

**EL FOSFATO IMPIDE EL EFECTO INHIBITORIO DEL ARSENICO
PENTAVALENTE SOBRE EL CRECIMIENTO DE RAICES DE CEBOLLA
(*Allium cepa* L.)¹**

**Phosphate prevents the inhibitory effect of pentavalent arsenic on root
growth in onions (*Allium cepa* L.)**

Inés Pepper B.², Norbel Galanti G.³ y Jorge Sans P.³

S U M M A R Y

The effects of As^{+5} on root growth of *Allium cepa* L. was studied, including an analysis of root longitudinal growth, frequency of mitotic cells in the meristematic zone, and interphase duration of these proliferating cells. Additionally, the consequences of the presence of P^{+5} in the incubation solution containing As^{+5} , was also studied.

As^{+5} induced a drastic fall in the longitudinal root growth and in the frequency of mitosis in the meristematic region, as well as an elongation of the interphase in these proliferating cells. The intensity of these effects is a function of As^{+5} concentration.

The simultaneous presence of P^{+5} in the As^{+5} in the solutions used for root incubation, prevents the effects produced by As^{+5} . This action depends on the (P) / (As) quotient.

INTRODUCCION

La presencia de metales pesados y otras sustancias contaminantes en el agua de riego, constituye un grave problema, que afecta a la producción de alimentos y a la salud de la población que los consume. El arsénico pentavalente (As^{+5}) es uno de estos elementos contaminantes, siendo su concentración en aguas de riego en la zona norte de Chile, superior a la aceptada por normas nacionales (INN, 1978) e internacionales (Schroeder y Balassa, 1966).

El efecto del As^{+5} sobre el crecimiento radicular ha sido analizado en cebolla (*Allium cepa* L.) (Pepper y otros, 1988). En la raíz de cebolla coexisten tres procesos que concurren a la elongación de este órgano. Estos son: proliferación, crecimiento y diferenciación celulares. Así, en la zona meristemática del ápice radicular, se encuentra una población de células en continua proliferación. En dirección proximal al bulbo, existe una zona de diferenciación en la que las células que provienen de la zona meristemática crecen en sentido longitudinal, adquiriendo características fenotípicas particulares. En condiciones estables de cultivo, el crecimiento monoaxial de la raíz está en equilibrio dinámico; esto es, la proliferación y elongación celulares permanecen constantes en el tiempo (López-Sáez y otros, 1975).

Se ha demostrado que el As^{+5} inhibe reversible o irreversiblemente el crecimiento longitudinal de la raíz de cebolla en forma dependiente de su concentración en el medio. Esta inhibición se debe, en parte, a una disminución de la actividad proliferativa en la zona meristemática; concomitante a ello, se produce un alargamiento del ciclo celular (Pepper y otros, 1988).

¹ Recepción de originales: 13 de noviembre de 1987.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los Proyectos B-2365 D.T.I., Universidad de Chile y por el Convenio de Cooperación Científica y Tecnológica entre la Universidad de Chile y el C.S.I.C. de España.

² Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, División Norte, Universidad de Chile. Casilla 70058, Correo 7, Santiago, Chile.

³ Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, División Norte, Universidad de Chile. Casilla 70061, Correo 7, Santiago, Chile.

El As^{+5} actúa sobre el metabolismo celular, compitiendo con fósforo pentavalente (P^{+5}) en diversas reacciones bioquímicas. La unión de As^{+5} a determinadas moléculas produce compuestos inestables no funcionales, en un proceso que se denomina arsenolisis (Klaasen, 1980). Considerando que la fosforilación es un mecanismo bioquímico básico en el metabolismo celular, cabe suponer que el As^{+5} puede interferir con una gran variedad de procesos metabólicos. De esta manera, puede desacoplar la fosforilación oxidativa a nivel de cadena respiratoria o de sustrato (Ginsburg y Lotspeich, 1973), inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Peters y otros, 1976), interferir con el transporte activo a través de membranas (Rothstein, 1963), etc. Asimismo, se podría suponer que podría interferir con la fosforilación de proteínas. Estos efectos del As^{+5} dependen de la relación (P) / (As) presente en el sistema en estudio (Scarborough, 1975; Schroeder y Balassa, 1966).

