

Efectos del catión Pb^{2+} en la multiplicación *in vitro* *Nicotiana tabacum* L. var: San Luis 21 y Burley Habana 13

Effects of the Pb^{2+} cation in the multiplication *in vitro* of two varieties of *Nicotiana tabacum* L. var: San Luis 21 and Burley Habana 13

Liane Portuondo Farías¹, Evelyn Valera Rojas¹, Sandra Pérez Álvarez¹, Andrés Calderín García¹, Fernando Guridi Izquierdo¹, Ricardo L. Louro Berbara².

¹Facultad de Agronomía, UNAH. Autopista Nacional Km 231/2, Carretera Tapaste, San José, La Habana, Cuba.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ). Instituto de Agronomia. Departamento do Solo. BR 465 km 7, Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: andres_garcia@isch.edu.cu; berbara@ufrj.br

RESUMEN. La contaminación por cationes Pb^{2+} y su influencia en la cadena trófica es problemática prioritaria para la comunidad científica internacional. En condiciones de campo, el tabaco es una especie capaz de acumular cantidades considerables de Pb^{2+} en sus tejidos, considerándose como una planta acumuladora de este metal. Por su fácil propagación *in vitro* y manejo biotecnológico, es posible llevar a cabo investigaciones que permitan conocer los mecanismos que ocurren en este cultivo ante el estrés por metales pesados y extrapolarlos a otras especies vegetales. En este trabajo se realizaron estudios de efectos en explantes de dos variedades de tabaco (SL.21 y BH.13), sometidos a estrés por el catión Pb^{2+} en condiciones de micropropagación. Los explantes fueron mantenidos en contacto con tres concentraciones de Pb^{2+} (100, 500 y 1000 mg.kg⁻¹) en un medio de cultivo MS. Se evaluaron semanalmente los indicadores morfológicos altura de las plántulas, número de hojas totales y número de hojas verdes, después de 15 días de colocados los explantes en el medio contaminado. En la fase de multiplicación, para ambas variedades, los tratamientos con Pb^{2+} afectaron a todos los indicadores evaluados, teniendo la mayor repercusión los de 500 mg.kg⁻¹ y 1000 mg.kg⁻¹, presumiblemente debido a una influencia antagónica del Pb^{2+} sobre el Mg^{2+} , que limitó la multiplicación y la especialización celular. Se considera la posible utilización del nitrógeno absorbido por las plántulas, para la producción de péptidos que conforman las fitoquelatinas y que intervienen en procesos de detoxificación.

Palabras clave: catión, Pb^{2+} , explantes, micropropagación.

ABSTRACT. The contamination by Pb^{2+} cations and their influence on the food chain is a priority issue for the international scientific community. In field conditions, the tobacco is a species able to accumulate substantial amounts of Pb^{2+} in their tissues, it credited as a plant accumulator of this metal. It's easy to spread *in vitro* and management of biotechnology, it is possible to carry out research to understand the mechanisms that occur in plants to stress by heavy metals and extrapolated to other plant species. In this study we have conducted studies of effects on explants of two varieties of tobacco (SL.21 and BH.13), under stress by Pb^{2+} cation able micropropagation. The explants were kept in contact with three concentrations of Pb^{2+} (100, 500 and 1000 mg.kg⁻¹) in a culture medium MS. Morphological indicators were assessed as the height of seedlings, leaf number and total number of green leaves, after 15 days of the explants located in the medium. At the stage of the multiplication of both varieties treatments Pb^{2+} caused damage in all the indicators evaluated, taking the maximum impact of 500 mg.kg⁻¹ and 1000 mg.kg⁻¹, presumably due to Pb^{2+} of an antagonistic influence on Mg^{2+} , which affected the cellular proliferation and specialization, in addition to a possible use of nitrogen absorbed by seedlings, for the production of peptides that make up the phytochelatin and involved in detoxification processes.

