

PRIMERA EVIDENCIA DE TOLERANCIA A METALES A TRAVÉS DE FITOQUELATINAS Y MONOTIOLES EN PLANTAS DE MARISMAS

Negrin, V.L.^a, Teixeira, B.^b, Mendes Godinho, R.^b,
Mendes, R.^b, Vale, C.^{b,c}

^aIADO (Instituto Argentino de Oceanografía)-CONICET, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, ^bIPMA (Instituto Português do Mar e da Atmosfera), Lisboa, Portugal, ^cCIIMAR (Centro Interdisciplinar De Investigação Marinha E Ambiental), Porto, Portugal

vlnegrin@criba.edu.ar

Introducción

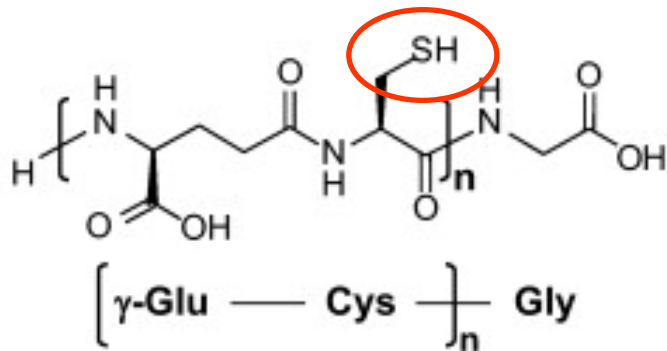
Las plantas de marismas suelen acumular metales en sus tejidos, aunque estos elementos en niveles tóxicos producen diferentes efectos deletéreos (alteración de la ultraestructura de cloroplastos, inactivación de enzimas, etc.)

Las plantas que acumulan metales en sus tejidos presentan alguna/s de estas estrategias para lidiar con este estrés (Anjum et al., 2014)

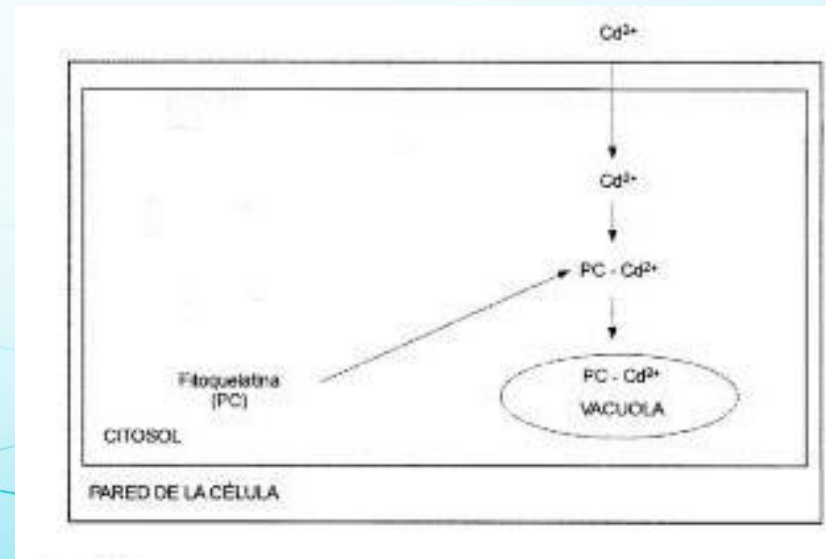
- Acumulación de metales principalmente en tejidos subterráneos (mayoría de las especies de marismas)
- Inmovilización de metales en la pared celular (*Halimione portulacoides*, *Sarcocornia perennis*)
- Síntesis de diferentes tioles (compuestos ricos en cisteína), como las fitoquelatinas

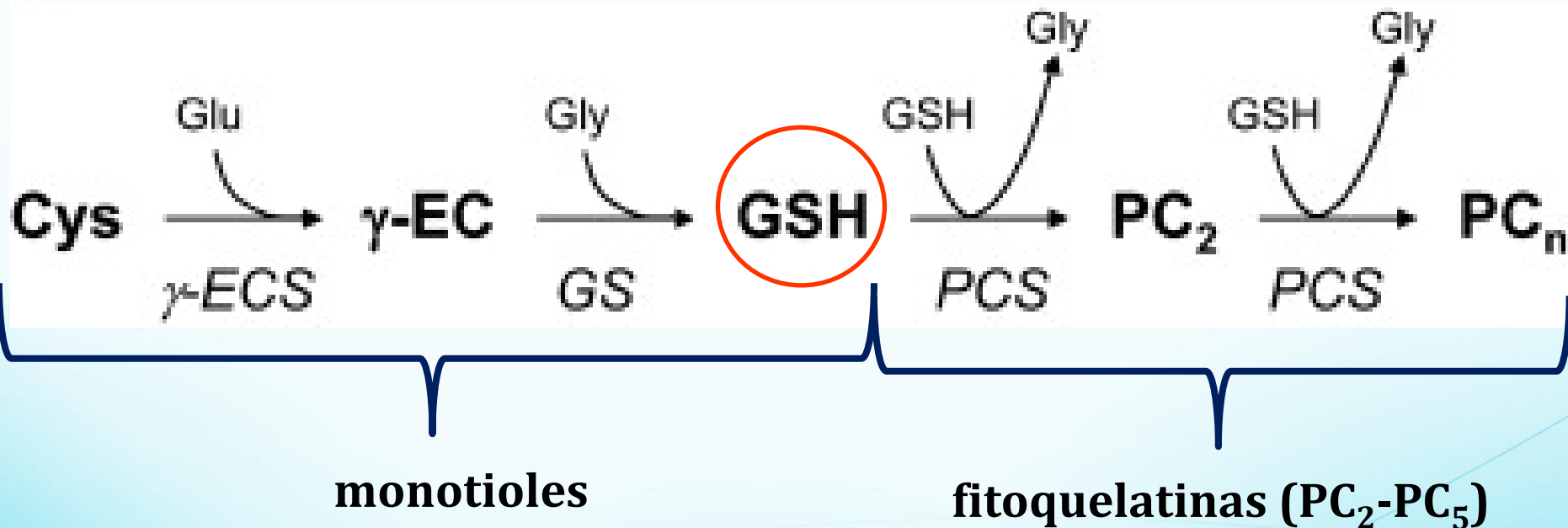
¿Qué son las fitoquelatinas (PCs)?

- Son politioles que tienen la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n es generalmente entre 2 y 5 ($\text{PC}_2\text{-PC}_5$)
- Son sintetizadas a partir del glutatión (GSH) por la enzima PC sintasa (PCS), que se activa con distintos metales y metaloides, especialmente Cd y As



(Cobbert & Goldsbrough, 2002)





El glutati3n (GSH) y sus precursores (ciste3na (Cys) y γ -glutamylcisteina (γ -EC)) est3n relacionados con la tolerancia a condiciones ambientales estresantes, inclu3da la contaminaci3n por metales (Anjum et al., 2014).

