

Inducción de poliploidía en *Cordia congestiflora* Hemsl., especie vegetal con potencial para remediar suelos contaminados con metales pesados

Yesenia López-López | Miguel Alvarado-Rodríguez

Unidad Académica de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Lenin Sánchez-Calderón | Saúl Fraire-Velázquez

Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

correo-e: mialvaro2909@hotmail.com

Resumen

La fitorremediación es una tecnología innovadora que consiste en utilizar plantas vivas y los microorganismos asociados a su rizósfera para la remediación *in situ* y *ex situ* de suelos, lodos, sedimentos y aguas contaminados a través de la remoción, degradación o estabilización de los contaminantes. Esta tecnología tiene un gran potencial para la remediación de sitios contaminados por sus bajos costos y por lo amigable con el medio ambiente. Existen varias especies vegetales que es posible usar en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Se ha demostrado que *Cordia congestiflora* es capaz de tolerar y acumular plomo, ya que presenta un FBC de 1.05. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, no se puede emplear en la fitorremediación de suelos contaminados (Salas-Luevano *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo fue inducir poliploidía en *C. congestiflora* mediante la utilización de colchicina *in vitro*, a fin de producir plantas de mayor tamaño que pudieran ser candidatas para el saneamiento de suelos contaminados con plomo y otros metales pesados. Se obtuvieron plantas con un tamaño superior a las control, a partir de semillas que fueron embebidas 48 y 96 h en soluciones de colchicina al 0.05 y 0.1%. Los ejemplares se multiplicaron y se enraizaron *in vitro*, se usaron diversos reguladores del crecimiento vegetal y posteriormente se aclimataron. Se determinó la poliploidía considerando el fenotipo, contenido de ADN genómico y diámetro nuclear.

Palabras clave: *Cordia congestiflora*, poliploidía, fitorremediación.

Introducción

La actividad minera genera suelos contaminados con residuos sólidos y semisólidos mediante la producción de desechos comúnmente llamados «jales», que se caracterizan por sus limitaciones físicas, químicas y biológicas para el establecimiento de la cubierta vegetal, los riesgos a la salud humana y al medio ambiente (Puga *et al.*, 2006).

Zacatecas tiene más de 450 años de tradición minera con la consecuente acumulación de residuos. Contiene metales pesados como el Pb, Cd, As, elementos que no tienen funciones metabólicas conocidas y que son tóxicos a muy bajas concentraciones (Méndez-Prieto *et al.*, 2009). Zn, que es esencial para los seres vivos pero puede llegar a ser tóxico conforme aumenta su concentración. Hg, que se usó en el proceso de amalgamación para la extracción de oro y plata; fue usado desde mediados del siglo XVI hasta mediados del siglo XIX, actualmente varias microcuencas del estado están contaminadas con ese elemento (Rodríguez *et al.*, 2011).

En el municipio de Guadalupe, las comunidades de La Zacatecana y Osiris son las zonas con mayores concentraciones de metales pesados (As, Pb y Hg), hasta 8 veces más que las concentraciones recomendadas por la PROFEPA (Santos-Santos *et al.*, 2006). En Vetagrande se han detectado concentraciones de hasta 400 mg de Pb por kg de suelo residencial, que es el valor máximo permitido conforme a la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

Una tecnología empleada para remover los metales pesados de suelos contaminados es la extracción por plantas que han desarrollado esa capacidad, esto es conocido como fitorremediación. Esas plantas absorben, concentran y precipitan metales tóxicos hallados en suelos contaminados, es la mejor forma de remediar áreas contaminadas, donde los contaminantes están presentes a relativamente bajas concentraciones y de manera superficial (Rulkens, *et al.*, 1998).

Por su parte, *Cordia congestiflora* es una planta que crece en suelos contaminados con desechos mineros, en lugares cercanos a la ciudad de Zacatecas; por ello es posible afirmar que está adaptada a tales condiciones y que es capaz de tolerar, traslocar y acumular cantidades relevantes de plomo. Sin embargo, aunque se presenta todo el año y tiene un buen factor de bioconcentración (FBC) de 1.05, no es candidata a utilizarse para fines de fitorremediación debido a su pequeña biomasa (Salas-Luévano *et al.*, 2009).