Key words: cation, Pb^{2+} , explants, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

La acumulación de cationes de metales pesados en la plantas depende de procesos de movilización, captación y compartimentación desde la disolución del suelo hacia la parte aérea, para su almacenamiento a nivel de las hojas. Para que estos procesos sean eficaces, se hace necesaria la

formación de complejos ligando-metal. Los ligandos potenciales incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos y péptidos como las fitoquelatinas y las metalotioneinas, principales encargadas de inmovilizar y atrapar metales pesados para su posterior almacenamiento dentro de la vacuola;

siendo este un mecanismo de defensa ante elevados niveles de toxicidad (Lobo, 2000). Una de las principales familias botánicas estudiadas mundialmente es la Solanaceae, dentro de la cual se incluyen importantes especies con fines comerciales como el girasol (*Helianthus annuus* L.), la cual se considera como hiperacumuladora de metales pesados y el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Esta última es una fuente importante de ingresos al país, que se utiliza como base para el estudio de la estructura y funciones del genoma, dada la buena caracterización genética que de ella se dispone (Grimmer *et al.*, 2000). Es un hecho que la contaminación ambiental por cationes de metales pesados constituye una de las mayores problemáticas actuales que afectan al suelo, las plantas y al hombre. Por otra parte el cultivo de tejidos es una poderosa herramienta que permite la propagación de grandes volúmenes de plantas asépticas. Teniendo en cuenta la facilidad del cultivo del tabaco, para estudios *in vitro* aplicados a la micropropagación y a la ingeniería genética, es por lo que el presente trabajo pretende el estudio de los efectos que pueden ser causados bajo condiciones de estrés por el catión Pb^{2+} , en plántulas multiplicadas mediante el cultivo de tejidos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con plántulas de tabaco obtenidas a partir de la germinación de semillas certificadas por el Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), pertenecientes a dos variedades: *San Luis 21* (SL.21) y *Burley Habana 13* (BH.13), recomendadas por los investigadores de este instituto.

Se evaluaron el efecto del Pb^{2+} sobre algunos indicadores morfológicos *in vitro* plantas y se realizaron medios de cultivo suplementados con Pb^{2+} .

A partir de una masa conocida de acetato de plomo ($PbAc_2$) (PRS-Panreac), se preparó una disolución patrón con una concentración de Pb^{2+} igual a 1000 mg.kg⁻¹ y de ésta se tomaron alícuotas para ser adicionadas al medio de cultivo de multiplicación, de manera que se consiguieran tres concentraciones diferentes del catión (100 ppm, 500 ppm y 1000 ppm) (García *et al.*, 2008). De esa manera se dispuso de un medio de cultivo con presencia de Pb^{2+} en cantidades totalmente biodisponibles para

las plántulas. En todos los experimentos se utilizó un tratamiento control, el cual contenía solamente el medio de cultivo de referencia.

Las plántulas utilizadas para la multiplicación fueron obtenidas a partir de un banco de germoplasma. Se utilizó el medio de cultivo Murashige-Skoog y según las condiciones de estrés por adición de Pb^{2+} a las que se sometieron las plántulas, se hizo necesaria la suplementación del medio con 6-BAP y las concentraciones de Pb^{2+} correspondientes a cada tratamiento. Después de quince días de exposición al estrés con Pb^{2+} , se procedió a la primera evaluación y posteriormente, se repitieron semanalmente para una duración total del experimento de 64 días. Se evaluaron los indicadores: altura de la plántula, número de hojas totales y número de hojas verdes en cada uno de los momentos de medición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La variación de la altura en el tiempo, desde los primeros 15 días en medio de multiplicación hasta los 64 días, momento en que concluye el experimento (figura 1).

Resulta evidente que los tratamientos correspondientes a las distintas concentraciones de Pb^{2+} , difieren con respecto al tratamiento control. Para ambas variedades, el crecimiento en el control (línea I) mostró un comportamiento logarítmico ascendente, detectándose que en el momento de conclusión del experimento no parece haberse alcanzado el máximo potencial de ese indicador. En los tratamientos de 500 mg.kg⁻¹ (línea III) y 1000 mg.kg⁻¹ (línea IV) se mostraron las mayores afectaciones durante el transcurso del tiempo, lo que sugiere que tal efecto negativo es dependiente de la concentración de Pb^{2+} en el medio. Es conocido que *Nicotiana tabacum* L. es considerada como una especie hiperacumuladora (Golia *et al.*, 2007) pero estos resultados se han reportado en suelos contaminados con plántulas obtenidas en condiciones óptimas.

