

Análisis del crecimiento de raíces primarias y raíces laterales de *Nicotiana tabacum* L. en condiciones de estrés generado por Cr(VI)

Joel Germán Cervantes García, María Gloria Solís Guzmán, Miguel Martínez Trujillo✉

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Santiago Tapia s/n, Col. Felicitas del Río. Edificio B4, Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán, México

Resumen

Las raíces originadas a partir de la raíz primaria se denominan raíces laterales. Tanto en *A. thaliana* como en *N. tabacum* se ha observado que cuando las plantas son transferidas de medios sin metal a medios suplementados por metales pesados se generan raíces laterales nuevas, mientras que la raíz primaria se inhibe en su crecimiento. Para determinar la diferente tolerancia de las raíces primarias y laterales en *N. tabacum* al estrés generado por metales y proporcionar información inicial acerca de si la tolerancia puede ser adquirida o es innata en las raíces laterales, en este trabajo se analizó el crecimiento de las plantas en condiciones in vitro adicionando Cr(VI). Se germinaron las semillas y se dejaron crecer en medio MS sin el metal durante 5 días y posteriormente se trasplantaron a medios MS suplementados con 100 μ M o 200 μ M de Cr(VI) y como control medios MS sin el metal. Se analizó el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales a los 5 y 8 días, estas últimas de manera individual y también de manera global considerando toda la planta. Considerando los resultados de este trabajo de forma global y sus comparaciones con los que se han realizado en *Arabidopsis* en nuestro laboratorio, se puede concluir que las plantas tienen una plasticidad para adaptarse a las condiciones del estrés generado por metales pesados como el cromo y dependiendo de la especie vegetal existen variaciones en las concentraciones estimuladoras o inhibitorias del crecimiento de los tipos de raíz (primarias, laterales preexistentes y laterales nuevas), teniendo como constante que las raíces laterales nuevas son siempre más tolerantes que las primarias y las laterales preexistentes.

Abstract

Both *A. thaliana* and *N. tabacum*, generate new lateral roots and the primary root is inhibited, when the plants are transferred from metal-free medium to medium supplemented with heavy metals. To determine the difference of tolerance of primary and lateral roots in *N. tabacum* to the stress generated by metals and provide preliminary information about whether this tolerance can be acquired or it is innate in lateral roots, in this study we analyzed the growth of tobacco plants in vitro by adding Cr(VI). Seeds were germinated and grown on MS medium without the metal for 5 days and then were transplanted to MS medium with Cr(VI) 100 or 200 μ M and the control MS medium without the metal. We analyzed the growth of primary root and lateral roots at 5 and 8 days, the latter on an individual and global-handle also considering the whole plant. Considering the results of this work globally and their comparison with those in *Arabidopsis* that have been made in our laboratory, we can conclude that plants have a plasticity to adapt to stress conditions created by heavy metals such as Cr(VI) and depending on plant species there are variations in stimulatory or inhibitory concentrations of the growth of root types (primary, lateral pre-existing and new laterals), with the constant that new lateral roots are always more tolerant than existing primary and laterals.

Introducción

La raíz es uno de los órganos más importantes y adecuados para la captación de agua y nutrimentos del ambiente necesarios para la vida de la planta. La primera raíz originada de la planta se llama radícula, que es formada después de la germinación de la semilla y forma la raíz primaria. Las raíces originadas a partir de la raíz primaria se denominan raíces laterales. En condiciones normales, el crecimiento de la raíz depende de la disponibilidad del agua en el suelo, hormonas de crecimiento y nutrimentos. (Taiz y Zeiger, 2010).

