soluble-conjugated	6.2 b	8.6 b	21.3 a	18.3 a	***
	Insoluble-bound	15.2	15.8	13.6	13.7	Ns
Cadaverine	Free	63.9	71.6	62.6	66.2	Ns
	Soluble-conjugated	31.6	23.7	30.4	26.5	Ns
	Insoluble-bound	4.5 c	4.7 bc	7.0 ab	7.3 a	**

Table 2. (Spm+Spd)/Put and Put/(Spm+Spmd) ratios of the leaf concentration data of pepper plants from the 'Cristal' variety grown in a hydroponic system under four different treatments which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: *** indicate significant differences at $p < 0.001$. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey's multiple range test ($n = 6$).

	-Cd/-Se	+Cd/-Se	+Cd/SeF	+Cd/+SeR	ANOVA
(Spm+Spd)/ Put	1.33 b	1.30 b	1.45 b	1.77 a	***
Put/(Spm+Spmd)	0.76 a	0.77 a	0.70 a	0.57 b	***

3.3. Other Metabolites Identified and Quantified in Leaves and Root by RMN

3.3.1. Carbohydrates Concentration in the Different Plant Tissues

The presence of +Cd in the nutrient solution (+Cd/-Se) altered the concentration of sugars in the leaves and roots of the plants, as it decreased the concentration of sucrose in the leaves and the concentration of fructose, glucose, and sucrose in the root, as compared with the control treatment -Cd/-Se (Figure 4). This response was similar to the application of the +Cd/+SeR, except that in this treatment, a decrease in the leaf concentration of glucose was also observed. In the case of the +Cd/+SeF treatment, the values of the concentration of these sugars were very similar to the control treatment plants, except for the concentration of glucose and sucrose in the root, in which an increase was observed in the former and a decrease in the latter, as compared to -Cd/-Se control plants.

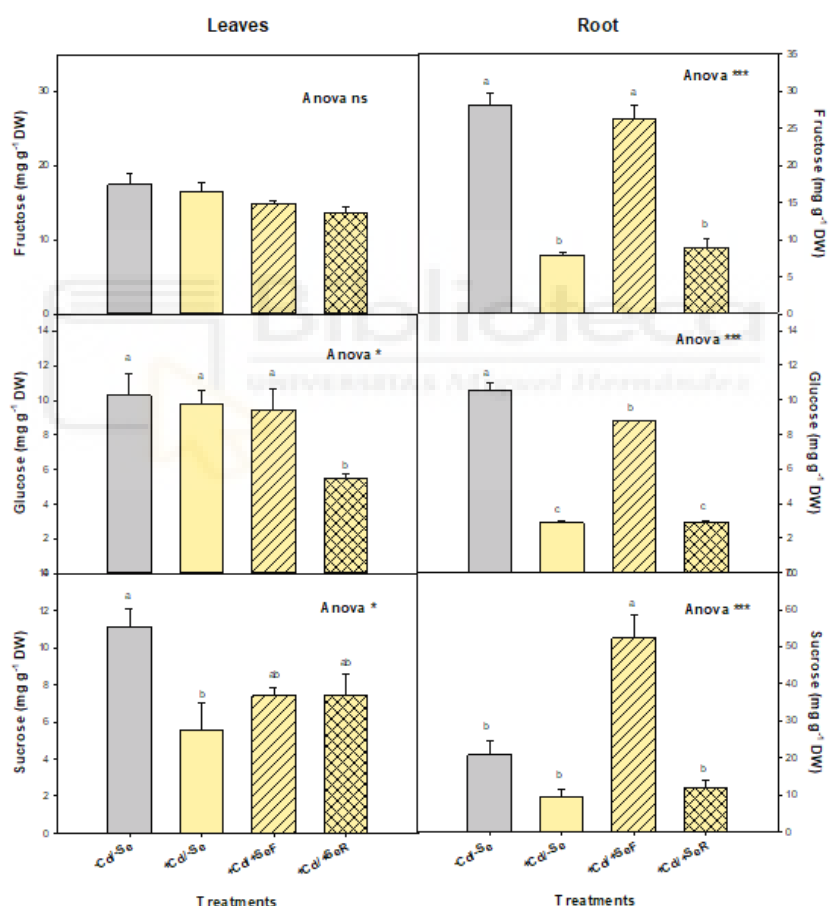


Figure 4. Concentration of fructose, glucose, and sucrose quantified in leaf and root tissue from pepper plants of the var. 'Cristal' grown in a hydroponic system under four different treatments, which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: 'ns' indicates nonsignificant differences for a 95% confidence level, and * and *** indicate significant differences at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey's test. The bars indicate the SE of the mean ($n = 6$).

3.3.2. GABA

The concentration of GABA (Figure 5) in the leaf tissue did not show significant differences between the treatments assayed. In the root, however, an increase was observed in the plants treated with +Cd/+SeF with respect to the rest of the treatments.

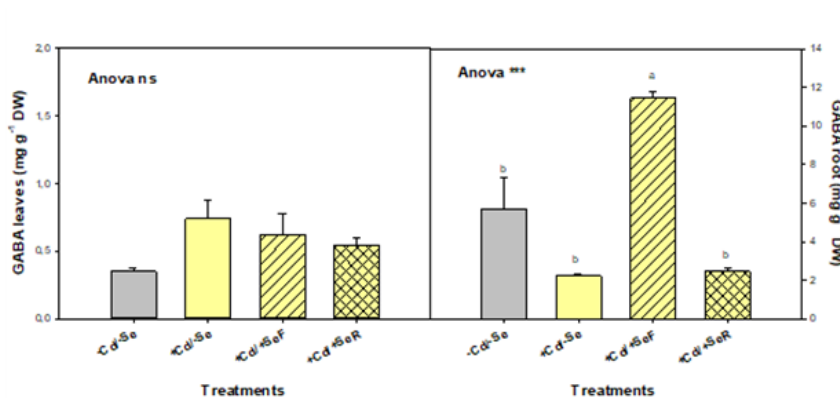


Figure 5. Concentration of GABA quantified in leaf and root tissue from pepper plants of the var. 'Cristal' grown in a hydroponic system under four different treatments, which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: 'ns' indicates non-significant differences for a 95% confidence level, and *** indicate significant differences at $p < 0.001$. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey's test. The bars indicate the SE of the mean ($n = 6$).

3.3.3. Amino Acids

The H-NMR analysis was able to detect and analyze the amino acids Tyr, Ala, Ile, Val, Phe, Pro, Glu, and Gln in the root. In leaves, these amino acids were also quantified, as well as Asp, but with the exception of Pro and Phe. In leaves, the most common amino acid was glutamate (65%), followed by glutamine (16%), and aspartate (8.4%), while in the root, the most common amino acids were proline (48%), followed by glutamate (21%) and Alanine (19%).

In leaves, the plants grown in the presence of Cd (+Cd/-Se, +Cd/+SeF, and +Cd/+SeR), increased their content of aspartate and glutamine with respect to -Cd/-Se, with this increase being significant in the +Cd/+SeR treatment for aspartate, and in the treatment +Cd/+SeR and +Cd/+SeF for glutamine (Table 3).

In the root, significant differences were found in the concentrations of all the amino acids quantified with the treatments (Table 2). With respect to treatment -Cd/-Se, the following responses were observed: (i) the concentrations of the amino acids Ile and Val decreased in treatments +Cd/-Se and +Cd/+SeR; (ii) the concentrations of Ala and Glu decreased in the +Cd/+SeR treatment, and only Ala for the +Cd/+SeR treatment; (iii) the concentrations of Phe and Pro increased in the plants from the +Cd/+SeF treatment, and Phe also decreased in the +Cd/+SeR treatment; iv) the concentration of Gln decreased in the +Cd/-Se and +Cd/+SeR treatments, and increased in the +Cd/+SeF one.

Table 3. Amino acids quantified in leaf and root tissue of pepper plants from the ‘Cristal’ variety grown in a hydroponic system under four different treatments which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: ‘ns’ indicates non-significant differences for a 95% confidence level, and *, **, and *** indicate significant differences at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey’s multiple range test ($n = 6$). ‘nd’ indicates no detection with NMR.

Amino acids detected in leaves by RMN ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)									
Treatment	Asp	Tyr	Ala	Iso	Val	Phe	Pro	Glu	Gln
-Cd/-Se	7.06 b	3.31	3.70	0.82	0.90	nd	nd	54.78	13.55 b
+Cd/-Se	13.37 ab	3.38	4.41	1.16	1.25	nd	nd	61.37	16.56 ab
+Cd/+SeF	9.92 ab	3.45	3.96	1.11	1.03	nd	nd	56.82	19.16 a
+Cd/+SeR	13.52 a	3.27	5.43	1.08	1.25	nd	nd	57.50	18.41 a
ANOVA	*	ns	ns	ns	ns	-	-	ns	**

Amino acids detected in root by RMN ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)									
Treatment	Asp	Tyr	Ala	Iso	Val	Phe	Pro	Glu	Gln
-Cd/-Se	nd	4.17 ab	45.80 a	2.64 a	2.02 a	1.92 b	118.13 b	50.30 a	16.97 b
+Cd/-Se	nd	4.08 ab	21.89 bc	1.12 b	1.20 b	1.91 b	55.68 b	37.79 a	6.36 c
+Cd/+SeF	nd	3.80 b	38.95 ab	2.21 a	1.89 a	2.50 a	241.81 a	46.35 a	27.44 a
+Cd/+SeR	nd	5.00 a	14.93 c	1.09 b	1.25 b	1.43 c	56.20 b	21.21 b	4.17 c
ANOVA	-	*	**	**	***	***	***	***	***

3.3.4. Organic Acid Salts

The organic acid salts detected and quantified by H-NMR in the leaves and roots were citrate, malate, formate, fumarate, and chlorogenate (Table 4). Their concentration as a percentage in the leaves followed the order: malate > citrate > chlorogenate > fumarate > formate; while in the root, citrate was found in the highest percentage followed by malate.

Table 4. Organic acid salts citrate (Cit), formate (For), fumarate (Fum), malate (Mal), and chlorogenate (CGA) quantified in leaf and root tissue of pepper plants from the ‘Cristal’ variety grown in a hydroponic system under four different treatments, which combined the application of Cd and Se (-Cd/-Se, +Cd/-Se; +Cd/+SeF and +Cd/+SeR). The results shown were obtained at the end of the experiment. In the ANOVA: ‘ns’ indicates non-significant differences for a 95% confidence level, and *, **, and *** indicate significant differences at $p < 0.05$, 0.01, and 0.001, respectively. Lower case letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ established by Tukey’s multiple range test ($n = 6$).

Organic acids salts detected by RMN ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)										
Treatment	Leaves					Root				
	Cit	Mal	For	Fum	CGA	Cit	Mal	For	Fum	CGA
-Cd/-Se	8.28 ab	36.39 a	0.67	0.84	1.13 bc	29.56 b	26.18 b	0.63 ab	0.44 b	nd
+Cd/-Se	12.75 a	39.45 a	1.00	3.17	2.08 ab	32.74 ab	20.06 b	0.46 b	0.61 ab	nd
+Cd/+SeF	6.40 b	29.91 ab	0.8	0.78	0.86 c	53.77 a	43.48 a	0.72 a	1.06 a	nd
+Cd/+SeR	11.50 ab	21.25 b	0.83	1.25	2.37 a	41.90 b	31.62 ab	0.56 ab	0.41 b	nd
ANOVA	*	**	ns	ns	ns	***	**	*	**	-

In the leaves, the treatment assays resulted in significant differences in the concentrations of citrate, malate, and chlorogenate. With respect to the control treatment, -Cd/-Se, the concentration of malate decreased, while the concentration of chlorogenate significantly increased for the +Cd/SeR plants. In the roots, an increase in the concentration of citrate, malate, and fumarate was observed in the +Cd/+SeF as compared to the -Cd/-Se treatment (Table 4).

4. Discussion

In the first part of the present publication [8], it was shown that the presence of Cd in the nutrient solution (+Cd/-Se, +Cd/+SeF and +Cd/+SeR) decreased the total dry biomass by 48%, 45%, and 38%, respectively, as compared to the control treatment (-Cd/-Se). Therefore, the application of Se through the root palliated the negative effect of Cd in the nutrient solution. It was also observed that the pepper plants could restrict the transport of Cd from the root to the leaves, at the expense of accumulating it in the root. Nevertheless, the low quantities that arrived at the leaf (30 ppm Cd) were very toxic, resulting in a reduction in growth. On the other hand, the application of Se through the leaves (foliarly) or the roots inhibited the transport of Cd to the leaves and deactivated its toxicity. Thus, in the present publication, we wanted to discover if the application of Se was able to inhibit Cd toxicity through the regulation/alteration of biochemical processes associated with C and N metabolism (sugars, organic acid salts, amino acids, polyamines, and nitrogen assimilation). The Cd concentrations reached in the plants from each of the treatments: +Cd/-Se, +Cd/-Se, +Cd/+SeF, and Cd/+SeR, are notable. In the leaves, these were 0.010, 26, 18, 18 ppm, respectively; and in the root, 2.15, 2400, 1000, and 2400 ppm, respectively [8].