Los efectos encontrados en el crecimiento de las plántulas de tabaco pudieran ser explicados teniendo en cuenta lo informado por Souza-Silva *et al.*, (2007) en leguminosas, quienes atribuyen efectos semejantes a éstos como consecuencia de una

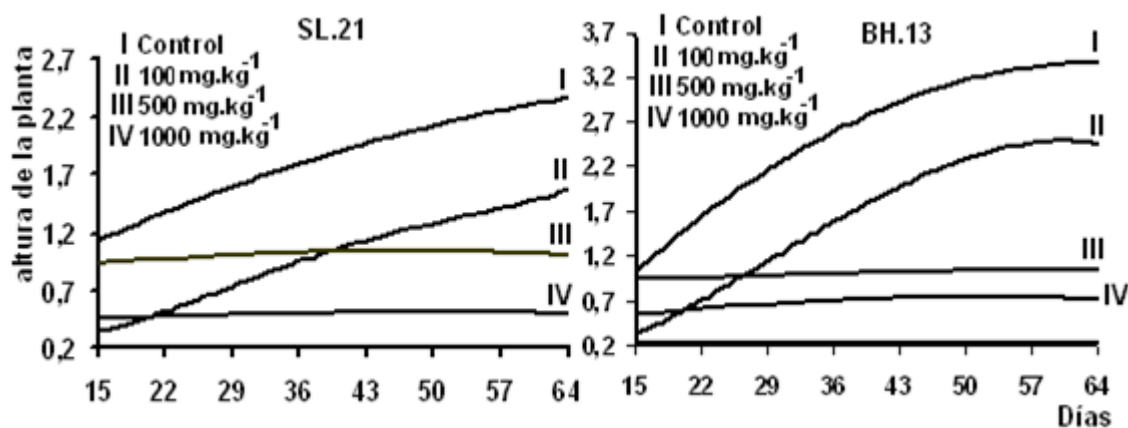


Figura 1. Dinámica de crecimiento

disminución de la traslocación de los elementos minerales desde la raíz hacia la parte aérea, funcionando como un mecanismo de defensa, en el que las raíces exudan compuestos orgánicos capaces de formar quelatos con los cationes metálicos y por tanto los inmovilizan, sin distinción entre los metales tóxicos y nutrientes minerales, produciéndose una afectación general en el desarrollo de la planta. También es posible que tenga lugar una menor toma de nutrientes, debido al antagonismo que es capaz de producirse entre el Pb^{2+} y otros minerales presentes y biodisponibles en el medio. Estos resultados concuerdan con los reportados en estudios sobre la germinación y desarrollo de *Raphanus sativus* L., donde las plántulas expuestas a un medio con concentraciones desde 100 hasta 1000 $mg.kg^{-1}$ de Pb^{2+} fueron disminuyendo su tamaño a medida que aumentaba la concentración en el medio de cultivo (Alarcón *et al.*, 2006).

El número de hojas totales de las plantas de tabaco se representa con el indicador bioproductivo más importante, ya que son el producto agrícola de este cultivo y su órgano principal de comercialización. En la figura 2 se muestra el comportamiento de este indicador en el tiempo, según los valores de las medias obtenidas para cada momento de medición, para las dos variedades utilizadas.

