

Levels of stress markers in populations of *Pinus halepensis* growing in different mine tailings

Niveles de marcadores de estrés en poblaciones de *Pinus halepensis* crecidas en balsas mineras

A. López-Orenes^{1*}, M.A. Ferrer¹, A.A. Calderón¹

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

*antonio.orenes@upct.es

Abstract

Soil pollution by heavy metals/metalloids (HMMs) is a problem worldwide. To prevent dispersion of contaminated particles by erosion, the maintenance of a vegetative cover is needed. Some plant species are able to thrive under these multi-stresses. This study aimed to investigate the metabolic adjustments involved in *Pinus halepensis* acclimative responses to conditions prevailing in HMM-enriched mine-tailings piles, during Mediterranean spring and summer in two consecutive years. Approximately 30 biochemical and physiological parameters were examined, including leaf redox components, primary and secondary metabolites and endogenous levels of salicylic acid. Multivariate data analysis showed a clear distinction in antioxidative/oxidative profiles between and within the populations studied. *P. halepensis* displayed a high physiological plasticity that probably allows it to successfully shift its metabolism to withstand the multiple stresses that plants must cope with in mine tailings piles under Mediterranean climatic conditions.

Keyword: *antioxidant system*; mine tailing; stress and revegetation.

Resumen

La contaminación del suelo por metales pesados/metaloides (HMMs) es un problema mundial. Para evitar la dispersión de las partículas contaminadas por la erosión, se necesita el mantenimiento de una cubierta vegetal estable. Algunas especies vegetales son capaces de prosperar bajo estos escenarios de múltiple estrés. El objetivo de este estudio fue investigar los ajustes metabólicos que intervienen en las respuestas de aclimatación de *Pinus halepensis* a las condiciones que prevalecen en las balsas de estériles mineros durante la primavera y el verano mediterráneos en dos años consecutivos. Se examinaron aproximadamente 30 parámetros fisiológicos y bioquímicos, incluyendo componentes del estado redox de la hoja, metabolitos primarios y secundarios, y niveles endógenos de ácido salicílico. El análisis multivariante de los datos mostró una clara distinción entre los perfiles antioxidantes/oxidativos de las poblaciones estudiadas y dentro de ellas. *P. halepensis* muestra una alta plasticidad fisiológica que le permite cambiar con éxito su metabolismo para soportar los múltiples estreses que las plantas deben soportar en las balsas de estériles mineros en las condiciones climáticas mediterráneas.

Palabras clave: sistemas antioxidantes; balsas de estériles mineros; estrés y revegetación.

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. Un exceso de Pb o de otros metales pesados, al igual que otros factores estresantes, puede provocar una alteración del estado redox a nivel celular, dando lugar a un estado pro-oxidativo que activaría toda una serie de reacciones en las que se generan y acumulan especies activadas del oxígeno (EAO). Las EAO, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), son productos universales del metabolismo aeróbico y reaccionan muy fácilmente con las macromoléculas biológicas, provocando la peroxidación de lípidos, modificaciones de aminoácidos, ruptura y agregación de proteínas y mutaciones y deleciones en los ácidos nucleicos. El H_2O_2 participa en el metabolismo vegetal, pero también actúa como molécula señal y participa en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetales y en las respuestas al estrés. Sin embargo, el H_2O_2 puede convertirse mediante reacciones de tipo Fenton en radical hidroxilo. Este compuesto es uno de los oxidantes más potentes que se conocen y, al reaccionar con macromoléculas esenciales, altera gravemente el metabolismo celular.

En todas las células existe un balance intracelular entre generación y consumo de EAO. Para regular el estado redox de la célula es necesario una coordinación eficiente de las reacciones que ocurren en los diferentes compartimentos celulares y que están gobernadas por una compleja red de sistemas pro- y antioxidantes. Los sistemas antioxidantes están constituidos por metabolitos de bajo peso molecular (ascorbato, glutatión, cisteína, compuestos fenólicos, tocoferoles, carotenoides) y diversos sistemas enzimáticos. La prevención del estrés oxidativo o la eliminación de EAO parecen ser estrategias prometedoras para obtener plantas tolerantes a diferentes estreses abióticos.