La síntesis de monotioles (GSH, Cys, γ -EC) y PCs se ha reportado en diversas especies de algas y plantas, generalmente en condiciones de cultivo, pero que no hemos encontrados estudios de estos compuestos en plantas de marismas



Objetivo: estudiar la síntesis de compuestos con tioles (monotioles y PCs) en dos marismas portuguesas con diferente grado de contaminación por metales

Amplitud Marea: 1-2 m
Eutrófico
Nivel de metales: moderado



Área de estudio



Amplitud Marea: 1-4m
300 km² en marea baja
Nivel de metales: alto



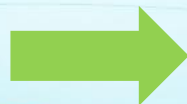
Rosário

Halimione portulacoides
Sarcocornia perennis
Spartina maritima



Óbidos

H.portulacoides
S.perennis





*Halimolobos
portulacastris*



*Sarcocornia
perennis*



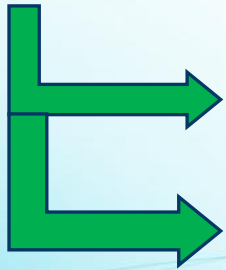
Spartina maritima

Metodología

- Muestreo: octubre 2014
- Separación de tejidos aéreos (hojas para *H.portulacoides* y *S. maritima* y tallos carnosos para *S. perennis*) y subterráneos (raíces)
- *S. maritima*: separación en raíces grandes (> 1mm de diámetro) y pequeñas (<1mm de diámetro)
- Inmediato lavado y congelamiento de las plantas (- 80° C)
- Extracción de tioles: según Akhter et al. (2012).
- Separación y cuantificación de tioles: derivatización con mBBr (monobromobimano) + HPLC con detector de fluorescencia (Minocha et al. , 2008)

Resultados y discusión

- Se detectaron monotoles y PCs en todas las especies y tejidos en ambas marismas
- Comparando con los valores reportados en un ambiente natural impactado (minería en México; Machado-Estrada et al., 2013)

