

CAPACIDAD DE ACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN CALLOS Y RESPUESTAS MORFOGÉNICAS IN VITRO DE SESBANIA PUNICEA Y SESBANIA VIRGATA: OPORTUNIDADES PARA LA FITORREMEDIACIÓN

Valenti, M.a*, Gonzalez, M. A.b, Ruscitti, M.b

aCentro Experimental de Propagación Vegetativa (LIMAD), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, ARGENTINA.

bInstituto de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (INFIVE-CCT-La Plata), ARGENTINA.

*e-mail: melinavalentimarone@gmail.com

INTRODUCCIÓN

CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS CU Y ZN
 Los metales pesados (MP) se acumulan en los ecosistemas afectando la estabilidad ecológica.

SALUD EDÁFICA

El suelo se ve afectado en sus propiedades:

Físicas: desestabilizando agregados e induciendo la constricción del suelo.

Químicas: aumentando el pH y generando competencia entre nutrientes.

Biológicas: inhibiendo actividad microbiana al reducir su biomasa, afectando el ciclo de nutrientes y la fertilidad edáfica.

SALUD HUMANA

La exposición prolongada a Cu y Zn puede causar daño neurológico, renal y óseo entre otras patologías graves.

FITORREMEDIACIÓN: SOLUCIÓN SOSTENIBLE

Tecnología "verde" que utiliza plantas, idealmente especies nativas, para rehabilitar ambientes contaminados.

Alternativa económica y ecológica frente a métodos tradicionales costosos e invasivos.



SESBANIA

Se han documentado especies del género *Sesbania* como ventajosas para la fitorremediación debido a su rápido establecimiento, notable tolerancia a la anoxia y a la toxicidad por MP. Tolerancia y supervivencia en áreas con altas concentraciones de Cu e hiperacumuladora de Pb.

CULTIVO IN VITRO

El cultivo *in vitro*, permite a través de la variación somaclonal, inducir la tolerancia de ciertas especies a metales pesados en ambientes controlados, con el objetivo de poder obtener individuos potencialmente Fitomejorados, los cuales podrán ser utilizados en programas de Fitorremediación de suelos degradados por la contaminación de MP.



MATERIALES Y MÉTODOS

1) OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN DE CALLOS DE SESBANIA PUNICEA Y SESBANIA VIRGATA

Tratamiento pregerminativo y desinfección de semillas: Escarificación mecánica. Desinfección superficial: alcohol al 70% (1'); hipoclorito de sodio al 40% (30'). Enjuague.

Establecimiento de cultivos in vitro: Siembra en condiciones controladas de pH, T°, fotoperiodo e irradiancia, en medio de cultivo de aislamiento estéril: agua, sacarosa y agar.

Selección de explantes y medios de cultivo: Siembra de explantes cotiledones y segmentos de epicótilo. Medios de cultivo: (Murashige & Skoog) enriquecidos con diversas combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal: ácido naftalén acético (NAA) (0-0,5-1-mg L⁻¹) y bencil amino purina (BAP) (1-1,5 mg L⁻¹). Tiempo de exposición 90 días.

Evaluación de respuestas morfogénicas in vitro: Sistema de categorización para evaluar crecimiento, viabilidad, morfología organogénesis.

2) EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE LOS CALLOS CULTIVADOS EN MEDIOS ENRIQUECIDOS CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE MP

Cultivo de callos en presencia de MP: Cu (0,063; 0,63 y 6,3 ppm) y Zn (19,5; 195 y 1950 ppm). Tiempo de exposición 100 días.

Monitoreo de crecimiento y respuesta al estrés inducido a través de la exposición de los callos a concentraciones crecientes de MP: Cuantificación del diámetro a través del análisis de imágenes fotográficas con software de procesamiento de imágenes (Fiji), al día 1, día 60 y día 100.

3) CUANTIFICACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE MP EN LOS CALLOS GENERADOS

Evaluación cuantitativa del crecimiento del callo por peso seco (PS): La mitad de los tratamientos se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 80°C hasta alcanzar peso cte. Se determinó el PS (indicador cuantitativo de la biomasa acumulada). 1) PS < testigo: toxicidad. 2) PS ≈ testigo: tolerancia. 3) PS > testigo: efecto hormético (estimulación/beneficio). ANOVA. Tukey (p > 0,05)

Digestión Ácida y Cuantificación de MP: Espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro Shimadzu AA6650F (Japón)). (mg de MP/kg de material seco). ANOVA. Tukey (p > 0,05)

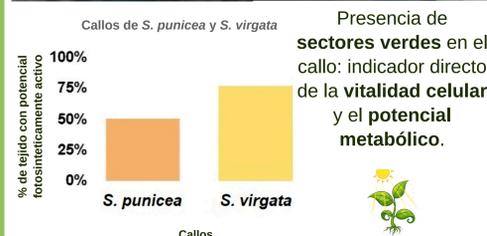
4) REGENERACIÓN DE LÍNEAS TOLERANTES A MP A PARTIR DE LOS CALLOS QUE HAYAN ACUMULADO DICHS MP

Regeneración de Líneas Tolerantes a MP: Medio de cultivo Murashige & Skoog, enriquecidos con diversas combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal: NAA (0-0,5 mg L⁻¹) y BAP (0-1-1,5-2-2,5 mg L⁻¹). Tiempo de exposición 360 días.