Tanto para la variedad SL.21 como para BH.13, la emisión de hojas resultó similar de acuerdo con los tratamientos utilizados. En ambas variedades el tratamiento correspondiente a 100 $mg.kg^{-1}$ presentó un aumento con el tiempo en el número de hojas, semejante al control en cuanto a sus comportamientos ascendentes, sin embargo para los

tratamientos correspondientes a 500 $mg.kg^{-1}$ y 1000 $mg.kg^{-1}$ el comportamiento descrito para ambas variedades tuvo un carácter lineal y estable en el tiempo, dado que apenas se emitieron nuevas hojas. Otro aspecto de gran interés fisiológico, comercial y productivo, es conocer si existe afectación en la pigmentación de las hojas emitidas bajo estas condiciones de estrés. Dado que en las observaciones realizadas en los experimentos, las plantas en contacto con estos tratamientos, comenzaron a presentar evidencias de clorosis, se evaluó también este proceso en el tiempo. La figura 3 muestra el comportamiento en la emisión de hojas verdes en ambas variedades para los tratamientos con Pb^{2+} , debido a que en ninguna de las variedades, el tratamiento control presentó síntomas de clorosis en sus hojas.

Es notable la diferencia existente entre el tratamiento de 100 $mg.kg^{-1}$ para ambas variedades, con los de 500 $mg.kg^{-1}$ y de 1000 $mg.kg^{-1}$, observándose que la emisión de hojas con pigmentación verde en el primero responde de manera creciente, sin embargo para los otros dos, las plantas mantienen una presencia de hojas estables hasta los 29 días, momento a partir del cual existe una disminución en el número de hojas verdes presentes, llegando a ser cero a partir de los 57 días en el caso de la mayor concentración de Pb^{2+} . Estos resultados presentan un gran valor interpretativo, teniendo en cuenta que aquellas hojas emitidas sin pigmentación, presentarán bajos niveles de clorofila y por tanto presentarán una capacidad fotosintética extremadamente reducida; lo que significa una disminución creciente de todas las funciones que de ella dependen en las plantas (Taiz y Zeiger, 2005). La emisión de hojas sin pigmentación, pudiera deberse a la utilización del nitrógeno absorbido, para la