En consecuencia, es posible postular que el P^{+5} impide la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz de cebolla, producida por el As^{+5} , cuando ambos elementos se agregan en forma simultánea al medio de incubación, en condiciones de concentración adecuadas. En este trabajo, se presenta evidencias que apoyan esta hipótesis.

MATERIALES Y METODOS

Bulbos y raíces adventicias: Se utilizaron bulbos de cebolla variedad perla, con un peso promedio de 20 g. Las raíces adventicias se obtuvieron sumergiendo la base de los bulbos en agua potable de pozo filtrada, contenida en tubos de vidrio, a los que se adaptó un sistema de burbujeo constante de aire (10–20 ml/min). El cultivo se efectuó en un incubador a $15 \pm 0,5^\circ C$, en la oscuridad.

Incubaciones: Los bulbos control se incubaron en agua potable de pozo filtrada. Los tratamientos con As^{+5} se hicieron utilizando soluciones de arsenato de sodio en concentraciones de 1 a 3 ppm del elemento, preparadas en dicha agua. Los tratamientos con P^{+5} se efectuaron en soluciones de fosfato de sodio y potasio en concentraciones de 2, 3, 6 y 9 ppm, calculadas considerando fósforo elemento. Todos los tratamientos se iniciaron una vez que las raíces alcanzaran una longitud de 2 a 3 cm. Las soluciones se renovaron cada 24 horas. El pH de estas soluciones, controlado antes y después de cada tratamiento, fluctuó entre 7,2 y 7,5; el del agua potable de pozo filtrada fue de 7,7.

Crecimiento radicular: Se determinó midiendo la longitud de 10 a 12 raíces (previamente individualizadas) por bulbo, cada 24 hr, durante 96 hr.

Actividad proliferativa: Se cuantificó determinando la frecuencia de células en mitosis en el ápice radicular. Raíces obtenidas después de 0, 12, 24 y 48 hr de iniciado el tratamiento, se fijaron en etanol–ácido acético, 3:1 v/v, durante 24 hr a $4^\circ C$. Luego de teñidas con orceína acética clorhídrica (Tjio y Levan, 1950), se efectuó aplastados de la región meristemática. Se determinó la frecuencia de células en mitosis en mil células por aplastado.

Duración de la interfase: Se determinó en una población de células meristemáticas sincrónicas, obtenidas mediante un tratamiento de la raíz con cafeína. Esta droga inhibe la citocinesis; en consecuencia, todas aquellas células que se encuentren en telofase durante el tratamiento quedan marcadas como células binucleadas (Giménez–Martín, González–Fernández y López–Sáez, 1965). Esta población avanza sincrónicamente por el ciclo celular, iniciando la mitosis hacia las 23 hr después de terminada la incubación con cafeína, a $15^\circ C$ (López–Sáez, Giménez–Martín y González–Fernández, 1966).

Bulbos con raíces de 2–3 cm de largo, se incubaron en una solución de cafeína 5 mM durante 1 hr. Luego se lavaron en agua potable de pozo filtrada y se transfirieron a soluciones de As^{+5} y/o P^{+5} , donde se mantuvieron hasta el término del experimento. A fin de estudiar la cinética de entrada de células binucleadas en mitosis, se fijaron 3–5 raíces, a las 24, 30, 32 y 46 hr de iniciado el tratamiento con cafeína, y se procesaron de la manera indicada para medir actividad proliferativa. Se cuantificó la frecuencia de células binucleadas en mitosis.