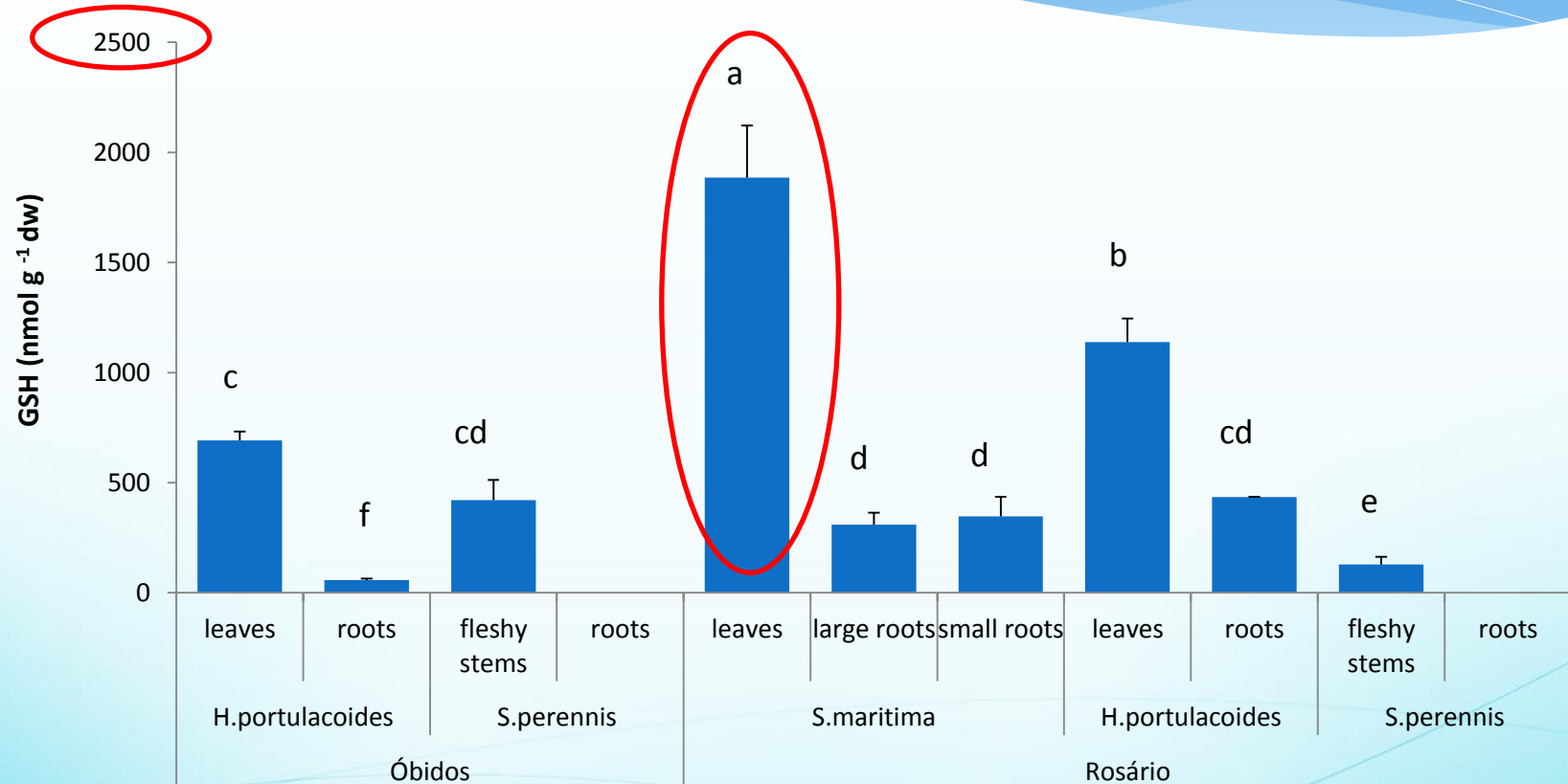


Valores de monotoles similares

En general menores valores de PCs

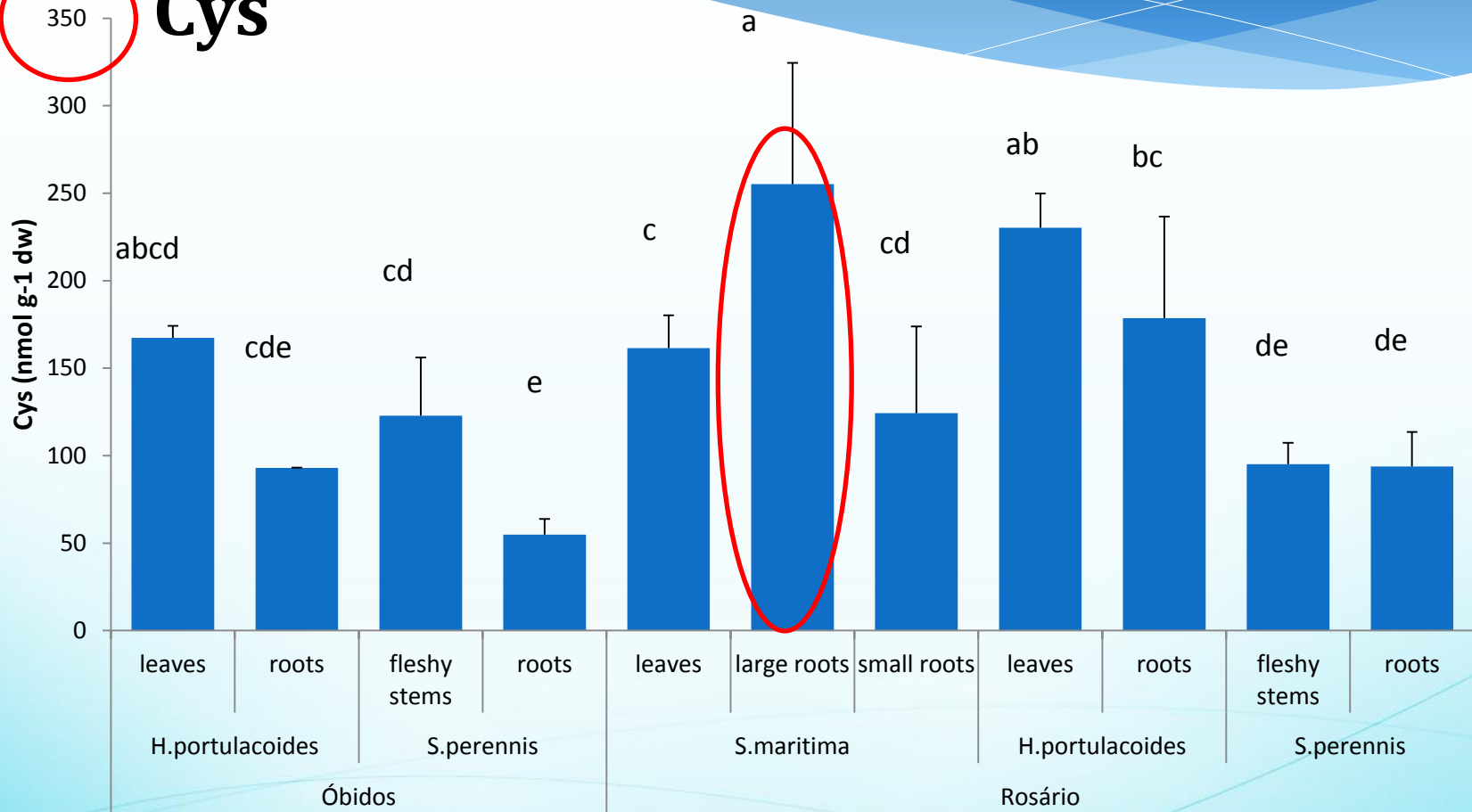
Marisma	Especie	Tejido	Monotioles totales (nmol g ⁻¹ dw)	PCs totales (nmol g ⁻¹ dw)
Óbidos	<i>H.portulacoides</i>	Hojas*	859,3±47,4	184,3±83,6
		Raíces*	150,9±6,13	83,41±7,46
	<i>S.perennis</i>	Tallos*	524,10±101	306,0±11,4
		Raíces *	54,79 ±9,02	28,19±2,57
Rosário	<i>S.maritima</i>	Hojas *	2246±259,7	382,3±81,1
		Raíces grandes*	782,8±98,4	619,3±47,2
		Raíces pequeñas*	680,4±155	346,4±72,1
	<i>H.portulacoides</i>	Hojas*	1461±134	212,2±33,8
		Raíces ns	315,9±276	131,7±44
	<i>S.perennis</i>	Tallos ns	183,7±60,9	189,6±98,3
		Raíces ns	93,83±19,8	78.92±23,3

GSH



La concentración de GSH fue mayor en tejidos aéreos, lo cual puede estar relacionado con el mayor estrés ambiental al cual están sometidas las partes aéreas (Alscher, 1989).

