

BIOACUMULACIÓN *IN VITRO* DE Pb EN *Buddleja scordioides* L. (ESCOBILLÓN)

Claudia Hernández-Salas*
 Manuel de Jesús
 Macías Patiño,
 Saúl Fraire Velázquez,
 Miguel Alvarado Rodríguez
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
 DE ZACATECAS

*Autor responsable:
clauyole@hotmail.com

[*IN VITRO* BIOACUMULATION OF Pb IN *Buddleja scordioides* L.
 (ESCOBILLON)]

R E S U M E N

Se logró desarrollar cultivos *in vitro* de la especie de planta *B. scordioides*, obteniendo un índice de germinación del 97 %, sin pérdida por contaminación. Para la etapa de brotación se consideraron diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal (RCV), donde el tratamiento que generó la mayor cantidad de brotes fue el T9 (MS1X con 0.4 ácido indol-3-butírico (AIB) mg·l⁻¹). Para obtener la mayor cantidad de raíces el mejor tratamiento fue el medio MS 1X con 0.5 mg·l⁻¹ de (AIB), sin embargo, para obtener las raíces más largas, el tratamiento fue el medio MS 1X + 0.5 g carbón activado (CA). Para la etapa de aclimatación se usaron 25 vitroplantas con un sistema radical desarrollado y vigoroso, todas las plantas sobrevivieron. Las plantas enraizadas se confrontaron *in vitro* con diversas concentraciones de los metales pesados (MPs) Pb, As y Hg, donde sobrevivieron solamente aquellas que estuvieron en presencia de Pb. Para Pb se consideraron concentraciones de 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm y 600 ppm. La determinación de Pb en hoja, tallo y raíz se hizo por espectrometría de absorción atómica (EAA). La mayor cantidad de Pb fue en la raíz (200 ppm: 49.18%, 400 ppm: 48.54% y 600 ppm: 52.81%), seguida por hoja, y con menor concentración en tallo. De los resultados obtenidos, el factor de bioconcentración (FBC) con 200 ppm de Pb fue de 4.4; con 400 ppm fue de 9.3 y con 600 ppm de 6. Mientras que el factor de traslocación (FT) para 200 ppm fue de 1, para 400 ppm 1.1 y para 600 ppm de 0.89.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, *Buddleja scordioides*, metales pesados
 fitorremediación

ABSTRACT

In vitro cultures of *B. scordioides* were obtained with a germination index of 97% free of contamination. Treatment with plant growth regulators (PGR) at different concentrations was used for budding, where the T9 treatment (0.4 IBA (indole butyric acid) mg·L⁻¹) generated the highest number of buds. The best treatment to obtain the highest amount of roots was MS medium 1X + 0.5 mg L⁻¹ IBA, however, longer roots were obtained with MS 1X + 0.5 activated charcoal (AC). For acclimatization, 25 vitroplants were used with a vigorous root system developed, all of them survived. Rooted plants were confronted *in vitro* with various concentrations of heavy metals (HMs), where only those that were in the presence of Pb survived. Concentrations of 0, 200, 400 and 600 ppm were used for the confrontation with Pb. The determination of Pb in leaves, stems and roots was performed by atomic absorption spectrometry (AAS), whose results showed that the highest amount of Pb was in the roots (200 ppm: 49.18%; 400 ppm: 48.54%; 600 ppm: 52.81%), followed by leaves, and with less concentration in stems. The bioconcentration factor for Pb with 200 ppm was 4.4; with 400 ppm was 9.3 and with 600 ppm was 6. Whereas the translocation factor with 200 ppm was 1, with 400 ppm was 1.1 and with 600 ppm was 0.89.

Key words: *In vitro* culture, *Buddleja scordioides*, heavy metals, phytoremediation

I N T R O D U C C I Ó N

La minería, es una de las actividades económicas más importantes en México, destacan los estados de Zacatecas, Guanajuato, Durango, entre otros. El problema de esta actividad es la contaminación del medio ambiente con metales pesados (MPs) (Mejía *et al.*, 1999). Varias tecnologías están disponibles para remediar suelos contaminados con metales pesados. Sin embargo, muchas de estas tecnologías son costosas (Mulligan, 2001). La fitorremediación puede proporcionar una solución rentable de larga duración para la remediación de sitios contaminados (Ma *et al.*, 2001). Las plantas han desarrollado mecanismos muy específicos para absorber, translocar y acumular ciertos metales (Lasat, 2000).

