

LOCALIZACIÓN DE Cd EN *Echinochloa polystachya* POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y ESPECTROMETRÍA DE DISPERSIÓN DE RAYOS X

Fernando Amílcar Solís-Domínguez(1); María del Carmen González-Chávez(2); Rogelio Carrillo-González(2); Lourdes Rojas Morales(3); Ana Bertha Soto Guzmán(4); Refugio Rodríguez-Vázquez(1).

(1) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), México, D.F. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. (2) Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas-IRENAT, Montecillo Edo. de México, México. (3) CINVESTAV-IPN, Unidad de Microscopía Electrónica, México D.F. (4) CINVESTAV-IPN, Departamento de Física, México, D.F.

E-mail: rrodrig@mail.cinvestav.mx

Los metales pesados en altas concentraciones, son tóxicos para las plantas y cualquier forma de vida. Sin embargo, existen plantas que toleran y acumulan a estos metales en sus tejidos. Recientemente se descubrió que *Echinochloa polystachya polystachya* es una planta hiper-acumuladora de Cd, pero no se ha utilizado en prácticas de fitorremediación.

El objetivo de este trabajo fue detectar los sitios de acumulación de Cd en el tejido vegetal de *E. polystachya* mediante microscopía electrónica y espectrometría de dispersión de rayos X (EDX).

Plantas de *E. polystachya* crecidas en arena de río con concentraciones crecientes de Cd, 0.25, 1, 2, 10, 50 y 100 mg.L⁻¹, aplicado como Cd(NO₃)₂ se cosecharon a las 12 semanas de edad (ocho semanas de exposición a Cd). Muestras de raíces y hojas se analizaron por microscopía electrónica de barrido (MEB) y EDX, así como microscopía electrónica de transmisión (MET).

Segmentos de raíces y hojas de *E. polystachya* se fijaron en glutaraldehído al 3% y Na₂S preparado en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.0. El material vegetal se post-fijó con OsO₄ 1% y se deshidrató a diferentes concentraciones de etanol (50, 60, 70, 80, 90 y 100%). Para MEB, las muestras se secaron a punto crítico, se sombrearon con oro [1] y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6300 acoplado a un espectrómetro de dispersión de rayos X, marca NORAN empleando el software VOYAGER II 1100/1110, mientras que para MET después de la deshidratación con alcohol, las muestras se trataron con óxido de propileno y se infiltraron en resina de Spurr, posteriormente se hicieron cortes finos (70-90 nm de espesor) en un microtomo Reichert-Jung Ultracut-E, los cortes se colocaron sobre rejillas de cobre de un orificio (2 x 1 mm) y sin contrastar se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEOL, JEM-2000 EX.

Por una parte, las plantas que se trataron con Cd presentaron en las células de la raíz pequeñas esferas que contenían Cd, que por su forma se consideran inclusiones (Figura 1). La presencia de Cd en las células de las hojas fue evidente mediante MEB (Figura 2). Se observó una mayor cantidad del metal en células buliformes de la epidermis y con menor frecuencia en la región del mesófilo. En contraste, las muestras de raíces y hojas de plantas testigo (sin adición de Cd), no presentaron inclusiones.

Por otra parte, mediante MET se observaron estructuras en forma de grumos en las vacuolas de las células de raíces (Figura 3) y de hojas, correspondientes a las plantas tratadas con Cd, mientras que en las células de las plantas testigo no se observaron dichas estructuras. A pesar de que no se realizó la técnica de EDX para confirmar que los grumos contienen Cd, Wang *et al.* (1997)[2] reportaron estructuras similares correspondientes a la acumulación de Cd en *Pseudomonas auroginosa* utilizando EDX.

La acumulación de Cd en las raíces, observada por MEB, fue mas evidente en el xilema que en la región cortical. Kabata-Pendias y Pendias (2001)[3] mencionaron la existencia de ligandos en xilema y floema, lo que probablemente permitió la detección del metal en esta zona de la raíz.