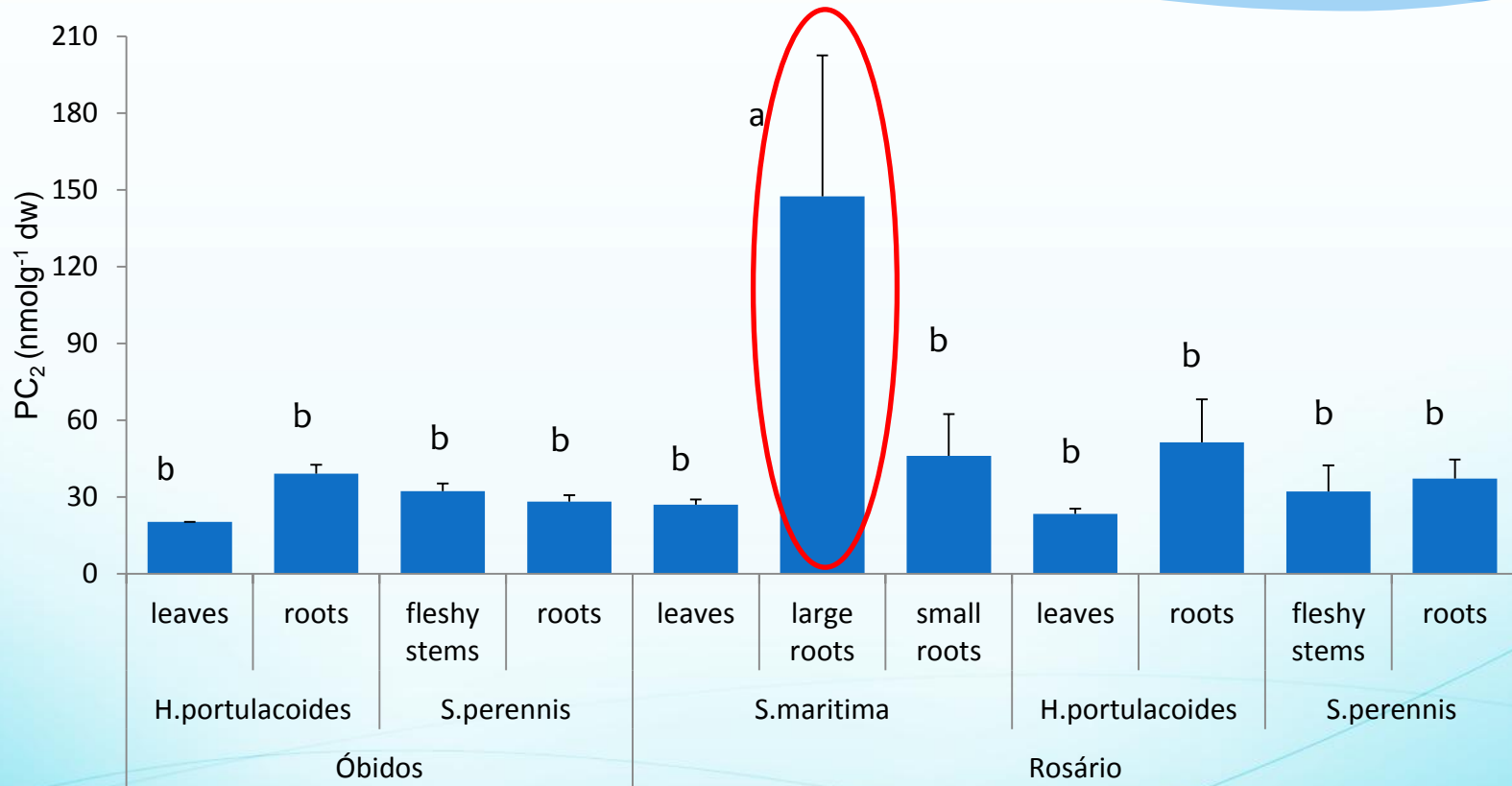
Cys



γ -EC solo fue producido por *S. maritima* y *H.portulacoides* de Rosário (tanto hojas como raíces), siendo los niveles mayores en *S.maritima*

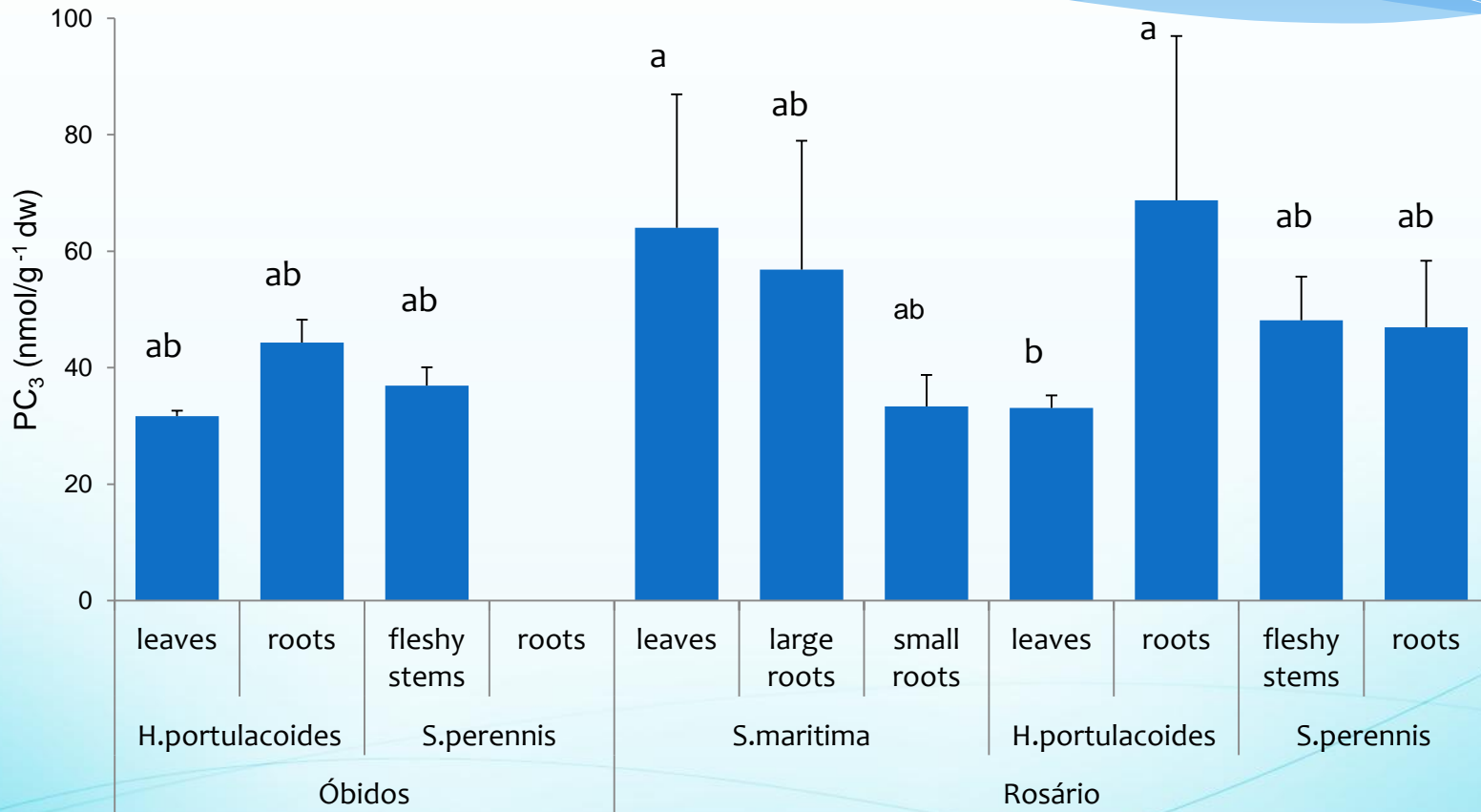
Fitoquelatinas (PCs)