La duración de la interfase se calculó según el método descrito por López–Sáez y otros, 1966, determinando el punto en el que la recta de regresión calculada en la zona ascendente de la curva de entrada en mitosis, corta el eje de la abscisa.

RESULTADOS Y DISCUSION

En primer término, se analizó el efecto de diversas concentraciones de As^{+5} sobre el crecimiento longitudinal de la raíz (Figura 1). Se observa que un tratamiento con 2 ppm de As^{+5} disminuye la velocidad de crecimiento radicular en relación al control. Con 3 ppm, se detiene el crecimiento a partir de las 24 hr, sin que ello se deba a muerte radicular. Estos resultados confirman que el As^{+5} produce una inhibición del crecimiento radicular, cuya intensidad depende de su concentración en el medio (Pepper y otros, 1988).

Diversos estudios muestran que el As^{+5} actúa sobre el metabolismo celular, compitiendo con P^{+5} . Se estudió el efecto de la coadministración de P^{+5} y As^{+5} ,

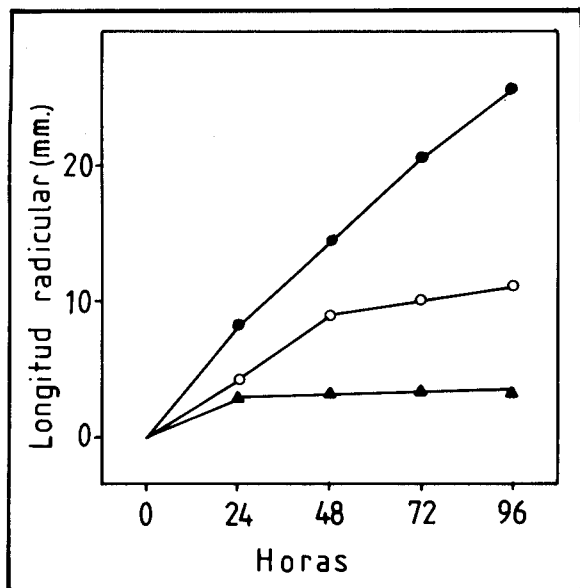


FIGURA 1. Efecto de As^{+5} sobre crecimiento longitudinal de la raíz ●-----●: Control; ○-----○: 2 ppm As^{+5} ; ▲-----▲: 3 ppm As^{+5} .

FIGURE 1. Effect of As^{+5} on root growth.

en proporciones 1:1 y 3:1 (figuras 2 y 3), sobre el crecimiento longitudinal de la raíz. La Figura 2A muestra que 2 ppm de P^{+5} no son capaces de impedir el efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de 2 ppm de As^{+5} . Cuando se utiliza P^{+5} y As^{+5} en relación de concentraciones de 3:1, el crecimiento radicular es similar al de los controles (Figura 2B). La Figura 3A muestra que 3 ppm de P^{+5} impiden sólo parcialmente el efecto inhibitorio de 3 ppm de As^{+5} , observándose en todo caso una velocidad de crecimiento menor que los controles. Cuando se utiliza P^{+5} en proporción tres veces mayor que As^{+5} , el crecimiento radicular sigue una cinética similar a la de los controles. Estos resultados indican que el P^{+5} tiene un efecto protector sobre la inhibición del crecimiento radicular producida por el As^{+5} . Este efecto protector depende de la relación (P) / (As). Así, una relación igual a 1 no impide (Figura 2A), o lo hace sólo parcialmente (Figura 3A), la inhibición del crecimiento longitudinal provocada por el As^{+5} . Por el contrario, una relación de 3:1, impide completamente el efecto inhibitorio de As^{+5} sobre el crecimiento radicular (figuras 2B y 3B).