Los cambios en la arquitectura de la raíz pueden afectar profundamente la capacidad de las plantas para tomar nutrimentos y agua. Existen tres procesos mayores que afectan la arquitectura del sistema radicular: a) La división celular de los

meristemos permiten un crecimiento indeterminado por adición de nuevas células a la raíz, b) La formación de raíces laterales incrementa la capacidad exploratoria y, c) La formación de pelos radicales incrementa la superficie total de raíces primarias y laterales. Las alteraciones en cualquiera de estos tres procesos pueden tener efectos profundos en la arquitectura del sistema radicular y en la capacidad de las plantas para crecer en suelos donde la disponibilidad de nutrimentos es limitada (López-Bucio *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2009). Los estudios histológicos han demostrado que en angiospermas las raíces laterales derivan de una capa interior del periciclo (McCully, 1975; Dubrovsky y Rost, 2003; Casimiro *et al.*, 2003).

Entre los factores adversos que pueden enfrentar las raíces en el suelo se encuentran concentraciones elevadas de algunos nutrimentos o de otros compuestos que no son necesarios para la nutrición de la planta. Entre estos factores se encuentra la presencia de concentraciones tóxicas de Cromo (Cr). Este elemento presenta como principales estados de oxidación

✉ Autor de correspondencia: Miguel Martínez Trujillo, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Santiago Tapia s/n, Col. Felicitas del Río. Edificio B4, Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán, México. email: codigogenetico@gmail.com, Tel. +52 (443) 3223500 ext. 4224

el Cr(VI), considerado muy tóxico por su alta movilidad y normalmente aparece asociado con oxígeno, como cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). El Cr(III) es bastante tóxico aunque poco móvil y es principalmente encontrado junto a materia orgánica en suelos y medios acuáticos. (Katz y Salem, 1993).

Mediante estudios con *Salmonella typhimurium*, así como con *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes eutrophus*, se ha demostrado que el transporte de $\text{Cr}_2(\text{VI})$ ocurre a través del sistema de transporte de sulfato (SO_4^{2-}) y que la captación del Cr(VI) se da por transporte activo en la membrana. La entrada del Cr(VI) en las raíces de las plantas ocurre mediante un sistema de transporte activo, no obstante, existe poca información sobre el mecanismo específico involucrado. (Shanker *et al.*, 2005).

En el citoplasma, la toxicidad del Cr(VI) está principalmente relacionada con los procesos de reducción del Cr(VI) a Cr(III), por acción tanto enzimática como no enzimática, pasando por estados inestables intermedios de Cr(V) y Cr(IV), en el cual se forman radicales libres (Cervantes y Campos-García, 2007).

El estudio del desarrollo y crecimiento de la raíz y el efecto de diferentes factores en ésta ha sido estudiado principalmente en *A. thaliana*, ya que presenta mayor simplicidad y diferentes líneas transgénicas que permiten determinar el cambio en la expresión de genes de manera relativamente sencilla (Schiefelbein *et al.*, 1997; Malamy y Benfey, 1997; Péret, 2009; López-Bucio *et al.*, 2003). No obstante, es necesario determinar si en otras especies vegetales el efecto de factores adversos ejerce el mismo efecto en el desarrollo y crecimiento de raíces. Si bien *Nicotiana tabacum* ha sido utilizada en estudios de transformación y cultivo *in vitro*, no se tienen estudios detallados del efecto de metales, posiblemente debido a que la raíz es más compleja, con mayor número de células en el área meristemática y de crecimiento. No obstante, la mayor cercanía evolutiva del tabaco con especies de importancia comercial como papa, chile y tomate, entre otros, sugiere que los estudios realizados puedan tener una mejor aplicación en zonas agrícolas.

En *Nicotiana tabacum* se reporta una alteración en el desarrollo de la raíz al ser transplantada a medios MS con diferentes concentraciones de níquel, zinc y plomo (Nava, 2009). Méndez-Ferreira (2009) demostró que en *N. tabacum* el peso de la raíz y el follaje se disminuye en concentraciones de 40 mM o mayores de Cr(VI), siendo más sensible el follaje a esta respuesta. Tanto en *A. thaliana* como en *N. tabacum* se ha observado que cuando las plantas son transferidas de medios sin metal a medios suplementados por metales pesados se generan raíces laterales nuevas, mientras que la raíz primaria se inhibe en su crecimiento (Ortiz-Castro *et al.*, 2007; Nava, 2009; Cañas, 2011).