A pesar de lo anterior existen estrategias biotecnológicas para incrementar el tamaño, el vigor y la tolerancia a ambientes desfavorables a las plantas, entre ellas se encuentran la inducción de poliploidía mediante el uso de colchicina. En este trabajo se obtuvieron *in vitro* plantas poliploides, resultaron ser de mayor tamaño que las plantas obtenidas de semillas no tratadas con colchicina.

Metodología

Material biológico

Se utilizaron semillas que se colectaron de plantas silvestres maduras de *C. congestiflora*, localizadas en la zona contaminada con jales provenientes de la Mina El Bote. Ésta se ubica en Morelos, Zacatecas y se aproxima a las comunidades Francisco I. Madero y Noria de Gringos, pertenecientes a los municipios de Zacatecas y Morelos, respectivamente.

Se seleccionaron 1 200 semillas de *C. congestiflora*, se lavaron con agua y jabón, a continuación se sumergieron en alcohol etílico 70% durante un minuto; se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 10% durante 25 min; finalmente, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Para inducir poliploidía, las semillas se mantuvieron en una solución de colchicina al 0, 0.01, 0.05 y 0.1%, durante 0, 48 y 96 h, lo que hizo un total de 12 tratamientos con 100 semillas cada uno. Las semillas tratadas se sembraron en medio de cultivo semisólido MS, sin reguladores del crecimiento vegetal.

Determinación de poliploidía

Se seleccionaron los ejemplares con un fenotipo diferente a las plantas control. Plantas con mayor altura, con hojas más anchas y de un verde más oscuro. Para aumentar la cantidad de material biológico, las plantas control y las que tuvieron un fenotipo de nuestro interés, se multiplicaron suplementando el medio nutritivo con la citocinina BA a concentraciones de 0, 1.0, 2.0 mg/L y la auxina AIB a concentraciones de 0 y 0.2 mg/L (en combinación), para dar un total de seis tratamientos.

Contenido de ADN genómico

La cantidad de ADN de células poliploides es más alta si se compara con las células diploides. El contenido de ADN se incrementa proporcionalmente con el incremento del nivel de ploidía, por lo tanto la misma unidad de masa de tejido diploide y poliploide tiene diferente cantidad de ADN; el cual puede ser determinado mediante espectrofotometría al seleccionar una longitud de onda de 260 nm (Hasnain Raza *et al.*, 2003). En este estudio el ADN de las plantas regeneradas fue extraído por el método de CTAB, de 500 mg de muestra.

Diámetro nuclear

Las células con núcleo poliploide son generalmente más grandes que las células de la misma especie vegetal con núcleo diploide. Se ha reportado que existe una fuerte correlación entre el tamaño del genoma y el volumen celular. Las células de gran tamaño tienen más ADN nuclear, y en eucariontes los núcleos son más grandes. Esta correlación se da en células de plantas superiores (Goff & Coleman, 1987).

Con base en lo anterior, se tomó como muestra una hoja por cada planta, considerada poliploides y otra de las plantas control. Las hojas se «clarearon» con Metil Salicilato, a fin de eliminar al máximo

pigmentos que pudieran interferir durante la observación de los núcleos celulares.

Las hojas montadas en portaobjetos, cubiertas y selladas, se observaron en un microscopio Confocal marca Carl Zeiss, modelo LSM 6 Pascal. A partir de las fotografías tomadas, se midió el diámetro nuclear y se hicieron las comparaciones entre plantas control y poliploides.

Enraizamiento

Para inducir un sistema radical vigoroso en los dos tipos de plantas, se probaron cuatro diferentes tratamientos: 1) MS 1X sin fitohormonas, 2) MS 0.5X, 3) MS 1X con 0.5 mg/l de AIB y 4) MS 1X suplementado con 0.5 g/l de carbón activado. Una fracción de esas plantas consideradas ya clonadas en esta fase fueron destinadas para mantenerlas *in vitro* y otra fracción para llevarlas a la etapa de aclimatación.