La inhibición del crecimiento radicular provocada por el As^{+5} puede atribuirse a interferencia del elemento con fenómenos relacionados con la proliferación celular en la zona meristemática y/o con alteraciones de la elongación celular en la zona de diferenciación. Se estudió la primera de estas alternativas, analizando el

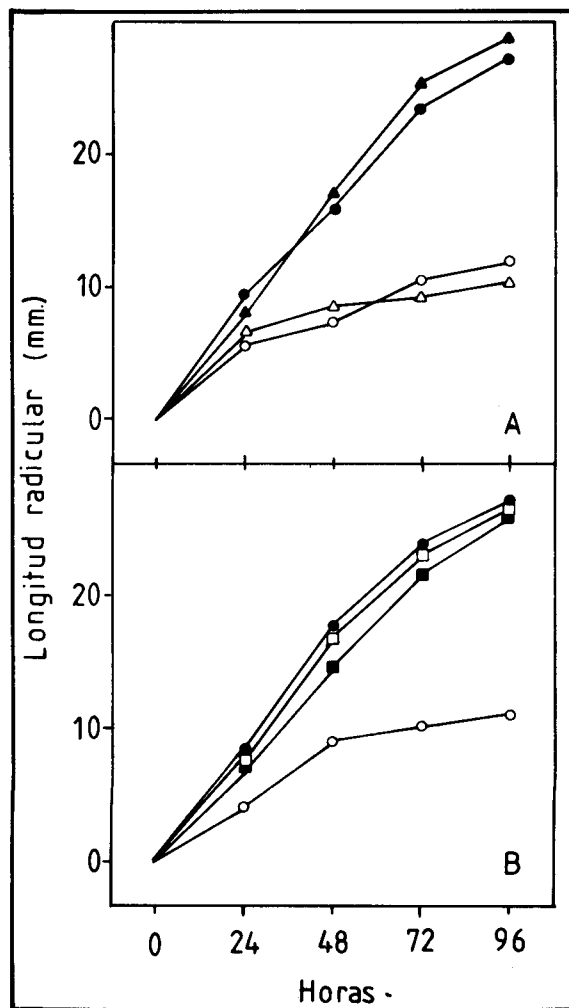


FIGURA 2. Efecto de P^{+5} , coadministrado con 2 ppm de As^{+5} , sobre crecimiento longitudinal de la raíz. A) ●-----●: Control; ▲-----▲: 2 ppm P^{+5} ; ○-----○: 2 ppm As^{+5} ; △-----△: 2 ppm As^{+5} + 2 ppm P^{+5} . B) ●-----●: Control; ○-----○: 2 ppm As^{+5} ; ■-----■: 2 ppm As^{+5} + 6 ppm P^{+5} .

FIGURE 2. Effect of P^{+5} , coadministered with 2 ppm of As^{+5} , on root growth.

efecto del As^{+5} sobre la proliferación celular. La Figura 4 muestra que la frecuencia de células en mitosis disminuye progresivamente con 2 ppm de As^{+5} , alcanzando un mínimo hacia las 24 hr de tratamiento. Esta inhibición es transitoria, puesto que se observa una recuperación de la actividad proliferativa hacia las 48 hr de incubación con As^{+5} .

Estos resultados sugieren que: 1) el As^{+5} bloquea el ciclo de división celular en una etapa anterior a la mitosis y 2) el bulbo de cebolla presenta mecanismos de eliminación o neutralización del As^{+5} .

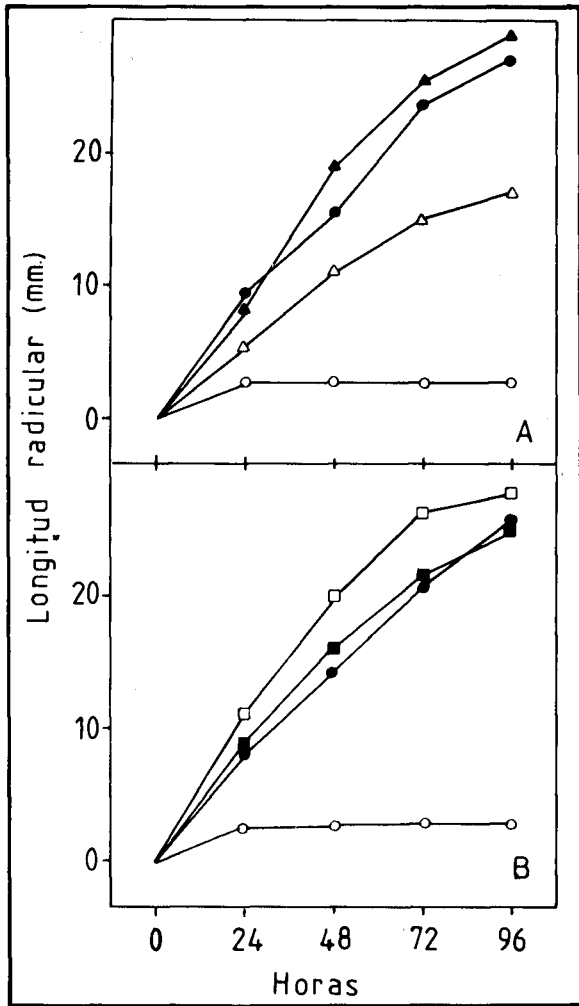


FIGURA 3. Efecto de P^{+5} , coadministrado con 3 ppm de As^{+5} , sobre crecimiento longitudinal de la raíz. A) ●—●: Control; ▲—▲: 3 ppm P^{+5} ; ○—○: 3 ppm As^{+5} ; △—△: 3 ppm As^{+5} + 3 ppm P^{+5} . B) ●—●: Control; □—□: 9 ppm P^{+5} ; ○—○: 3 ppm As^{+5} ; ■—■: 3 ppm As^{+5} + 9 ppm P^{+5} .

FIGURE 3. Effect of P^{+5} , coadministered with 3 ppm As^{+5} , on root growth.

Cuando las raíces se incuban en soluciones de As^{+5} y P^{+5} simultáneamente, se observa que una relación de concentraciones de (P) / (As) igual a 1:4 no impide el efecto inhibitorio del As^{+5} (Figura 4). Cuando ambos elementos están en igual concentración en el medio, se produce una disminución de la frecuencia de células en mitosis, con una cinética similar pero menos intensa que la producida sólo por el As^{+5} . Finalmente, cuando el P^{+5} está en una concentración tres veces mayor que el As^{+5} , la frecuencia de células en mitosis es similar a los controles. En consecuencia y de igual forma que lo descrito para el crecimiento longitudinal

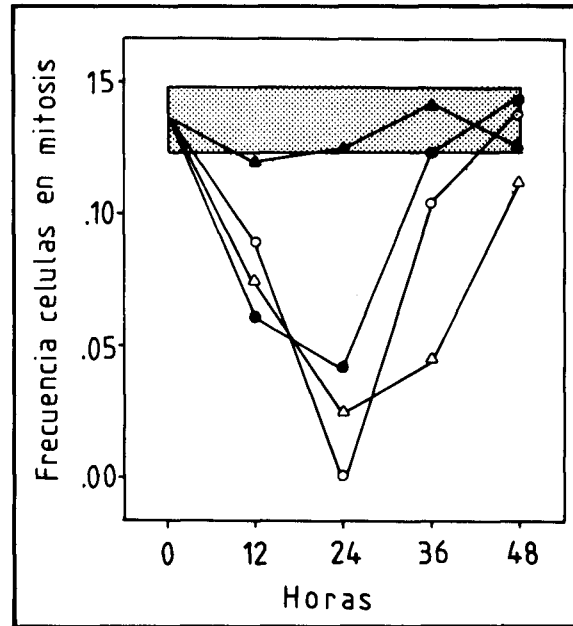


FIGURA 4. Efecto de P^{+5} , coadministrado con 2 ppm As^{+5} , sobre actividad proliferativa del meristema radicular. Barra de puntos representa frecuencia de mitosis en meristemas control. ○—○: 2 ppm As^{+5} ; △—△: 2 ppm As^{+5} + 0,5 ppm P^{+5} ; ●—●: 2 ppm As^{+5} + 2 ppm P^{+5} ; ▲—▲: 2 ppm As^{+5} + 6 ppm P^{+5} .