Una de las estrategias de la fitorremediación de suelos contaminados con MPs es la fitoextracción, es decir, a través de absorción y acumulación de metales en los brotes de plantas que luego pueden ser cosechadas y retiradas del lugar (Moreno *et al.*, 2008).

Más de 400 plantas se conocen como hiperacumuladoras de metales, ya que pueden acumular alta concentración de metales en

su biomasa. Olivares y Peña (2009) definen el factor de bioconcentración (FBC) como el cociente entre la concentración de metales en los órganos aéreos y la del suelo; mientras, el factor de traslocación (FT) es definido como el cociente entre la concentración del metal en los órganos aéreos y raíz (Zhang *et al.*, 2006).

B. scordioides es una especie que podría ser usada en la fitoextracción de Pb ya que reportó que tiene un factor de bioconcentración (FBC) de 1.31 (Salas-Luévano *et al.*, 2009).

M E T O D O L O G Í A

ÁREA DE MUESTREO

Semillas maduras de planta *B. scordioides*, fueron recolectadas de la comunidad de Francisco I. Madero, Zacatecas, Zac. ubicado a 22° 48 '42 "de latitud norte y 102° 42' 058" de longitud oeste, a 2250 metros sobre el nivel del mar, la cual es una zona contaminada con residuos mineros.

DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Para su desinfección, las semillas fueron lavadas con detergente, se enjuagaron con agua corriente y enseguida con agua destilada. Posteriormente, en campana de flujo laminar se colocaron en una solución de etanol al 70% durante 1 min; se enjuagaron con agua destilada estéril; posteriormente se colocaron 25 min en una solución al 10% (p/v) de hipoclorito de sodio comercial. Finalmente las semillas tratadas se enjuagaron 4 veces más con agua destilada estéril.

GERMINACIÓN

Las semillas desinfectadas de *B. scordioides* se transfirieron al medio de cultivo basal de Murashige and Skoog, 1962, (MS). Se colocaron de 3-5 semillas por frasco con medio nutritivo.

MULTIPLICACIÓN

Las plántulas generadas en la etapa anterior, fueron usadas para la fase de multiplicación, donde se probaron 9 tratamientos con diversas concentraciones de Reguladores del Crecimiento Vegetal (RCV) (Cuadro 1). Luego de seis semanas se evaluó la cantidad de brotes obtenidos por explante.

Tratamiento	Medio nutritivo	BA (mg/l)	AIB (mg/l)
T ₁	MS	0	0
T ₂	MS	2	0
T ₃	MS	4	0
T ₄	MS	6	0
T ₅	MS	0	0.2
T ₆	MS	2	0.2
T ₇	MS	4	0.2
T ₈	MS	6	0.2
T ₉	MS	0	0.4

CUADRO 1.

Tratamientos para inducir brotación múltiple

ENRAIZAMIENTO

Con el propósito de inducir un sistema radical vigoroso y abundante, se probaron cuatro tratamientos: 1) MS 1X sin RCV, 2) MS 0.5X sin RCV, 3) MS 1X con 0.5 mg.L⁻¹ de AIB y 4) MS 1X suplementado con 0.5 g.L⁻¹ de carbón activado (CA). Una fracción de las plántulas generadas se emplearon para probar la capacidad de acumular MPs, y otra para establecer la metodología para su aclimatación. En el proceso de enraizamiento se evaluó el número de raíces por explante.

ACLIMATACIÓN

En esta etapa fueron consideradas 25 vitroplantas con un sistema radical desarrollado. Para esta fase, las plantas fueron extraídas de los frascos con medios de cultivo, eliminando éste completamente de las raíces de las plántulas; enseguida se trasplantaron de manera individual en vasos de plástico que contenían sustrato, correspondiente a una mezcla de peat most, agrolita y vermiculita, en cantidades volumétricas iguales de cada componente. Para este procedimiento el sustrato se humedeció con agua corriente. Los vasos con las plántulas se cubrieron con una bolsa plástica transparente ligándola al vaso para evitar la pérdida de humedad. A la cubierta plástica se le realizó una perforación de aproximadamente 1 cm² diariamente, durante 15 días, con la finalidad de obtener una adaptación gradual al medio ambiente.