4.1. Selenium in the Root Induced Changes in the Accumulation of PAs and Its Homeostasis, Favoring the Tolerance of Plants to Cd Excess

Polyamines (PAs) are low molecular weight polycationic molecules [45], which are fundamental for the development and growth of eukaryotic and prokaryotic cells [46]. In plants cells, Put, Spd, and Spm are the most important, and can be found in three forms: (i) free, (ii) conjugated with phenolic acids and other low molecular weight compounds, and (iii) insoluble, associated to proteins and cell walls. These compounds are involved in a wide range of functions in the growth and development of plants, including senescence, responses to fungi and viruses, and environmental stresses, including toxicity due to heavy metals [11,47–52]. Their function in the tolerance to abiotic stresses are due, among other causes, to their capacity to avoid the oxidation of cell structures, and this is achieved because PAs (i) have an enormous capacity to bond with cations and anions of membrane phospholipids or nucleic acids,

protecting them from oxidative stress, and (ii) can directly bond to heavy metals such as Co, Cu, Fe, or Ni, precisely avoiding the formation of these free radicals [53–55].

In our experiment, it was observed that pepper plants naturally increased the concentration of PAs when they were grown with a nutrient solution containing Cd (Figure 4). This response, however, was not sufficiently intense or efficient for protecting the plants from its toxicity. In other plants sensitive to Cd [56,57], the increase in PAs was accompanied by a greater increase of Put as compared to Spm and Spd, so that the Spm+Spd/Put ratio decreased as compared to conditions without Cd. This is due to the increase in the concentration of Cd and the increase in enzymatic activity and/or gene expression of Arg decarboxylase (ADC) and Orn decarboxylase (ODC, amino oxydases (DAO), and polyamine oxydases (PAO)) [56,57]. In our experiment with pepper plants, although they are very sensitive to Cd, the response was different, as the Spm+Spd/Put ratio was not altered (Table 2), so that the decrease in this ratio was not universal for all the plants sensitive to Cd toxicity.

The application of Se, either foliarly or through the root, increased the concentration of the polyamines Spm, Spd, and Put. Thus, this response could have helped the plants to protect themselves from the ROS compounds produced by Cd. In fact, in a previous publication [8], it was observed that plants treated with +Cd/-Se had an MDA content (a compound that indicates the level of lipid peroxidation) of 10 nm g⁻¹ fw, while the plants treated with Se, either foliarly or through the root, obtained an MDA value of 6 nm g⁻¹ fw, the same as the control plants. Thus, the application of Se to plants treated with Cd induced the accumulation of PAs, which helped in reducing oxidative stress. Of these three polyamines, Put was found at the highest concentration, due to the treatment with Se. Put is a PA with a low molecular weight diamine structure, so that it can be rapidly translocated towards the cell membranes, bonding with them to offer a fast and safe protection, as compared to Spd and Spm, as they are triamine and tetramine molecules, respectively [50]. In the bibliography, we found evidence that PAs help in the tolerance of stress caused by heavy metals. Thus, Tiae et al., (2019) [58] applied PAs foliarly (Spm, Spd, or Put) to wheat plants treated with Cd, and observed that the foliar application of Put obtained good results in the growth of the plants, as it increased their antioxidant capacity to deal with the toxicity of this metal. As for PA homeostasis, differences were also found in the +Cd/+SeR treatment with respect to the rest of the treatments. The Spm+Spd/Put ratio increased in this treatment (1.77 vs. 1.36). For Spm and Spd, an increase was observed in their soluble-conjugated forms to the expense of a decrease in their free form. Some authors have related the tolerance to stresses with the increase in the Spm+Spd/Put ratio [59] and the conversion of the free forms of the PA to their conjugated ones [57]. Therefore, the changes in the polyamines, both in their concentration and the Spm+Spd/Put ratio, and their

conjugated forms, are related with a greater tolerance to an excess of Cd with the application of Se to the roots.

4.2. Does the Foliar Application of Se Damage the Plants?

The foliar application of Se (+Cd/+SeF), although it improved the vegetative growth and development of plants, did not avoid the phytotoxic damage caused by Cd, as observed with the application of Se to the root (+Cd/+SeR), despite the plants from both treatments accumulating the same concentration of Cd. An increase in the leaf concentration of H₂O₂ was observed in plants from the +Cd/+SeF treatment [8], with respect to (+Cd/+SeR), in parallel to an increase in the leaf concentration of Spm, Put, Cad, and the root concentration of GABA. In addition, a differential response was also observed in the root, with respect to the amino acids phenylalanine, proline, and glutamine, the organic acids salt citrate and malate, and the sugar sucrose, as their concentration was higher as compared to the other treatments (Table 3). This response could suggest that the application of Se to the leaves (+Cd/+SeF) could have activated a series of responses that were different from the root treatment (+Cd/+SeR), which would make the +Cd/+SeF less effective, or cause some damages to the plant, although these may not be as severe as the control treatment (+Cd/-Se). Thus, the application of Se to the leaves could have increased the concentrations of Put and Cad in this organ, which are secreted in the apoplast and boost the activity of PAOs (flavin-containing polyamine oxidases) and CuAOs (copper-dependent amine oxidases), leading to a higher production of H₂O₂, thus threatening the redox homeostasis of cells [60].

This hypothesis could be justified by the close relationship observed between Put, Spm, Spd, GABA, and H₂O₂ (see Schematic representation of the biosynthesis, back-conversion, and terminal catabolism of Put, Spd, and Spm in plants in Sporman et al., 2020 [61]). From this point on, this excess of H₂O₂, although it could act as a signal for plants to respond to abiotic stresses, could have also affected other physiological processes, thus resulting in changes to C metabolism characterized by amino acids, organic acid salts, and sugars. It has been observed that damage can occur when the concentrations of PAO and H₂O₂ are high, as they oxidize Spd quickly, leading to a decreased regulation of survival genes, so that the protection pathway is not observed [61–63]. This very different response observed in the +Cd/+SeF treatment could be associated with the catabolism of the polyamines in which a Put-Spd-Spm conversion is observed, resulting in an accumulation of ammonium and H₂O₂, aside from the production of other molecules such as GABA [61].

4.3. Nitrogen Metabolism in Leaves and Root

With respect to nitrogen metabolism, we found three differential responses in plants from the +Cd/-Se, +Cd/+SeF, and +Cd/+SeF treatments. What was common to these responses was the

increase in concentration of ammonium in the leaves and roots, with this concentration being greater in the +Cd/+SeF and +Cd/+SeR leaves, and the roots from the +Cd/-Se plants. However, this accumulation of ammonium cannot be explained only with the nitrate and nitrite concentration data, or the enzymatic activities of NR, NiR, GOGAT, and GDH, which determine the synthesis and catabolism of ammonium. Thus, other processes such as the absorption of nitrate by the roots, the anabolism/catabolism of the polyamines, and/or deamination of free amino acids and other N forms could affect the final ammonium concentration in the plants. The observation revealed that in the treatment with Cd without Se (+Cd/-Se), there was an inhibition of NR and an overstimulation of NiR, while in the treatments with Se, there was an overall stimulation of GOGAT. Other studies have shown that in zucchini plants, the presence of Cd in the nutrient solution led to an increase in nitrate and a decrease in ammonium, as the enzymatic activity of NR, GOCAT, GS and GDH was inhibited [64]. Similar results were found in potato plants, as Cd decreased the enzymatic activities of NR, NiR, GS, and GOGAT, with the subsequent reduction of nitrate and nitrite, and an increase in ammonium. However, these effects on zucchini and potato were reversed by the presence of Si and Se, for zucchini and potato plants, respectively [65]. However, it is not yet clear why heavy metals reduce these activities, although it could be due to the direct effects of the heavy metals due to indirect effects caused by alterations produced in other physiological processes, such as net photosynthesis, or chlorophyll biosynthesis [66].

4.4. Other Metabolites Identified and Quantified in Leaves and Root Related with the High Tolerance to Cd and with the Application of +Cd/+SeR

One of the differentiating responses produced by the +Cd/+SeR treatment with respect to the other treatments (-Cd/-Se, +Cd/+SeF) is the decrease in concentration of malate and the increase in chlorogenate in the leaves, and the decrease of phenylalanine and glutamate in roots (Figure 6). Malate is the only organic acid salts that restricts the accumulation of Cd in plants, as it blocks the anionic channels, which it can penetrate. In many plants, it has been observed that a segregation of malate to the root zone decreases the accumulation of Cd [67]. Phenylalanine intervenes in important metabolic processes such as protein biosynthesis and the phenylpropanoid route, producing a broad range of secondary metabolites such as flavonoids, anthocyanins, lignins, or phenylpropanoids, which can palliate the effects caused by toxicity to heavy metals [68,69]. Glutamate intervenes in nitrogen assimilation processes. More specifically, it reacts with ammonium to incorporate nitrogen to the plants [70]. In the present work, the decrease in phenylalanine in the +Cd/+SeR plants could indicate that this treatment activates the phenylpropanoid route to protect against Cd toxicity, while the decrease in glutamate could indicate an increase in the biochemical activity associated with the synthesis of elicitor molecules [68]. Both mechanisms could help the +Cd/+SeR plants to with stand Cd

toxicity in the pepper plant tissues. This also occurs with chlorogenic acids, as it is a phenolic compound, a caffeic acid, and quinic acid ester, which acts as an intermediate in the biosynthesis of lignin [71]. In turn, the decrease in the concentration of malate suggests that these plants also put into place mechanisms to avoid the accumulation of the excess accumulation of Cd in the tissues. The segregation of malate to the root, to the expense of its decrease in the other tissues, could be blocking the entry of Cd, as we have observed in the study by Perez-Millan et al. (2021) [8]. However, in this work, it is not clear why root Se triggers all of these processes. It would be necessary to conduct molecular biology experiments to elucidate why Se is able to start all of these biochemical processes and changes. In fact, it has been observed in tomato plants that Se application produces changes in miR172, CRTISO, bZIP, DREB1A transcriptional factors, and gene expression of HQT1, HCT1, and PAL what could be related with abiotic stress tolerance [72,73].

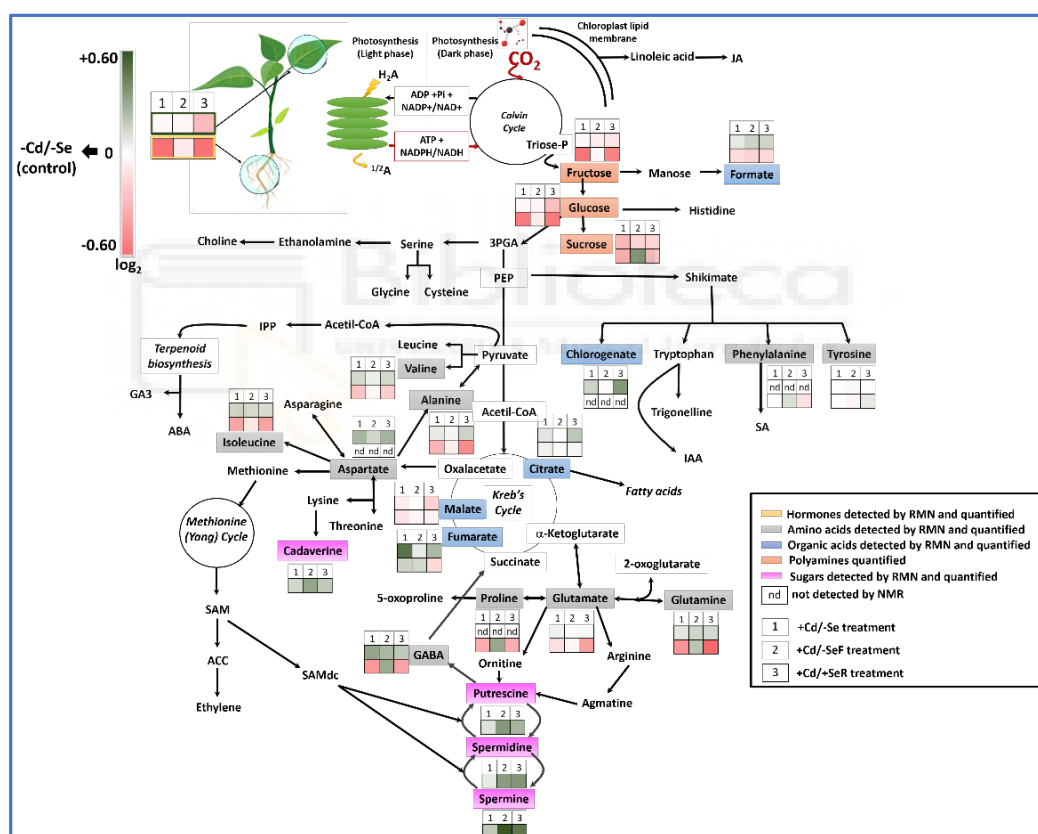


Figure 6. Proposed diagram of the distribution of the metabolites quantified with NMR ('nd' indicates that the metabolite was not quantified by NMR). For each metabolite quantified by NMR, a heat map is shown for leaf (top squares) and root (bottom squares) tissue for each Cd excess treatment (1: +Cd/-Se; 2: +Cd/+SeF; 3: +Cd/+SeR). In both tissues, the green color indicates a higher relative concentration, and the red color indicates a lower relative concentration as compared to the control treatment (-Cd/-Se). Scale is the \log_2 of the mean concentration values after normalization ($n = 6$).