PC₂

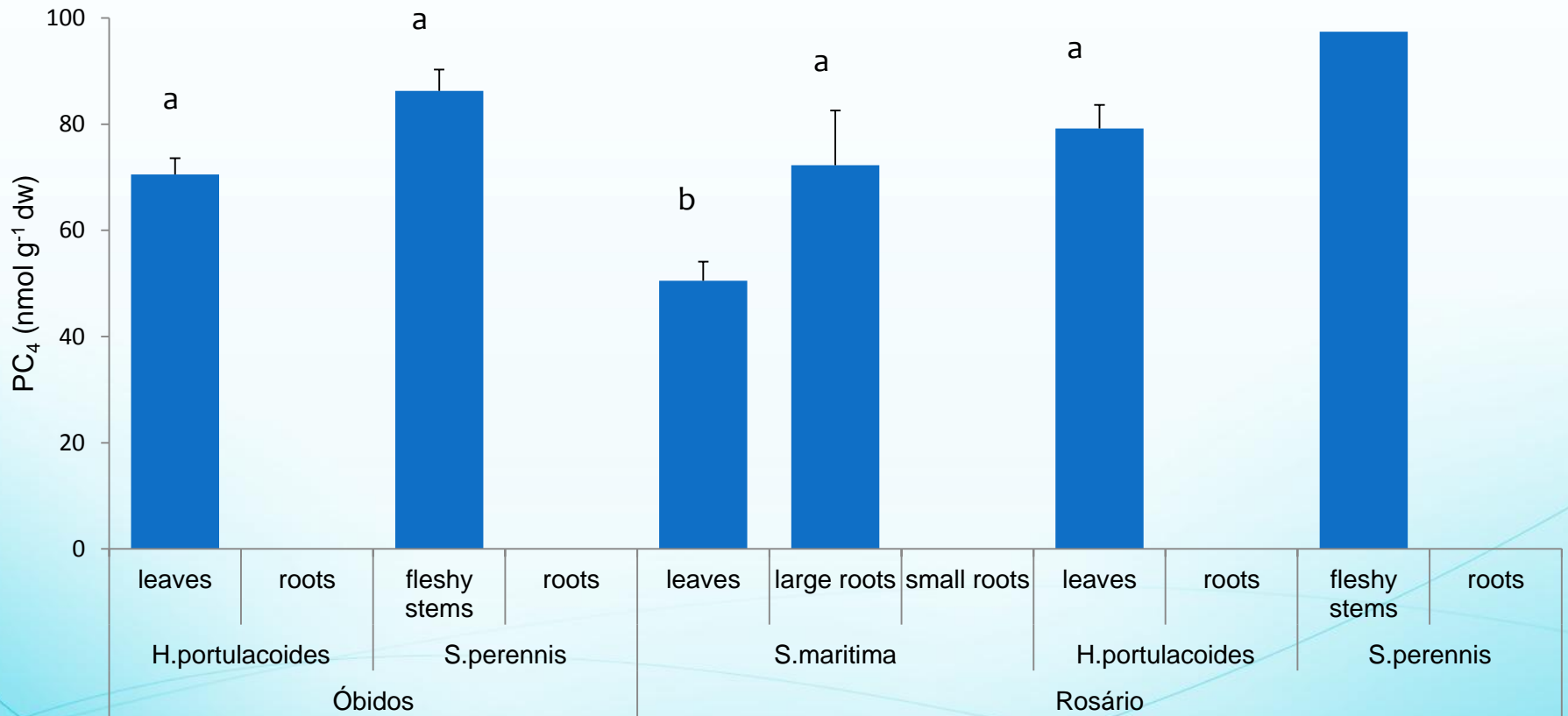


PC₂ fue sintetizada por todos los tejidos y especies de ambos sitios

PC₃

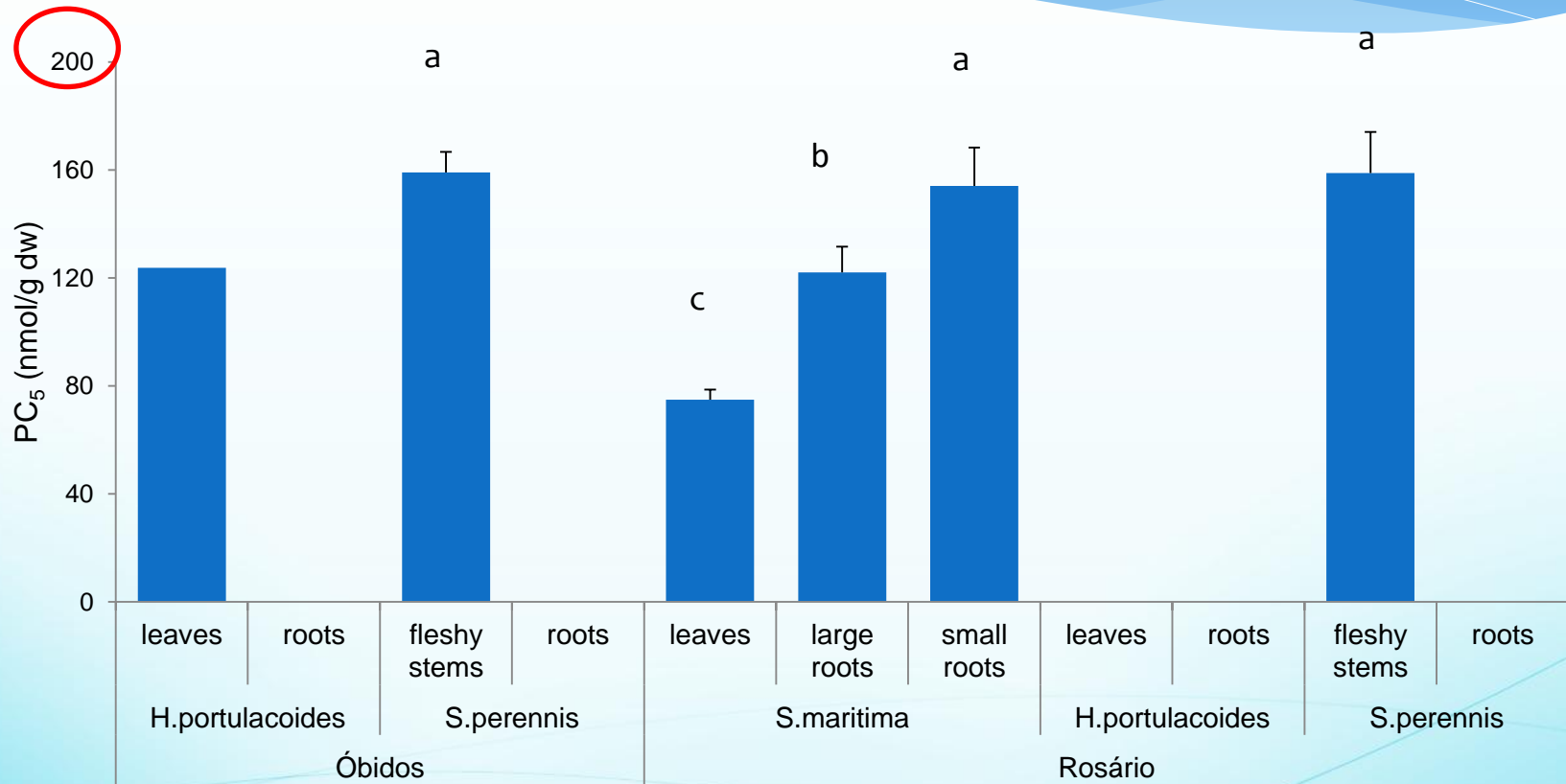


PC₄

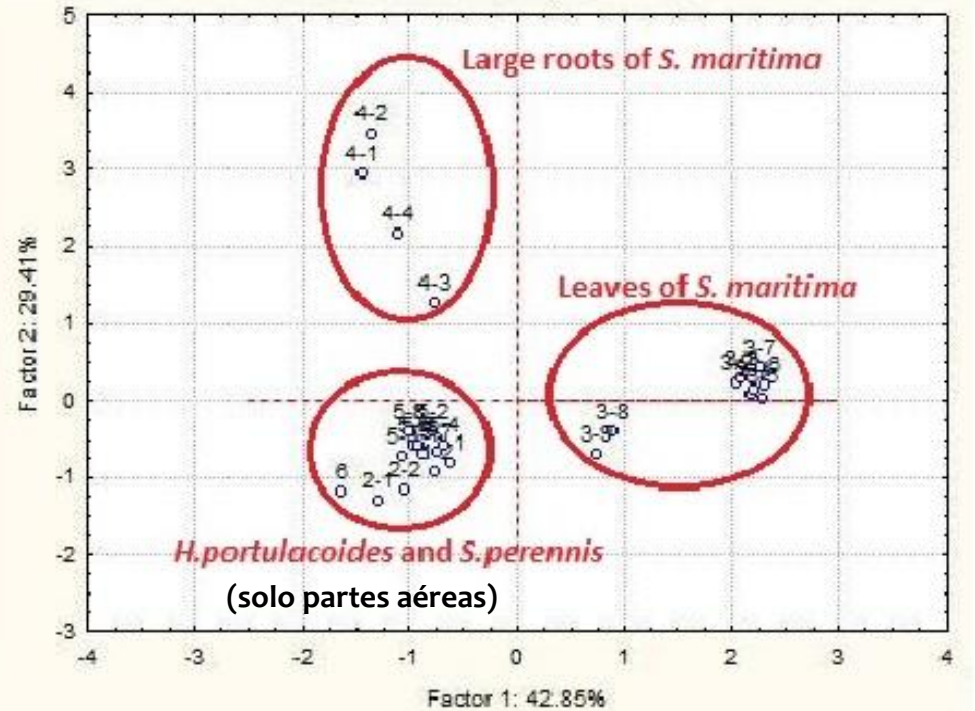
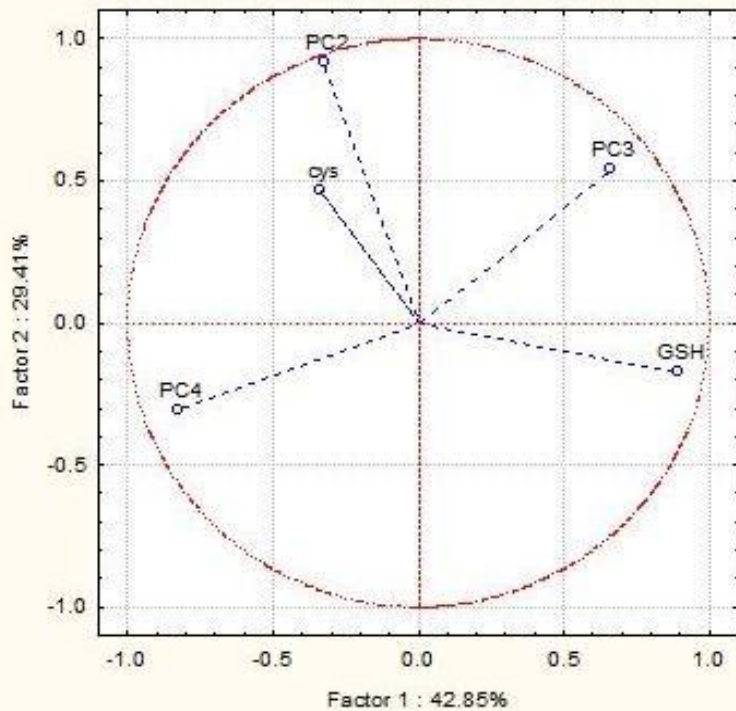


PC₄ no fue sintetizada por raíces, excepto raíces grandes de *S. maritima*

PC₅



En raíces, PC₅ solo fue detectada en *S. maritima*



Las raíces grandes de *S.maritima* se caracterizan por la alta concentración de PC₂ lo cuales es consistente con los altos valores de metales en las raíces de esta especie (Duarte et al., 2010)

Las hojas de *S. maritima* poseen altos niveles de GSH y PC₃

Conclusiones

- Se demostró la síntesis de monotioles y PCs por plantas de marismas
- *S. maritima* fue la especie con los niveles más altos de tioles
- Las raíces de *S. maritima* mostraron las concentraciones más altas de PCs
- *H. portulacoides* también presentó altos niveles de GSH y Cys , pero sólo en Rosário.