Aclimatación

Se consideraron 20 vitroplantas con un sistema radical bien desarrollado, abundante y vigoroso. Se extrajeron las plantas de los medios de cultivo, se eliminó cuidadosa y totalmente el agar de sus raíces; manera individual a macetas conteniendo una mezcla de peatmoss y tierra de cultivo en una proporción del 49.5% de cada componente, más el 4% del fertilizante de liberación lenta ozmocote triple 14. El trasplante se realizó al humedecer el sustrato. Los vasos con las plantas se cubrieron con una bolsa plástica transparente, se ligó ésta. En forma gradual se eliminó la cubierta en el lapso de dos semanas.

Resultados y discusión

Tratamientos para inducir poliploidía

La cantidad de semillas germinadas en promedio para todos los tratamientos fue de 46.66%, luego de cuatro semanas de iniciado el proceso con colchici-



na. Sin embargo, sólo en los tratamientos de 0.1% de colchicina con 48 y 96 h se produjeron plantas con una gran variación fenotípica, determinada a las 16 semanas después de iniciado el tratamiento. En la figura 1 se aprecia una planta control y una planta poliploide que presenta hojas más anchas y una altura mayor.



Figura 1. Se muestra a la derecha una planta de *C. congestiflora* poliploide con hojas anchas, y a la izquierda una planta control.

En el cuadro 1 se expone un comparativo de algunos parámetros morfológicos entre plantas control y plantas poliploides.

Cuadro 1
Valores medios de los parámetros morfológicos de plantas poliploides y de plantas control

Parámetros	Control (mm)	Poliploides mm
Distancia intermodal	3.06	9.5
Largo	5.05	6.92
Hoja Ancho	0.475	1.42
Grueso	0.156	0.4
Diámetro del tallo	0.3	0.56
Altura	97	234
Color de la hoja	 B = 180 G = 198 R = 28	 B = 93 G = 129 R = 31

Carga cromosómica

Sólo en los tratamientos 0.1% de colchicina de 48 y 92 h germinaron 21 y 18 semillas respectivamente; de las 39 semillas germinadas fue posible obtener tres plantas con el fenotipo deseable: una planta en el primer tratamiento y dos en segundo. Se extrajo ADN genómico de ambos tipos de plantas por el método de CTAB. La concentración de éste se cuantificó, por lo que la planta control tuvo 4.9 µg/ml, mientras que las plantas poliploides tuvieron una concentración de 20.3 µg/ml.

Diámetro nuclear

Las hojas clareadas y montadas en el portaobjetos se observaron al microscopio Confocal. Se registraron las características señaladas en el siguiente cuadro.

Cuadro 2
Comparación de parámetros anatómicos de hojas de plantas control y de plantas poliploides

Tipo de planta	Relación N/C	No. E/mm ²	No. T/mm ²	Longitud de E	C/T
Planta control	0.3579	46	28	50	1
Planta poliploide	0.4444	36	4	18	6

Donde: N = Núcleo; C = Célula; T = Tricoma; E = Estoma.

De acuerdo con lo registrado se comprobó que el núcleo de las células de las plantas poliploides es de mayor diámetro con respecto a las plantas control. Cada tricoma de las plantas control se compone por una sola célula, mientras que las poliploides tuvieron tricomas segmentados conformados por seis células cada uno. También se observó una escasa presencia de tricomas en las plantas poliploides, que presentaron un 225% más estomas por mm² que las plantas control, aunque de un tamaño muy reducido. En la figura 2 se indican segmentos de hoja de una planta control y de una poliploide.

Multiplicación de plántulas

La tasa más alta de multiplicación para las plantas control y poliploides se logró con el tratamiento 1 mg/L de BA con 0 mg/L de AIB, seguida de 0 mg/L de BA con 0.2 mg/L de AIB o de 1 mg/L de BA con 0.2 mg/L de AIB. Se obtuvo una tasa media de multiplicación de 5.5 para el primer tratamiento, y de 4.4 para los dos segundos tratamientos.