Para determinar la diferente tolerancia de las raíces primarias y laterales en *N. tabacum* al estrés generado por metales y proporcionar información preliminar acerca de si la tolerancia puede ser adquirida o es innata en las raíces laterales, en este trabajo se analizó el crecimiento de plantas de *N. tabacum* en medios suplementados con Cr(VI).

Materiales y métodos

Las semillas de *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi se desinfectaron de acuerdo al procedimiento reportado por Ortiz-Castro *et al.*

(2007) y se sembraron en cajas de Petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa comercial al 4%.

Las condiciones de crecimiento fueron de acuerdo a una temperatura de 24°C y un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Una vez germinadas las semillas se dejaron crecer las plantas durante 5 días y se transfirieron a cajas de Petri con medio MS adicionados con diferentes concentraciones de dicromato de potasio como Cr(VI): 0, 100 o 200 μM .

La posición de la raíz primaria (RP) y de las raíces laterales pre-existentes (RLP) en ese momento, se marcaron con puntos rojos. Se dejaron crecer durante 5 días y se marcó la nueva posición con puntos verdes. Finalmente se dejaron crecer otros 3 días (8 días después del trasplante) y se marcó la posición final con puntos azules. Las mediciones del crecimiento de la raíz primaria, raíces laterales pre-existentes y raíces laterales nuevas se realizaron al día 8 utilizando una regla graduada en mm. Se analizaron 6 plantas por tratamiento.

Resultados

El aumento de tamaño de la raíz primaria a los 5 y 8 días después del trasplante se consideró como un porcentaje del tamaño de la longitud al tiempo 0. En el día 5, la raíz primaria en el control sin Cr(VI) aumentó de tamaño en 69%, mientras que en los tratamientos con 100 y 200 μM del metal el aumento fue de 14% y 4%, respectivamente. Del día 5 al día 8, el tratamiento con mayor aumento de tamaño fue el de 100 μM (64%), seguido por 200 μM (35%) y finalmente el tratamiento sin el metal (11%). Lo anterior demuestra que si bien la planta se inhibe por el Cr(VI) los primeros 5 días, después existe una estimulación y el crecimiento llega a ser mayor que el control. (**Fig. 1**).

Para determinar si el Cr(VI) afecta la velocidad de crecimiento de las raíces primarias (RP), raíces laterales preexistentes (RLP) y raíces laterales nuevas (RLN), se determinó esta variable del día 0 a 5 después del trasplante y del día 5 a 8 después del trasplante (**Fig. 2**). En el tratamiento sin el metal, la velocidad de crecimiento (mm/día) de la raíz primaria en los primeros 5 días fue en promedio de 3.2 y más lenta en los tratamientos de 100 μM y 200 μM (0.6 y 0.2, respectivamente), sin embargo, del día 5 al 8 la velocidad se igualó en los tratamientos de 0 μM y 100 μM (3.7) y fue menor en 200 μM (2.3). Las raíces laterales pre-existentes prácticamente no tuvieron crecimiento en los tratamientos con Cr(VI), mientras que en el control la velocidad de 0 a 5 días fue muy similar a la del periodo de 5 a 8 días (0.9 y 0.8, respectivamente), es decir, se mantuvo constante. La situación fue diferente en las raíces laterales nuevas formadas después del trasplante, ya que mientras la velocidad se mantuvo constante en los medios sin metal en los 2 diferentes periodos (0.8 y 0.9, respectivamente), en el tratamiento de 100 μM hubo un cambio entre los dos periodos (1 y 3.5, respectivamente), mostrando una aceleración en el periodo de 5 a 8 días. En el tratamiento de 200 μM también hubo un incremento de velocidad entre el periodo 1 y 2 (0.6 y 2.1, respectivamente). Resumiendo, el comportamiento de las raíces laterales ante el Cr(VI) depende de si éstas ya estaban formadas al entrar en contacto con el metal o si se formaron de manera posterior al estímulo. En el primer caso se afectan y detienen su crecimiento, mientras que las raíces laterales nuevas son más tolerantes.