5. Conclusions

The previous publication on this experiment highlighted that pepper plants were sensitive to Cd when it was found in high concentrations in the nutrient solution, and that the negative effects

could be offset if the plants were provided with Se foliarly or through the root, with the latter providing greater benefits. In the present work, we deciphered the mechanisms through which the application of Se via the root could decrease the accumulation and toxicity of Cd with respect to C and N metabolism, in which polyamines played an important part. Thus, the greatest tolerance of the +Cd/SeR treatment, with respect to the other treatments, could be due to this treatment inducing an increase in the concentration of the polyamines Spm, Spd, Put, and Cad, so that the Spm+Spd/Put ratio and the conjugated forms are greater than the free or insoluble forms. This response makes the plants more tolerant to Cd. Furthermore, the study of the organic acid salts and amino acids revealed that these plants could put into play other protection pathways in the presence of Cd, such as the phenylpropanoid pathway, the activation of elicitors, and segregation of malic acid to block its entry into the plant. On the other hand, although the +Cd/+SeF treatment was also efficient against the presence of Cd, it was not as efficient as +Cd/+SeR. The data from the metabolic study indicated that the foliar treatment with Se caused some damages to the pepper plants or triggered a series metabolic response that was different from those observed in the SeR plants, which were less efficient against Cd toxicity.

Author Contributions: F.G.-S. and R.P.-M.; methodology, S.S.-G.; software, E.A.Z.-G.; validation, F.G.-S., E.A.Z.-G. and A.A.-M.; formal analysis, M.A.-S.; investigation, R.P.-M.; resources, J.M.C.-Z.; data curation, M.A.S.; writing—original draft preparation, R.P.-M.; writing—review and editing, S.S.-G.; visualization, M.A.-S.; supervision, S.S.-G.; project administration, F.G.-S. All authors have

read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors want to thank the company ATLANTICA AGRICOLA S.L. for

providing us technical support and materials used in the experiments.

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

References

1. Friberg, L. Cadmium in the Environment; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018.
2. Solís-Domínguez, F.A.; González-Chávez, M.C.; Carrillo-González, R.; Rodríguez-Vázquez, R. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *141*, 630–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Shanmugaraj, B.M.; Malla, A.; Ramalingam, S. Cadmium stress and toxicity in plants: An overview. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 1–17. [[CrossRef](#)]
4. Wu, Z.; Wang, F.; Liu, S.; Du, Y.; Li, F.; Du, R.; Wen, D.; Zhao, J. Comparative responses to silicon and selenium in relation to cadmium uptake, compartmentation in roots, and xylem transport in flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) under cadmium stress. *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *131*, 173–180. [[CrossRef](#)]
5. Saha, U.; Fayiga, A.; Sonon, L. Selenium in the soil-plant environment: A review. *Int. J. Appl. Agric. Sci.* **2017**, *3*, 1–18. [[CrossRef](#)]
6. Luo, Y.; Wei, Y.; Sun, S.; Wang, J.; Wang, W.; Han, D.; Huifang, S.; Hongfang, J.; Fu, Y. Selenium modulates the level of auxin to alleviate the toxicity of cadmium in tobacco. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mozafariyan, M.; Shekari, L.; Hawrylak-Nowak, B.; Kamelmanesh, M.M. Protective role of selenium on pepper exposed to cadmium stress during reproductive stage. *Biol. Trace Elem. Res.* **2014**, *160*, 97–107. [[CrossRef](#)]
8. Perez-Millan, R.; Alfosea-Simon, M.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Camara-Zapata, J.M.; Martinez-Nicolas, J.J.; Lidon, V.; Simon, I.; Shahid, M.A.; Sanchez-Garcia, F.; Simon-Grao, S. The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions. *Agronomy* **2021**, *11*, 1905. [[CrossRef](#)]
9. Hasegawa, M.; Bressan, R.; Pardo, J.M. The dawn of plant salt tolerance genetics. *Trends Plant Sci.* **2000**, *5*, 317–319. [[CrossRef](#)]
10. Sairam, R.K.; Tyagi, A. Physiology and Molecular Biology of Salinity Stress Tolerance in Plants. *Curr. Sci.* **2004**, *86*, 407–421. [[CrossRef](#)]
11. Chen, D.; Shao, Q.; Yin, L.; Younis, A.; Zheng, B. Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1945. [[CrossRef](#)]
12. Saha, B.; Chowardhara, B.; Kar, S.; Devi, S.S.; Awasthi, J.P.; Moulick, D.; Tanti, B.; Panda, S.K. Advances in heavy metal-induced stress alleviation with respect to exogenous amendments in crop plants. In *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings*; Springer: Singapore, 2019; pp. 313–332. [[CrossRef](#)]
13. Schulze, E.D.; Beck, E.; Buchmann, N.; Clemens, S.; Müller-Hohenstein, K.; Scherer-Lorenzen, M. Adverse soil mineral availability. In *Plant Ecology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 203–256. [[CrossRef](#)]
14. Carrasco-Gil, S.; Ortega-Villasante, C.; Sobrino-Plata, J.; Barón-Sola, Á.; Millán, R.; Hernandez, L.E. Attenuation of Mercury Phytotoxicity with a High Nutritional Level of Nitrate in Alfalfa Plants Grown Hydroponically. *Res. Sq.* **2021**, in press. [[CrossRef](#)]
15. Foyer, C.H.; Noctor, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* **2005**, *28*, 1056–1071. [[CrossRef](#)]
16. Grobelak, A.; S'wia tek, J.; Murtas', A.; Jaskulak, M. Cadmium-induced oxidative stress in plants, cadmium toxicity, and tolerance in plants: From physiology to remediation. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 213–231. [[CrossRef](#)]
17. Ahmad, P.; Ahanger, M.A.; Alyemeni, M.N.; Wijaya, L.; Alam, P. Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato. *Protoplasma* **2018**, *255*, 79–93. [[CrossRef](#)]

18. Zhu, G.; Xiao, H.; Guo, Q.; Zhang, Z.; Zhao, J.; Yang, D. Effects of cadmium stress on growth and amino acid metabolism in two Compositae plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *158*, 300–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Islam, M.M.; Hoque, M.A.; Okuma, E.; Banu, M.N.A.; Shimoishi, Y.; Nakamura, Y.; Murata, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* **2009**, *166*, 1587–1597. [[CrossRef](#)]
20. Rasheed, R.; Ashraf, M.A.; Hussain, I.; Haider, M.Z.; Kanwal, U.; Iqbal, M. Exogenous proline and glycinebetaine mitigate cadmium stress in two genetically different spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Braz. J. Bot.* **2014**, *37*, 399–406. [[CrossRef](#)]
21. Seifikalhor, M.; Aliniaefard, S.; Bernard, F.; Seif, M.; Latifi, M.; Hassani, B.; Didaran, F.; Bosacchi, M.; Rezadoost, H.; Li, T. - Aminobutyric acid confers cadmium tolerance in maize plants by concerted regulation of polyamine metabolism and antioxidant defense systems. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–18. [[CrossRef](#)]
22. Yang, L.; Yao, J.; Sun, J.; Shi, L.; Chen, Y.; Sun, J. The Ca²⁺ signaling, Glu, and GABA responds to Cd stress in duckweed. *Aquat. Toxicol.* **2020**, *218*, 105352. [[CrossRef](#)]
23. Benavides, M.P.; Gallego, S.M.; Tomaro, M.L. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **2005**, *17*, 21–34. [[CrossRef](#)]
24. Bali, A.S.; Sidhu, G.P.S.; Kumar, V. Root exudates ameliorate cadmium tolerance in plants: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *18*, 1243–1275. [[CrossRef](#)]
25. Salt, D.E.; Prince, R.C.; Pickering, I.J.; Raskin, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 1427–1433. [[CrossRef](#)]
26. Liu, P.; Yan, X.; Yang, X.; Yang, Y.; Zhang, H.; Cui, H.; Wang, Z. Different roles of tobacco glandular and non-glandular trichomes in response to cadmium stress. *J. Agric. Sci. Technol.* **2019**, *21*, 55–60.
27. Thomine, S.; Wang, R.; Ward, J.M.; Crawford, N.M.; Schroeder, J.I. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4991–4996. [[CrossRef](#)]
28. Luo, J.S.; Huang, J.; Zeng, D.L.; Peng, J.S.; Zhang, G.B.; Ma, H.L.; Guan, Y.; Yi, H.Y.; Fu, Y.L.; Han, B.; et al. A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Clemens, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **2006**, *88*, 1707–1719. [[CrossRef](#)]
30. Ahmad, J.; Ali, A.A.; Baig, M.A.; Iqbal, M.; Haq, I.; Qureshi, M.I. Role of phytochelatins in cadmium stress tolerance in plants. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 185–212. [[CrossRef](#)]
31. Bano, C.; Amist, N.; Singh, N.B. Role of polyamines in plants abiotic stress tolerance: Advances and future prospects. In *Plant Life Under Changing Environment*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 481–496. [[CrossRef](#)]
32. Ma, Q.; Cao, X.; Tan, X.; Si, L.; Wu, L. Effects of cadmium stress on pakchoi (*Brassica chinensis* L.) growth and uptake of inorganic and organic nitrogenous compounds. *Environ. Exp. Bot.* **2017**, *137*, 49–57. [[CrossRef](#)]
33. Ma, H.; Li, X.; Wei, M.; Zeng, G.; Hou, S.; Li, D.; Xu, H. Elucidation of the mechanisms into effects of organic acids on soil fertility, cadmium speciation and ecotoxicity in contaminated soil. *Chemosphere* **2020**, *239*, 124706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Sidhu, G.P.S.; Bali, A.S.; Bhardwaj, R. Role of organic acids in mitigating cadmium toxicity in plants. In *Cadmium Tolerance in Plants*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 255–279. [[CrossRef](#)]
35. Li, C.; Liu, Y.; Tian, J.; Zhu, Y.; Fan, J. Changes in sucrose metabolism in maize varieties with different cadmium sensitivities under cadmium stress. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0243835. [[CrossRef](#)]
36. Shanying, H.E.; Xiaoe, Y.A.; Zhenli, H.E.; Baligar, V.C. Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: A review. *Pedosphere* **2017**, *27*, 421–438. [[CrossRef](#)]
37. Hageman, R.H.; Hucklesby, D.P. [45] Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.* **1971**, *23*, 491–503. [[CrossRef](#)]
38. Kempers, A.J. Determination of sub-microquantities of ammonium and nitrates in soils with phenol, sodiumnitroprusside and hypochlorite. *Geoderma* **1974**, *12*, 201–206. [[CrossRef](#)]
39. Groat, R.G.; Vance, C.P. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.): Developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiol.* **1981**, *67*, 1198–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Lillo, C. Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiol. Plant.* **1984**, *61*, 214–218. [[CrossRef](#)]
41. Singh, R.D.; Srivastava, H.S. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* **1986**, *66*, 413–416. [[CrossRef](#)]
42. Kanamori, T.; Konishi, S.; Takahashi, E. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. *Physiol. Plant.* **1972**, *26*, 1–6. [[CrossRef](#)]
43. Alfosea-Simón, M.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Camara-Zapata, J.M.; Martínez-Nicolás, J.J.; Simón, I.; Simón-Grao, S.; García-Sánchez, F. Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, 10950. [[CrossRef](#)]
44. Flores, H.E.; Galston, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* **1982**, *69*, 701–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Cohen, S.S. *Guide to the Polyamines*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1998.
46. Tiburcio, A.F.; Kaur-Sawhney, R.; Galston, A.W. Polyamine metabolism. *Biochem. Plants* **1990**, *16*, 283–325.
47. Liu, J.H.; Kitashiba, H.; Wang, J.; Ban, Y.; Moriguchi, T. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol.* **2007**, *24*, 117–126. [[CrossRef](#)]
48. Groppa, M.D.; Benavides, M.P. Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids* **2008**, *34*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kuznetsov, V.V.; Shevyakova, N.I. Polyamines and plant adaptation to saline environments. In *Desert Plants*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 261–298. [[CrossRef](#)]
50. Rady, M.M.; Hemida, K.A. Modulation of cadmium toxicity and enhancing cadmium-tolerance in wheat seedlings by exogenous application of polyamines. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *119*, 178–185. [[CrossRef](#)]
51. Rady, M.M.; El-Yazal, M.A.S.; Taie, H.A.; Ahmed, S.M. Response of wheat growth and productivity to exogenous polyamines under lead stress. *J. Crop. Sci. Biotechnol.* **2016**, *19*, 363–371. [[CrossRef](#)]