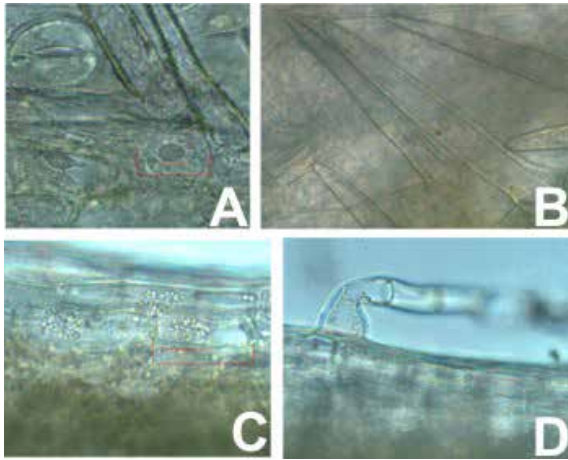


Figura 2. La imagen A corresponde a una planta control, donde se aprecian estomas de gran tamaño. En B, planta control con gran cantidad de estomas. En C, células de planta poliploide con núcleos de tamaño mayor que los de las plantas control. En D, tricoma segmentado conformado por seis células, mientras que en las plantas control son unicelulares.

Enraizamiento

Se obtuvo un sistema radicular abundante y vigoroso con el tratamiento MS suplementado con 0.5 mg/L de AIB, tanto en plantas control como en plantas poliploides. En los otros tres tratamientos probados, luego de 6 semanas de iniciado el proceso no hubo respuesta alguna.

Aclimatación

La aclimatación no pudo lograrse cuando las plantas se extrajeron del frasco y fueron trasplantadas en

el sustrato ya señalado. Sin embargo, se efectuó una aclimatación del 30% cuando las plantas libres de restos de agar se trasplantaron en condiciones de asepsia, en frascos con peatmoss estéril. Bajo esas condiciones se hizo una preaclimatación durante dos semanas; luego, durante otras dos semanas se mantuvieron en macetas con el sustrato señalado y cubiertas con una bolsa plástica, ésta se perforó gradualmente.

Conclusiones

Se generaron plantas poliploides de *C. congestiflora* mediante el uso de colchicina, a la única concentración de 0.4% a partir de semillas que estuvieron en contacto con dicho alcaloide por un periodo de 48 y 96 h. Las células poliploides presentaron núcleos de mayor tamaño y estomas más pequeños que las células de las plantas control.

Referencias

- Goff, L., Coleman, A. (1987). The Solution to the Cytological Paradox of Isomorphy. *The Journal of Cell Biology*, 40(3):739-748
- Hasnain, R., Jaskani, M.J., Khan, M.M., Malik, T.A. (2003). *In vitro* induction of polyplids in watermelon and estimation based on DNA content. *International Journal of Agriculture & Biology*, 5(3):298-302.
- Méndez-Prieto, J., Ramírez, C.A., Gutiérrez, A.D., García, F.P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 40(4):29-44. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93941243003>
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología aplicada*, 5(4-2):149-155. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-221620060004100020&script=sci_arttext
- Rodríguez, M.C. (2014). *La vida cotidiana en el territorio contaminado de la Zacatecana, en Guadalupe, Zacatecas*

- (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social: 216.
- Rulkens, W.H., Tichy, J.T., Grotenhuis, C. (1998). Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. *Water Science and Technology*, 37(8):27-35
- Salas-Luévano, M.A., Manzanares-Acuña E., Letechipía-De León, C., Vega-Carrillo, H.R. (2009). Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23(1):27-32
- Santos-Santos, E., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-García, I., Castro-Díaz, J., Gavilán-García, A., Rosiles, R., Suárez, S., López-Villegas, T. (2006). Analysis of arsenic, lead and mercury in farming areas with mining contaminated soils at Zacatecas, México. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50(2):57-63. Recuperado de <http://www.jmcs.org.mx/OLD/PDFS/V50/N2/02-Analysis.pdf>