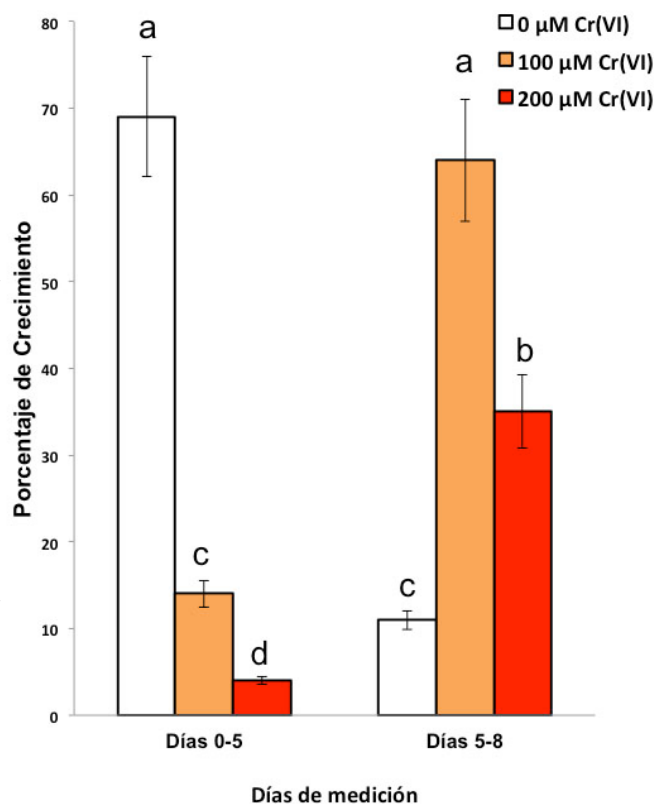


Figura 1. Crecimiento de la raíz primaria en porcentaje del tamaño inicial después de transferir las plantas a medios con Cr(VI). Las plantas se germinaron y crecieron durante 5 días en medio MS y posteriormente fueron transplantadas a medios MS con diferentes concentraciones de Cr(VI) (0, 100 o 200 µM). Los porcentajes de crecimiento de la raíz primaria se determinaron para el intervalo de 0 a 5 días y de 5 a 8 días después del trasplante. Las barras indican el intervalo de confianza para $\alpha=0.05$. Las letras indican las diferencias significativas mediante la prueba de Tukey para $\alpha=0.05$.

Discusión

En las plantas, las raíces laterales inician su desarrollo a cierta distancia hacia atrás del meristemo de la raíz apical o primaria (Malamy y Benfey, 1997). Si bien se ha descrito que la formación de cada raíz lateral sigue un patrón característico de divisiones transversales y longitudinales determinado por factores intrínsecos como la concentración de auxina (Péret, 2009), existen factores ambientales que modifican la cantidad, distribución y tamaño de las raíces laterales (Taiz y Zeiger, 2010). Entre los factores que se han estudiado que modifican el crecimiento y frecuencia de raíces laterales se encuentra la baja disponibilidad de fósforo (López-Bucio *et al.*, 2003) y la presencia de metales no esenciales como el Cr(VI) (Ortiz-Castro *et al.*, 2007).

Si bien se ha reportado que al transferir plantas de *Arabidopsis* o tabaco a medios con Cr(VI) el crecimiento de la raíz primaria se inhibe (Ortiz-Castro *et al.*, 2007; Nava, 2009), no se ha analizado si este retraso en el crecimiento es constante o depende del tiempo transcurrido después del trasplante. En este trabajo se pudo determinar que si bien el crecimiento de la raíz primaria se inhibe en los primeros 5 días, en los días 5 a 8 este crecimiento se incrementa en las plantas con Cr(VI).