MONTAJE DE LAS PRUEBAS CON MPS.

Para realizar esta etapa se utilizaron vitroplantas que se desarrollaron en presencia de MPs. Plántulas vigorosas enraizadas, se subcultivaron en medios nutritivos conteniendo cuatro diferentes concentraciones de sales derivadas de los metales Pb, Hg y As [Pb(NO₃)₂, Hg(NO₃)₂ y KH₂AsO₄] por separado, que fueron adicionados al medio de cultivo. Cada metal se evaluó de manera independiente. Las concentraciones de sales de los MPs utilizadas, fueron las concentraciones referenciales en la NOM-147-SEMARNAT / SSA1-2004. Se consideró el 0% (control), lo máximo permitido por la norma, un 50% por debajo y un 50% por encima de la concentración señalada como Concentración Máxima permitida en suelos para zonas habitacionales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración de MPs considerados en los tratamientos que se probaron.

Elementos	Concentración (mg L ⁻¹)			
Pb	0	200	400*	600
Hg	0	12	24*	36
As	0	11	22*	33

*Valores máximos permitidos en suelos, con base a la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004

CUANTIFICACIÓN DE Pb

La cuantificación de la concentración de Pb, se realizó a las seis semanas de iniciada la confrontación con Pb. Los ensayos se realizaron por espectrometría de absorción atómica (EAA). Se seleccionaron y separaron hojas, tallos y raíces.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N

Se consiguió un índice de germinación del 97 %, sin pérdida por contaminación. Cabe señalar el índice de germinación fue muy alto, y que la metodología que se practicó para desinfectar las semillas fue exitosa. En la etapa de multiplicación, se utilizaron explantes de la etapa de germinación (Figura 1A); los resultados obtenidos demuestran la heterogeneidad en la emisión de brotes por explante en los diferentes tratamientos (Cuadro 3). La tasa de multiplicación

más alta se logró en el T9 (0 mg.L⁻¹ de BA y 0.4 mg.L⁻¹ (Figura 1B). Este resultado no concuerda con lo que generalmente ocurre en los CTV, ya que una alta concentración de BA generalmente produce mayor cantidad de brotes adventicios, en nuestro caso se generaron la mayor cantidad de brotes, aún en la ausencia de BA. Por lo anterior, creemos que la planta misma produce citocininas como para presentar una tasa alta de brotación. El registro final del enraizamiento se registró 10 semanas después de iniciada esta etapa.

Las plantas que generaron la mayor cantidad de raíces, fueron aquellas que contenían MS+0.5 mg.L⁻¹ AIB, seguido de las que contenían medio MS 1X+CA (Cuadro 4), coincidiendo así con Pérez-Molphe y cols., 1999, quien establece que el uso de RCV como la auxina AIB, promueve la producción de raíces en el cultivo *in vitro* (Figura 1C). También se ha visto que mediante la adición de CA al cultivo, es posible remover compuestos fenólicos, evitando o disminuyendo el deterioro del explante.

		Número de brotes/repetición									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T r a t a m i e n t o s	T ₁	2	2	1	2	2	3	0	2	3	3
	T ₂	8	6	3	4	0	3	8	9	12	4
	T ₃	2	2	5	12	16	16	6	4	3	2
	T ₄	13	14	10	3	7	8	7	12	14	7
	T ₅	2	3	2	2	2	2	2	1	2	2
	T ₆	4	5	4	8	2	6	12	4	2	2
	T ₇	7	9	11	6	5	8	8	15	13	12
	T ₈	0	3	0	2	0	0	0	1	1	1
	T ₉	7	11	3	2	22	15	25	18	8	22

CUADRO 3.

Registro final del número de brotes en los 9 tratamientos estudiados

En los resultados de aclimatación de *B. scordioides* se obtuvo el 100 % de sobrevivencia (25/25), esto sugiere que aunque la planta se había desarrollado bajo condiciones *in vitro*, fácilmente se le pudo aclimatar (Figura 1D). Por esta razón, creemos que dicha planta puede ser producida en grandes cantidades en el laboratorio y posteriormente ser llevadas a campo, para ser empleadas en suelos contaminados para fines de fitorremediación.