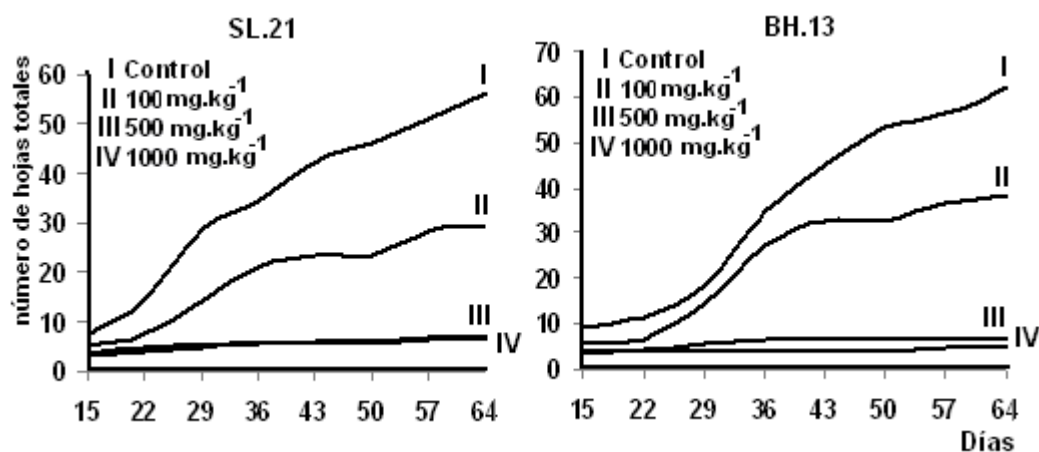


Figura 2. Variación en el tiempo del número de hojas totales

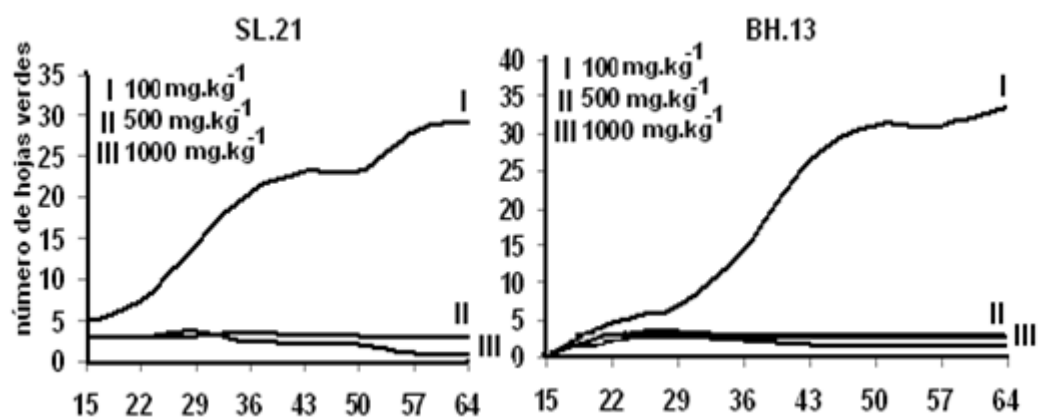


Figura 3. Variación de la cantidad de hojas verdes

producción de péptidos que conforman las fitoquelatinas y que intervienen en procesos de detoxificación, en lugar de su utilización para la síntesis de pigmentos fotosintéticos (Soares, 2005). También habría que considerar, que en la absorción de nutrientes por las raíces, el Pb^{2+} esté ejerciendo un efecto antagónico con el Mg^{2+} presente en el medio o a nivel de las hojas, esté ejerciendo una disminución en la absorción de la luz por los cloroplastos, lo que también puede traer como consecuencia una reducción en la conversión de energía lumínica a energía electrónica, desaceleración del transporte electrónico, afectación en la fotólisis del agua y la evolución del oxígeno (Wu et al., 2007).

CONCLUSIONES

1. En ambas variedades estudiadas los tratamientos con Pb^{2+} ejercieron efectos negativos sobre el crecimiento, la emisión de hojas totales y verdes en las plantas.

2. Las concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm fueron las que más afectaron los indicadores

evaluados presumiblemente debido a una influencia antagónica del Pb^{2+} sobre el Mg^{2+} .

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón H. T., Brenda G., Magdaleno G., Benavides M. A. 2006. Efecto de la concentración de Plomo en suelos sobre la germinación y desarrollo de cultivos de *Raphanus sativus* L. (Rábano). XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, mayo del 2006.
- Lobo Bedmar M. 2000. Descontaminación de suelos. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria. Alcalá de Henares (Madrid). Disponible en: <http://www.estrucplan.com>. Consultada el: 16 de noviembre del 2007.
- García E. N., Valdés R. C., Sánchez S. E., Guzmán A. M., Calderín A. G., Guridi F. I., Balbín M. A., Cruz O. P., Mollineda A. T. 2008. Evaluación de residuos líquidos con metales pesados disueltos y su impacto en el agroecosistema (San José de las Lajas). Artículo en prensa.

4. Golia E., Dimirkou A., Mitsios K. 2007. Accumulation of Metals on Tobacco Leaves (Primings) Grown in an Agricultural Area in Relation to Soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 79:158–162.

5. Soares dos Santos Fabiana. 2005. Remediação da Contaminação com Metais Pesados Provenientes da Disposição de Resíduos Perigosos da Produção de Zinco. Instituto de Agronomia Curso de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo. UFRRJ.

6. Souza-Silva M., Vitti Godofredo C., Trevizam Ricardo A. 2007. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. *Pesq. agropec. bras.* vol.42 no.4 Brasília Apr.

7. Taiz, L. and Zeiger, E. *Plant Physiology*. Third Edition, Copyrights by Sinauer Associates, Inc, 2005.

8. Wu Xiao, Hong Fashui, Liu Chao, Su Mingyu, Zheng Lei, Gao Fengqing and Yang Fan. 2007. Effects of Pb^{2+} on energy distribution and photochemical activity of spinach chloroplast. *Science Direct, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Article in press.

Recibido: 12/09/2010

Aceptado: 13/07/2011