

Effects of Pb⁺² on three populations of *Zygophyllum fabago*: Genotoxicity study

Efectos del Pb⁺² en tres poblaciones de *Zygophyllum fabago*: estudio de genotoxicidad

A. López-Orenes^{*1}, S. Silva², C. Santos², M.A. Ferrer¹, A.A. Calderón¹

¹Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Spain.

²Department of Biology and CESAM, Laboratory of Biotechnology and Cytomics, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

Abstract

Zygophyllum fabago is a succulent perennial shrub that is able to tolerate harsh environmental conditions prevailing in the southeastern Spain, where mine tailing ponds are scattered throughout the Sierra de Cartagena. However, despite being a pioneer species in the study area and produce a substantial amount of viable seeds, the rate of soil cover by this species in mine tailing ponds is low, probably because of adverse conditions in the area, especially high content of heavy metals. The main objective of this work is to assess the impact of applying a high lead concentration to *Z. fabago* plants from three different populations in the level of stress endured by the plants. Two genotoxicity assays (the comet assay and the micronucleus test) were carried out in order to evaluate the DNA damage induced by the heavy metal. Our results show that lead toxicity affects differently each population. This may be due to the different adaptation mechanisms developed to survive in any environment.

Keywords: lead; comet assay; micronuclei.

Resumen

Zygophyllum fabago es un arbusto perenne que es capaz de tolerar las duras condiciones ambientales prevalentes en el sudeste español, donde se localizan las balsas de estériles mineros que se encuentran dispersas por la Sierra de Cartagena. Sin embargo, a pesar de ser una especie pionera en estas balsas y de producir una considerable cantidad de semillas viables, la tasa de cobertura del suelo por esta especie en las balsas de estériles mineros es baja, debido a las condiciones adversas de la zona, sobre todo por los altos contenidos en metales pesados. El objetivo principal de este trabajo es evaluar el nivel de estrés soportado al aplicar plomo a plantas de *Z. fabago* procedentes de tres poblaciones distintas. El estudio se centra en determinar los daños de ADN debido a la presencia del metal pesado mediante los ensayos cometa y de micronúcleos. Los resultados obtenidos muestran que la toxicidad por plomo se manifiesta de forma diferente dependiendo de la población considerada, lo que sugiere que cada población pone en juego diferentes mecanismos de adaptación para sobrevivir a las condiciones específicas de cada entorno.

Palabras clave: plomo; cometas; micronúcleos.

* E-mail: antonio.orenes@upct.es

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales del suelo es un problema en todo el mundo debido a los impactos ecológicos, ambientales y sobre la salud humana, además de que el aumento de los metales pesados en el medio junto con su elevada persistencia, favorecen su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. En concreto, el Pb es conocido por afectar negativamente a algunos criterios de valoración del desarrollo de las plantas como la tasa de germinación, el crecimiento y la masa seca de raíces y brotes. La mayor parte del Pb absorbido se encuentra en las raíces con sólo una pequeña fracción que es trasladada a los brotes.

Zygophyllum fabago L. es un arbusto perenne de la familia Zygophyllaceae. *Z. fabago* surge como un colonizador precoz de zonas alteradas en el sudeste de España, incluyendo suelos afectados por la actividad minera y, en muchos casos, altamente contaminados con Pb [1,2]. Por tanto es una especie prometedora para la restauración de las zonas contaminadas por metales, a pesar de que los mecanismos implicados en la tolerancia sean todavía en gran parte desconocidos. Este carácter pionero pone de relieve la importancia de la especie para el establecimiento de las denominadas "islas de vegetación" en zonas contaminadas, mejorando las condiciones del suelo y permitiendo la colonización posterior por otras especies de plantas [3]. Numerosos estudios han puesto de manifiesto las diferencias entre poblaciones metalíferas y no metalíferas de especies vegetales, y que las poblaciones de plantas pueden evolucionar en respuesta a las condiciones ambientales.