52. Rady, M.M.; El-Yazal, M.A.S.; Taie, H.A.A.; Ahmed, S.M. Response of *Triticum aestivum* (L.) plants grown under cadmium stress to polyamines pretreatments. *Plant* **2016**, *4*, 29–36. [[CrossRef](#)]
53. Lovaas, E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv. Pharmacol.* **1996**, *38*, 119–149. [[CrossRef](#)]
54. Bouchereau, A.; Aziz, A.; Larher, F.; Martin-Tanguy, J. Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Sci.* **1999**, *140*, 103–125. [[CrossRef](#)]
55. Walters, D.R. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 97–107. [[CrossRef](#)]
56. Paul, S.; Banerjee, A.; Roychoudhury, A. Role of polyamines in mediating antioxidant defense and epigenetic regulation in plants exposed to heavy metal toxicity. In *Plants under Metal and Metalloid Stress*; Springer: Singapore, 2018; pp. 229–247. [[CrossRef](#)]
57. Yang, H.Y.; Shi, G.X.; Li, W.L.; Wu, W.L. Exogenous spermidine enhances *Hydrocharis dubia* cadmium tolerance. *Russ. J. Plant Physiol.* **2013**, *60*, 770–775. [[CrossRef](#)]
58. Taie, H.A.; El-Yazal, M.A.S.; Ahmed, S.M.; Rady, M.M. Polyamines modulate growth, antioxidant activity, and genomic DNA in heavy metal-stressed wheat plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 22338–22350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Sánchez-Rodríguez, E.; Romero, L.; Ruiz, J.M. Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. *J. Plant Physiol.* **2016**, *190*, 72–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Wang, Y.; Ye, X.; Yang, K.; Shi, Z.; Wang, N.; Yang, L.; Chen, J. Characterization, expression, and functional analysis of polyamine oxidases and their role in selenium-induced hydrogen peroxide production in *Brassica rapa*. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 4082–4093. [[CrossRef](#)]
61. Spormann, S.; Soares, C.; Teixeira, J.; Fidalgo, F. Polyamines as key regulatory players in plants under metal stress—A way for an enhanced tolerance. *Ann. Appl. Biol.* **2021**, *178*, 209–226. [[CrossRef](#)]
62. Romero, F.M.; Maiale, S.J.; Rossi, F.R.; Marina, M.; Ruíz, O.A.; Garriz, A. Polyamine metabolism responses to biotic and abiotic stress. *Polyamines* **2018**, *1694*, 37–49. [[CrossRef](#)]
63. Wuddineh, W.; Minocha, R.; Minocha, S.C. Polyamines in the context of metabolic networks. *Polyamines* **2018**, *1694*, 1–23. [[CrossRef](#)]
64. Feng, J.; Shi, Q.; Wang, X.; Wei, M.; Yang, F.; Xu, H. Silicon supplementation ameliorated the inhibition of photosynthesis and nitrate metabolism by cadmium (Cd) toxicity in *Cucumis sativus* L. *Sci. Hortic.* **2010**, *123*, 521–530. [[CrossRef](#)]
65. Shahid, M.A.; Balal, R.M.; Khan, N.; Zotarelli, L.; Liu, G.D.; Sarkhosh, A.; Fernandez-Zapata, J.C.; Nicolas, J.J.M.; Garcia-Sanchez, F. Selenium impedes cadmium and arsenic toxicity in potato by modulating carbohydrate and nitrogen metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *180*, 588–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Hussain, S.; Khaliq, A.; Noor, M.A.; Tanveer, M.; Hussain, H.A.; Hussain, S.; Shah, T.; Mehmood, T. Metal toxicity and nitrogen metabolism in plants: An overview. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil*; Springer: Singapore, 2020; pp. 221–248. [[CrossRef](#)]
67. Guo, H.; Hong, C.; Chen, X.; Xu, Y.; Liu, Y.; Jiang, D.; Zheng, B. Different growth and physiological responses to cadmium of the three *Miscanthus* species. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153475. [[CrossRef](#)]
68. Sanayama, Y.; Nagasaka, H.; Takayanagi, M.; Ohura, T.; Sakamoto, O.; Ito, T.; Ishige-Wada, M.; Usui, H.; Yoshino, M.; Ohtake, A.; et al. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *103*, 220–225. [[CrossRef](#)]

- 69.** Zemanová, V.; Pavlík, M.; Pavlíková, D. Cadmium toxicity induced contrasting patterns of concentrations of free sarcosine, specific amino acids and selected microelements in two *Noccaea* species. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177963. [[CrossRef](#)]
- 70.** Qiu, X.M.; Sun, Y.Y.; Ye, X.Y.; Li, Z.G. Signaling Role of Glutamate in Plants. *Front. Plant Sci.* **2020**, *10*, 1743. [[CrossRef](#)]
- 71.** Sharma, A.; Shahzad, B.; Rehman, A.; Bhardwaj, R.; Landi, M.; Zheng, B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* **2019**, *24*, 2452. [[CrossRef](#)]
- 72.** Neysanian, M.; Iranbakhsh, A.; Ahmadvand, R.; Oraghi Ardebili, Z.; Ebadi, M. Comparative efficacy of selenate and selenium nanoparticles for improving growth, productivity, fruit quality, and postharvest longevity through modifying nutrition, metabolism, and gene expression in tomato; potential benefits and risk assessment. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0244207. [[CrossRef](#)]
- 73.** Abedi, S.; Iranbakhsh, A.; Oraghi Ardebili, Z.; Ebadi, M. Nitric oxide and selenium nanoparticles confer changes in growth, metabolism, antioxidant machinery, gene expression, and flowering in chicory (*Cichorium intybus* L.): Potential benefits and risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 3136–3148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



11.3. PUBLICACIÓN 3

Application of Biocat G, Selenium, and Chitosan to Counteract the Negative Effects of Cd in Broccoli Plants Grown in Soilless Culture

Rafael Pérez-Millán, Jose Maria Cámara-Zapata, Juan Carlos Fernández-Zapata, Silvia Simón-Grao, Marina Alfosea-Simón, Ernesto Alejandro Zavala-González, Muhammad Adnan Shahid and Francisco García-Sánchez

Agronomy 2022, 12, 1327.

Factor de impacto: 3,949 Q1 (2021) (Categoría Agronomy y Plant Science)

Application of Biocat G, Selenium, and Chitosan to Counteract the Negative Effects of Cd in Broccoli Plants Grown in Soilless Culture

Rafael Pérez-Millán¹, Jose Maria Cámara-Zapata², Juan Carlos Fernández-Zapata², Silvia Simón-Grao³, Marina Alfosea-Simón³, Ernesto Alejandro Zavala-González³, Muhammad Adnan Shahid^{4*} and Francisco García-Sánchez³

1 Atlántica Agrícola S.L., 03400 Villena, Spain; rperez@atlanticaagricola.com (R.P.-M.); ezavala@atlanticaagricola.com (E.A.Z.-G.)

2 Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, 03312 Orihuela, Spain; jm.camara@umh.es (J.M.C.-Z.); jc.fernandez@umh.es (J.C.F.-Z.)

3 Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 30100 Murcia, Spain; ssimon@cebas.csic.es (S.S.-G.); msimon@cebas.csic.es (M.A.-S.); fgs@cebas.csic.es (F.G.-S.)

4 Department of Horticultural Sciences Department, UF/IFAS, North Florida Research and Education Center, University of Florida, Gainesville, FL 32351, USA

* Correspondence: mshahid@ufl.edu; Tel.: +1-850-8757150

Abstract: The accumulation of cadmium in plants produces phytotoxic damage and a decrease in crop yield. To avoid this effect, it is necessary to prevent its absorption by roots and reduce its toxicity in plant tissues. The current study was aimed to evaluate the effect of the exogenous applications of Biocat G (fulvic/humic acids), selenium (Se), and chitosan to roots and leaves of broccoli plants exposed to Cd stress. The applied treatments were: (i) T1: Hoagland nutrient solution (NS), (ii) T2: NS + Cd at 3 mg L⁻¹ (NS + Cd), (iii) T3: NS + Cd + root application of Biocat G (NS + Cd + BioG), (iv) T4: NS + Cd + foliar application of Se (NS + Cd + Se1), (v) T5: NS + Cd + root application of Se (NS + Cd + Se2), (vi) T6: NS + Cd + foliar application of chitosan (NS + Cd + chitosan1), and (vii) T7: NS + Cd + root application of chitosan (NS +

Cd + chitosan²). The results showed that the exogenous application of Biocat G and Se (T3 and T5) ameliorated the adverse effects caused by Cd toxicity and significantly improved plant growth rate by decreasing Cd toxicity; besides, Biocat G was able to limit the transport of Cd from the leaves to the inflorescences, reducing the content of Cd in the edible part. These treatments (T3 and T5) yielded the best results, act on the plants by deactivating Cd toxicity, but they did not affect its accumulation in the plant tissue. In addition, Biocat G limits the transport of Cd from the non-edible to the edible part.

Keywords: *Brassica oleracea* L.; heavy metal toxicity; humic and fulvic acids; selenium; chitosan

1. Introduction

The environmental contamination due to cadmium (Cd) has drastically increased in nature as a result of the increase in industrial activity in the last two centuries, which has progressively affected different ecosystems, including the agrarian sector [1]. This element is a heavy metal without any biological function, and is toxic in low concentrations [2]. It is the only metal whose toxic concentration is lower in humans than in plants, with a toxicity threshold between 3 and 30 mg kg⁻¹ dry weight [3], which can result in some of the following negative effects: (i) it interferes in the entry, transport and use of essential element such as Ca, Mg, P, and K [4–6]; (ii) it reduces the activity of ATPase in the plasma membrane, altering its biological functions [7,8]; (iii) it reduces the net assimilation of CO₂ as the concentration of chlorophylls and carotenoids decrease, it inactivates the enzymes involved in the Calvin cycle, damages photosystems I and II, and alters the control of stomatal opening [9–11]; (iv) it alters nitrogen metabolism, due to the reduction in the absorption and transport of nitrates, and the inhibition of the nitrate reductase enzyme [12]; (v) it damages genes and alters the expression of proteins [13]; and (vi) it inhibits the plant's response to oxidative stress [1], etc. All these alterations cause an inhibition of growth, loss of production, and low quality of the harvest of crops, and in severe cases, the death of the plants. The Cd in the rhizosphere can be found dissolved in water, adsorbed to the organic and mineral fraction, forming part of the structure of minerals, either precipitated with other rhizosphere compounds, incorporated into biological structures, or both (Figure 1) [3,13]. In plants, its availability depends on numerous physical, chemical, and biological factors such as [14,15]: (i) pH, (ii) redox potential, (iii) mineral state of the soil, and (iv) organic matter content. EFSA has established a tolerable weekly intake (TWI) of Cd of 2.5 µg kg⁻¹ of body weight, which is the maximum amount of cadmium that a person can ingest weekly throughout their lives without manifesting adverse effects. Furthermore, the maximum content of Cd in leaf crops is 0.20 mg kg⁻¹ fresh weight (EFSA).

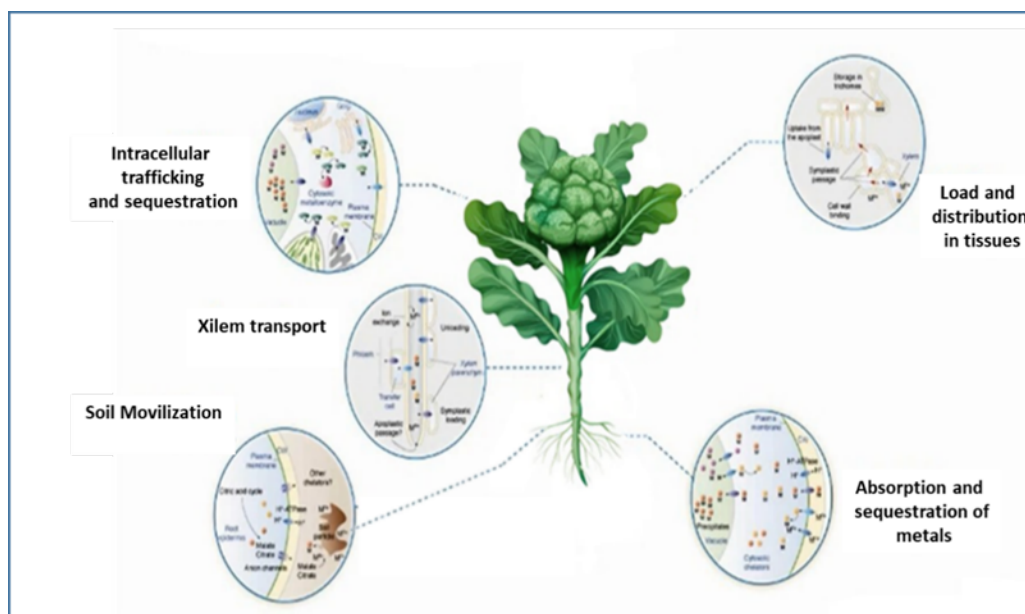


Figure 1. Dynamics of cadmium in broccoli plants according to the bibliography consulted

Biostimulants are agrochemical products that are applied to crops, helping them to overcome adverse climate and rhizosphere effects, such as high temperatures, salinity, boron toxicity, floods, drought, and heavy metals, among others [16]. For their formulation, it is necessary to obtain scientific knowledge related to how plants behave against stresses (physiological, biochemical, metabolic, etc.), what active materials can be used to palliate the negative effects of a specific stress, how these primary materials can be combined with each other in the formulation of the products, and how these must be applied to the crops (dose and frequency). As for the products destined to palliate the negative effects of Cd, primary materials are sought that are able to block the entry of this element in plants, and decrease its toxicity in plant tissues [16,17]. Taking advantage of Cd chemistry, we look for primary materials that are able to form complexes with Cd, such as OMCd compounds (OM = organic molecule), that can inhibit its absorption through the roots, as well as limit its reactivity in plant tissues. These organic molecules must contain a great quantity of hydroxide groups (-OH) that act as points of attachment of Cd with the organic molecule, to inactivate its mobility and reactivity [17].

Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) belongs to the *Cruciferous* family, which includes more than 300 genera and 3000 species belonging to temperate or cold regions of the northern hemisphere. The term *Brassica*, its genus, is the Latin name for cabbages. Its origin seems to be located in Eastern Mediterranean countries, more specifically in the Middle East (Anatolian peninsula, Lebanon, Syria, etc.). Its production and consumption began to generally increase

less than 20 years ago [18]. As of today, it is grown in many European countries and the United States. Broccoli provides many health benefits through its inflorescences (edible part), as they contain compounds such as indole-3-carbinol, sulforaphane, flavonoids, and vitamins A, B, and C. Furthermore, its high fiber content and 0% fat makes it an ideal food for weight-loss diets [19].

The contamination of water and soil by heavy metals due to anthropic and natural means is drastically affecting food safety and public health [20]. Recent studies have provided evidence on the presence of heavy metals and metalloids, such as mercury (Hg), arsenic (As), lead (Pb), cadmium (Cd), zinc (Zn), nickel (Ni), and chromium (Cr), in vegetables [21]. Broccoli can retain the toxic elements found in soil, water, substrate, or fertilizers, due to its manner of growth and its high level of nutrient absorption [22]. Broccoli has been reported to be quite tolerant to different metals including Cd [23], although it can uptake and accumulate it in its tissues very easily. The main problem comes when this metal reaches the edible part (inflorescence) [16], as it can be consumed by humans, resulting in toxicity problems. Cd accumulates in broccoli tissues in the following order: root < stem < inflorescence < leaves, with the highest percentage of accumulation mainly in leaves (50% of leaves in inflorescence). This Cd accumulation in tissue decreases the productivity of the foliar biomass and affects the quality parameters of the crop.

The application of some biostimulant substances (organic matter, selenium, and chitosan) reduces the toxic effect of heavy metals, such as Cd, on plants. The formulated products based on organic matter (humic or fulvic acids) contain carboxylic acids and phenolic groups. These compounds have the ability to immobilize metal ions, such as Cd, forming stable complexes that reduce their phytoavailability in soil [24]. Selenium (Se) is a metalloid that, when applied at low doses, is capable of activating the oxidative response of plants, which can reduce the toxicity of Cd and improve crop yields [25]. Eventually, chitosan is a precursor of chitin that activates the defense mechanisms of plants, this way, in crops with Cd toxicity, it reduces the response to stress and improves the development and yield of crops [24,26,27].

The method of application of these biostimulant substances, their effects, and their mode of action in broccoli plants is not clear. Therefore, the objective of this essay is to study the effect produced by the application on soil of Biocat G (granulated product with a mixture of humic and fulvic acids), and root and foliar applications of Se and chitosan in broccoli plants grown with high concentrations of Cd. The hypothesis that these products could limit the absorption of Cd by the root and its toxicity in plant tissue by forming –OH or Se complexes with Cd is evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Growing Conditions and Plant Material

This study was conducted on broccoli plants, obtained from a nursery (Semilleros BabyPlant, Santomera, Murcia, Spain). The seedlings from the nursery were transplanted to a soilless system with rock wool (Grodan Classic Forte, Almeria, Spain) in a greenhouse. Rock wool is an inert substrate that is commonly utilized in soilless cropping systems, and is composed of 60% diabase, 20% coke, and 20% limestone. This mix of components, when properly treated, results in very fine fibers that are 0.005 mm in width, innocuous, and free of pathogens. Once transplanted, the broccoli plants were watered with nutrient solution, which was applied with self-compensating drippers at a rate of 2 L h⁻¹, with a volume of solution that was sufficient for a drainage of 15% in each irrigation event. During the emergence phase, a 50% Hoagland nutrient solution was utilized. The complete Hoagland solution (100%) was composed, for 100 L of water, of 54 g KNO₃, 84 g Ca(NO₃)₂, 14 g KH₂PO₄, 25 g MgSO₄, 2 g Fe, and 2 g (equivalent in mM: 14 N, P 1, K 6.30, Ca 4, Mg 1, S 1) of a micronutrient mix, and was used after this phenological phase. pH was adjusted to 6.5 with NaOH. As the plants grew, the percentage of Hoagland solution and the irrigation volume was increased, according to the nutritional and water demands of the crop. The cultivation of the crop took place in a multi-tunnel greenhouse in the CEBAS experimental plot “La Matanza”, located in Santomera (18 km from Murcia, Spain; 38°6′26.83” N; 1°2′8.57” W). To control the temperature, a “Cooling-System” refrigeration unit was utilized, along with an aluminum shading net (30%). The greenhouse also included a system of radiation, temperature, and relative humidity sensors placed 1.5 m above the ground. During the experimental period, the inside of the greenhouse had the following climatic conditions: photoperiod of 10–12 h with a PAR of sunny light between 1000–1200 μmol m⁻² s⁻¹, air temperatura (day/night) of 23/15 °C, and relative humidity (day/night) of 60/80%. All the data were collected periodically, and were stored in a database for later analysis. The experiment took place between 1 October 2020 when the seedlings were transplanted and 1 January 2021 when the plants were harvested. Cd and product treatments were started two weeks after transplanting. To combat pests, chromatic traps were placed throughout the greenhouse, and different insecticides, fungicides, and acaricides were applied to the leaves as needed.

2.2. Treatment with an Excess of Cd and Active Materials to Mitigate Its Toxicity

After two weeks of acclimatization to the greenhouse conditions, the broccoli plants were divided into two groups. One of them was watered with Hoagland nutrient solution without Cd (NS), and another with Hoagland solution which contained Cd (NS + Cd), applied in the form of CdSO₄·8H₂O, with a final Cd concentration of 3 mg L⁻¹ (considered as a high toxicity level according [28], recommended maximum concentration 0.01 mg L⁻¹). The group of plants treated with Cd was also divided into 6 sub-groups, according to the different treatments:

- (i) T1: NS, without the application of products (NS)
- (ii) T2: NS + Cd at 3 mg/L⁻¹, without the application of products (NS + Cd)
- (iii) T3: NS + Cd + root application of Biocat G (NS + Cd + BioG). Biocat G (fulvic/humic acids) from Atlántica Agrícola S.A., with dose of 4 g plant⁻¹ applied manually in solid form on the substrate, around the stem. Biocat G is a granulated bio-activator that is highly soluble in soil, whose formulation includes specific amino acids, N-K, fulvic acids, polysaccharides, and organic material that is immediately available after it is applied to the rhizosphere.
- (iv) T4: NS + Cd + foliar application of Se (NS + Cd + Se1) in the form of Na₂SeO₄ at a concentration of 10 μM [25]
- (v) T5: NS + Cd + root application of Se (NS + Cd + Se2) in the form of Na₂SeO₄ at a concentration of 10 μM [25]
- (vi) T6: NS + Cd + foliar application of chitosan (NS + Cd + chitosan1), acquired from Sigma-Aldrich (chitosan hydrochloride, degree of deacetylation 87.4%, molecular weight 200–800 kDa), at a concentration of 0.5 g L⁻¹ in water, according to previous experiments.
- (vii) T7: NS + Cd + root application of chitosan (NS + Cd + chitosan2), acquired from Sigma-Aldrich (chitosan hydrochloride, degree of deacetylation 87.4%, molecular weight 200–800 kDa) at a concentration of 1.0 g L⁻¹ in water, according to previous experiments.

In the solutions prepared for the foliar application of the treatments, the pH was adjusted to values between 5.5 and 6.0, and a surfactant (Tween-20 at 0.1%) was added to improve the adherence of the pulverized solution. The foliar applications were performed every two weeks. Deionized water was utilized for the treatments that did not receive a foliar application. The root applications were performed every two weeks, by manually adding the product with 500 mL of Hoagland nutrient solution (EC = 2 dS m⁻¹, pH = 6.5).

For each treatment, 12 broccoli plants were utilized, distributed into four growing bags (3 plants per bag), and placed randomly in the area where the experiment was set up. Biocat G was applied one time only to start Cd treatment, and Se and chitosan via foliar and root were applied every two weeks (days 0, 15, and 30 after starting Cd treatment).

2.3. Analytical Parameters Analyzed

2.3.1. Growth Parameters and Phytotoxicity

At the end of the experiment (45 days after starting Cd treatment), the height of the plants (cm) was measured, as well as the diameter of the stem. After these measurements, each of the broccoli plants were harvesting, separately and the inflorescences, leaves, and stems were weighed. Afterwards, these were washed with deionized water, and dried in an oven at 60 °C

for at least 48 h. Afterwards, they were weighed once again, and ground into a fine powder for their later analysis in the lab. Using these values, the dry weight was calculated for each tissue (inflorescence, leaves, and stem), and the relative water content of the shoot was calculated (RWC, %) as: $(\text{fresh weight, g, Fw} - \text{dry weight, g Dw}) / \text{dry weight, g Dw} \times 100$. Dry and fresh weight was determined with a digital balance Sartorius (Sartorius digital scale; Sartorius, Madrid, Spain). Phytotoxicity symptoms were evaluated by comparing the visual symptoms of plants treated with Cd and plants without Cd taken pictures at the end of the experiment.

2.3.2. Percentage of Reduction of the Total Shoot and Level of Tolerance

To determine the level of tolerance of the broccoli plants to Cd excess as a function of the Cd treatment, the percentage of reduction of the total dry biomass of the shoot (leaves + stem + inflorescence) of the plants grown under these conditions was calculated with respect to those grown under control conditions. The relationship between the percentage of reduction of the total aerial part (AP) with the degree of tolerance was the following: very tolerant ($<-20\%$), tolerant (-20% to 10%), semi-tolerant (11% – 30%), sensitive (31% – 50%), and very sensitive (51% – 100%) (classification defined by the experience of the authors).

2.3.3. Relative Chlorophylls Content

At the end of the experiment, relative chlorophylls content was measured in all the plants with a portable CL-01 device (Hansatech) in SPAD units (soil plant analysis development), which is proportional to the amount of chlorophyll present in the leaf. It is a non-destructive measurement method and is based on the indirect measurement of leaf chlorophyll content in red (650 nm) and early infrared (940 nm) light (Minolta Camera Co., 1989) [25]. The measurements were made at the central margin of each leaf in old leaves (OL), middle-aged leaves (ML), and young leaves (YL).

2.3.4. Mineral Analysis of the Plant Samples

The dry and ground plant tissues (50 mg) from each broccoli plants were used to analyze the concentration of Cd and Se in leaf tissues (non-edible), as well as the inflorescence (edible) in each plant. These elements were determined with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, TN, USA), after digestion with $\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{O}_2$ (5:3 in volume), using a microwave (CERM Mars Xpress, Matthews, NC, USA) with a temperature ramp up to $200\text{ }^\circ\text{C}$ [29].

2.4. Evaluation of Risk for Human Health

For this study, the estimated daily intake, EDI ($\text{mg (kg BW day)}^{-1}$) of Cd, the target hazard quotient (THQ), and the carcinogenic risk (CR) factor were calculated for adults and children. The EDI was calculated according to Fan et al. [30]: $\text{EDI (mg (kg BW day)}^{-1}) = ((\text{Ccd} \times$

$AB)/(BW))/103$, where C_{cd} is the concentration of Cd in the inflorescence (mg kg^{-1}), AB is the quantity of broccoli consumed each day (g day^{-1}) by adults [31] and children, according to the proposal by dos Santos et al. [32]. BW is the mean body weight of the population, 70 and 30 kg, for adults and children, respectively [32].