Las raíces laterales de plantas de tabaco formadas antes del trasplante a medios con Cr(VI) no resultaron ser tolerantes al metal, ya que no siguieron creciendo (fig. 2). Esto contrasta

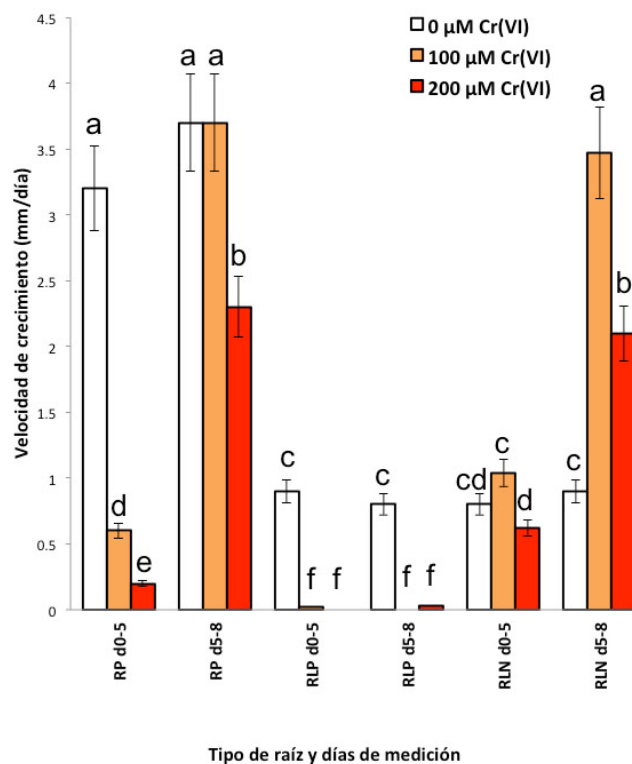


Figura 2. Efecto del Cr(VI) en la velocidad de crecimiento de los diferentes tipos de raíz de *N. tabacum*. Las plantas se germinaron y crecieron durante 5 días en medio MS y posteriormente fueron transferidas a medios MS con diferentes concentraciones de Cr(VI) (0, 100 ó 200 µM). La velocidad se estimó para dos tiempos, 0 a 5 días (d0-5) y 5 a 8 días (d5-8). RP, Raíz primaria; RLP, raíces laterales preexistentes al momento del trasplante; RLN, raíces laterales nuevas que aparecieron después del trasplante. Se indica el intervalo de confianza para $\alpha=0.05$. Las letras indican las diferencias significativas mediante la prueba de Tukey para $\alpha=0.05$.

con lo reportado por Jiménez-Saragoz (2011) en *A. thaliana*, en que sus raíces laterales ya formadas pueden seguir creciendo en medios con Cr(VI), e incluso con mayor intensidad en 100 µM del metal con respecto al control sin metal. Lo anterior demuestra que la plasticidad del crecimiento en las raíces ante el estrés tiene variaciones según la especie, ya que mientras en tabaco la raíz primaria es más tolerante, en *Arabidopsis* lo son las raíces laterales preexistentes. No obstante estas variaciones, existe un rango de concentración del metal en el que algún tipo de raíz se estimula para aumentar la superficie de absorción.

En *A. thaliana*, las raíces laterales que se forman posteriores al estrés generado por metales, muestran mayor tolerancia a esas condiciones con respecto a la raíz primaria (Ortiz-Castro *et al.*, 2007; Sántiz-Gómez, 2006; Valdovinos, 2007). En tabaco, la estimulación del crecimiento de las raíces laterales nuevas se presentó en 100 y 200 µM de Cr(VI), mientras que en *Arabidopsis* se estimula a 100 µM y 150 µM y se inhibe a 200 µM (Jiménez-Saragoz, 2011). Comparando las raíces laterales preexistentes y nuevas, tanto en tabaco como en *Arabidopsis*, es una constante que la mayor tolerancia a los metales la presentan las últimas (fig. 2), lo que sugiere que o bien existe un cambio en las raíces laterales nuevas que las hace más tolerantes o la planta canaliza más recursos para favorecer este tipo de raíces.