FIGURE 4. Effect of P^{+5} , coadministered with 2 ppm of As^{+5} , on proliferative activity in the meristematic zone of the roots. The pointed bar represents frequency of mitosis in the control meristems.

de la raíz, se observa un efecto protector del P^{+5} sobre la disminución de la frecuencia de células en mitosis inducida por el As^{+5} . Este efecto protector sólo es evidente cuando la concentración es, por lo menos, tres veces superior a la de As^{+5} .

De estos resultados expuestos, destaca el hecho que una concentración de 2 ppm de As^{+5} presenta una disminución transitoria de la frecuencia de células en mitosis. Se puede postular que ello se debe a la movilización de P^{+5} , desde el bulbo hacia el ápice de la raíz desviando la relación (P) / (As) en favor del primero. La movilidad del P^{+5} en los distintos compartimentos de la planta, así como su rápida incorporación a moléculas celulares, han sido descritas (Mengel y Kirkby, 1978). Este resultado puede explicarse postulando que la unión de As^{+5} a moléculas biológicas implicadas en el ingreso de células a mitosis, es reversible. Otra explicación probable y no excluyente con la anterior deriva de proponer un rápido recambio para la (o las) molécula(s) biológica(s) que unen el As^{+5} .

Por otra parte, los resultados mostrados en las figuras 2B, 3B y 4, sugieren que la afinidad del As^{+5} por grupos funcionales de moléculas biológicas involucradas en el crecimiento de la raíz y en el entrada de células en mitosis, es más alta que la del P^{+5} . Esto es aún más evidente si se considera que el P^{+5} está normalmente presente en el medio intracelular del meristema radicular. Esta proposición explicaría la necesidad de una concentración de P^{+5} superior a la de As^{+5} para impedir la acción inhibitoria de este último elemento sobre los dos procesos biológicos aludidos: crecimiento longitudinal de la raíz y frecuencia de mitosis.

Considerando los efectos del As^{+5} sobre el metabolismo celular, se puede postular que la presencia continua del elemento en el medio de incubación podría derivar en una mayor duración del ciclo celular. Esta proposición proveería de otra explicación para el efecto inhibitorio del As^{+5} sobre el crecimiento de la raíz y sobre la frecuencia de células en mitosis en el meristema proliferativo. En estudios previos en este sistema, se demostró que la duración de la interfase de las células del comportamiento proliferativo se duplica en raíces tratadas con 2 ppm de As^{+5} (Pepper y otros, 1988).

En el Cuadro 1 se muestra que, en agua potable de pozo filtrada, la duración de la interfase es de 20,8 hr, aumentando a 46 hr en presencia de 2 ppm de As^{+5} . Raíces tratadas con 6 ppm de P^{+5} , presentan una duración de la interfase de sólo 4,2 hr mayor que la de los controles. Un efecto similar a éste se observa cuando se administra simultáneamente P^{+5} y As^{+5} , en relación 3:1. Estos resultados muestran claramente que la presencia de P^{+5} en la solución de incubación conteniendo As^{+5} , impide la elongación de la interfase producida por As^{+5} . Por otra parte, estos datos coinciden con los de Van't Hof y Wilson (1962), quienes trabajando en *Pisum sativum*, establecieron que agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa aumentan el tiempo del ciclo celular. Considerando que el As^{+5} ha sido postulado como un agente desacoplante, su efecto sobre la duración de la interfase podría ser atribuido a esta propiedad.