The non-cancer risk assessment index (the target hazard quotient) was calculated according to Yaacob et al. [33]: $THQ = EDI/ORD$, where ORD is the oral reference dose ($\text{mg kg}^{-1} \text{BW day}^{-1}$). In the case of Cd, ORD is defined as $0.001 \text{ mg kg}^{-1} \text{BW day}^{-1}$ [34]. The carcinogenic risk (CR) factor was calculated according to dos Santos (2021) [32]: $CR = ((EF \times ED \times C_{cd} \times AB \times SF)/(BW \times AT))/103$, where EF is the exposure frequency ($365 \text{ days year}^{-1}$), ED is the exposure time, considered 70 years for adults and 14 years for children [32], SF is the oral contaminant safety factor, which for Cd is defined as $6.1 \text{ kg BW day mg}^{-1}$ [34,35]. AT is the average time for carcinogens ($365 \text{ days year}^{-1} \times ED$).

2.5. Experimental Design and Statistical Analysis

The experimental design was unifactorial entirely randomized, in which were assayed on broccoli plants one control treatment (T1) grown under conditions without Cd and six different treatments (T2, T3, T4, T5, T6, and T7) grown under an excess of Cd (3 mg L^{-1}). There was a total 28 experimental units (7 treatments \times 4 replications) in the experiment. Each experimental unit contained three plants in each bag. A total of 12 broccoli plants were utilized distributed into four independent bags that were randomly placed in the area where the experiments took place. The statistical analysis included an analysis of variance (ANOVA), performed with the SPSS version 24 statistical package. The values shown for each treatment are arithmetic means of 4 repetitions ($n = 4$), considering each repetition as the three plants placed in each growing bag. When the ANOVA was significant ($p < 0.05$), Tukey's multiple range test ($p \leq 0.05$) was applied to separate the means. The application of all the parametric tests was carried out after verifying the normality of the data (Shapiro–Wilk test) and assumptions of equal variance.

3. Results

3.1. Growth Parameters

The growth of the broccoli plants was affected by the excess of Cd in the nutrient solution (T2) at the end of the experiment relative to control plants (T1) as shown in Tables 1 and 2. The Cd toxicity in the nutrient solution (T2) reduced height, stem diameter, leaf surface area, and dry weight of leaf, stem, and inflorescence relative to T1 plants, although only the reduction of the inflorescence was significant with a reduction of 50%.

Table 1. Height, stem diameter, and leaf surface measured at the end of the experiment of the broccoli plants grown under Cd toxicity conditions and treated with different active materials to mitigate this toxicity (T1: NS, T2: NS + Cd, T3: NS + Cd + BioG, T4: NS + Cd + Se1, T5: NS + Cd + Se2, T6: NS + Cd + chitosan1, and T7: NS + Cd + chitosan2).

Treatments		Height (cm)	Stem Diameter (mm)	Leaf Surface Area (cm ²)
NS	T1	15.29 ± 1.68	6.64 ± 0.57 ab	306.6 ± 76.6 bc
	T2	13.83 ± 2.30	6.13 ± 0.55 b	259.0 ± 40.2 c
NS + Cd	T3	14.92 ± 1.42	7.22 ± 0.59 a	454.3 ± 38 a
	T4	14.50 ± 1.68	6.42 ± 0.80 ab	286.3 ± 56.1 bc
	T5	15.20 ± 1.59	6.86 ± 0.73 ab	334.8 ± 54.1 b
	T6	15.35 ± 1.28	6.64 ± 0.47 ab	297.6 ± 44.8 bc
	T7	15.35 ± 2.32	6.41 ± 0.77 b	271.9 ± 42.6 bc
ANOVA		ns	**	***

In the ANOVA: “ns” indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; on their part, ** and *** indicate significant differences at $p < 0.01$ and 0.001 , respectively. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.05$ established by Tukey’s multiple range test ($n = 4$). Results accompanied by standard deviation.

Table 2. Growth parameters: dry biomass of the leaves, stems, and inflorescences, and the relative water content of the shoot (RWC) obtained at the end of the experiments with plants grown under Cd toxicity conditions and treated with different active materials to mitigate this toxicity (T1: NS, T2: NS + Cd, T3: NS + Cd + BioG, T4: NS + Cd + Se1, T5: NS + Cd + Se2, T6: NS + Cd + chitosan1, and T7: NS + Cd + chitosan2).

Treatments		Leaves (g Dw)	Stem (g Dw)	Inflorescence (g Dw)	RWC Shoot (%)
NS	T1	6.47 ± 1.89 b	1.37 ± 0.56	1.89 ± 0.96 ab	86 ± 0.79 a
	T2	5.43 ± 0.72 b	1.16 ± 0.37	0.97 ± 0.51 c	86 ± 1.01 a
NS + Cd	T3	9.28 ± 1.82 a	1.76 ± 0.43	2.24 ± 0.75 a	85 ± 1.57 ab
	T4	6.26 ± 1.76 b	1.46 ± 0.68	1.30 ± 0.71 bc	85 ± 1.32 ab
	T5	7.11 ± 2.09 b	1.55 ± 0.56	1.40 ± 0.61 bc	84 ± 2.12 ab
	T6	6.05 ± 0.85 b	1.52 ± 0.37	1.17 ± 0.38 bc	85 ± 0.45 ab
	T7	5.43 ± 1.30 b	1.33 ± 0.35	1.45 ± 0.67 abc	85 ± 0.89 b
ANOVA		***	ns	***	*

In the ANOVA: “ns” indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; on their part, * and *** indicate significant differences at $p < 0.01$ and 0.001 , respectively. The different lowercase letters indicate significant differences between the treatments for $p < 0.05$ established by Tukey’s multiple range test ($n = 4$). Results accompanied by standard deviation.

Relative to products applied in plants suffering Cd toxicity, the plants treated with them (Biocat G, Se, and chitosan) obtained values that were similar or higher than those from the control treatment without Cd (T1). Thus, Biocat G (T3) and Se applied via roots (T5) had higher growth parameters than those plants under control conditions without Cd (Tables 1 and 2). Biocat G via root, significantly increased the leaf surface area and leaf biomass, and inflorescence biomass by 48% and 43%, respectively, with respect to the values obtained in the T1 treatment. The Se applied through the root significantly increased the values of stem diameter, leaf area, and biomass by 3%, 8%, and 9%, respectively, as compared to those obtained in the T1 treatment, although not significant. Therefore, these treatments reversed the damage caused by Cd in the T2 plants.

3.2. Percentage of Reduction and Degree of Tolerance

Cd toxicity negatively affected the shoot growth of the broccoli plants. Due to its toxicity, the growth of shoot plants was reduced by 22% in T2 vs. T1 (Figure 2). Therefore, according to our classification of Cd tolerance, broccoli behaves as a semi-tolerant crop against Cd toxicity. Nevertheless, it was observed that the different products utilized (Biocat G, Se, and chitosan) increased this tolerance, with the following findings especially relevant: Biocat G increased the growth of shoot under Cd toxicity conditions, resulting in the broccoli plants being defined as “very tolerant”; Se via root improved the growth of the aerial part under Cd toxicity conditions, although not significant, thus these plants behaved as “tolerant” plants. Therefore, we can conclude that the best treatments were the root application of Biocat G.

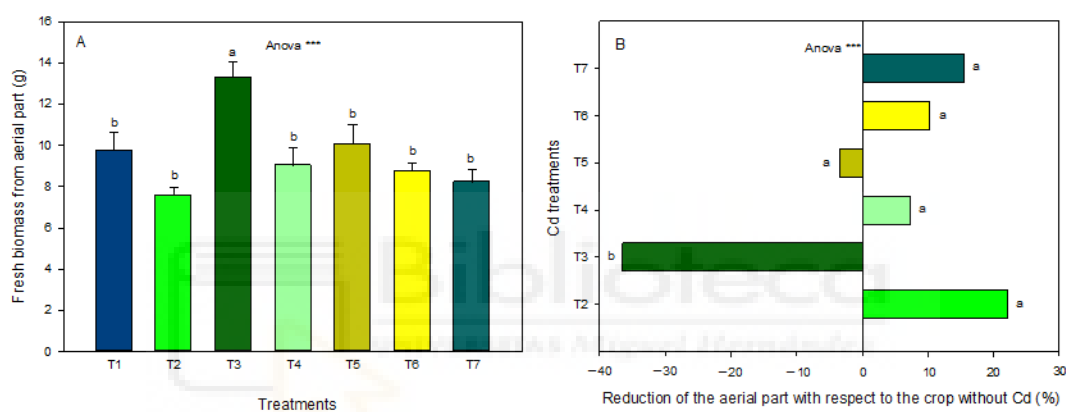


Figure 2. (A) Biomass of shoot (g Dw); and (B) percentage of reduction of this part with respect to T1 (NS) of plants grown under Cd toxicity conditions and treated with different active materials to mitigate this toxicity (T2: NS + Cd, T3: NS + Cd + BioG, T4: NS + Cd + Se1, T5: NS + Cd + Se2, T6: NS + Cd + chitosan1, and T7: NS + Cd + chitosan2). In the ANOVA: *** indicates significant differences at $p < 0.001$. When the ANOVA was significant, Tukey’s multiple range test was utilized to separate the means, where the different lower-case letters indicate significant differences between treatments. The vertical bars indicate the standard error of the mean ($n = 4$).

3.3. Phytotoxicity Symptoms and Relative Chlorophylls Content

Under Cd toxicity conditions without the application of products (T2), the broccoli plants obtained SPAD values that were similar to control plants without Cd for the three types of leaves measured, young, middle-aged, and old. The latter had a lower value than the other two (Table 3). As for the SPAD units in the rest of the treatments, a strong influence was observed according to the type of product applied (Table 3 and Figure 3). Biocat G application significantly increased the SPAD unit values in older leaves by 8.6-fold with respect to the values observed in the plants from the T2 treatment. Se, independently from the way in which it was applied (foliar or root), increased the values of the SPAD units in the old leaves 1.5 times with respect to the values observed in the plants from the +Cd/SP treatment, although this increase was not significant; chitosan, independently from the way in which it was applied, did

not affect the SPAD units in any type of leaf. However, in these chitosan-applicate plants, phytotoxicity symptoms were observed in the middleaged leaves and the stem, this phytotoxicity being more severe in the plants that received chitosan foliarly.

Table 3. Relative chlorophylls content measured in old leaves (OL), middle-aged leaves (ML), and young leaves (YL) of broccoli plants grown under Cd toxicity conditions and treated with different active materials to mitigate this toxicity (T1: NS, T2: NS + Cd, T3: NS + Cd + BioG, T4: NS + Cd + Se1, T5: NS + Cd + Se2, T6: NS + Cd + chitosan1, and T7: NS + Cd + chitosan2).

Treatments		Chl OL (SPAD)	Chl ML (SPAD)	Chl YL (SPAD)
NS	T1	15.6 ± 8.9 b	58.8 ± 16.8 ab	50.2 ± 10.5
	T2	17.7 ± 8.2 b	51.7 ± 18.7 ab	39.1 ± 13.7
	T3	77.7 ± 22.2 a	73.6 ± 26.1 a	52.8 ± 18.2
NS + Cd	T4	22.4 ± 12.7 b	50.1 ± 22.7 ab	46.3 ± 12.1
	T5	24.0 ± 18.6 b	52.0 ± 14.8 ab	52.1 ± 14.1
	T6	14.2 ± 7.1 b	49.1 ± 16.5 b	48.1 ± 16.5
	T7	14.6 ± 7.3 b	55.5 ± 15.8 ab	55.7 ± 16.2
ANOVA		***	*	ns

In the ANOVA: “ns” indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; on their part, * and *** indicate significant differences at $p < 0.05$ and 0.001 , respectively. When the ANOVA was significant, Tukey’s multiple range test was utilized to separate the means, where the different lower-case letters indicate significant differences between treatments ($n = 4$). Results accompanied by standard deviation.



Figure 3. Toxicity symptoms in broccoli plants grown under Cd toxicity conditions and treated with different active materials to mitigate this toxicity (T1: NS, T2: NS + Cd, T3: NS + Cd + BioG, T4: NS + Cd + Se1, T5: NS + Cd + Se2, T6: NS + Cd + chitosan1, and T7: NS + Cd + chitosan2) at the end of the experiment. Chlorosis and phytotoxicities produced either by Cd toxicity, active materials, or in combination.

3.4. Concentration of Cd and Se in Leaves and Inflorescences

The concentration of Cd in the aerial part increased due to the use of Hoagland nutrient solution (NS) containing 3 mg L⁻¹ of Cd. The plants watered with NS without Cd (-Cd/SP) had concentrations of this metal lower than 1.00 mg kg⁻¹, in the leaf tissue as well as the inflorescence. The plants watered with an excess of Cd had mean values around 6.03 and 8.17 mg kg⁻¹ in the leaves and inflorescences, respectively (Table 4), with the greater accumulation of Cd in the edible part of the plant. Leaf and inflorescence Se concentration increased with the T4 and T5 treatment, being this increase higher in T5 plants with Se root application.