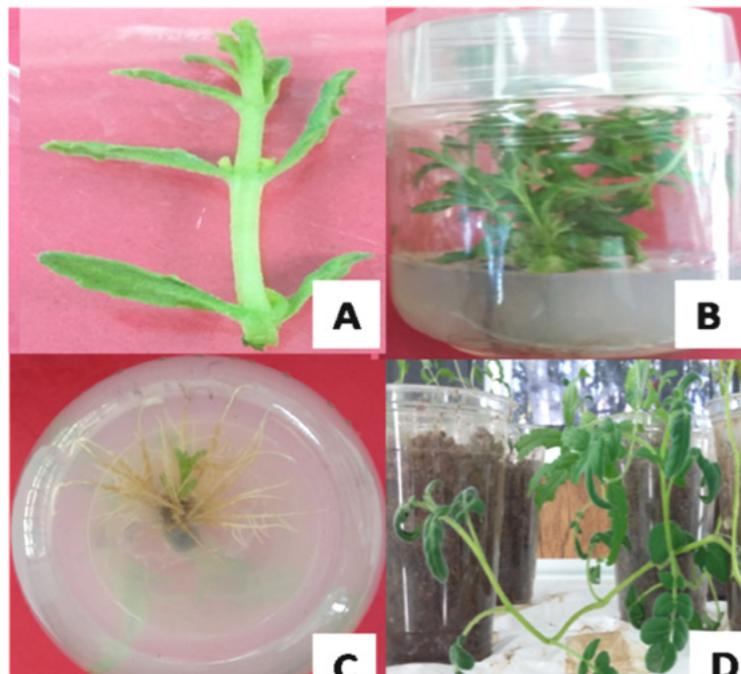
CUADRO 4.

Registro final del número de raíces

Tratamiento	Estimación del número de raíces de las vitroplantas/repetición														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MS 1X	14	6	0	6	1	0	10	2	0	6	2	4	0	8	2
MS 0.5X	4	5	0	0	8	0	15	2	5	8	4	10	5	5	5
MS 1X+ 0.5 AIB	20	20	10	2	10	15	10	10	10	15	12	16	3	15	3
MS 1X+CA	4	3	4	3	5	3	4	5	3	3	4	4	6	4	3

FIGURA 1.

Obtención de plantas de *B. scordioides in vitro* y aclimatación. En A, explantes para la etapa de multiplicación; en B, tratamiento con RCV que generó la mayor cantidad de brotes (T9). En C, tratamiento que generó la mayor cantidad de raíces. En D, plantas de *B. scordioides* aclimatada a las 8 semanas.



Es conveniente señalar, que las plántulas que se confrontaron a Pb a todas las concentraciones, lograron sobrevivir; mientras que, las que se confrontaron a Hg y As, no lo lograron a ninguna de las concentraciones experimentadas. Lo anterior, puede deberse a que las plantas bajo condiciones *in vitro*, no encienden ciertos mecanismos moleculares que le permitan soportar estas condiciones de estrés, tales como la expresión de proteínas entre las que encontramos metalotioneínas, fitoquelatinas, ATPasas de metales pesados, etc., que participan en soportar altas concentraciones de algunos MPs (Barceló & Poschenrieder, 1992). Sin embargo, en condiciones naturales estos mecanismos pueden estar presentes en la planta debido al clima, las condiciones del suelo, la presencia de microorganismos, etc. (Ramakrishna and Ravishankar, 2011)

En el cuadro 5 se puede observar la concentración de Pb que absorbieron las plantas de *B. scordioides*, mientras que en el cuadro 6 se muestra el porcentaje de Pb en los diferentes tejidos.

Se observa que tanto a 200 ppm como para 400 ppm y 600 ppm, la planta presenta un mayor porcentaje de Pb en la raíz. En hoja, el mayor porcentaje se obtuvo cuando se le confrontó a la planta a 400 ppm. Si comparamos estos resultados con lo que obtuvimos en el tallo, aquí se muestra menos concentración de Pb.

	ppm		
Concentración de Pb inicial	200	400	600
Concentración de Pb en el medio MS	148.73	224.69	244.09
Concentración que absorbió la planta	51.27	175.31	355.91

CUADRO 5.