Con algunas variantes en los rangos de concentración de los metales, es una constante que las plantas ante el estrés de un

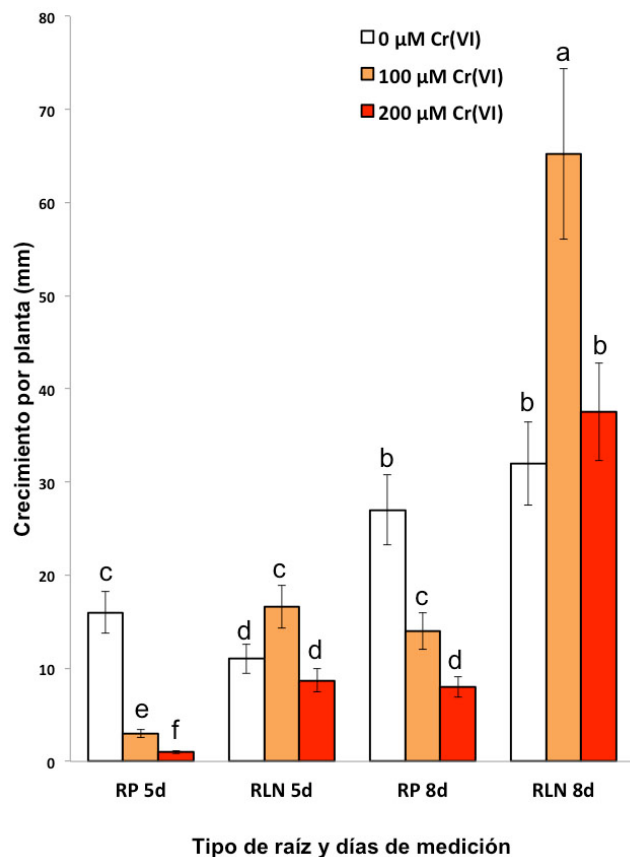


Figura 3. Efecto del Cr(VI) en el de crecimiento global de las raíces laterales totales y la raíz primaria, por planta de *N. tabacum*. Las plantas se germinaron y crecieron durante 5 días en medio MS y posteriormente fueron transplantadas a medios MS con diferentes concentraciones de Cr(VI) (0, 100 o 200 μM). La suma del crecimiento de las raíces laterales por planta y de la raíz primaria por planta se determinó a los 5 y 8 días después del trasplante. RP, Raíz primaria; RLN, raíces laterales nuevas que aparecieron después del trasplante. Las barras indican el intervalo de confianza para $\alpha=0.05$. Las letras indican las diferencias significativas mediante la prueba de Tukey para $\alpha=0.05$.

metal aumentan su sistema de raíces laterales con relación a la raíz primaria. El incremento del radio de crecimiento de las raíces laterales sobre la raíz primaria de 4 ó más veces en los medios con Cr(VI) (fig. 4), implica un incremento en la superficie de absorción en aproximadamente 4 ó más veces, ya que cada raíz lateral tiene una zona densa de pelos radicales posterior a la zona de crecimiento, lo que le permite a la planta enfrentar en mejores condiciones de absorción las condiciones adversas del medio (Gray, 2004; Taiz y Zeiger, 2010).

Finalmente, considerando los resultados de este trabajo de forma global y sus comparaciones con los que se han realizado en *Arabidopsis* en nuestro laboratorio, se puede concluir que las plantas tienen una plasticidad para adaptarse a las condiciones del estrés generado por metales pesados como el Cr(VI) y dependiendo de la especie vegetal existen variaciones en las concentraciones estimuladoras o inhibitorias del crecimiento de los tipos de raíz (primarias, laterales preexistentes y laterales nuevas), teniendo como constante que las raíces laterales nuevas son siempre más tolerantes que las primarias y las laterales preexistentes, lo que abre perspectivas para el estudio de la naturaleza del cambio en este tipo de raíces.