- Aunque en menores valores que en Rosário, en Óbidos se detectaron casi todos los tioles estudiados

¡Muchas gracias!



Bibliografía

Akhter, M. F., McGarvey, B., Macfie, S. M. 2012. Reduced translocation of cadmium from roots is associated with increased production of phytochelatins and their precursors. *J. Plant Physiol.* 169 (18), 1821-1829

Anjum, N. A., Ahmad, I., Válega, M., Mohmood, I., Gill, S. S., Tuteja, N., Duarte, A.C, Pereira, E. 2014. Salt marsh halophyte services to metal-metalloid remediation: Assessment of the processes and underlying mechanisms., *Crit Rev Env Sci Tech* 44 (18), 2038-2106

Alscher, R.G., 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* 77, 457-464

Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol* 53(1), 159-182

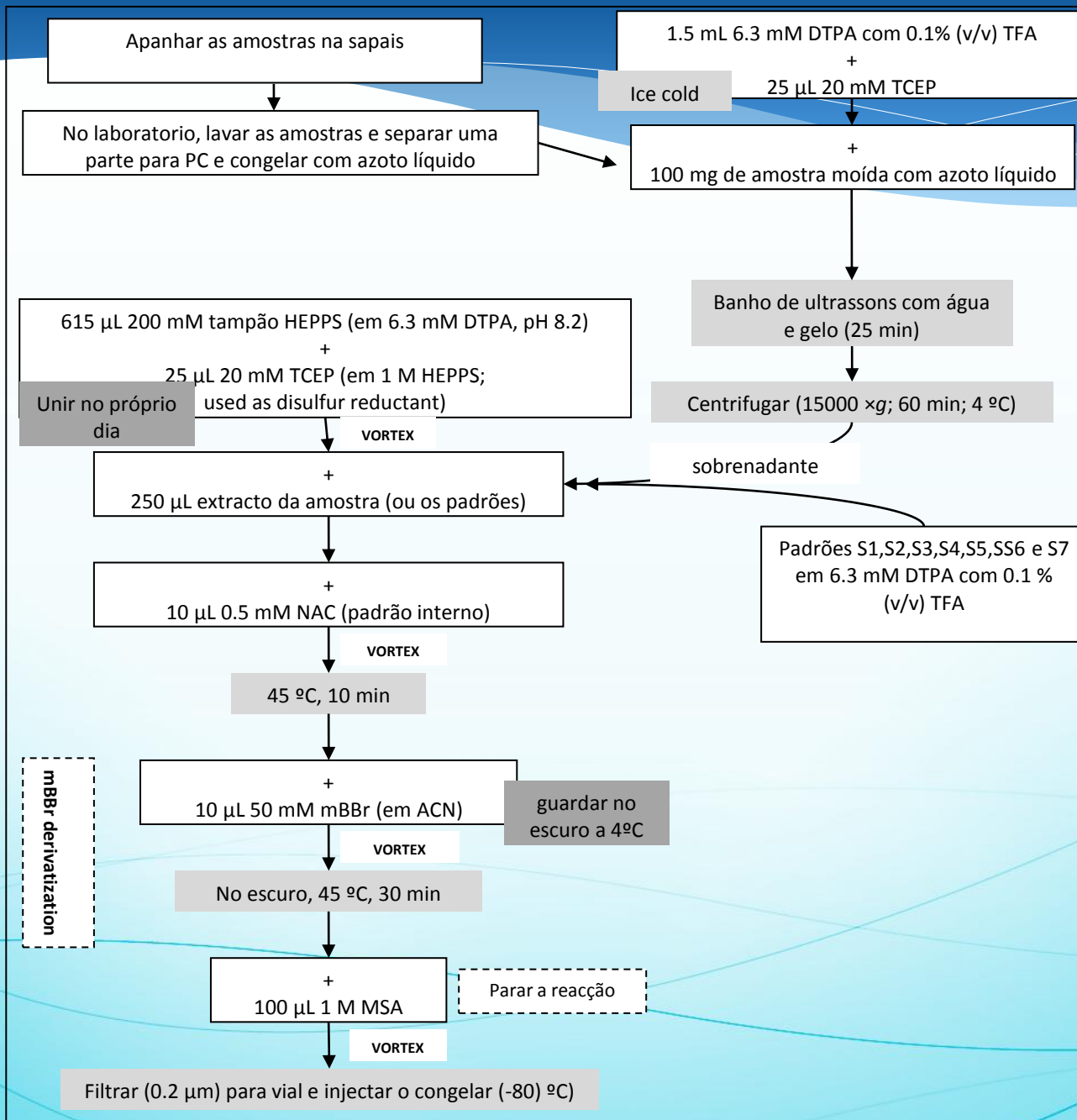
Duarte, B., Caetano, M., Almeida, P. R., Vale, C., Caçador, I., 2010. Accumulation and biological cycling of heavy metal in four salt marsh species, from Tagus estuary (Portugal). *Environ.Pollut* 158(5), 1661-1668.