Concentración promedio de Pb acumulado en las plantas de *B. scordioides* a las 8 semanas

De acuerdo con estos resultados, la mayor acumulación de Pb en las raíces puede atribuirse a la formación de complejos entre ellos y grupos sulfhidrilo de las proteínas a nivel celular, lo cual resulta en menor transporte de los MPs a las partes aéreas (Hall, 2002). Se considera que en plantas, el Pb se acumula principalmente en las raíces, siendo muy baja la fracción transportada hacia la parte aérea. Sin embargo, estos resultados sugieren que aunque hay mayor concentración del metal en raíz, también se presenta alta la concentración en hoja (Rotkittikhun *et al.*, 2006). Con esto podemos decir que *B. scordioides* es una especie que puede ser usada para fines de fitorremediación para remover, reducir o estabilizar contaminantes, como Pb. En la cuadro 7, se muestran los valores del FBC y del FT en los diferentes tejidos de la planta.

Concentración ppm	0	200	400	600
Porcentajes	0	%	%	%
Concentración de Pb en tallo	0	14.72	8.67	5.99
Concentración de Pb en hoja	0	36.08	42.78	41.19
Concentración de Pb en raíz	0	49.18	48.54	52.81

CUADRO 6.

Porcentaje de Pb cuantificado en los tejidos de vitroplantas de *B. scordioides*

CUADRO 7.

FBC y de FT de *B. scordioides* *in vitro*, en presencia de diversas concentraciones de Pb

Concentración inicial de Pb (ppm)	200	400	600
FBC	4.4	9.3	6
FT	1	1.1	0.89

C O N C L U S I O N E S

1. *B. scordioides* es una especie que puede sobrevivir *in vitro* a concentración hasta 50% superior de Pb, a la máxima permitida por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

2. *B. scordioides* es una planta que puede ser usada en la fitorremediación (fitoextracción) en suelos contaminados con Pb, dado su alto valor en el FBC (9.3) y FT (1.1), a concentraciones elevadas (400 ppm) de este elemento contaminante.

R E F E R E N C I A S

- BARCELÓ, J. and Poschenriede, Ch. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo Planta*, 2:345-361, 1992.
- HALL, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366), pp. 1-11.
- MA, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y. and Kennelley, E.D. (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409: 579. Macmillan Magazines Ltd.
- MEJÍA, J., Carrizales, L., Rodríguez, V.M., Jiménez-Capdeville, M.E. and Díaz-Barriga, F. (1999) Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Pùb. Mex.* 41(Supl. 2): S132-S140.
- MORENO, F.N., C. W. N. Anderson, R. B. Stewart, and B. H. Robinson. (2008). Phytoremediation of mercury-contaminated water: volatilisation and plant-accumulation aspects, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 62, 78-85.
- MULLIGAN, C. N. (2001). An overview of in situ bioremediation processes. Proceedings of the 29th Annual Conference of the Canadian Society for Civil Engineering. Victoria, BC, May 30-June 2. Montreal, PQ: Canadian Society of Civil Engineering.
- MURASHIGE, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- LASAT, M. (2000). Phytoremediation of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *J. Hazard Subst Res* 2, 1-25.

OLIVARES, E. y Peña E. (2009). Bioconcentración de elementos minerales en *Amaranthus dubius* (bledo, pira), creciendo silvestre en cultivos del estado miranda, Venezuela, y utilizado en alimentación. *Interciencia*. 34: 604-611.

PÉREZ Molphe Balch, E.G.; Ramírez Malagón, R.; Núñez Palenius, H. G. y N. Ochoa Alejo. (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. 1ra. Ed. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

RAMAKRISHNA A. and Ravishankar GA. (2011). Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 1720-1731.

ROTKITTIKHUN, P., M. Kruatrachue, R. Chaiyarat, C.Ngersansaruay, A.J.M. Baker. (2006). Uptake and accumulation of lead by plants from the Bo Ngam lead mine area in Thailand. *Environmental Pollution*. 144, 681-688.

SALAS-LUÉVANO, M.A., Manzanares-Acuña, E., Letechipía-de León, C. and Vega-Carrillo, H.R. (2009) Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian J. Exp. Sci.* 23, 27-32.

ZHANG, X.H.; Lin, A. J.; Chen, B. D.; Wang, Y. S.; Smith, S. E. and Smith, F. A. (2006). Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. *J. Environ. Sci.* 18: 721-726.

Z