Los ensayos de cometas y de micronúcleos son técnicas muy útiles para estudiar la genotoxicidad de los metales pesados, ya que sirven para detectar daños en el ADN y se ha demostrado que estos metales (entre los que se incluye el Pb) causan efectos genotóxicos en exposiciones, relativamente, cortas [4].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Se obtuvieron semillas de *Z. fabago* procedentes de tres poblaciones, dos procedentes de sendas balsas de estériles mineros, denominadas "Agustín" y "Mercader", y otra población de una zona cercana degradada, todas ellas pertenecientes al Distrito Minero de Cartagena-La Unión (SE España). Las plantas se germinaron y cultivaron en semillero con perlita y se regaron con Hoagland (1/4) suplementado con 2 concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0 y 20 μM) durante 4 semanas. Las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de 16/8 h con 25/20 °C temperatura de día/noche, con una densidad de flujo de fotones de 470 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Después de 4 semanas de tratamiento, las raíces se lavaron durante 10 min en 0,5 mM CaSO_4 , y a continuación con agua destilada, se secaron con papel de filtro y, se dividieron las muestras en raíces y hojas.

2.2 Ensayo cometa

El ensayo de cometa se realizó según Gichner et al. 2004 [4], con ligeras modificaciones. Las hojas y raíces se cortaron en tampón frío Tris 0,4 M (pH 7,5), y los núcleos aislados se recogieron en el tampón. Se realizó una mezcla de 50 μL de la suspensión de núcleos y 50 μL de 1% de agarosa de bajo punto de fusión, y dicha mezcla se extendió sobre cada portaobjetos, el cual tenía agarosa de punto de fusión normal 1%. Los portaobjetos se sumergieron en un tampón alcalino (NaOH 0,30 M y EDTA 1 mM, pH > 13) para desenrollar el ADN (15 min) y la electroforesis a 0,74 V/cm y 300 mA durante 25 min a 4 °C. Las láminas fueron neutralizadas con tampón de 0,4 M Tris (pH 7,5) y se lavaron con agua. Los núcleos se tiñeron con bromuro de etidio y se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) equipado con un filtro de excitación de 510 a 560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Las imágenes fueron capturadas con NIS Elements F 3.00, software SP7. La clasificación de los cometas se realizó según Avishai et al 2003 [5].

2.3 Micronúcleos (MNi)

Se obtuvieron tejidos meristemáticos de las raíces de plantas de *Z. fabago* y se tiñeron con yoduro de propidio. Se observaron las preparaciones a 400x utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) con un filtro de excitación de 510-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se siguieron los criterios de Fenech (2007) [6] para la identificación de MNi.

2.4 Análisis estadísticos

Los datos se presentan como la media de tres muestras de cada zona, con un mínimo de cuatro repeticiones por muestra. Todo los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS (versión 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos muestran un aumento general de daño del ADN en hojas y raíces de *Z. fabago* expuestas a Pb. En la Figura 1 se muestra la clasificación de los cometas [5] utilizada para la realización de la Tabla 1, donde se puede ver los valores numéricos que expresan ese incremento en el daño producido. La degradación del ADN inducida por Pb fue evidente por el ensayo cometa, en ambas partes, hojas y raíces expuestas a Pb. Así, además, encontramos diferencias entre los órganos hojas y raíces, donde el daño fue más acusado en las raíces debido seguramente al estar este órgano en contacto directo con el Pb y servir de barrera para el paso al resto de la planta, por lo que es de prever que el daño sea mayor en este órgano que en el resto de la plántula. Además se pudieron observar claras diferencias entre las diferentes poblaciones, las plantas pertenecientes a la balsa minera "Mercader" sufrieron menos daño del ADN, por lo tanto tendrían mecanismos de protección al daño ocasionado por el Pb, para impedir su degradación. A su vez, las plantas de la balsa de "Agustín" también se comportaron de la misma manera que las de "Mercader", pero con un menor grado de protección o mayor grado de degradación respecto a las plantas de "Mercader" (Tabla 1). Aunque algunos autores [7] señalan que el ensayo cometa no es un buen método para la monitorización de la genotoxicidad *in situ* en ambientes contaminados, en nuestro trabajo debido a las condiciones de cultivo y cómo se ha desarrollado el experimento, con dosis bajas de Pb, hemos podido comprobar que el ensayo cometa se puede aplicar con éxito para detectar daños en el ADN, incluso con una dosis baja de exposición, si se toma el cuidado apropiado. Por otro lado, no se encontró, a pesar del elevado número de células analizadas, la presencia de ningún MNi, por lo que la toxicidad de Pb en las raíces de estas poblaciones de *Z. fabago* no fue muy acusada.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los niveles de plomo afectan significativamente a la degradación de núcleos de las células de hojas y raíces de plántulas de *Z. fabago*. Además se puede observar que dependiendo de la población de partida los resultados son diferentes, siendo la población denominada Control más susceptible al plomo que las de "Agustín" y "Mercader", y a su vez, "Agustín" más que "Mercader", lo que conduce a verificar la hipótesis de partida de la diferenciación poblacional en la especie dependiendo de las condiciones presentes en el entorno. Esto podría deberse a una adaptación genética desarrollada por la planta para hacer frente a las condiciones ambientales presentes en las balsas de estériles mineros. Por tanto, implantando protocolos de revegetación con semillas o plantas procedentes de balsas de estériles mineros los resultados podrían ser muy esperanzadores, ya que las plántulas procedentes de parentales del pantano presentan mayor resistencia. Para ello, habría que evitar el primer paso de germinación y desarrollo de los primeros estadios de la plántula en las condiciones de los pantanos, con lo que las probabilidades de éxito del establecimiento y posterior desarrollo y colonización de las zonas degradadas serían mucho mayores.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MECD (beca FPU AP2012/02559). Parte del trabajo se ha realizado en la Universidad de Aveiro (Portugal) gracias a la concesión de una ayuda para la movilidad del MECD (EST13/00414).