Generalmente los metales pesados causan daños a las células al actuar en algunas ocasiones como inactivadores enzimáticos ó formar precipitados con metabolitos esenciales [4], sin embargo, en *E. polystachya* no se presentaron daños aparentes en raíces ni hojas, aún creciendo en soportes que tuvieron 100 mg.L⁻¹ de Cd. Así, se determinó que la vacuola es el organelo principal de acumulación de Cd en células de *E. polystachya*. En las hojas la mayor cantidad de Cd se concentra en las células buliformes.

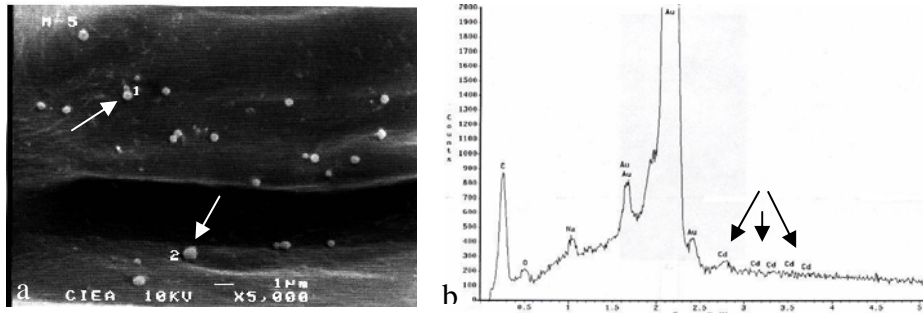


Figura 1. a) Corte longitudinal en la región del haz vascular de raíces de *E. polystachya* tratadas con 100 mg.L^{-1} de Cd, las flechas indican inclusiones de Cd. b) gráfica obtenida por EDX que confirma la presencia de Cd en las inclusiones (flechas).

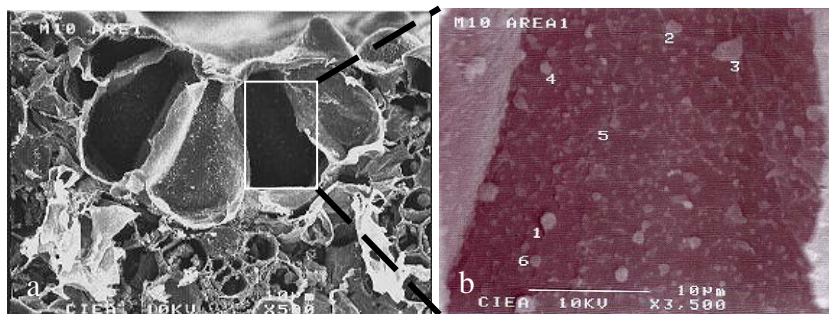


Figura 2. a) Células buliformes en hojas de *E. polystachya* con inclusiones de Cd. b) los puntos 1, 2, 3, 4 y 5 se analizaron por EDX para comprobar la presencia del metal.

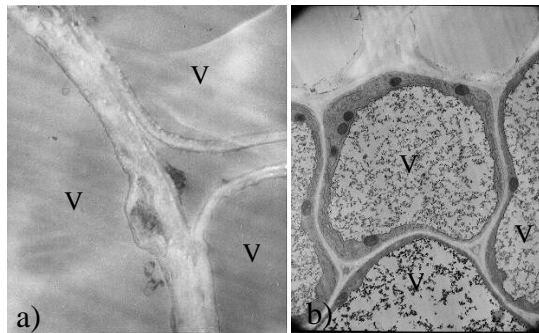


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión de células de raíz de *E. polystachya*. a) testigo, células con vacuolas (V) totalmente limpias, b) células de plantas tratadas con Cd mostrando grumos dentro de las vacuolas (v).

Literatura citada

- [1] Bozzola J.J., Russel L.D. 1992. Electron microscopy : Principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett publishers. USA. 519 pp.
- [2] Wang C.L., Michels P.C., Dawson S.C., Kitisakkul S., Baross J.A., Keasling J.D., Clark D. 1997. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4075-4078.
- [3] Kabata-Pendias A., Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd Ed. CRC Press. Boca raton, Florida. 413 pp.
- [4] Ghosh M., Singh S.P. 2005. Environ. Pollut. 133: 365-371.