Machado-Estrada, B., Calderón, J., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Zavala, J.S., 2013. Accumulation of arsenic, lead, copper, and zinc, and synthesis of phytochelatins by indigenous plants of a mining impacted area. *Environ Sci Pollut Res* 20(6), 3946-3955.

Minocha, R., Thangavel, P., Dhankher, O. P., Long, S. 2008. Separation and quantification of monothiols and phytochelatins from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1207, 72-83.

- 1) molienda de la muestra en nitrógeno líquido inmediatamente antes de la extracción
- 2) extracción de tioles con buffers ácidos y baño ultrasonido
- 3) centrifugación
- 4) agregado de estándar interno (NAC: N-acetyl-l-cisteina)
- 5) derivatización con mBBr (monobromobimano), en baño de agua a 45 °C en oscuridad
- 6) finalización de la reacción con el agregado de MSA (methanesulfonic acid)
- 7) filtrado de las muestras (con filtros de 0.2 µm)
- 8) inyección en HPLC (con detector de fluorescencia), donde también se procesan los correspondientes estándares y los blancos
- 9) Cálculo del contenido de tioles en peso seco de la planta, basado en previo análisis del contenido de humedad





Ecotoxicology (2013) 22:1403–1412
DOI 10.1007/s10646-013-1126-1

Effect of Hg, As and Pb on biomass production, photosynthetic rate, nutrients uptake and phytochelatin induction in *Pfaffia glomerata*

D. K. Gupta · H. G. Huang · F. T. Nicoloso ·
M. R. Schetinger · J. G. Farias · T. Q. Li ·
B. H. N. Razafindrabe · N. Aryal · M. Inouhe

Plant Cell Tiss Organ Cult (2007) 88:201–216
DOI 10.1007/s11240-006-9192-1

ORIGINAL PAPER

Changes in phytochelatins and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress

P. Thangavel · Stephanie Long ·
Rakesh Minocha

Available online at www.sciencedirect.com



Plant Science 170 (2006) 471–480

Phytochelatins are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*

Winona R. Gadapati, Sheila M. Macfie *

Department of Biology, University of Western Ontario, London, Ont., Canada N6A 5B7