RESULTADOS

1) PRODUCCIÓN DE CALLOS

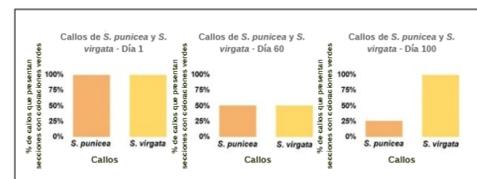
100% DE EXPLANTES DESARROLLARON MASAS CALLOSAS EN TODAS LAS CONDICIONES EVALUADAS, DESTACÁNDOSE LA COMBINACIÓN NAA 1 MG L⁻¹ Y BAP 1 MG L⁻¹.



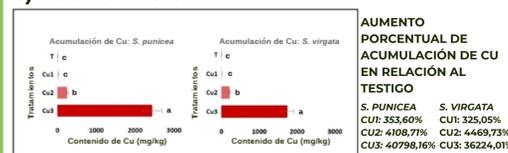
Crecimiento: tamaños Mediano/Muy Grande.
Viabilidad: intermedia.
Potencial fotosintético: pequeñas secciones de tejido color verde.
Organogénesis: Todos los explantes diferenciaron brotes.

2) CALLOS SUBCULTIVADOS EN MP

DÍA 1: 100% DE CALLOS PRESENTARON SECCIONES VERDES EN AMBAS ESPECIES.
DÍA 60: 50% DE CALLOS PRESENTARON SECCIONES VERDES EN AMBAS ESPECIES.
DÍA 100: 25% DE CALLOS PRESENTARON SECCIONES VERDES EN *S. PUNICEA*. 100% DE CALLOS PRESENTARON SECCIONES VERDES EN *S. VIRGATA*.



3) ACUMULACIÓN DE MP



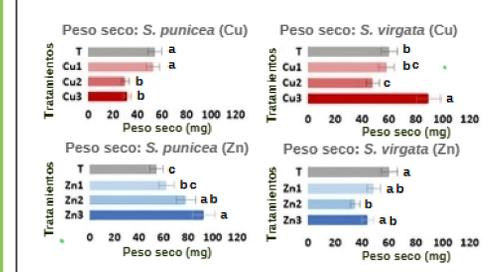
AUMENTO PORCENTUAL DE ACUMULACIÓN DE CU EN RELACIÓN AL TESTIGO

S. PUNICEA
 CU1: 353,60%
 CU2: 4108,77%
 CU3: 40798,16%

S. VIRGATA
 CU1: 325,05%
 CU2: 4469,73%
 CU3: 36224,01%

SE OBSERVÓ UN AUMENTO PORCENTUAL DE ACUMULACIÓN DE CU Y ZN EN RELACIÓN AL TESTIGO DOSIS-DEPENDIENTE PARA AMBAS ESPECIES.

VARIACIÓN PORCENTUAL DEL PS EN FUNCIÓN DEL TESTIGO



S. PUNICEA
 CU1: 2,56%
 CU2: 44,38%
 CU3: 41,59%
 ZN1: 15,21%
 ZN2: 44,25%
 ZN3: 71,12%

S. VIRGATA
 CU1: 3,32%
 CU2: 20,33%
 CU3: 48,56%
 ZN1: 19,10%
 ZN2: 41,92%
 ZN3: 26,42%

Rojo: disminución del peso seco, se asocia con toxicidad.
 Verde: aumento del peso seco, se asocia con efecto hormético.

4) REGENERACIÓN DE LINEAS TOLERANTES

DEBIDO A QUE *S. VIRGATA* PRESENTÓ AUMENTO CONSIDERABLE DE SECCIONES VERDES, MORFOLOGÍA COMPACTA, MAYOR CRECIMIENTO Y MAYOR CAPACIDAD ORGANOGÉNICA, SE CONTINUÓ HACIA LA INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS SOLO CON DICHA ESPECIE.

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS ESPECÍFICAS: RIZOGÉNESIS

Diferenciación de estructuras radicales: callo de *S. virgata* que había sido expuesto a una concentración de cobre 0,063 ppm.

Diferenciación de estructuras radicales: callo de *S. virgata* que había sido expuesto a una concentración de cobre 6,3 ppm.

CONCLUSIÓN

Optimización de protocolo de desinfección y germinación para *S. punicea* y *S. virgata* (100% de eficiencia germinativa garantizando la disponibilidad del material estéril).

Inducción exitosa de masas callosas a partir de explantes de cotiledones y epicótilos en ambas sp. (proporción equimolar (1 mg L⁻¹) de NAA y BAP).

Validación del potencial intrínseco de estas especies para la fitorremediación, gracias a su capacidad para acumular Cu y Zn en sus masas callosas, en forma dosis-dependiente.

Inducción de rizogénesis a partir de callos de *S. virgata* incluso en altas concentraciones de MP.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Fitomejoramiento: Los resultados establecen las bases para el fitomejoramiento de líneas más eficientes y futuras investigaciones en la regeneración de plantas tolerantes a metales pesados.

Continuar investigando la regeneración completa de *Sesbania* a partir de callos sometidos a estrés por MP. Campo con gran potencial de investigación. Finalmente poder evaluar a campo la capacidad de tolerancia a metales pesados a partir de individuos regenerados.