Table 4. Concentration of Cd and Se quantified at the end of the experiment in leaf tissues (nonedible) and in the inflorescences (edible tissue) of broccoli plants grown under Cd toxicity conditions and treated with different active materials to mitigate this toxicity (T1: NS, T2: NS + Cd, T3: NS + Cd + BioG, T4: NS + Cd + Se1, T5: NS + Cd + Se2, T6: NS + Cd + chitosan1, and T7: NS + Cd + chitosan2). *n.q.* sample no presence in analysis results.

Treatments	Leaf Tissues (Non-Edible)		Inflorescences (Edible Tissue)		
	Cd (mg kg ⁻¹)	Se (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Se (mg kg ⁻¹)	
NS	T1	<1.00 c	0.57 c	<1.00 d	<0.01 c
NS + Cd	T2	5.90 b	0.53 c	8.15 b	<0.01 c
	T3	8.65 a	<i>n.q.</i>	4.64 c	<i>n.q.</i>
	T4	6.19 b	1.62 b	11.34 a	0.33 b
	T5	5.40 b	3.30 a	9.32 ab	2.09 a
	T6	5.05 b	<i>n.q.</i>	7.45 b	<i>n.q.</i>
	T7	4.98 b	<i>n.q.</i>	8.10 b	<i>n.q.</i>
ANOVA		***	***	***	***

In the ANOVA: “*ns*” indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; on their part, and *** indicate significant differences at $p < 0.05$ and 0.001, respectively. When the ANOVA was significant, Tukey’s multiple range test was utilized to separate the means, where the different lower-case letters indicate significant differences between treatments ($n = 4$). Results accompanied by standard deviation.

3.5. Study on the Risk to Human Health (EDI-THQ)

The results of the study on risk to human health are shown in Table 5. In all the cases, as expected, the indices were higher for children than for adults. The treatment with Biocat G reduced the EDI value for adults by 40%, and for children by 44% relative to T2. On the contrary, the Se treatments, both foliar and root, considerably increased the value of EDI, while the treatment with chitosan did not affect the EDI value. The THQ values in the edible part of broccoli with Cd in the nutrient solution, without additional treatments, were 1.05 for adults and 1.63 for children. The treatment with Biocat G reduced these values by 43 and 45%, respectively, thus in both cases, the values decreased to less than 1 (0.60 and 0.93 for adults and children, respectively). The response of the THQ values to the rest of the treatments was similar to those found when analyzing the EDI, although in this case, the foliar treatment with

chitosan slightly reduced the THQ (9% for both adults and children). On their part, the results found when analyzing the carcinogenic risk, showed the same trend, with ORD values oscillating between 3.6×10^{-3} and 1.38×10^{-2} .

Table 5. Values of EDI ($\text{mg (kg BW day)}^{-1}$), THQ, and ORD indexes, according to the Cd concentration in the inflorescence for plants grown in the presence of Cd with different treatments (T2: NS + Cd, T3: NS + Cd + BioG, T4: NS + Cd + Se1, T5: NS + Cd + Se2, T6: NS + Cd + chitosan1, and T7: NS + Cd + chitosan2).

Active Material	EDI ($\text{mg (kg BW day)}^{-1}$)		THQ (-)		ORD (-)	
	Adults	Children	Adults	Children	Adults	Children
T2	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ a	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ ab	1.05 ± 0.14 ab	1.63 ± 0.22 a	$(6.4 \pm 0.9) \times 10^{-3}$ ab	$(9.9 \pm 1.3) \times 10^{-3}$ ab
T3	$(0.6 \pm 0.01) \times 10^{-3}$ b	$(0.9 \pm 0.01) \times 10^{-3}$ c	0.60 ± 0.02 c	0.93 ± 0.03 c	$(3.6 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ c	$(5.7 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ c
T4	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ a	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ a	1.46 ± 0.09 a	2.27 ± 0.15 a	$(8.9 \pm 0.6) \times 10^{-3}$ a	$(13.8 \pm 0.9) \times 10^{-3}$ a
T5	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ a	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ a	1.20 ± 0.05 a	1.86 ± 0.08 a	$(7.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ a	$(11.4 \pm 0.5) \times 10^{-3}$ a
T6	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ a	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ ab	0.96 ± 0.13 ab	1.49 ± 0.21 ab	$(5.8 \pm 0.8) \times 10^{-3}$ ab	$(9.1 \pm 1.3) \times 10^{-3}$ ab
T7	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ a	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ ab	1.04 ± 0.11 ab	1.62 ± 0.18 a	$(6.4 \pm 0.7) \times 10^{-3}$ ab	$(9.9 \pm 1.1) \times 10^{-3}$ ab
ANOVA	**	***	***	***	***	***

In the ANOVA: “ns” indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; on their part, ** and *** indicate significant differences at $p < 0.01$ and 0.001 , respectively. When the ANOVA was significant, Tukey’s multiple range test was utilized to separate the means, where the different lower-case letters indicate significant differences between treatments ($n = 4$). Results accompanied by standard deviation.

4. Discussion

Cadmium (Cd), aside from being a heavy metal without any biological functions in plants, is toxic in leaves at low concentrations. It can reach crops due to the use of water and sludge, used for irrigation and fertilizers, coming from urban and industrial water treatment plants, and organic materials from different industries. Thus, growers are forced to adopt specific measures to impede its accumulation in the edible part of plants, especially in broccoli plants, as this crop has a great capacity to extract nutrients and heavy metals from the rhizosphere [36,37]. In fact, among all the heavy metals, Cd is accumulated more easily in these plants, followed by Zn and Pb [32]. The great challenge of companies that produce biostimulants is the formulation of products that can reduce the uptake of Cd through the plant roots, to impede its accumulation in the edible part of the crops, and to deactivate its toxicity in plant tissues. Our assay of the five strategies utilized to reduce the absorption and the negative effects of Cd toxicity showed that the best ones were the application of Biocat G (fulvic/humic acids) and the application of Se, both via root, as these were able to mitigate Cd toxicity (Tables 1, 2, and 4). In addition, Biocat G reduced Cd concentration in the edible part of the plants; although the leaves from the broccoli plants under this treatment accumulated the most Cd, the transport from leaves to inflorescence was reduced as reported by low Cd concentration in this tissue (Table 4). Cadmium in plants can negatively affect different process, such as seed germination, plant growth and development, and yield and fruit quality, and this is due to toxicity of Cd in plants negatively affecting multifactorial levels, such as decrease nutrient uptake, cause oxidative damage, injure the photosynthetic system, affect synthesis of amino acids and proteins, and impair water abortion [38]. In our experiment, broccoli plants showed a high sensibility to Cd toxicity respect to inflorescence growth as this part of the plants was reduced by 49%.

Additionally, this could have been due to it accumulating a high Cd concentration in this tissue, even more than in the leaves. Rizwan et al. (2019) [39] reported that *Brassica* species are tolerant to Cd toxicity via different mechanisms, including the stimulation of the antioxidant defense system, chelation, compartmentation of Cd into metabolically inactive parts, and accumulation of total amino-acids and osmoprotectants. However, high Cd accumulation and growth reduction in the inflorescence tissue by the presence of Cd in the water irrigation result in it being necessary to practice strategies to reduce this issue to avoid production and harvest quality loss. Thus, the application of Biocat G via root provided the best results, as it stimulated the growth of the plant, increasing the dry weight and leaf surface area not only relative to the Cd treatment (T2), but also the control treatment (T1), in which the plants were irrigated without any Cd (Table 1, Figure 1). Additionally, this occurred despite the Cd concentration in the leaves being greater (+46%) compared to those plants from the rest of the treatments (Table 4). This indicates that the benefits of this product are due to its ability to inactivate Cd toxicity in plants, instead of restricting its absorption. Furthermore, another benefit of this product is that it limited the accumulation of Cd in the edible part (inflorescences), reducing it by 43% compared to the rest of the treatments (Table 4). The great accumulation of Cd in this treatment, along with its low reactivity or toxicity, could be explained because the Biocat G product is formulated with a high concentration of organic acids, among them fulvic and humic acids. These are low molecular weight acids that can form soluble complexes with metals, reducing their reactivity [40,41]. When these complexes are absorbed by the plants, they can be stored in plant tissues as organic complex with a low phytotoxicity, or as inactive compounds [40,42,43], therefore, although the concentration of Cd in broccoli increases, the plants do not suffer damage due to phytotoxicity. In these plants, the inflorescences had a lower concentration of Cd, and the entry of Cd into the phloem and its transport from the leaves to the inflorescence could have been limited, although the causes for this remain unknown. The formation of organic compounds with Cd immobile in the phloem, or changes in phloem pH, could be the causes for this result [43].

Selenium is a beneficial element for the growth, development, performance, and resistance against diseases in a wide variety of plant species, and it has also been shown that it can improve the tolerance of plants against Cd toxicity [44]. In our experiment with broccoli plants, it was also observed that the root application of Se had more beneficial effects than its foliar application. These effects are due to the greater accumulation of Se when it is applied to the roots as compared to through the leaves, thus this greater concentration of Se could be more efficient when decreasing Cd toxicity. In plants of *Pfaffia glomerata* (Spreng.), it was observed that the application of Se, along with Cd, reduced the presence of Cd in the different plant tissues, and decreased Cd toxicity when activating the antioxidant system of the plant through

the increase of the activities of superoxide dismutase and guaiacol peroxidase [45]. In an experiment conducted with pepper plants, Perez-Millan et al. [23] also indicated that the application of Se had positive effects when the plants were irrigated with Cd-containing water, and these effects were more beneficial when Se was applied to the roots, as the concentration and toxicity of Cd decreased. Therefore, Se can increase the concentration of glutathione, proline, and phytochelatins in the plant, the latter being a substance that complexes Cd and sequesters it into vacuoles decreasing its toxicity [46]. Relative to chitosan treatments (via foliar, T6, or root, T7), these did not change the response pattern to Cd toxicity relative to plants coming from T2 treatment (Cd without product application). In another experiment, Zong et al. (2017a,b) [27,47] reported that foliar application of chitosan (molecular weight of 1 kDa) showed decreased Cd concentration in shoots of edible rapeseed. The authors indicated this was due to chitosan having the ability to form complexes with non-nutrient elemental ions including a number of heavy metals due to presence of functional amino and hydroxyl group. The different response between our experiment and Zong's experiment could be due to the molecular weight used being different. Thus, for every crop, growth condition, and Cd concentration in the nutrient solution, it is necessary to select the optimum molecular weight of chitosan. Regulation (CE) N. 1881/2006 of the European Commission from 19 December 2006, which determines the maximum content of specific contaminants in food products, established, for Cd, a maximum concentration of $0.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Dw}$ in vegetables after washing and separation of the edible part, and an estimated daily intake (EDI) of $0.001 \text{ mg (kg BW day)}^{-1}$. In our assay, the concentration of Cd in the edible part oscillated between 4.64 and 1.34 mg kg^{-1} , thus it was higher than that recommended by the European Commission (EFSA) [20]. Therefore, the daily intake, expressed as mg kg^{-1} body weight per day, for both adults and children, was higher than the EDI (Table 5). However, in the case of the treatment with Biocat G, the EDI value was below $0.001 \text{ mg (kg BW day)}^{-1}$. The THQ values lower than one are indicators of food safety, and represent a potential risk for health when higher than one [34]. When analyzing the results obtained, we found that the treatment with Biocat G was the only one that eliminated the potential risk to health due to the presence of Cd, for both adults and children. In the present study, the carcinogenic risk (CR), as a function of long-term exposure to Cd contamination in adult individuals, oscillated between $3.6\text{--}8.9 \times 10^{-3}$ and $1.14\text{--}9.9 \times 10^{-3}$ for adults and children, respectively. These values were higher than the threshold value of 1.0×10^{-6} and lower than unacceptable values of 1.0×10^{-4} [48]. CR values equal to 10^{-6} and 10^{-4} are equivalent to a case of cancer per every 1,000,000 and 10,000 individuals, respectively [41], with the worst treatment being foliar application of Se (T4), even exceeding the treatment without any application of active materials to the plants.

5. Conclusions

Irrigation with water that contains a Cd concentration of 3 mg/L decreased the inflorescence growth of Broccoli plants and highly increased the accumulation of this metal, both in the edible and inedible parts of the plant, exceeding the risk indices to human health for both adults and children (EDI, CR). Among the strategies utilized to mitigate Cd toxicity, the best ones were the applications of Biocat G (fulvic/humic acids) and Se, both applied via roots. Relative to health index ORD, this index indicates that the use of water containing 3 mg L⁻¹ of Cd makes growing broccoli unfeasible at the toxicological level for all application products. Lastly, it is important to highlight that the foliar application of Se must be avoided, as it can increase Cd toxicity, as indicated by the high accumulation of Cd and the high ORD values found in the present study. In future experiments it will be studied if beneficial effects of Biocat G (fulvic/humic acids) and Se, both via foliar, is due to these products acting on the plants by deactivating Cd toxicity, but they did not affect its accumulation in the plant tissue.