CUADRO 1. Efecto del As^{+5} y el P^{+5} sobre la duración de la interfase en células meristemáticas sincrónicas

TABLE 1. Effect of As^{+5} and P^{+5} on the interphase duration in synchronic meristematic cells

Tratamiento	Duración Interfase (horas)	r
Control	20,8	0,998
As^{+5} 2 ppm	46,0	—
P^{+5} 6 ppm	25,2	0,961
As^{+5} 2 ppm + P^{+5} 6 ppm	26,2	0,949

r: coeficiente de correlación.

Los resultados expuestos muestran que la presencia de P^{+5} modifica el efecto inhibitorio de As^{+5} sobre el crecimiento de la raíz, de una manera dependiente de la relación de concentración entre ambos elementos. Esto concuerda con diversos trabajos que plantean dicha dependencia en otros sistemas biológicos. Así, Mandel, Mayersack y Riis (1965) describieron que la inhibición de la formación de colonias de *Bacillus cereus* mediada por As^{+5} , depende de la relación (P) / (As). Por otra parte, en estudios efectuados en *Streptococcus faecalis*, Harold y Spitz (1975) observaron que la incorporación de As^{+5} y P^{+5} es un proceso unidireccional modulado por ATP, y que la incorporación de As^{+5} está regulada por el P^{+5} intracelular. En *Neurospora crassa*, Scarborough (1975) demostró que la inhibición del transporte de sorbosa a través de membrana, producido por arsenato, es suprimida por la presencia de fosfato. El mismo fenómeno fue descrito por Da Costa (1972), en hongos. Finalmente, Johnstone (1980) estableció que el As^{+5} desacopla la fosforilación oxidativa en mitocondrias hepáticas y que este efecto no ocurre en presencia de P^{+5} .

El hecho que se requiere de concentraciones de P^{+5} elevadas para impedir el efecto inhibitorio de As^{+5} , en crecimiento y proliferación, sugiere que existe diferente sensibilidad, por parte de estos fenómenos, a la presencia del elemento. La ubicuidad de la acción de As^{+5} sobre el metabolismo celular hace difícil adjudicar a una reacción metabólica determinada el efecto inhibitorio provocado por este elemento sobre el crecimiento de la raíz de cebolla. En términos generales, el efecto inhibitorio de As^{+5} podría ser atribuido a problemas energéticos derivados de su acción desacoplante o bien a problemas de fosforilación de proteínas específicas, necesarias para determinados eventos del ciclo de proliferación celular. Estos efectos no ocurrirían en presencia de concentraciones más elevadas de P^{+5} .

CONCLUSIONES

- El As^{+5} inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz en función de su concentración.
- Dicho efecto se debe, al menos en parte, a una inhibición transitoria de la proliferación celular en la zona meristemática y a un alargamiento de la duración del ciclo celular.
- La presencia de P^{+5} en la solución de As^{+5} impide, total o parcialmente, el efecto inhibitorio de éste sobre las variables estudiadas. La acción de P^{+5} depende de la relación (P) / (As).

RESUMEN

Se estudió los efectos del As^{+5} sobre el crecimiento de la raíz de la cebolla (*Allium cepa* L.), enfocando el análisis sobre las siguientes variables: incremento longitudinal, frecuencia de mitosis en la región meristemática y duración de la interfase de las células en proliferación. Posteriormente, se investigó las consecuencias de la presencia de fosfato (P^{+5}) en las soluciones de arsénico utilizadas para incubar las raíces.

Se observó que As^{+5} produce una disminución drástica en el incremento longitudinal de la raíz y en la

frecuencia de células en mitosis en la región meristemática; además, aumenta la duración de la interfase de las células en proliferación. La intensidad de estos efectos es función de la concentración de As^{+5} .

La presencia simultánea de P^{+5} y As^{+5} en las soluciones de incubación de las raíces, impide los efectos producidos por As^{+5} . Esta acción depende de la relación (P) / (As).