6. REFERENCIAS

- [1] Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., Willis, A.J. (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41, 219–228.
- [2] Conesa, H.M., Faz, A. Arnaldos, R. (2006). Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailing of the semiarid Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Sci. Total Environ.* 366: 1-11.
- [3] Párraga-Aguado, I., Álvarez-Rogel, J., González-Alcaraz, M.N., Jiménez-Cárceles, F.J., Conesa, H.M., (2013a). Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. *Ecol. Eng.* 58,84–90.
- [4] Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., and Demnerová, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat. Res.* 559, 49-57.
- [5] Avishai, N., Rabinowitz, C., and Rinkevich, B. (2003). Use of the Comet Assay for Studying Environmental Genotoxicity Comparisons Between Visual and Image Analyses. *Environ. Molecular Mutagenesis* 42,155-165.
- [6] Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084-1104.
- [7] Gichner, T., Znidar, I., Szakova, J. (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by Lead in tobacco plants. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 652,186-190.

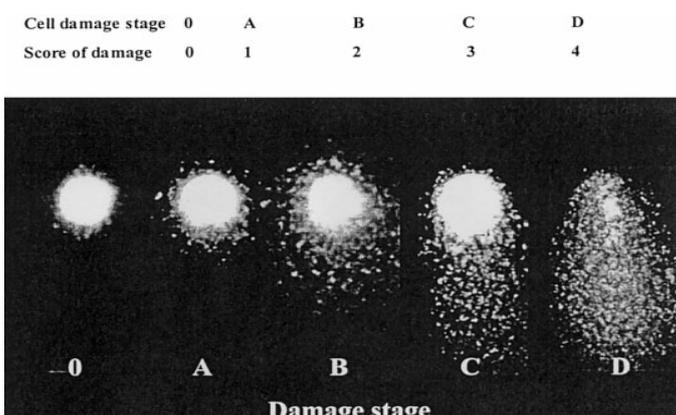


Figura 1. Diferentes estados de los núcleos según un menor o mayor daño del ADN [5].

Tabla 1. Clasificación de núcleos y formación de micronúcleos (MNi)

	Pb (μ M)	Hojas	Raíces	MNi
Control	0	1.01 ± 0.03b	1.39 ± 0.04b	nd
	20	2.99 ± 0.05a	3.02 ± 0.06a	nd
Agustín	0	0.78 ± 0.03b	1.18 ± 0.05b	nd
	20	1.42 ± 0.05a	1.93 ± 0.06a	nd
Mercader	0	0.55 ± 0.03b	0.83 ± 0.04b	nd
	20	0.91 ± 0.04 a	1.28 ± 0.05a	nd

Resultados expresados como la media \pm SD ($n = 3$; > 300 núcleos por tratamiento). Diferentes letras significan diferencias entre tratamientos para $p < 0.05$. Para MNi se contaron más de 1000 células por tratamiento, (nd = no detectado).