Author Contributions: Conceptualization, R.P.-M. and M.A.-S.; methodology, R.P.-M., J.M.C.-Z., S.S.-G., and M.A.-S.; validation, J.C.F.-Z., M.A.S., and E.A.Z.-G. formal analysis, J.C.F.-Z., M.A.S., and S.S.-G.; investigation, R.P.-M., S.S.-G., and M.A.S.; resources, E.A.Z.-G.; data curation, F.G.-S.; writing—original draft preparation, F.G.-S. and E.A.Z.-G.; writing—review and editing, R.P.-M. and S.S.-G.; visualization, J.M.C.-Z.; supervision, F.G.-S. and M.A.S.; project administration, F.G.-S.; funding acquisition, F.G.-S. and E.A.Z.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors want to thank the company ATLANTICA AGRICOLA S.L. for providing us technical support and materials used in the experiments.

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

References

1. Rai, P.K.; Lee, S.S.; Zhang, M.; Tsang, Y.F.; Kim, K.-H. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environ. Int.* **2019**, *125*, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>.
2. Friberg, L. *Cadmium in the Environment*; CRC Press: 2018. Stockholm, Sweden. <https://doi.org/10.1201/9781351070379>.
3. Solís-Domínguez, F.; González-Chávez, M.C.; Carrillo-González, R.; Rodríguez-Vázquez, R. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a

- hydroponic system. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *141*, 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.014>.
4. Khan, A.; Khan, S.; Khan, M.A.; Qamar, Z.; Waqas, M. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 13772–13799. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4881-0>.
5. Khan, A.; Khan, S.; Alam, M.; Khan, M.A.; Aamir, M.; Qamar, Z.; Rehman, Z.U.; Perveen, S. Toxic metal interactions affect the bioaccumulation and dietary intake of macro- and micro-nutrients. *Chemosphere* **2016**, *146*, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.014>.
6. Li, X.; Zhou, Q.; Sun, X.; Ren, W. Effects of cadmium on uptake and translocation of nutrient elements in different welsh onion (*Allium fistulosum* L.) cultivars. *Food Chem.* **2016**, *194*, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.114>.
7. Astolfi, S.; Zuchi, S.; Passera, C. Effect of cadmium on H⁺ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Sci.* **2005**, *169*, 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.03.025>.
8. Sandalio, L.; Dalurzo, H.; Gómez, M.; Romero-Puertas, M.; del Río, L. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 2115–2126. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2115>.
9. Parmar, P.; Kumari, N.; Sharma, V. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Bot. Stud.* **2013**, *54*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-45>.
10. Xue, Z.-C.; Gao, H.-Y.; Zhang, L.-T. Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. *Biol. Plant.* **2013**, *57*, 587–590. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0318-0>.
11. Chang, Y.-S.; Lin, C.-T.; Lee, M.-C.; Wu, C.-W.; Lai, Y.-H. Nitrogen fertilization promotes the phytoremediation of cadmium in *Pentas lanceolata*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2013**, *85*, 709–714. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.021>.
12. Sánchez-Pardo, B.; Carpena, R.O.; Zornoza, P. Cadmium in white lupin nodules: Impact on nitrogen and carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* **2013**, *170*, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.10.001>.
13. Irfan, M.; Hayat, S.; Ahmad, A.; Alyemeni, M.N. Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *20*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.004>.
14. Quezada-Hinojosa, R.; Föllmi, K.B.; Gillet, F.; Matera, V. Cadmium accumulation in six common plant species associated with soils containing high geogenic cadmium concentrations at Le Gurnigel, Swiss Jura Mountains. *CATENA* **2015**, *124*, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.09.007>.
15. Li, H.; Luo, N.; Li, Y.W.; Cai, Q.Y.; Mo, C.H.; Wong, M.H. Cadmium in rice: Transport mechanisms, influencing factors, and minimizing measures. *Environ. Pollut.* **2017**, *224*, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.087>.
16. Bulgari, R.; Franzoni, G.; Ferrante, A. Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* **2019**, *9*, 306. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>.
17. Wu, J.; Song, Q.; Zhou, J.; Wu, Y.; Liu, X.; Liu, J.; Zhou, L.; Wu, Z.; Wu, W. Cadmium threshold for acidic and multi-metal contaminated soil according to *Oryza sativa* L. Cadmium accumulation: Influential factors and prediction model. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *208*, 111420. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111420>.

18. Branca, F.; Cartea, E. Brassica. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 17–36. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14871-2_2.
19. Le, T.N.; Chiu, C.-H.; Hsieh, P.-C. Bioactive Compounds and Bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* Sprouts and Microgreens: An Updated Overview from a Nutraceutical Perspective. *Plants* **2020**, *9*, 946. <https://doi.org/10.3390/plants9080946>.
20. European Food Safety Authority (EFSA). Available online. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/metals-contaminantsfood> (accessed on 4 October 2021).
21. Chabukdhara, M.; Sanjay, K.; Gupta, Arvind, K.N. Heavy Metal Accumulation in Crops: Status, Sources, Risks, and Man-agement Strategies. In book *Field Practices for Wastewater Use in Agriculture 2021*, Apple Academic Press. 9781003034506.
22. Bakhshayesh, B.E.; Delkash, M.; Scholz, M. Response of Vegetables to Cadmium-Enriched Soil. *Water* **2014**, *6*, 1246–1256. <https://doi.org/10.3390/w6051246>.
23. Pedrero, Z.; Madrid, Y.; Hartikainen, H.; Cámara, C. Protective Effect of Selenium in Broccoli (*Brassica oleracea*) Plants Subjected to Cadmium Exposure. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *56*, 266–271. <https://doi.org/10.1021/jf072266w>.
24. Zhou, T.; Wu, L.; Luo, Y.; Christie, P. Effects of organic matter fraction and compositional changes on distribution of cadmium and zinc in long-term polluted paddy soils. *Environ. Pollut.* **2018**, *232*, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.081>.
25. Perez-Millan, R.; Alfosea-Simon, M.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Camara-Zapata, J.M.; Martinez-Nicolas, J.J.; Lidon, V.; Simon, I.; Shahid, M.A.; Garcia-Sanchez, F.; Simon-Grao, S. The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions. *Agronomy* **2021**, *11*, 1905. <https://doi.org/10.3390/agronomy11101905>.
26. Faizan, M.; Rajput, V.; Al-Khuraif, A.; Arshad, M.; Minkina, T.; Sushkova, S.; Yu, F. Effect of Foliar Fertilization of Chitosan Nanoparticles on Cadmium Accumulation and Toxicity in *Solanum lycopersicum*. *Biology* **2021**, *10*, 666. <https://doi.org/10.3390/biology10070666>.
27. Zong, H.; Liu, S.; Xing, R.; Chen, X.; Li, P. Protective effect of chitosan on photosynthesis and antioxidative defense system in edible rape (*Brassica rapa* L.) in the presence of cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2017**, *138*, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.009>.
28. FAO. *Water Quality for Agriculture, FAO Irrigation and Drainage Paper No. 29*; FAO: Rome, Italy, 1985.
29. Alfosea-Simón, M.; Simón-Grao, S.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Cámara-Zapata, J.M.; Simón, I.; Martínez-Nicolás, J.J.; Lidón, V.; García-Sánchez, F. Physiological, Nutritional and Metabolomic Responses of Tomato Plants After the Foliar Application of Amino Acids Aspartic Acid, Glutamic Acid and Alanine. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, 2138. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581234>.
30. Fan, Y.; Li, Y.; Li, H.; Cheng, F. Evaluating heavy metal accumulation and potential risks in soil-plant systems applied with magnesium slag-based fertilizer. *Chemosphere* **2018**, *197*, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.055>.
31. Zheng, S.; Wang, Q.; Yuan, Y.; Sun, W. Human health risk assessment of heavy metals in soil and food crops in the Pearl River Delta urban agglomeration of China. *Food Chem.* **2020**, *316*, 126213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126213>.
32. dos Santos, C.A.; Sobrinho, N.M.B.D.A.; Gonçalves, R.G.D.M.; Costa, T.G.A.; Carmo, M.G.F.D. Toxic Metals in Broccoli by Combined Use of Acidity Correctives and Poultry Litter Under Mountain Tropical Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2021**, *80*, 507–518. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00817-3>.

33. Yaacob, A.; Yap, C.K.; Nulit, R.; Omar, H.; Al-Shami, S.A.; Bakhtiari, A.R. Assessment of health risks of the toxic Cd and Pb between leafy and fruit vegetables collected from selected farming areas of Peninsular Malaysia. *Integr. Food, Nutr. Metab.* **2018**, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.15761/ifnm.1000215>.
34. Cao, L.; Lin, C.; Gao, Y.; Sun, C.; Xu, L.; Zheng, L.; Zhang, Z. Health risk assessment of trace elements exposure through the soil-plant (maize)-human contamination pathway near a petrochemical industry complex, Northeast China. *Environ. Pollut.* **2020**, *263*, 114414. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114414>.
35. Mohammadi, A.A.; Zarei, A.; Majidi, S.; Ghaderpoury, A.; Hashempour, Y.; Saghi, M.H.; Alinejad, A.; Yousefi, M.; Hosseingholizadeh, N.; Ghaderpoori, M. Carcinogenic and non-carcinogenic health risk assessment of heavy metals in drinking water of Khorramabad, Iran. *MethodsX* **2019**, *6*, 1642–1651. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.07.017>.
36. Melo, R.D.C. A cultura dos brócolis. Embrapa Hortaliças-Col Criar Plantar 2015, ABC 500P/500R Saber (INFOTECA-E).
37. Mourato, M.P.; Moreira, I.N.; Leitão, I.; Pinto, F.R.; Sales, J.R.; Martins, L.L. Effect of Heavy Metals in Plants of the Genus *Brassica*. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 17975–17998. <https://doi.org/10.3390/ijms160817975>.
38. Haider, F.U.; Liqun, C.; Coulter, J.A.; Cheema, S.A.; Wu, J.; Zhang, R.; Wenjun, M.; Farooq, M. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *211*, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>.
39. Rizwan, M.; Ali, S.; Rehman, M.Z.U.; Rinklebe, J.; Tsang, D.; Bashir, A.; Maqbool, A.; Tack, F.M.G.; Ok, Y.S. Cadmium phytoremediation potential of *Brassica* crop species: A review. *Sci. Total Environ.* **2018**, *631–632*, 1175–1191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.104>.
40. Silva, J.A.M.F.; Sobrinho, N.M.B.D.A.; García, A.C.; Pandolfo, C.M.; da Veiga, M. Mitigation of Heavy Metal Contamination in Soil via Successive Pig Slurry Application. *Soil Sediment Contam. Int. J.* **2017**, *26*, 675–690. <https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1403415>.
41. De Sousa, F.F.; Carmo, M.G.F.D.; Lima, E.S.A.; Souza, C.D.C.B.D.; Sobrinho, N.M.B.D.A. Lead and Cadmium Transfer Factors and the Contamination of Tomato Fruits (*Solanum lycopersicum*) in a Tropical Mountain Agroecosystem. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2020**, *105*, 325–331. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02930-w>.
42. Bolan, N.; Kunhikrishnan, A.; Thangarajan, R.; Kumpiene, J.; Park, J.; Makino, T.; Kirkham, M.B.; Scheckel, K. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils—To mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* **2014**, *266*, 141–166. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>.
43. Shahid, M.; Pinelli, E.; Dumat, C. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *219–220*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.060>.
44. Thiruvengadam, M.; Chung, I.-M. Selenium, putrescine, and cadmium influence health-promoting phytochemicals and molecular-level effects on turnip (*Brassica rapa* ssp.). *Food Chem.* **2015**, *173*, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.012>.
45. Pereira, A.S.; Dorneles, A.O.S.; Bernardy, K.; Sasso, V.M.; Bernardy, D.; Possebom, G.; Rossato, L.V.; Dressler, V.L.; Tabaldi, L.A. Selenium and silicon reduce cadmium uptake and mitigate cadmium toxicity in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen plants by activation antioxidant enzyme system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 18548–18558. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2005-3>.
46. Huang, B.; Xin, J.; Dai, H.; Zhou, W. Effects of Interaction between Cadmium (Cd) and Selenium (Se) on Grain Yield and Cd and Se Accumulation in a Hybrid Rice (*Oryza sativa*) System. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 9537–9546. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03316>.

47. Zong, H.; Li, K.; Liu, S.; Song, L.; Xing, R.; Chen, X.; Li, P. Improvement in cadmium tolerance of edible rape (*Brassica rapa* L.) with exogenous application of chitooligosaccharide. *Chemosphere* **2017**, *181*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.024>.

48. Shaheen, N.; Ahmed, K.; Islam, S.; Mamun, H.A.; Tukun, A.B.; Rahim, A.T.M. Health risk assessment of trace elements via dietary intake of ‘non-piscine protein source’ foodstuffs (meat, milk and egg) in Bangladesh. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 7794–7806. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6013-2>.