LITERATURA CITADA

- Da COSTA, E.W.B. 1972. Variation in the toxicity of arsenic compounds to microorganisms and the suppression of the inhibitory effects by phosphate. *Appl. Microbiol.* 23: 46–53.
- GIMENEZ–MARTIN, G., GONZALEZ–FERNANDEZ, A., and LOPEZ–SAEZ, J.F. 1965. A new method of labelling cells. *J. Cell. Biol.* 26: 305–309.
- GINSBURG, J.M. and LOTSPEICH, W.D. 1973. Interrelations of arsenate and phosphate transport in the dog kidney. *Am. J. Physiol.* 205: 707–714.
- HAROLD, F. M. and SPITZ, E. 1975. Accumulation of arsenate, phosphate and aspartate by *Streptococcus Faecalis*. *J. Bacteriol.* 122: 266–277.
- INN—Instituto Nacional de Normalización. 1978. Requisito de la calidad del agua para diferentes usos. Norma Chilena Oficial, NCh 1333.
- JOHNSTONE, R.M. 1980. Sulphydril agents: arsenicals. En: *Metabolic Inhibitors*. Vol. II. Hochster, R.M. and Quastel, J.H. (Ed.). Mac Millan. 1929 p.
- KLAASEN, C.D. 1980. Heavy metals and heavy metal antagonists. En: *The pharmacological basis of therapeutics*. Sixth Ed. Goodman, A., Gillman, L.S. and Gillman, A. (Eds) Mac Millan. 1929 p.
- LOPEZ–SAEZ, J.F., GONZALEZ–FERNANDEZ, A., De la TORRE, C., DIEZ, J.L., FERNANDEZ–GOMEZ, E., NAVARRETE, M.H., GARCIA–HERDUGO, G., and GIMENEZ–MARTIN, G. 1975. A model for cell cycle and growth kinetics in roots. *J. Theor. Biol.* 53: 463–473.
- LOPEZ–SAEZ, J.F., GIMENEZ–MARTIN, G., and GONZALEZ–FERNANDEZ, A. 1966. Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature. *Zeitschr. für Zellforsch.* 75: 591–600.
- MANDEL, H.G., MAYERSACK, J.S., and RIIS, M. 1965. The action of arsenic on *Baccillus cereus* J. *Pharm. Pharmacol.* 17: 794–804.
- MENGEL, K. and KIRKBY, E.A. 1978. Phosphorus. En: *Principles of Plant Nutrition*. International Potash Institute (Ed.) Berne, Switzerland. 347 p.
- PEPPER, I., GALANTI, N., SANS, J., and LOPEZ–SAEZ, J. F. 1988. Reversible inhibition of root growth and cell proliferation by pentavalent arsenic in *Allium cepa* L. *Experimental and Environmental Botany* 28: 9–18.
- PETERS, J., BARON, D., KIEFER, G., GLAESNER, J.J., HUG, J., and HAGEDORN, M. 1976. Comparative studies of the incorporation inhibition of radioactive nucleotides and aminoacids *in vitro* under the influence of Adriamycin, Bleomycin and Sodium Arsenate. *Arch. Derm. Res.* 257: 185–194.
- ROTHSTEIN, A. 1963. Interactions of arsenate with the phosphate transporting system of yeast. *J. Gen. Physiol.* 46: 1075–1085.
- SCARBOROUGH, G.A. 1975. The mechanism of arsenate inhibition of the glucose active transport system in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 166: 245–250.
- SCHROEDER, H.A. and BALASSA, J.J. 1966. Abnormal trace metals in man: arsenic. *J. Chron. Dis.* 19: 85–105.
- TJIO, J.M. and LEVAN, A. 1950. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *An. Tal. Exptl. Aula dei* 2: 21–64.
- VAN'T HOF, J. and WILSON, G.B. 1962. Studies on the control of mitotic activity. The effect of respiratory inhibitors on mitotic cycle time in the root meristem of *Pisum sativum*. *Chromosoma (Berl.)* 13: 39–46.