Received 27 September 2005; accepted 28 September 2005

Available online 25 October 2005



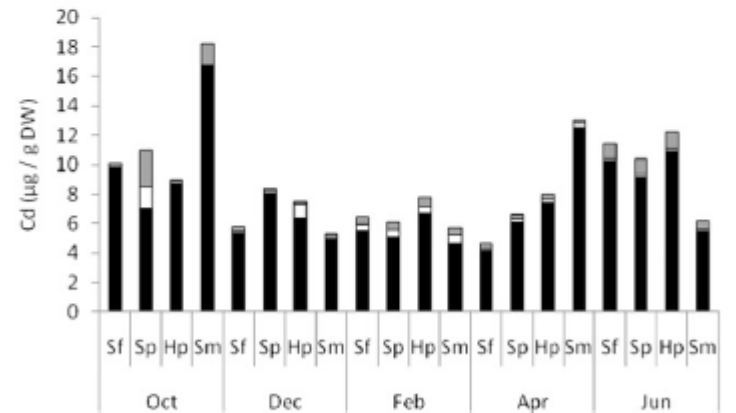
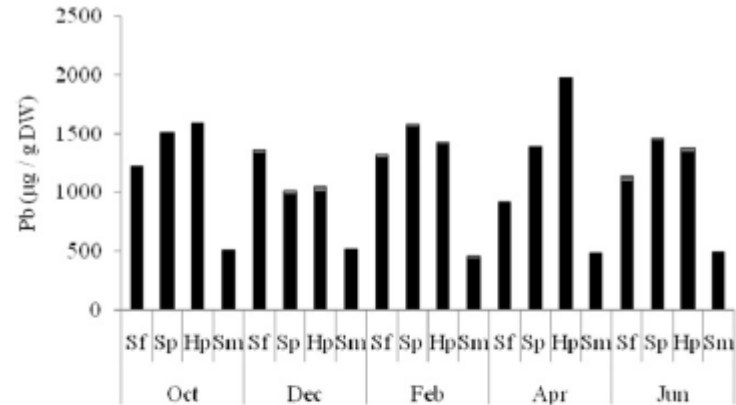
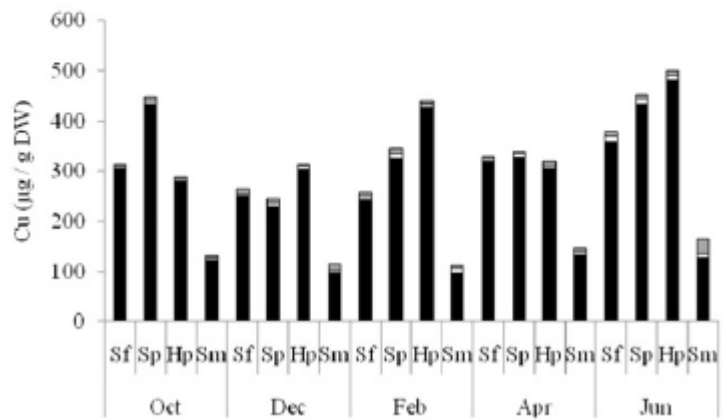
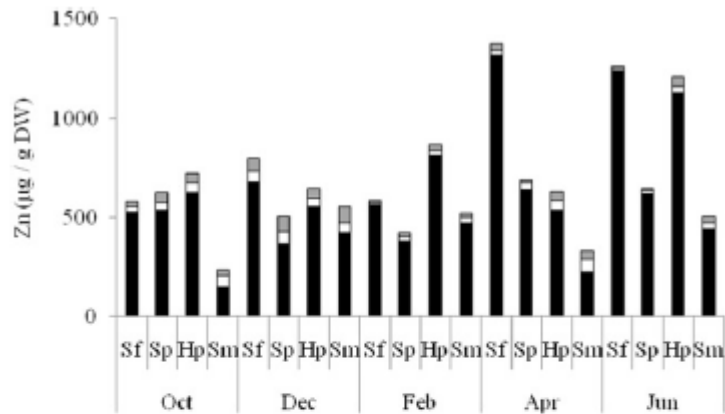
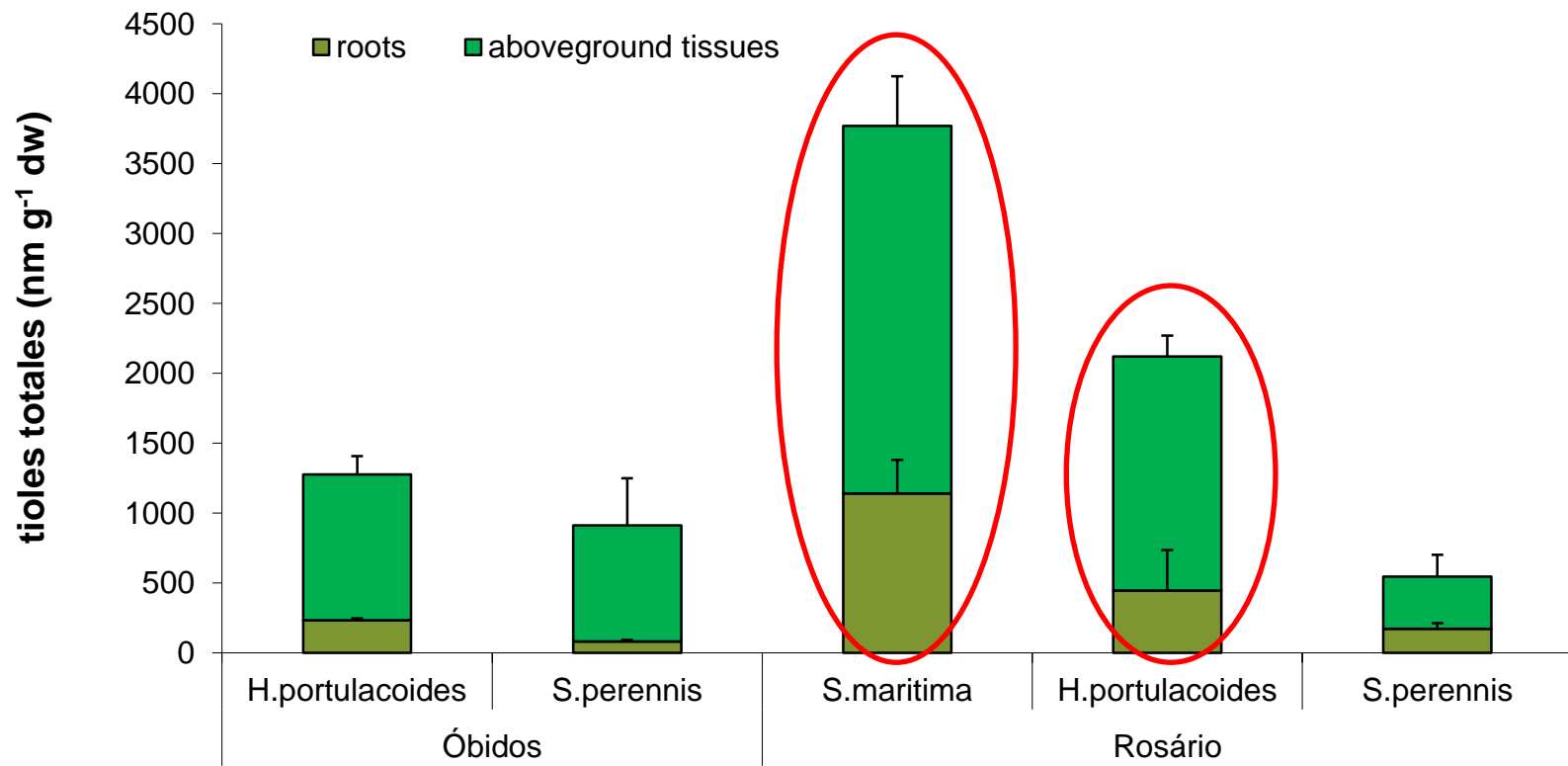


Fig. 1. Above and belowground metal accumulation values for *S. fruticososa* (Sf), *S. perennis* (Sp), *H. Portulacoides* (Hp) and *S. maritima* (Sm) measured between October 2001 and June 2002 (Roots: ■; Stems: □; Leaves: ▒).





Mayor contenido de tioles totales en tejido aéreo



Salt marsh	Species		Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Total Me
Óbidos	H.portulacoides	leaves	0,0008	0,0059	0,0398	0,0039	nd	0,0012	0,05
		roots	0,0186	0,4021	0,4082	0,0742	0,0014	0,3629	1,27
	S. perennis	fleshy stems	0,0011	0,0110	0,0388	0,0001	nd	0,0012	0,05
		roots	0,0392	0,4724	0,3818	0,0523	0,0007	0,2023	1,15
Rosário	S.maritima	leaves	0,0012	0,0056	0,0861	-0,0007	0,0001	0,0035	0,10
		Large roots	0,0171	0,3383	1,7435	0,1804	0,0094	0,6891	2,98
		small roots	0,0009	0,0063	0,0268	-0,0013	nd	0,0037	0,04
	H.portulacoides	leaves	0,0216	0,3158	1,4072	0,2457	0,0051	1,0754	3,07
		roots	0,0020	0,0051	0,0554	0,0014	nd	0,0050	0,07
	S.perennis	fleshy stems	0,0114	0,0341	0,4428	0,3900	0,0010	0,1905	1,07
		roots	0,0031	0,0093	0,1326	0,1071	0,0002	0,0419	0,29