Pinus halepensis es una especie de plantas leñosas que ha sido ampliamente utilizada en la restauración de ecosistemas semiáridos degradados en el área mediterránea. Además, se ha propuesto que algunas especies de pino podrían ser utilizadas como bioindicadores de la disponibilidad de metal(oid)es en sitios contaminados por estos elementos [1]. Por tanto, *P. halepensis* es una especie prometedora para la restauración de las zonas contaminadas por metales pesados en el sureste español, a pesar de que los mecanismos implicados en la tolerancia sean todavía, en gran parte, desconocidos. Numerosos estudios han puesto de manifiesto diferencias a nivel metabólico entre poblaciones metalíferas y no metalíferas de especies vegetales, y que las poblaciones de plantas pueden evolucionar en respuesta a las condiciones ambientales.

En el presente trabajo se analizan los niveles de algunos metabolitos y enzimas, relacionados con la tolerancia al estrés, en poblaciones de *P. halepensis* procedentes de balsas de estériles mineros como paso previo para evaluar las posibilidades de esta especie como herramienta para la revegetación/estabilización de estas estructuras mineras en el marco climático semiárido del sureste ibérico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Se tomaron muestras de acículas de *P. halepensis* crecidas en el Distrito Minero de Cartagena-La Unión, concretamente en 4 balsas de estériles mineros (Agustin, Mercader, Ripolles y Wikon) y en una zona no contaminada localizada a 1.5 km de distancia [2]. Los muestreos se llevaron a cabo en la primavera (mayo) y el verano (septiembre) de dos años consecutivos.

2.2. Determinación de marcadores de estrés

La peroxidación lipídica de los tejidos vegetales se estimó mediante el ensayo del ácido tiobarbitúrico y la reacción de los grupos carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina se usó para determinar el grado de oxidación proteica. [2]

2.3. Análisis de compuestos antioxidantes y determinación de la capacidad antioxidante: El contenido de ácido ascórbico total y reducido se determinó mediante absorbancia a 260 nm antes (ascorbato reducido) y después (ascorbato total) del tratamiento de los extractos con ditiotreitól. Los niveles de glutatión total se determinaron mediante el método de reciclado enzimático. La cuantificación de fenoles solubles totales se realizó mediante técnicas espectrofotométricas, además, se cuantificaron los niveles de flavonoides, flavanoles y ácidos hidroxicinámicos (HCAs). La capacidad antioxidante total se determinó utilizando el método del DPPH, ABTS y FRAP. [2]

2.4. Cuantificación de la actividad de enzimas implicadas en la detoxificación de EAO:

La actividad de los sistemas enzimáticos desactivadores de EAO se realizó mediante el empleo de técnicas espectrofotométricas, de acuerdo con lo descrito en [2].

2.5. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos y gráficos se llevaron a cabo utilizando el software R (<http://www.r-project.org>). Todos los datos fueron verificados para la normalidad y la homogeneidad de las varianzas. Cuando estas suposiciones no fueron cumplidas, se utilizó la familia de transformaciones de Box-Cox para normalizar los residuos del análisis de varianza (ANOVA). Se realizó el análisis de componentes principales (PCA) no supervisado y con los datos transformados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de facilitar la detección de cualquier patrón estacional entre las cinco poblaciones *P. halepensis* y las inter-correlaciones entre los diferentes parámetros fisiológicos y antioxidantes/oxidativos evaluados, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Figura 1). Las tres primeras componentes (PC) capturaron el 60,48 % de la varianza entre las muestras. La primera componente principal (PC1), que representa el 32,42 % y la segunda componente principal (PC2), que representa el 18,06% de la varianza total, separó las muestras de control, agrupadas en el lado negativo del eje X e Y, de las muestras de las balsas, además se separaron claramente entre las muestras de primavera y verano. La primera PCA (PC1-PC2) se asoció positivamente con fenoles, flavanoles, flavonoides, HCAs, capacidad antioxidante total (ABTS, DPPH y FRAP), GSH y AA en el lado positivo del eje X y RWC en el lado negativo, y el eje Y se definió por los niveles de proteína (en el lado positivo del eje Y) y de peroxidasa soluble (sPRX, en el lado negativo). Por lo tanto, los resultados de la PCA sugirieron que hubo cambios estacionales bruscos entre los controles y las plantas de las balsas de estériles mineros, indicando que las plantas de *P. halepensis* mostraron una alta plasticidad fisiológica y fueron capaces de cambiar su metabolismo en respuesta al estrés por metales pesados de una manera dependiente de la estación y de las condiciones de cada pantano, siendo las poblaciones de los pantanos Agustín y Mercader más próximas en la PCA a las de la población control, y Ripolles y Wikon las más alejadas, y por tanto con mayores diferencias con respecto a la población de la zona control.

4. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos muestra que los patrones de expresión de los parámetros analizados son marcadamente diferentes en mayo y septiembre y, además, estos patrones de expresión difieren entre las poblaciones, independientemente del tiempo de

muestreo considerado. Las plantas presentes en las balsas de estériles mineros tienen niveles similares de ciertos parámetros fisiológicos y bioquímicos y fueron significativamente mayores que los encontrados en plantas no mineras. Como las condiciones meteorológicas pueden ser descartadas para explicar las diferencias observadas entre las correlaciones de las variables, las condiciones edáficas deben ser los principales determinantes de la aptitud de las plantas. A pesar de estas diferencias *P. halepensis* se adapta a las condiciones estresantes de la zona y por tanto puede ser empleada con éxito para la revegetación de las balsas de estériles mineros minimizando el impacto causado en la zona.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MINECO (CGL2014-54029-R) y el MECD (beca FPU AP2012/02559). Parte del trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV) de la UPCT.

6. REFERENCIAS

[1] Párraga-Aguado I, Álvarez-Rogel J, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (2013). 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.

[2] López-Orenes A, Bueso MC, Conesa HM, Calderón AA, Ferrer MA (2017). Seasonal changes in antioxidative/oxidative profile of mining and non-mining populations of Syrian beancaper as determined by soil conditions. Science of the Total Environment 575, 437-447.

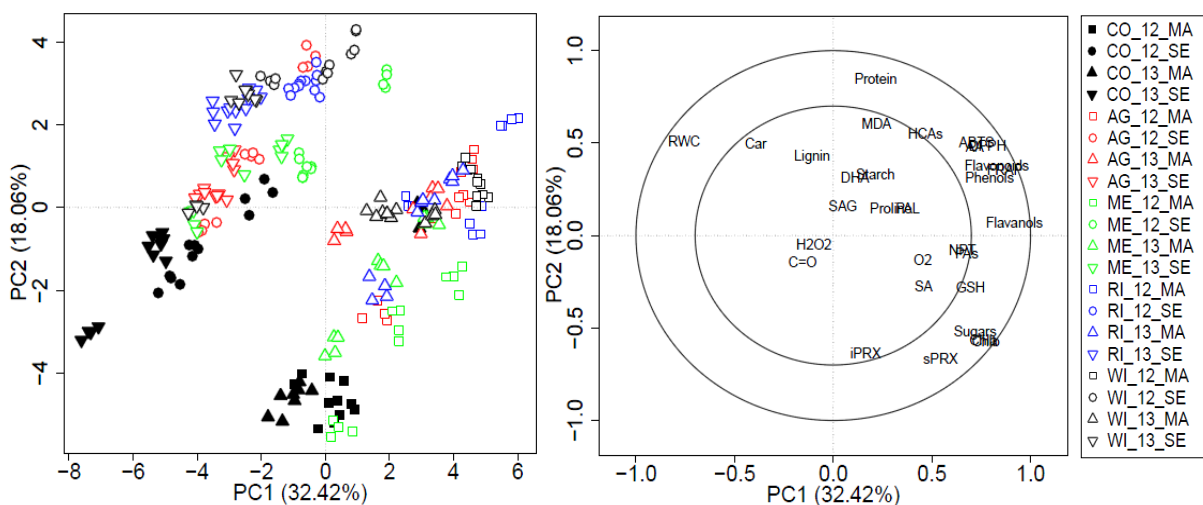


Figura 1. Análisis de Componentes Principales (PCA), para las dos primeras componentes, que explican un 50.48% de la varianza, aplicada a las variables fisiológicas y bioquímicas de hojas de *P. halepensis*.