

Expression patterns of antioxidant systems in pioneer plants present in mine tailings contaminated with high concentrations of heavy metals

A. López-Orenes⁽¹⁾, H. Oliveira⁽²⁾, C. Santos⁽²⁾, M.A. Ferrer⁽¹⁾, A.A. Calderón⁽¹⁾

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

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

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. 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: *Zygophyllum fabago*; citometría de flujo; división celular; tolerancia al estrés; plomo

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 on the level of stress endured by the plants. 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: *Zygophyllum fabago*; flow cytometry; cell division; stress tolerance; lead

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.

En este trabajo se busca evaluar cómo influye el plomo en el ciclo celular en raíces y hojas de tres poblaciones diferentes de *Z. fabago*, y comprobar si estas poblaciones han sufrido una evolución adaptativa para poder implantarse con mayor éxito en las zonas contaminadas. Con esta evaluación se podrán obtener datos sobre la genotoxicidad producida en las plantas de *Z. fabago* al exponerlas a concentraciones conocidas de plomo bajo condiciones controladas. La citometría de flujo (FCM) es una técnica de alta velocidad de análisis que proporciona información sobre las variaciones en el contenido de ADN y poliploidización, variaciones en la dinámica del ciclo celular y, también, sobre el daño del ADN.

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 , se lavaron abundantemente a continuación con agua destilada, se secaron con papel de filtro y, a continuación, se dividieron las muestras en raíces y hojas.

2.2 Análisis por citometría de flujo

Los cambios en la progresión del ciclo celular se evaluaron en raíces y hojas por FCM, según [4]. Las suspensiones de núcleos se obtuvieron mediante un picado fino en tampón WPB [5] y después se filtró a través de un filtro de nylon de 55 micras. A las suspensiones de núcleos se añadieron 50 mg / ml de yoduro de propidio y 50 mg/ml de RNasa. Los análisis se llevaron a cabo en un citómetro de flujo (EPICS XL-Coulter Electrónica, EE.UU.) equipado con un láser de argón (15 mW, 488 nm).

Se analizaron las poblaciones de núcleos en las fases G0 / G1, S y G2 y los cambios en la progresión del ciclo celular para evaluar el efecto mitogénico / citostático del Pb. Los cambios en la dinámica del ciclo celular también fueron expresados por el PRI (índice de proliferación), que da el porcentaje de células que, en cada población, fueron capaces de superar el punto de control R (entre las fases G0 / G1 y S). La ecuación para obtener el PRI es: $\text{PRI} = (\% \text{ S} + \% \text{ G2}) / (\% \text{ G0} / \text{G1} + \% \text{ S} + \% \text{ G2})$.

2.3. 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

El ciclo celular es el conjunto de eventos que conducen a la división de una célula, es decir, la proliferación celular propiamente dicha. El ciclo celular se encuentra dividido en cuatro fases delimitadas que transcurren siguiendo la secuencia siguiente: G1, S, G2 y M. Las fases G1 y G2 implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Por su parte, la fase S consiste en la replicación del ADN y la fase M en la división celular [6] (Figura 1). La duración completa de este ciclo varía con el tipo de célula y con las condiciones del medio en el que se encuentre. Cuando la célula no está en actividad proliferante se dice que ha salido del ciclo celular y se encuentra en estado de quiescencia, o G0.

Existen varias hipótesis para explicar cómo el plomo es capaz de bloquear el ciclo celular, una de ellas es debido a la interferencia con los mecanismos de reparación del ADN, ya que el plomo tiene la capacidad de sustituir al calcio y/o al zinc de las enzimas implicadas en el procesamiento y reparación del ADN, conduciendo a una inhibición de la reparación del ADN. Su efecto está probablemente relacionado con el aumento de la expresión de genes supresores de tumores. En condiciones normales estos genes presentan niveles bajos en todas las células. Cuando una célula sufre daños en su ADN, o es sometida a estrés, activa la transcripción de determinados genes que conducen a la parada del ciclo celular en G1/S, la reparación del ADN y/o la entrada en apoptosis. Además, también se inhiben las transiciones de G1/S y de G2/M del ciclo celular.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que está regulada genéticamente. Dado que la apoptosis actúa de manera opuesta a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. La apoptosis puede iniciarse al final de la fase G1 para impedir que una célula dañada entre en la fase S, de manera que las mutaciones no se hereden durante la replicación del ADN o en la fase G2 para impedir que las células no alcancen la madurez y entren en mitosis.

Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 1, donde se puede observar que las células en G0/G1 aumentan en presencia de Pb lo que sugiere que se induce un retraso en el ciclo celular al igual que ocurre con la exposición a Cd en lechuga [7], como estrategia para hacer frente a las células que presentan daño en su ADN. Sin embargo, algunas células pueden continuar la proliferación sin, probablemente, completar la reparación del ADN, lo que podría conducir a un proceso de acumulación de mutaciones del ADN en la fase S, aumentando la susceptibilidad a la rotura del ADN. Como resultado del daño del ADN y el avance incontrolado a través del punto de control G2, se pueden perder fragmentos de ADN durante la anafase, por lo que las células hijas podrían mostrar anomalías citogenéticas, como micronúcleos. El efecto del Pb sobre los microtúbulos podría dar un bloqueo en G2 (como puede observarse en la Tabla 1), que luego, durante la mitosis, provocaría que el huso mitótico pueda convertirse en disfuncional, lo que en consecuencia conduciría a anomalías cromosómicas, aberraciones cromosómicas y/o catástrofe mitótica.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que los niveles de plomo afectan significativamente a la división celular en las plántulas de *Z. fabago*, disminuyendo la proliferación celular, provocando un retraso en el ciclo celular y un mayor daño del ADN. 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 mejora genética desarrollada por la planta para hacer frente a las condiciones ambientales presentes en las balsas de estériles mineros.

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 bibliográficas

- [1] Tordoff GM, AJM Baker, AJ Willis, (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41: 219–228.
- [2] Conesa HM, 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 MN, Jiménez-Cárceles FJ, Conesa HM, (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] Rodríguez E, Azevedo R, Fernandes P, Santos C (2011). Cr(VI) Induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. *Chemical Res Toxicol* 24:1040–1047.
- [5] Loureiro J, Rodríguez E, Doležel J, and Santos C, (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Ann Bot.* 100: 875-88.
- [6] Graña X and Reddy EP (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11: 211-219.
- [7] Monteiro C, Santos C, Pinho S, Dias C (2012). Cadmium-induced cyto and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chem Res Tox* 25: 1423–1434.

Tablas y Figuras

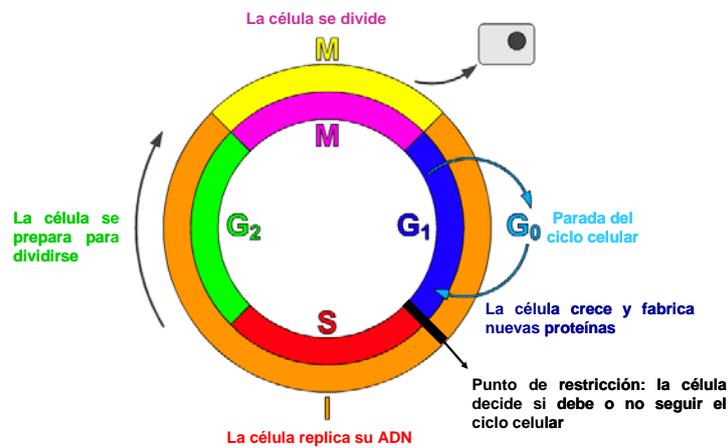


Figura 1. Esquema representativo del ciclo celular (adaptado [6]).

Tabla 1. Características observadas en el ciclo celular. Los resultados están expresados como la media de las determinaciones (n=6), los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (p<0.05).

	Pb (µM)	%G ₀ /G ₁	%S	%G ₂	PRI
Control	Hojas				
	0	81.26	8.89	9.85	0.19
	20	87.31*	6.58*	6.11*	0.13*
	Raíces				
	0	82.54	5.05	12.41	0.17
	20	87.70*	3.99*	8.30*	0.12*
Agustín	Hojas				
	0	84.95	6.00	9.05	0.15
	20	85.90	6.05	8.05	0.14
	Raíces				
	0	87.69	3.71	8.61	0.12
	20	94.80*	1.84*	3.35*	0.05*
Mercader	Hojas				
	0	87.35	5.52	7.13	0.13
	20	86.25	6.49	7.26	0.14
	Raíces				
	0	78.34	5.53	16.13	0.22
	20	81.87*	5.14	12.99*	0.18*