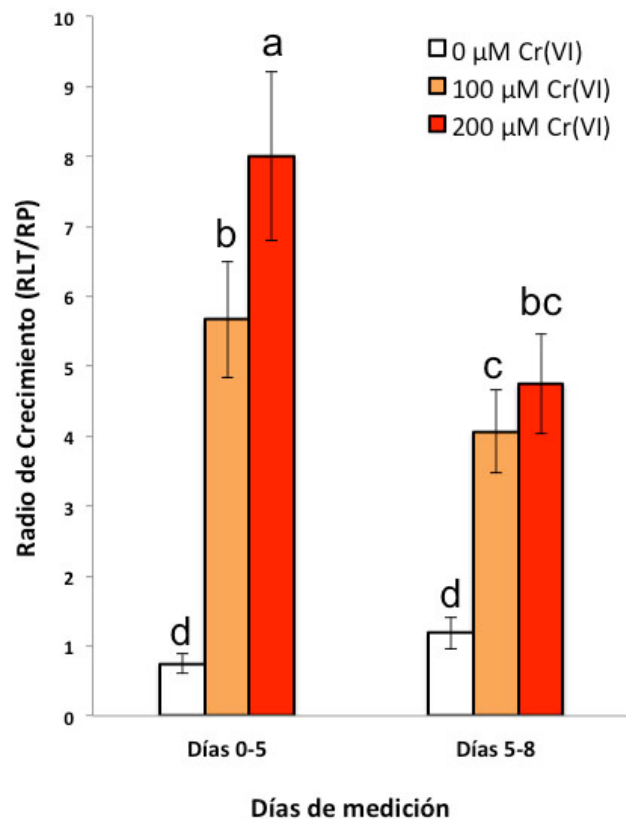


Figura 4. Efecto del Cr(VI) en el radio o proporción de crecimiento de las raíces laterales totales y la raíz primaria, por planta de *N. tabacum*. Las plantas se germinaron y crecieron durante 5 días en medio MS y posteriormente fueron transplantadas a medios MS con diferentes concentraciones de Cr(VI) (0, 100 o 200 μM). El radio del crecimiento se determinó a los 5 y 8 días después del trasplante. Las barras indican el intervalo de confianza para $\alpha=0.05$. Las letras indican las diferencias significativas mediante la prueba de Tukey para $\alpha=0.05$.

Referencias

- Cañas Navarro MA** (2011) *Efecto del níquel, zinc y cobre en el crecimiento y desarrollo de plantas de Arabidopsis thaliana L.* Tesis Profesional de Biólogo. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.
- Casimiro I, Beekman T, Graham N, Bhalarao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ** (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8: 165-171.
- Cervantes C, Campos-García J** (2007) Reduction and efflux of chromate in bacteria. In Dh Nies, S Silver (eds), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin.
- Dubrovsky JG, Rost TL** (2003) Lateral root initiation. In T Brian, JM Denis, GM Brian (eds), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. pp 1101-1107
- Gray WM** (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol* 2: E311.
- Jiménez-Saragoz JC** (2011) *Análisis de la respuesta de raíces laterales de Arabidopsis thaliana L. a condiciones variables de estrés causado por Cr(VI).* Tesis Profesional de Biólogo. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.
- Katz SA, Salem H** (1993) The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* 13: 217-224.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.

- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- McCully ME** (1975) The development of lateral roots. In JG Torrey and DT Clarkson (eds), *The Development and Function of Roots*. New York: Academic Press. pp 105-124
- Méndez-Ferreira GD** (2009) *Efecto del Cromo (VI) en el crecimiento y el desarrollo de Nicotiana tabacum L.* Tesis Profesional de Biólogo. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nava GJ** (2009) *Efecto de níquel, plomo y zinc, en el desarrollo de la raíz de Nicotiana tabacum L.* Tesis Profesional de Biólogo. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C, Dubrovsky J** (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* 172:684-691.
- Péret B, de Rybel B, Casimiro I, Benkova I, Swarup R, Laplace L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14: 399-408.
- Sántiz-Gómez M** (2006) *Efecto del cobre en el crecimiento y desarrollo de la raíz de Arabidopsis thaliana L.* Tesis profesional de Biólogo. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México.
- Schiefelbein JW, Masucci JD, Wang H** (1997) Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9: 1089-1098.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31:739-753.
- Taiz, L, Zeiger, E** (2010) *Plant Physiology*. Fifth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA.