

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“TOLERANCIA Y CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE Cr(VI) y Pb(II) EN CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Prosopis laevigata*”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en B. AMALIA MALDONADO MAGAÑA**

Director de Tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa

Co-Directora de Tesis: Dra. Leticia Buendía González

México, D.F.

Julio 2014

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

México, D.F. a 3 de Julio del 2014

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“Tolerancia y capacidad de remoción de Cr (VI) y Pb(II) en cultivos de células en  
suspensión de *Prosopis laevigata*”**

Que presentó

**M. en B. Amalia Maldonado Magaña**

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Co-Director: Dra. Leticia Buendía González

Asesor: Dr. Juan Orozco Villafuerte

Jurado:

**Presidente:**

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

  
Dr. Fernando Rivera Cabrera

**Secretario:**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

  
Dra. Angélica Román Guerrero

**Vocal:**

Universidad Autónoma Metropolitana- Lerma

  
Dr. Ricardo Beristaín Cardoso

**Vocal:**

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

  
Dr. Antonio Bernabé Antonio

*En memoria de mi padre*

## *AGRADECIMIENTOS*

Agradezco a **Dios** por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mi **madre**, que con su demostración de una madre ejemplar me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

A mi hija **Sahará Fernanda** por ser el ATP que mueve todo mi ser.

A **Uriel**, por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos.

A mi hermana **Natalia** por ser mi cómplice y apoyarme en todo momento, a mi sobrino **Víctor** por ser como mi hermanito.

A mi primo **Agustín** por apoyarme cuando más lo necesite.

A la **Dra. Magdalena Ocampo** por saber escucharme y aconsejarme en los momentos que lo he necesitado.

Al **Dr. Francisco Cruz** por creer en mí y apoyarme desde que llegue a este laboratorio.

Al **Dr. Antonio Bernabé** por sus consejos y apoyo en el laboratorio.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

Y sobre todo le doy gracias a *Prosopis laevigata* por existir, tolerar y acumular altas concentraciones de Cr y Pb, ya que sin ella no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

## RESUMEN

Estudios en cultivos *in vitro* indican que *Prosopis laevigata* (Humb & Bonpl. Ex Willd) M. C. Johnst. puede ser considerada como una especie potencialmente hiperacumuladora de cromo (Cr) y plomo (Pb). En este trabajo se presenta un protocolo para el establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*, con el objetivo de evaluar el efecto del Cr(VI) y Pb(II) sobre el crecimiento, y su acumulación en los cultivos celulares, así como, la competencia del Cr(VI) y Pb(II) por los transportadores de Mn(II) y Zn(II), respectivamente. Los callos fueron inducidos a partir de cotiledones de 15 días de edad cultivados en medio Murashige y Skoog adicionado con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN). La cinética de crecimiento, de las células en suspensión cultivadas en ausencia de metales pesados (MP), presentaron una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.0491 d<sup>-1</sup> y tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 14.1 d, con una viabilidad del 80%. Mientras que los cultivos en suspensión suplementados con 1.0 mM de Cr(VI) o Pb(II) mostraron un  $\mu$  y  $t_d$  de 0.0633 d<sup>-1</sup>, 10.94 d para el Cr(VI), y 0.0620 d<sup>-1</sup>, 11.17 d para el Pb(II), respectivamente. Para evaluar el crecimiento celular y la acumulación de MP se realizaron bioensayos usando concentraciones desde 0.0 a 3.0 mM de Cr(VI) o Pb(II). Las células cultivadas con 1.0 mM de Cr(VI) mostraron un crecimiento relativo (CR) significativamente mayor (122%) que el control (100%); en contraste, las células cultivadas con 2.0 y 3.0 mM de Cr(VI) tuvieron menor CR (81% y 58%, respectivamente) comparado con el control. Por otra parte, las células cultivadas con 1.0 mM de Pb(II) no presentaron diferencias significativas en el CR con respecto al control, mientras que en los tratamientos con 2.0 y 3.0 mM de Pb(II), el CR (81% y 70%, respectivamente) fue significativamente menor que el control (100%). Con relación a la acumulación de MP en las células en suspensión de *P. laevigata*, se observó una mayor acumulación de Pb (14,086-30,079 mg Pb Kg<sup>-1</sup> peso seco (PS)) que Cr (2379-7194 mg Kg<sup>-1</sup> PS). Además, se observó que al incrementar la concentración de ambos metales en el medio de cultivo, también se incrementó la acumulación de Cr o Pb en la biomasa. Para determinar la competencia del Cr(VI) por los transportadores de Mn(II) se realizó un bioensayo con Cr(VI)/Mn(II) (0.0, 0.5 y 1.0 mM), en los cuales, se observó que las células presentaron un crecimiento relativo del 83-98% en todas las concentraciones y combinaciones de Cr(VI) y Mn(II). Cuando el Cr(VI) fue adicionado al medio con o sin Mn(II), las células mostraron mayor eficiencia de acumulación para el metal no esencial (Cr) sobre el metal esencial (Mn). Para determinar la competencia del Pb(II) por los transportadores de Zn(II) se realizó un bioensayo

con Pb(II)/Zn(II) (0.0, 0.5 y 1.0 mM), en donde se observó que las células presentaron un crecimiento relativo del 63-98% en todas las concentraciones y combinaciones de Pb(II) y Zn(II). Además, cuando el Pb(II) fue adicionado al medio con o sin Zn(II), las células mostraron mayor eficiencia de acumulación para el metal no esencial (Pb) sobre el metal esencial (Zn) (valores del factor de bioconcentración (FBC) para Pb >> valores de FBC para zinc; 2-33 veces). Las imágenes de las células observadas con microscopía electrónica de barrido evidenciaron la acumulación del Cr y Pb en la pared celular. Estos resultados proporcionan información sobre los mecanismos de tolerancia y acumulación de Cr y Pb que se llevan a cabo en *P. laevigata*

**Palabras clave:** *Prosopis laevigata*, cromo, manganeso, plomo, zinc, transporte competitivo, bioacumulación, fitorremediación.

## ABSTRACT

*In vitro* studies indicate that *Prosopis laevigata* (Humb & Bonpl. Ex Willd) M. C. Johnst can be considered a potential hyperaccumulator of chromium (Cr) and lead (Pb). This paper presents a protocol for the establishment of *Prosopis laevigata* cell suspension culture with the aim of determining the effect of Cr(VI) and Pb(II) on the growth and accumulation in *P. laevigata*, well as, the competition of Cr(VI) and Pb(II) by Mn(II) and Zn(II) transporters, respectively. The callus used for this purpose were obtained from cotyledons of 15 days, cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4 -D, 1.5 mg L<sup>-1</sup>) and kinetin (KIN, 1.0 mg L<sup>-1</sup>). The growth kinetics of cultured cells in suspension in the absence of MP showed a specific growth rate ( $\mu$ ) of 0.0491d<sup>-1</sup> and doubling time ( $t_d$ ) of 14.1 d with a viability of 80 %. While the suspension cultures added of 1 mM Cr(VI) or Pb(II) showed a  $\mu$  and a  $t_d$  of 0.0633 d<sup>-1</sup>, d 10.94 for Cr(VI) and 0.0620 d<sup>-1</sup>, 11.17 d for Pb(II). To determine the growth and accumulation of Cr and Pb bioassays were performed with different concentrations of Cr and Pb (0.0 – 3.0 mM) was observed in the cultured cells with 1.0 mM Cr(VI) relative growth (CR) was significantly higher (122 %) than the control, while the CR of the cultured cells with 2.0 and 3.0 mM of Cr(VI) was lower than in the control treatment (81 % and 58 % respectively). In the case of Pb was observed that cells cultured with 1 mM Pb(II) no significant differences in CR relative to the control, while those which were grown to 2.0 to 3.0 mM Pb CR was significantly less than control (81 % and 70% respectively). With respect to the accumulation of Cr and Pb by *P. laevigata* cell suspensions was observed that the cells accumulate more Pb (14,086-30,079 mg Pb Kg<sup>-1</sup> dry weight (DW)) to Cr (2379-7194 mg Kg<sup>-1</sup> DW)). It was further observed that as the concentration is increased Cr or Pb in between both metal accumulation in biomass was greater. To determine the competence of the Cr(VI) by transporters Mn(II), a bioassay with Cr(VI)/ Mn(II) (0.0, 0.5 and 1.0 mM) was carried out on cell suspension cultures. Cells showed significant tolerance to growth of 83-98 % in all concentrations and combinations of Cr and Mn (0.0, 0.5, 1.0 mM). When the Cr(VI) with or without Mn(II) were added to the culture medium, the cells showed highest accumulation efficiency for non- essential (Cr) metal over essential (Mn) metal. Finally, to determine the competence of the Cr(VI) by transporters Mn(II), a bioassay with Pb(II)/Zn(II) (0.0, 0.5, and 1.0 mM) was carried out on cell suspension cultures. Cells showed significant tolerance to growth (CR>60%) at all concentrations and combinations of Pb(II) and Zn(II) (0.0, 0.5 and 1.0 mM). When the Pb(II) with or without Zn(II) were added to the culture medium, the cells showed the highest accumulation efficiency for

non-essential (lead) metal over essential (zinc) metal (bioconcentration factor (FBC) values for Pb > FBC values for Zn; 2-33 times). Scanning electron micrographs evidenced the accumulation of Cr and Pb in the cells walls. These results provide insights about the tolerance and accumulation mechanisms of Cr and Pb occurring in *P. laevigata*.

**Keywords:** *P. laevigata*, chromium, lead, manganese, zinc, competitive transport, bioaccumulation, phytoremediation

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
2,4-D	Acido 2,4-Diclorofenoxi acético
BAP	6-Bencil aminopurina
Cr	Cromo
FBC	Factor de bioconcentración
GR	Crecimiento relativo
KIN	Cinetina
Mn	Manganeso
MP	Metales pesados
MS	Medio Murashige & Skoog
Pb	Plomo
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
SEM	Microscopia electrónica de barrido
$t_d$	Tiempo de duplicación
Zn	Zinc
PS	Peso seco
PF	Peso fresco

## ÍNDICE

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE .....	6
LISTA TABLAS.....	8
LISTA FIGURAS .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Fitorremediación de metales pesados.....	16
2.1.1 Fuentes de los metales pesados en el ambiente.....	16
2.1.2 Efectos de los metales pesados sobre la salud humana .....	17
2.1.3 Limpieza de suelos contaminados con metales pesados.....	18
2.1.4 Estrategias de fitorremediación .....	19
2.1.5 Uso de árboles en la fitorremediación.....	22
2.2 Cultivo de tejidos vegetales .....	25
2.2.1 Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales .....	26
2.2.2 El Cultivo de Tejidos Vegetales como modelo para estudios de genética, bioquímica y fisiología de plantas .....	33
2.3 Absorción de los metales pesados por las plantas.....	34
2.3.1 Mecanismos de defensa y tolerancia .....	36
2.3.2 Cromo.....	38
2.3.3 Plomo .....	40
2.4 Generalidades de <i>Prosopis laevigata</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst.....	43
2.4.1 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>P. laevigata</i> .....	45
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>49</b>
<b>5 OBJETIVO .....</b>	<b>51</b>
5.1 General .....	51
5.2 Específicos.....	51
<b>6 MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>53</b>
6.1 Material vegetal .....	53

6.2 Inducción de callo.....	53
6.3 Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.....	54
6.4 Evaluación de MP en cultivos de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> .....	55
6.5 Cuantificación de metales (Cr, Pb, Zn y Mn) en biomasa vegetal .....	56
6.6 Estimación de índices y coeficientes .....	56
6.7 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	57
6.8 Análisis estadístico .....	58
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
7.1 Inducción de callo.....	60
7.2 Establecimiento de cultivos en suspensión y cinética de crecimiento.....	61
7.3 Efecto de Cr(VI) y Pb(II) sobre el crecimiento de cultivos en suspensión.....	63
7.4 Acumulación de Cr y Pb en cultivos de células suspensión .....	66
7.5 Efecto de la competencia de Cr(VI) por los transportadores de Mn(II) de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> .....	68
7.6 Efecto de la competencia de Pb(II) por los transportadores de Zn(II) de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> .....	71
7.7 Análisis por microscopía electrónica de barrido y energía dispersiva de rayos X.....	74
<b>8 CONCLUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>9 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>11 ARTICULO .....</b>	<b>88</b>

## LISTA TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fuentes antropogénicas de metales pesados en el ambiente .....	17
<b>Tabla 2.</b> Efectos tóxicos de los metales pesados sobre la salud .....	18
<b>Tabla 3.</b> Composición de algunos medios de cultivo. ....	29
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos empleados para la inducción de callo.....	54
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos para evaluar la competencia entre Mn y Cr, y del Zn con el Pb ...	56
<b>Tabla 6.</b> Efecto de los diferentes reguladores de crecimiento y tipo de explante de <i>P. laevigata</i> en la inducción de callo .....	61
<b>Tabla 7.</b> Factor de Bioconcentración (FBC) de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> , 18 días de cultivo.....	68
<b>Tabla 8.</b> Acumulación y Factores de Bioconcentración para el Cr y Mn en células en suspensión de <i>P. laevigata</i> , a los 18 días de cultivo.....	70
<b>Tabla 9.</b> Acumulación y Factores de Bioconcentración para el Pb y Zn en células en suspensión de <i>P. laevigata</i> , a los 18 días de cultivo .....	73
<b>Tabla 10.</b> Composición elemental (%) de la pared celular (EDS) de <i>P. laevigata</i> .....	75

## LISTA FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Posibles destinos de los contaminantes durante la fitorremediación, pueden ser estabilizados o degradados en la rizosfera, secuestrados o degradados dentro de la planta o volatilizados. Tomado de Pilon-Smits, 2005 .....	19
<b>Figura 2.</b> Interacciones de Auxinas y Citocininas requeridas para el crecimiento y morfogénesis en CTV(Adaptado de Staden et al., 2008).....	31
<b>Figura 3.</b> Toxicidad ocasionada por los metales pesados sobre las biomoléculas. Tomado de McGrath et al., 2002.....	34
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de defensa activados por los MP en las células vegetales. CS, cisteína sintasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión; GST, glutatión-S-transferasa; SOD, superóxido dismutasa; APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; POD, peroxidasa; PDI, proteína disulfuro isomerasa; HSP, proteína de choque térmico; OPR, ácido 12-oxo-fitodienoico isomerasa; SAMS, S-adenosil-L-metionina sintetasa; ACC oxidasa, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa; CHS, chalcona sintasa; SAM, S-adenosil-L-metionina; JA, ácido jasmónico. (Ahsan et al., 2009). .....	36
<b>Figura 5.</b> Sistemas antioxidantes para la eliminación de ERO en plantas: (a) Ciclo agua–agua; (b) ciclo ascorbato–glutatión; (c) ciclo glutatión peroxidasa (GPX); (d) acción de la catalasa (CAT) sobre el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Fd, ferredoxina; MDHA, monodehidro-ascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; PSI, fotosistema I; tAPX, APX tilacoidal (Modificado de: Mittler, 2002).....	37
<b>Figura 6.</b> Modelo del transporte y toxicidad del Cr en plantas (Modificado de Shanker et al., 2005).....	39
<b>Figura 7.</b> Vista general de los efectos tóxicos causados por el plomo en las plantas. Todos estos eventos relacionados con la fototoxicidad finalmente ocasionan alteraciones en diversos procesos fisiológicos. Los signos “+” y “-” indican efectos positivos y negativos, respectivamente (Sharma y Dubey, 2005).....	42
<b>Figura 8.</b> Callo inducido en diferentes explantes de <i>P. laevigata</i> : a) callo beige de apariencia friable inducido de hipocotilo (D <sub>1.5</sub> K <sub>1.0</sub> , 30 d); b) callo obtenido de raíz color blanquecino/beige de apariencia esponjosa y friable (D <sub>1.5</sub> K <sub>1.0</sub> , 30 d); c) callo friable de color verde-amarillo y beige obtenido a partir de cotiledón (D <sub>1.5</sub> B <sub>1.0</sub> , 30); d) callo beige friable inducido de cotiledón (D <sub>1.5</sub> K <sub>1.0</sub> , 30d); e) cultivo de células en suspensión obtenido a partir de callo inducido de cotiledón (D <sub>1.5</sub> K <sub>1.0</sub> , 18 d).....	60

<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento de líneas celulares en suspensión de <i>P. laevigata</i> , cultivadas en medio MS. ....	62
<b>Figura 10.</b> Efecto del cromo (VI) en el crecimiento relativo de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> a los 18 días de cultivo. ....	64
<b>Figura 11.</b> Efecto del plomo (II) en el crecimiento relativo de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> a los 18 días de cultivo. ....	65
<b>Figura 12.</b> Cálculo de la concentración crítica (CC) de Cr(VI) y Pb(II) para <i>P. laevigata</i> a partir del crecimiento relativo (CR), a los 18 días de crecimiento. ....	66
<b>Figura 13.</b> Acumulación de cromo en células en suspensión de <i>P. laevigata</i> cultivadas con diferentes concentraciones de Cr(VI) durante 18 días de cultivo. ....	67
<b>Figura 14.</b> Acumulación de plomo en células en suspensión de <i>P. laevigata</i> cultivadas con diferentes concentraciones de Pb(II) durante 18 días de cultivo. ....	67
<b>Figura 15.</b> Efecto del Mn y Cr en el crecimiento de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> durante 18 días de cultivo .....	69
<b>Figura 16.</b> Efecto del Zn y Pb en el crecimiento de células en suspensión de <i>P. laevigata</i> durante 18 días de cultivo .....	72
<b>Figura 17.</b> Células en suspensión de cultivos de <i>P. laevigata</i> : (a) células del tratamiento control (b) células cultivadas con 1mM Cr(VI), y (c) células cultivadas con 1mM Pb(II) (Magnificación 100x). ....	74
<b>Figura 18.</b> Células en suspensión de <i>P. laevigata</i> cultivadas en medio MS adicionado de: (a) sin MP; (b) 1.0 mM Cr(VI) y 1.0 mM Pb(II) (SEM magnificación 2,000 X). ....	76

# **1.INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados (MP) son componentes naturales del suelo, y como elementos traza, algunos metales pesados como el cobre (Cu), selenio (Se), zinc (Zn), etc., son esenciales para mantener el metabolismo de los seres vivos, mientras que a concentraciones más altas pueden ser tóxicos. La toxicidad por metales pesados podría resultar de la contaminación del agua, las altas concentraciones en el aire cerca de las fuentes de emisión, o a través de la contaminación de la cadena alimenticia. La actividad industrial y minera arroja al ambiente metales tóxicos como plomo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As) y cromo (Cr), muy dañinos para la salud humana y para la mayoría de las formas de vida. Además, los metales originados en las fuentes de emisión generadas por el hombre (antropogénicas), incluyendo la combustión de gasolina con plomo, se encuentran en la atmósfera como material suspendido que respiramos (Zhen-Guo *et al.*, 2002). Por otro lado, las aguas residuales no tratadas, provenientes de minas y fábricas, llegan a los ríos, mientras los residuos industriales contaminan las aguas subterráneas. Cuando se abandonan metales tóxicos en el ambiente, contaminan el suelo y se acumulan en las plantas y los tejidos orgánicos. La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación. La exposición a estos elementos está relacionada con problemas de salud como retrasos en el desarrollo, cánceres, daños en el riñón, e incluso, con casos de muerte (Liu *et al.*, 2008). El cromo como toxico ambiental se produce en el medio ambiente principalmente en dos estados de valencia, el cromo trivalente (Cr III) y el cromo hexavalente (Cr VI). El cromo trivalente (Cr III), ocurre naturalmente y es un nutriente esencial. Mientras que el cromo hexavalente (Cr VI), es producido por los procesos industriales. El Cr VI es más tóxico que el Cr III, bajo una exposición aguda y crónica. El tracto respiratorio es el blanco principal para el cromo. Por otro lado, el Pb es uno de los elementos más tóxicos y abundantes que existen en el ambiente, afecta a la salud humana y a la vida silvestre, posee baja solubilidad y ha sido clasificado como carcinogénico y mutagénico. Las concentraciones del Cr y Pb en el ambiente se incrementan año con año (Govindasamy *et al.*, 2011). Por lo que es necesario limpiar los suelos contaminados con estos elementos con el fin de minimizar el daño que ocasionan al ambiente y a la salud. Uno de los métodos para remediar los suelos es la fitorremediación, la cual es considerada como una alternativa amigable con el ambiente

para la limpieza de suelos contaminados con MP. La fitorremediación es una estrategia de biorremediación, que se define como el uso de vegetación y la microbiota asociada para el tratamiento *in situ* de suelos, sedimentos y aguas contaminadas. Puede utilizarse para remover, transferir, estabilizar y concentrar metales de suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ* (Salt *et al.*, 1998; Meagher, 2000; Van Deuren *et al.*, 1997). La fitorremediación es una tecnología relativamente reciente, los estudios de investigación en esta área se han realizado en su mayoría durante las dos últimas décadas (1990 en adelante). Hasta ahora la información sobre los mecanismos de desintoxicación/tolerancia a MP en las especies vegetales es escasa por lo que una herramienta importante para conocer las vías y mecanismos de detoxificación de las plantas a los MP es el cultivo de tejidos vegetales ya que proporciona información acerca de las relación planta-contaminante, ayuda a predecir la respuesta de la planta hacia los contaminantes ambientales, y a diseñar plantas con características mejoradas para la fitorremediación. Los callos, células en suspensión, cultivo de raíces y brotes se utilizan actualmente como sistemas modelo para el entendimiento de la absorción, localización, metabolismo, toxicidad, y tolerancia de los contaminantes en condiciones asépticas (Couselo *et al.*, 2012).

Hasta ahora se sabe que el Cr y el Pb no son elementos esenciales para las plantas, sin embargo, éstas los absorben con facilidad. La entrada del Cr y Pb así como su acumulación en las plantas ocurre directamente, cuando son absorbidos a través de las raíces junto con otros minerales y agua (Sengar *et al.*, 2008). En las células vegetales, los MP pueden unirse a átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno, y sustituir metales esenciales, alterando así diversas funciones. Sin embargo, ciertas plantas poseen mecanismos por los que pueden tolerar la presencia de MP, entre éstos se encuentran la unión del metal a la pared celular, su compartimentalización en la vacuola y la activación de sistemas enzimáticos y no enzimáticos que eliminan especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la presencia de MP. El transporte de los MP como el Cr y Pb dentro de una planta, así como su localización en las células son factores determinantes en la toxicidad que la planta puede presentar. El Cr y el Pb ocasionan efectos adversos en la morfología, crecimiento y fotosíntesis en las plantas e inhiben algunas actividades enzimáticas, además de provocar alteraciones en el balance de agua, en la permeabilidad de la membrana y en la absorción de minerales. Asimismo, la presencia de estos metales en los tejidos de una planta pueden ocasionar un incremento en el estrés oxidativo, es decir, una sobreproducción de especies

reactivas de oxígeno (ERO) como respuesta al estrés abiótico provocado por su presencia (Ahsan *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se evaluó la tolerancia y capacidad de remoción de Cr(VI) y Pb(II) en cultivos de células en suspensión de *Prosopis laevigata*.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Fitorremediación de metales pesados**

La contaminación por MP constituye un serio problema a nivel mundial. La movilización de MP a través de la extracción de minerales y su subsecuente procesamiento para diferentes aplicaciones es lo que ha permitido la liberación de esos elementos en el ambiente. El problema con la contaminación por MP ha llegado a ser más serio con el incremento en la industrialización y la alteración de los ciclos biogeoquímicos. A diferencia a de las sustancias orgánicas, los MP no son biodegradables por lo que se acumulan en el ambiente. La acumulación de los MP en suelos y mantos acuíferos constituye un riesgo para la salud ambiental y humana. Estos elementos se acumulan en los seres vivos (bioacumulación) y sus concentraciones se van incrementando (fenómeno conocido como biomagnificación). En el suelo, los MP ocasionan efectos tóxicos sobre los microorganismos del suelo, lo que puede llevar a una disminución en su número y actividades (Padmavathiamma *et al.*, 2007). De acuerdo al rol de los MP en los sistemas biológicos estos son clasificados como esenciales y no esenciales. Los MP esenciales son aquellos que son necesarios en cantidades mínimas por los organismos vivientes para sus funciones fisiológicas y bioquímicas vitales. Algunos de los metales esenciales son hierro (Fe), manganeso (Mn), Cu, Zn. Los metales no esenciales son aquellos que no tienen ninguna función fisiológica ni bioquímica, entre ellos se encuentran, el Cd, Pb, Cr, As y Hg. Las concentraciones de MP mas allá de los límites umbrales poseen efectos adversos para la salud humana porque interfieren con el normal funcionamiento de los sistemas vivos (Ali *et al.*, 2013).

#### **2.1.1 Fuentes de los metales pesados en el ambiente**

Los MP llegan al ambiente de fuentes naturales como son la actividad volcánica y la erosión, además, de algunas fuentes antropogénicas (Tabla 1) como la minería, la industria, el uso de pesticidas y fertilizantes, etc. (Ali *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** Fuentes antropogénicas de metales pesados en el ambiente

<b>Metal pesado</b>	<b>Fuente origen</b>	<b>Referencia</b>
As	Pesticidas, conservadores de la madera	Thagavel y Sbbhuramm, 2004
Cd	Pinturas y pigmentos, estabilizantes plásticos, galvanoplastia, fertilizantes	Salem <i>et al.</i> , 2000, Pulford y Watson 2003
Cr	Industria del acero, curtido de pieles	Khan <i>et al.</i> , 2007
Cu	Pesticidas y fertilizantes	Khan <i>et al.</i> , 2007
Hg	Minas de Au-Ag, combustión de carbón, desechos médicos	Memon <i>et al.</i> , 2009, Wuana y Okieimen, 2011, Rodrigues <i>et al.</i> , 2012
Ni	Efluentes industriales, aparatos de cocina, instrumentos quirúrgicos, aleaciones de acero, baterías de automóviles	Tariq <i>et al.</i> , 2006
Pb	Combustión de gasolina con Pb, fabricación de baterías, herbicidas, insecticidas	Thagavel y Sbbhuramm, 2004; Wuana y Okieimen, 2011

### 2.1.2 Efectos de los metales pesados sobre la salud humana

Los MP ocasionan efectos adversos en la salud humana, por lo que la contaminación de la cadena alimenticia requiere especial atención. Muchos MP son tóxicos y pueden causar efectos indeseables y problemas severos a bajas concentraciones. Los MP provocan estrés oxidativo por la formación de radicales libres. El estrés oxidativo se refiere a un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales pueden vencer la defensa antioxidante de las células permitiendo daño o muerte celular. Además, pueden remplazar los metales esenciales en los pigmentos o enzimas alterando su función. De acuerdo a su toxicidad los MP más tóxicos son Hg, Cd, Pb, As, Cu, Zn, Sn y Cr. De estos metales Hg, Cd, Pb y As son metales no esenciales, mientras que el Cu y Zn son metales esenciales (elementos traza). Los MP pueden ocasionar diferentes problemas de salud según del metal que se trate, concentración, estado de oxidación, etc. (Ali *et al.*, 2013) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efectos tóxicos de los metales pesados sobre la salud

<b>Metal pesado</b>	<b>Efecto tóxico</b>	<b>Referencia</b>
As	As (arsenato) es un análogo del fosfato por lo que interfiere con procesos celulares esenciales como la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP	Tripathi <i>et al.</i> , 2007
Cd	Carcinogénico, mutagénico y teratogénico, disruptor endocrino, interfiere con la regulación del calcio en sistemas biológicos, provoca falla renal y anemia crónica	Degraeve, 1981; Salem <i>et al.</i> , 2000 y Awofolu, 2005
Cr	Provoca pérdida del cabello	Salem <i>et al.</i> , 2000
Cu	Elevados niveles ocasionan daño cerebral y renal, cirrosis, anemia crónica, irritación estomacal e intestinal	Salem <i>et al.</i> , 2000; Wuana y Okieimen, 2011
Hg	Ansiedad, enfermedades autoinmunes, depresión, alteraciones en el equilibrio, somnolencia, fatiga, pérdida de cabello, insomnio, irritabilidad, pérdida de memoria, infecciones recurrentes, alteraciones en la visión, temblores, úlceras, daño cerebral, renal y pulmonar	Neustadt y Pieczenik, 2007; Ainza <i>et al.</i> , 2010 y Gulatu <i>et al.</i> , 2010
Ni	Dermatitis alérgica, su inhalación puede ocasionar cáncer pulmonar, nasal y de senos paranasales, así como cáncer de garganta y estómago,	Salem <i>et al.</i> , 2000, Khan <i>et al.</i> , 2007, Das <i>et al.</i> , 2008
Pb	En niños ocasiona alteraciones en el desarrollo, retraso mental, pérdida de la memoria, problemas de aprendizaje; insuficiencia renal, alteraciones cardiovasculares.	Salem <i>et al.</i> , 2000; Padmavathamma y Li, 20007; Wuana y Okieimen, 2011; y Igbal, 2012
Zn	Una sobredosis puede ocasionar mareos y fatiga	Hess y Schmid, 2002

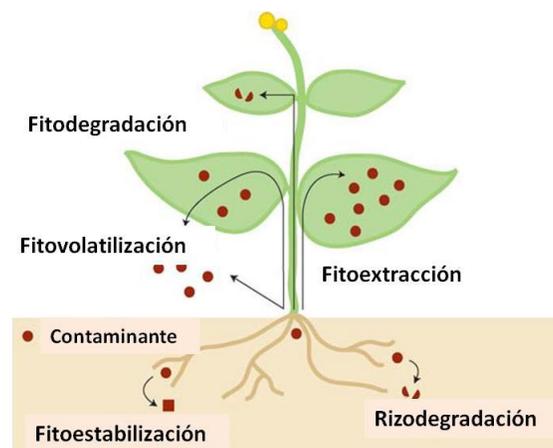
### 2.1.3 Limpieza de suelos contaminados con metales pesados

Las concentraciones de los MP en el ambiente se incrementan año con año (Govindasamy *et al.*, 2011). Por lo que es necesario remediar los suelos contaminados con MP con el fin de minimizar el daño que ocasionan al ambiente y a la salud. Los métodos convencionales de remediación *in situ* incluyen la vitrificación, incineración del suelo y excavación y relleno, lavado del suelo, la solidificación, y métodos electrocinéticos (Sheoran *et al.*, 2011; Wuana y Okieimen, 2011). Los métodos físicos y químicos tienen como desventajas altos costos, cambios irreversibles en las propiedades del suelo y alteraciones en la microflora nativa del suelo. Los métodos químicos también pueden crear problemas de contaminación secundarios (Sheoran *et al.*, 2011). Por lo anterior, es necesario desarrollar métodos económicos, eficientes y amigables con el ambiente para la limpieza de suelos contaminados con MP. Uno de estos métodos es la fitorremediación, la cual se define como el uso de vegetación y la microbiota asociada para el tratamiento *in situ* de suelos, sedimentos y aguas contaminadas. Se caracteriza porque las plantas generalmente manejan a los contaminantes sin afectar el suelo, conservando su utilidad y funcionalidad. Además, las plantas pueden aumentar la fertilidad del suelo mediante la aportación de materia orgánica (Mench *et al.*, 2009). Por otra parte, pueden utilizarse para remover,

transferir, estabilizar y concentrar metales de suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ* (Salt *et al*, 1998; Meagher, 2000; Van Deuren *et al.*, 1997). Las plantas tienen una enorme capacidad de absorber contaminantes del ambiente y llevar a cabo su detoxificación por diversos mecanismos. La fitorremediación es una tecnología relativamente reciente, los estudios de investigación en esta área se han realizado en su mayoría durante las dos últimas décadas (1990 en adelante), demostrando que, es una técnica estéticamente agradable, adecuada para la aplicación en sitios grandes donde otros métodos de remediación no son rentables o factibles (Garbisu y Alkorta, 2003). Además, tiene un bajo costo para su instalación y mantenimiento comparada con otras técnicas de remediación (Van Aken, 2009). Adicionalmente, el establecimiento de vegetación sobre suelos contaminados puede ayudar a prevenir la erosión y la lixiviación de los MP (Chaudhry *et al.*, 1998).

#### 2.1.4 Estrategias de fitorremediación

Las plantas exhiben diferentes mecanismos de captación de contaminantes orgánicos e inorgánicos que se emplean en los procesos de fitorremediación (Pilon-Smits, 2005) (Figura 1).



**Figura 1.** Posibles destinos de los contaminantes durante la fitorremediación, pueden ser estabilizados o degradados en la rizosfera, secuestrados o degradados dentro de la planta o volatilizadas. Tomado de Pilon-Smits, 2005

##### 2.1.4.1 Fitoextracción

La fitoextracción (también conocida como fitoacumulación, fitoabsorción o fitosequestración) se refiere a la acumulación y translocación, a través de las raíces, de contaminantes presentes en el suelo hacia diferentes partes de la planta, dando como

resultado la limpieza permanente del sitio. Esta es la tecnología más estudiada entre todas las de este tipo (Tangahu *et al.*, 2011).

#### 2.1.4.2 Fitofiltración

La fitofiltración se refiere a la remoción de los contaminantes del agua o aguas residuales por plantas (Mukhopadhyay y Maiti, 2010). La fitofiltración se puede dividir en rizofiltración (uso de raíces), y blastofiltración o caulofiltración (uso de plántulas). En la fitofiltración los contaminantes son absorbidos o adsorbidos y por lo tanto su disponibilidad hacia aguas subterráneas es minimizada.

#### 2.1.4.3 Fitoestabilización

La fitoestabilización o fitoinmovilización es el uso de ciertas plantas para la estabilización de contaminantes en suelos contaminados (Singh, 2012). Esta técnica es empleada para disminuir la movilidad y biodisponibilidad de contaminantes en el ambiente, evitando así su migración a aguas subterráneas o su entrada en la cadena alimenticia (Erakhrumen, 2007). Las plantas pueden inmovilizar los MP a través de la sorción en sus raíces, precipitación, formación de complejos, reducción de la valencia del MP en la rizósfera (Barceló y Poschenrieder, 2003; Ghosh y Singh, 2005). Los metales con diferente valencia varían en su toxicidad. Debido a ciertas enzimas redox las plantas tienen la capacidad de convertir metales altamente tóxicos en menos tóxicos. Por ejemplo, la reducción de Cr(VI) en Cr(III) es ampliamente estudiada, ya que este último es menos tóxico. Aunque la fitoestabilización limita el movimiento de los MP hacia la cadena trófica o mantos acuíferos, no es una solución permanente ya que los MP siguen estando en el suelo. Actualmente, es empleada como una estrategia para la estabilización (inactivación) de contaminantes potencialmente tóxicos (Vangronsveld *et al.*, 2009).

#### 2.1.4.4 Fitovolatilización

La fitovolatilización es la absorción de los contaminantes del suelo por las plantas, su conversión en formas volátiles y subsecuente liberación a la atmósfera. Esta técnica puede ser empleada para contaminantes orgánicos y algunos metales como el Hg y Se. Sin embargo, su uso es limitado por el hecho de que no remueven el contaminante completamente solo lo transfieren del suelo a la atmósfera (Padmavathiamma y Li, 2007).

#### 2.1.4.5 Fitodegradación

La fitodegradación es la degradación de los contaminantes orgánicos por las plantas a través de enzimas como deshalogenasas y oxigenasas. Las plantas pueden acumular contaminantes orgánicos de sitios contaminados y eliminarlos a través de sus actividades

metabólicas. La fitodegradación está limitada solo a contaminantes orgánicos porque los metales no son biodegradables (Vishnoi y Srivastava, 2008).

El éxito de cualquier estrategia de fitorremediación depende de la identificación de especies vegetales adecuadas, que acumulen altas concentraciones de metales y produzcan grandes cantidades de biomasa. Pocas son las especies de plantas adaptadas para sobrevivir en suelos contaminados con altas concentraciones de metales. Estas especies se dividen principalmente en dos grupos: las llamadas pseudometalofitas, que crecen tanto en suelos no contaminados como en suelos contaminados; y las metalofitas, que crecen solo en suelos contaminados con metales y/o naturalmente ricos en ellos (Baker, 1987).

Las plantas que crecen en su hábitat natural y que acumulan en sus tejidos aéreos altas concentraciones de metales (mayor a 1000 mg Kg<sup>-1</sup> en peso seco) se conocen como hiperacumuladoras (Reeves, 1992). Generalmente las concentraciones en brotes, usadas como criterio para definir especies hiperacumuladoras se encuentran entre 1 y 5% en peso seco., específicamente 0.1% para Ni, Co, Cu y Pb; 1.0% para Zn y 0.01% para Cd (Baker *et al.*, 2000). Se ha reportado una gran biodiversidad de especies con potencial, probado en campo y en laboratorio, para la fitorremediación. A la fecha, se han identificado 163 taxones de plantas, pertenecientes a 45 familias, tolerantes a los metales y capaces de crecer en concentraciones elevadas. Entre las angiospermas se han identificado cerca de 400 hiperacumuladoras; entre las familias dominantes se encuentran: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae y Europhobiaceae. De estas familias, Brassicaceae tiene el mayor número de taxones, 11 géneros y 87 especies, con capacidad para hiperacumular metales (Prasad y Freitas, 2003).

Un prerrequisito para la hiperacumulación de metales, es la capacidad de una especie para tolerar eficientemente altas concentraciones de metales dentro de sus tejidos y células. Las plantas hiperacumuladoras de metales tienen la habilidad de solubilizar metales del suelo, absorbiéndolos en sus raíces y translocándolos hasta sus brotes (Pollard *et al.*, 2002). La superficie de la raíz está específicamente desarrollada para captar los nutrientes elementales presentes en el suelo y en soluciones. Algunas de las plantas acumuladoras de metales liberan componentes que atrapan los metales en la rizósfera, lo cual ayuda a su solubilización y captación, como en el caso del Fe (Ma y Nomoto, 1996), el aluminio (Al) (Pellet *et al.*, 1995) y, posiblemente, el Zn (Cakmak *et al.*, 1996).

El principal mecanismo en especies tolerantes a metales, parece ser la captación en el compartimento vacuolar, la aparente tolerancia de las plantas para incrementar niveles de elementos tóxicos en sus tejidos puede ser resultado de la exclusión de los mismos elementos tóxicos de los sitios celulares donde se llevan a cabo los procesos vitales, tales como la división celular y la respiración. Lo anterior provee a la planta con un efectivo mecanismo de protección (Chaney *et al.*, 1997; Hall 2002).

Para la adecuada limpieza, por fitorremediación, de un suelo contaminado con metales, es necesaria la selección adecuada de especies vegetales. Una planta adecuada para fitorremediación debe poseer las siguientes características (Raskin *et al.*, 1997):

- Capacidad para acumular metales, preferentemente en sus partes aéreas.
- Tolerancia a los efectos tóxicos del metal acumulado
- Rápido crecimiento y grandes cantidades de biomasa
- Sistema radicular extenso, raíces profundas y ramificadas
- Buena adaptación a las condiciones ambientales y climáticas
- Resistencia a patógenos
- Fácil cultivo y cosecha
- Rechazo a herbívoros para evitar la entrada en la cadena alimenticia

### **2.1.5 Uso de árboles en la fitorremediación**

A pesar de los avances que se han hecho en estudio de fitorremediación, su aplicación en campo aun es limitada debido a que las especies vegetales hiperacumuladoras muchas veces producen poca biomasa, pobre adaptación a las condiciones geográficas y climatológicas de los sitios contaminados, susceptibilidad a enfermedades. Por lo que la fitorremediación con árboles ha estado recibiendo mayor atención debido a la capacidad que tienen para crecer en suelos pobres de nutrientes, por su mayor capacidad para producir biomasa, sistema radicular profundo, resistencia a los contaminantes del suelo y la acumulación selectiva de contaminantes (Liu *et al.*, 2013).

Hasta ahora se sabe que los MP son absorbidos y translocados por las plantas en diferentes grados. La biodisponibilidad de los metales y su subsecuente acumulación en los tejidos del árbol pueden variar en gran medida dependiendo de la fuente de contaminación por metales y las condiciones del sitio. La movilidad de los MP en suelos depende de muchos factores, incluyendo el pH, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico, presencia de materia orgánica, actividad biológica, etc (Liu, *et al.*, 2013).

Numerosos estudios demuestran que la absorción de MP por arboles varía con la edad de este. En *Salix viminalis* la acumulación de Cd, Co, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn se ha estudiado en relación con la edad del árbol y los resultados indican que arboles de entre dos y tres años de edad son más eficientes con fines de remediación, exhiben mayor tolerancia al estrés y una mejor capacidad de adaptación que plantas de un año de edad.

En el sauce y el álamo, Lombini *et al.* (2003) ha atribuido estas variaciones a diferentes tasas de crecimiento que se producen durante un año. Dinelli y Lombini (1996) reportaron que las concentraciones de los MP fueron más altas en la etapa inicial de crecimiento vegetativo, debido a la alta absorción de nutrientes en comparación con la tasa de crecimiento. El crecimiento vigoroso diluye las concentraciones hasta la etapa de floración, en la que se obtuvieron los valores mínimos para casi todos los elementos. Además, también se han encontrado variaciones estacionales en la absorción de MP por los árboles. La absorción de MP en *Silene armeria* es más activa en la zona radicular durante las primeras etapas del crecimiento, cuando las necesidades de nutrientes son mayores; con la madurez de la planta y con condiciones ambientales más cálidas se favorece la transpiración y la translocación del metal a la parte superior de la planta y en la etapa de senescencia los MP tienden a almacenarse en las hojas (Lombini *et al.*, 2003). Hasselgren (1999) reporta una tendencia de incremento de Cu en las hojas de sauce en el otoño como un posible efecto de desintoxicación en relación con la defoliación.

La translocación de MP en arboles varía entre las diferentes especies. Rosselli *et al.* (2003) reportaron que *Salix viminalis* y *Betula pendula* almacenan Zn y Cd en ramas y hojas mientras que *Alnus incana*, *Fraxinus excelsior* y *Sorbus mougeotii* los excluyen de sus tejidos aéreos. Stoltz y Greger (2002) observaron que existen diferencias en la absorción y translocación de los MP dentro de la misma especie vegetal cuando las plantas son cultivadas en campo y en sistemas hidropónicos; estas diferencias probablemente se deben a los procesos que ocurren en la interfaz raíz-suelo. Pulford *et al.* (2001) confirmaron que el Cr se transloca poco desde la raíz a los tallos sin importar la forma en que es suministrado (III y VI). Sin embargo, el Zn se transloca fácilmente de raíces a tallos y hojas (Pulford *et al.*, 2001). Se sabe que la transpiración es una fuerza motriz importante en el transporte de los MP de las raíces a la parte aérea. Por lo cual, se ha sugerido que el Cd y Zn se transportan de manera gradual desde la raíz hacia las hojas durante el crecimiento a través de la transpiración (Takenaka *et al.*, 2009).

El transporte de los iones absorbidos por las raíces y su migración hacia la parte aérea se lleva a cabo a través de la savia en las células del xilema (Clemens *et al.*, 2002). La

translocación de los MP a la parte aérea de la planta (hojas, vainas, brotes) depende de diversos factores siendo los más importantes el estado de oxidación y concentración del MP, la capacidad de los tallos para formar órganos de almacenamiento así como las interacciones entre los metales (Ernst, 1996). El Cd y el Zn suelen interactuar en la absorción por las plantas, además estos metales poseen cierta similitud química. En *Populus tremula* se ha encontrado que existe una fuerte correlación entre las concentraciones de Cd y Zn y el factor de bioacumulación lo que sugiere mecanismos de transporte similares para estos dos metales (Hassinen *et al.*, 2009); la translocación de Cd y Zn de la raíz hacia la hoja fue mayor que en el tallo y los tratamientos de Cd y Zn estimularan la translocación del Cd hacia las hojas y tallo, mientras que la translocación de Zn fue menor. Por lo tanto, la interacción fue fuertemente sinérgica con el Cd en presencia del Zn. Sin embargo, White y Chaney (1980) reportaron que la absorción de Cd se redujo en raíces y brotes de soya cuando se aplicó Zn. Por lo que, el efecto de la interacción Zn-Cd puede variar con diferentes especies.

La acumulación de los MP en los diferentes órganos de los árboles varía dependiendo del metal. En *P. tremula* se ha reportado que el Zn se almacena en partes específicas de órganos: hojas viejas y corteza; mientras que el Cd no presenta tal compartimentalización. Otros estudios han demostrado que el Zn se transloca a las hojas; mientras que el Cu es poco translocado en éste mismo órgano. El Zn junto con el Cd se acumula principalmente en las hojas de *P. tremula* cultivada en suelo con contaminación mixta, mientras que el Cu y Pb no son translocados (Langer *et al.*, 2012)

Hasta ahora la información sobre los mecanismos de desintoxicación/tolerancia a MP en las especies arbóreas es escasa y la mayoría está centrada en las metalotioneínas (MTs) y en los sistemas antioxidantes de diferentes especies. En el sauce y de álamo se ha encontrado que los MP estimulan la sobreproducción de radicales libres en raíces y causan disminución en la actividad de la guayacol peroxidasa y probablemente alteran la lignificación; las actividades de las enzimas ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa no se vieron afectadas por la presencia de MP. Se ha encontrado que las MTs están involucradas en la eliminación de ERO, ya que la expresión de MTs induce la producción de enzimas antioxidantes, aunque las MTs juegan un papel importante en la detoxificación de ERO, las vías y mecanismos específicos no se han determinado aún (Liu *et al.*, 2013). Una herramienta importante para conocer estas vías y mecanismos de detoxificación es el cultivo de tejidos vegetales ya que proporciona información acerca de la relación planta-contaminante, ayuda a predecir la respuesta de la planta hacia los contaminantes

ambientales, y a diseñar plantas con características mejoradas para la fitorremediación. Los callos, células en suspensión, cultivo de raíces y brotes se utilizan actualmente como sistemas modelo para el entendimiento de la absorción, localización, metabolismo, toxicidad, y tolerancia de los contaminantes en condiciones asépticas. Además, los cultivos *in vitro* se pueden propagar indefinidamente, están disponibles durante todo el año, y su uso permite una reducción en la cantidad de material vegetal necesario para la investigación (Couselo *et al.*, 2012).

## 2.2 Cultivo de tejidos vegetales

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” (CTV) involucra diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microorganismos en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. También se le conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también de otros materiales) (Pierik, 1990).

Las primeras experiencias relacionadas con el CTV se remontan a 1902, pero en 1922 se logró el primer experimento exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias) ((Pierik, 1990).

Los objetivos perseguidos con la utilización del CTV son numerosos y diferentes. Brevemente, las aplicaciones de tales cultivos se pueden resumir como: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma (Pierik, 1990).

El fundamento del CTV, se asocia a la teoría de la totipotencialidad celular que constituye el principio rector de las técnicas de CTV. Enuncia la posibilidad de obtener una planta entera a partir de cualquier célula viva, bajo condiciones controladas de cultivo. Resulta requisito lograr la desdiferenciación previa de la célula inicial, induciendo la pérdida de las características de especialización de dicha célula hasta un estado de desdiferenciación meristemática. Posteriormente se buscará la rediferenciación de esta célula de partida, para lograr variadas respuestas morfogénicas tales como la obtención de callo, la regeneración de brotes o primordios de raíz, etc. Para promover estas posibles respuestas es necesario

adicionar a los medios sintéticos de cultivo reguladores del crecimiento, fundamentalmente auxinas y citoquininas (Pierik, 1990).

### **2.2.1 Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales**

Las plantas continuamente responden a señales o estímulos (externos e internos) que usan para alterar su fisiología, morfología y desarrollo. Dichos estímulos son: luz, nutrientes minerales, compuestos orgánicos, agua, suelo, calor, frío, reguladores de crecimiento vegetal (RCV), pH, gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), etc. (Buchanan *et al.*, 2000). Por tanto el éxito sobre el establecimiento de CTV se asocia en gran medida a dichos estímulos, por lo que deben considerarse los siguientes factores cuando se desean establecer CTV: a) fuente de explantes, b) constituyentes nutricionales inorgánicos y orgánicos del medio de cultivo, c) RCV y d) temperatura, luz y pH (Bhojwani y Razdan, 1983; Pierik, 1990; Trigiano y Gray, 2000).

#### *2.2.1.1 Fuente de explantes*

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido.

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una amplia gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos; por ejemplo, en el caso de numerosas dicotiledóneas se puede lograr la proliferación callosa con relativa facilidad mediante la utilización de explantes provenientes de diversas partes del vegetal. En el caso de vegetales en los cuales la obtención de callos no esté limitada por el tipo de explante, este se seleccionara por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro*; en estos casos se opta por explantes provenientes de plantas jóvenes. Sin embargo, hay otros vegetales más recalcitrantes para la obtención de callos, y en estos casos es necesario utilizar ciertos explantes, esto ocurre con muchas plantas leñosas y algunas gramíneas. La respuesta de los explantes cultivados *in vitro* puede variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades

de obtener proliferación callosa. Se debe tener en cuenta la presencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados; entre estos factores están la época del año que se realizan los cultivos. Otros factores son los pretratamientos de los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos (Bhojwani y Razdan, 1983).

#### 2.2.1.2 Medios de cultivo

Los requerimientos nutricionales para el óptimo crecimiento de un tejido *in vitro* dependen de la especie a ser cultivada, inclusive puede ser diferente entre tejidos de distintas partes de una planta, por tanto un medio de cultivo específico no será completamente satisfactorio para el cultivo de todos los tipos de tejidos y órganos (Trigiano y Gray, 2000; Bhojwani y Razdan, 1983).

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos (Tabla 3).

Básicamente, los medios de cultivo se componen de (Pierik, 1990):

- Una fuente de carbono
- Nutrientes minerales
- Sustancias vitamínicas
- Sustancias reguladoras del crecimiento
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- Otros compuestos

**Fuente de carbono:** Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se le reemplaza por glucosa.

**Nutrientes minerales:** Los medios de cultivo deben suministrar los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado conjuntamente con un agente quelante ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), lo que lo hace disponible en un amplio rango de pH.

**Sustancias vitamínicas:** De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos.

**Sustancias reguladoras del crecimiento:** En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ácido naftalenacético [ANA], ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D], ácido indolacético [AIA], ácido indolbutírico [IBA], ácido naftoxi-2-acético [NOA], Dicamba, Picloram) y/o citocininas (bencilaminopurina [BA], cinetina [KIN], zeatina [ZEA], 6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilaminopurina [2iP], Thidiazurón [TDZ]). Las giberelinas (especialmente GA<sub>3</sub>) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes.

**Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos):** El agar (entre 0,6 y 1%) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse «Agargel» (0,40-0,60%), «Transfergel» (2-2,60%), «Phytigel» (0,25-0,40%), agarosa (0,80-0,90%) y «Gelrite» (0,10-0,20%).

**Otros compuestos:** Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios. Es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0,1 a 5%) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos. En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. Aún hoy se siguen utilizando ciertas sustancias de composición química indefinida como el agua de coco (5 a 15%), jugo de tomate y puré de banana. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona, entre otros) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos.

**Tabla 3.** Composición de algunos medios de cultivo.

Componentes	B5	MS	WMP
	mg L <sup>-1</sup> (mM)		
<b>Macronutrientes</b>			
KNO <sub>3</sub>	2500	1900	--
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	--	--	556
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	--	1650	400
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	--	--
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150	--	--
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	--	170	170
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	--	990
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150	440	96
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	370	370
<b>Micronutrientes</b>			
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.80	27.80	27.80
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	13.20	22.30	22.30
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.00	8.60	8.60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.00	6.20	6.20
KI	0.75	0.83	--
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	--
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30	37.30	37.30
<b>Compuestos orgánicos</b>			
Mioinositol	100	100	100
Glicina	--	2.00	--
Acido nicotínico	1.00	0.5	0.5
Piridoxina	1.00	0.5	0.5
Tiamina	10.00	0.1	1.0

MS medio Murashige y Skoog (1962); B5 medio Gamborg (1976); WMP Medio Lloyd y McCown (1981)

### 2.2.1.3 Reguladores de Crecimiento Vegetal

Los RCV son compuestos orgánicos, diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades y por la naturaleza o el arreglo particular de su molécula fomentan, inhiben o modifican el desarrollo de las plantas.

Actualmente se reconocen 7 tipos de reguladores:

- Auxinas: Compuestos caracterizados para inducir la extensión de las células.

- Giberelinas: Compuestos que estimulan la división o la elongación celular.
- Citoquininas: Sustancias que provocan la división celular.
- Etileno: Sustancia gaseosa que actúa sobre el crecimiento isodiamétrico en tallos y raíces.
- Ácido abscísico: Sustancia inhibidora del crecimiento y el desarrollo. Tiene un efecto antagónico a las giberelinas.
- Inhibidores: Retrasan o inhiben el proceso fisiológico o bioquímico. Compuestos generalmente sintéticos.

#### 2.2.1.3.1 Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado que promueven la división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhibición de formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos de células en suspensión. Es decir, con una concentración baja de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones da lugar a la formación de callo (Pierik 1990).

Las auxinas son encontradas en su mayoría en su forma conjugada con aminoácidos y azúcares, ó en su forma libre/activa (aproximadamente el 1% del total de auxina en la planta) (Benjamins y Scheres, 2008), siendo el ácido indol-3-acético (AIA) la principal auxina en la mayoría de las plantas. El AIA si bien puede ser producido en grandes cantidades, tiene el inconveniente de degradarse con la luz. Por ello se han buscado compuestos más estables. Los más usados son: ácido indol-butírico (IBA), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido triclorofenoxiacético (2,4,5-T), picloram.

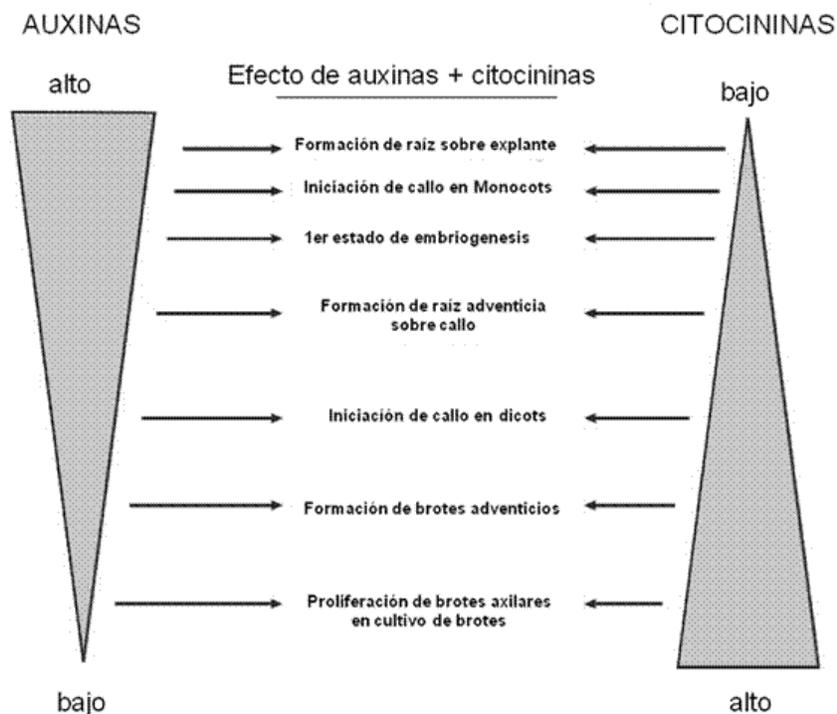
En la práctica el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar.

#### 2.2.1.3.2 Citocininas

Las citocininas por su parte, se usan para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo las más comunes, el 6-furfurilaminopurina ó cinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), 6-dimetilaminopurina (2iP), y 6-hidroximetilbuterilaminopurina (zeatina). Estos reguladores, además de promover la división celular, inducen la formación de vástagos axilares por la disminución de la dominancia apical y retarda el envejecimiento (Cardoza 2008; Pina 2008; Pierik 1990).

### 2.2.1.3.3 Interacción Auxina – Citoquinina

Existen efectos controlados por la interacción auxina – citoquinina (Fig. 2).



**Figura 2.** Interacciones de Auxinas y Citoquininas requeridas para el crecimiento y morfogénesis en CTV (Adaptado de Staden *et al.*, 2008).

Sin embargo no siempre se obtienen estos resultados. En las monocotiledóneas el callo es inducido por altos niveles de auxina sin que haya necesidad de aportar citoquinina.

No obstante, en general es necesario un balance entre auxinas y citoquininas para la formación de tallos adventicios y meristemas radicales.

La interacción es compleja y a veces es necesario la combinación de más de dos sustancias para obtener el efecto óptimo (Stadel *et al.*, 2008).

### 2.2.1.3.4 Giberelinas, poliaminas, brasinoesteroides, ácido abscísico y etileno

Comparada con las auxinas y citoquininas, las giberelinas (GAs), poliaminas y brasinoesteroides (BRs) son rara vez empleados en CTV ya que en la mayoría de los casos son sustancias no esenciales pero se usan cuando se desea potenciar el crecimiento o la regeneración de plantas (Herman, 2000). En general las GAs inducen en algunas especies la elongación de brotes, el crecimiento de los meristemas o yemas,

rompe la dormición de embriones aislados *in vitro*, siendo GA<sub>3</sub> la más usada para dichos fines, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor (se pierde el 90% de su actividad biológica después del autoclaveado) (Pierik, 1990; Trigiano y Gray, 2000; Davies, 1995). Se ha demostrado que las poliaminas (putrescina y espermina) están relacionadas con la diferenciación celular y el desarrollo durante la embriogénesis, reportándose que su adición al medio de cultivo puede mejorar la productividad en sistemas de embriogénesis somática (Pierik, 1990; Herman, 2000). Se sabe que los BRs (brasinólida [BrL], 24-epibrasiólida [24-EBrL] biobras-6), promueven la elongación de brotes, inhiben el crecimiento y desarrollo de la raíz, y promueven la síntesis de etileno (Davies, 1995), y su uso en CTV se refiere a análogos sintéticos reportados como sustitutos de auxinas y citocininas en procesos de calogénesis, embriogénesis somática y multiplicación de brotes para micropropagación (Herman, 2000).

El ácido abscísico (ABA) no es considerado normalmente un importante RCV en CTV, excepto cuando se está llevando a cabo la embriogénesis somática ya que en bajas concentraciones puede promover la maduración y germinación de embriones somáticos de algunas especies debido a que éste contrarresta el efecto de la giberelina sobre la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa en el proceso de germinación (Trigiano y Gray, 2000; Gamborg y Phillips, 1995; Davies, 1995). Su empleo en altas concentraciones suprime el crecimiento y promueve la dormancia (Gamborg y Phillips, 1995). Por otro lado, se sabe que los cultivos de callos y órganos son capaces de producir etileno y debido a que los contenedores son sellados, éste RCV puede acumularse llegando a reprimir el crecimiento y acelerando la senescencia en algunos cultivos, por lo que algunas veces se emplea nitrato de plata para inhibir su síntesis (Trigiano y Gray, 2000; Gamborg y Phillips, 1995). Sin embargo, parece ser que el efecto del etileno sobre la diferenciación *in vitro*, particularmente para la rizogénesis, depende de la etapa en la que ésta se encuentra, siendo efectivo cuando es aplicado después del inicio del tratamiento de rizogénesis (Herman, 2000).

#### 2.2.1.4 Temperatura, luz y pH

En los CTV la fotosíntesis no es eficiente, sin embargo, la iluminación influye en los procesos morfogénéticos y en general en el metabolismo. El fotoperiodo generalmente utilizado es de 16 horas luz y 8 de oscuridad, con una intensidad de luz de 25-50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Algunos cultivos son también incubados en la oscuridad, debido a que la luz incrementa la producción de compuestos fenólicos, los cuales interfieren con el crecimiento del cultivo

de callos (Pina 2008; Cardoza 2008; George y Davis 2008). A veces, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja (18° C para especies bulbosas), o una temperatura más alta (28-29° C para especies tropicales), pero debe tomarse en cuenta que la temperatura interior de los recipientes que contienen los cultivos *in vitro* es 3-4 grados más alta que en la cámara de crecimiento. Por otra parte, debe tenerse también en cuenta que la humedad en los recipientes del cultivo es relativamente alta, por lo que la humedad de la cámara de crecimiento debe ser 30-50%.

Sin embargo, si la humedad es elevada en la cámara, dará como resultado una mayor cantidad de infecciones al igual que una elevada temperatura (Pierik 1990).

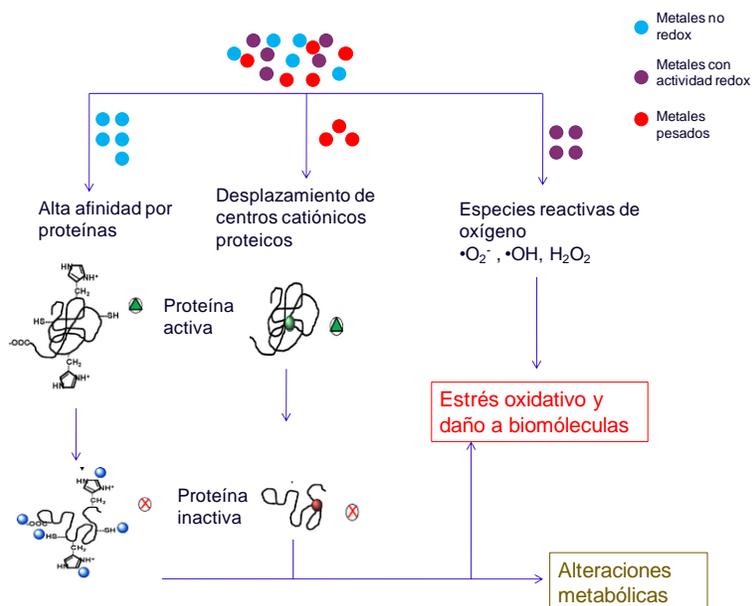
El pH en el medio es de gran importancia ya que influye en la absorción de varios componentes del medio, la mayoría de éstos se ajustan a un pH de 5.2-5.8 (Cardoza 2008). Pierik (1990) menciona que el pH en el rango de 5-6.5 es apto para el crecimiento, con un máximo de 6.0, mientras que un pH bajo (menor de 4.5) o alto (mayor de 7), generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo, puede ocasionar que la auxina AIA y el ácido giberélico sean menos estables, el agar pierde su rigidez, y algunas sales como el fierro y fosfato pueden precipitar.

### **2.2.2 El Cultivo de Tejidos Vegetales como modelo para estudios de genética, bioquímica y fisiología de plantas**

Una de las aplicaciones más importantes del CTV es la producción de plantas libres de virus, hongos y bacterias, permitiendo una mayor confiabilidad en los resultados sobre estudios genéticos, bioquímicos y fisiológicos para entender el crecimiento, desarrollo ó estrés en las plantas y así posibilitar su mejoramiento (Pierik, 1990; Vasil, 1991; Buchanan *et al.*, 2000). Así por ejemplo, el CTV ha permitido conocer algunos de los mecanismos detoxificantes en plantas que tienen la capacidad de tolerar, degradar o acumular contaminantes orgánicos o inorgánicos (Doran, 2009; Pilon-Smits, 2005; Clemens *et al.*, 2002). En fitopatología, el cultivo *in vitro* contribuye de manera significativa a generar eficazmente conocimientos referentes a la interacción planta-patógeno (Pierik, 1990), los cuales serán un componente esencial de beneficio a la agricultura moderna sobre el control de enfermedades y la reducción de costos con respecto al uso de agroquímicos (Pierik, 1990; Lawton *et al.*, 1992; Buchanan *et al.*, 2000).

### 2.3 Absorción de los metales pesados por las plantas

Las plantas son capaces de absorber metales esenciales y no esenciales del suelo, como respuesta a los gradientes de concentración, mediante la absorción selectiva de iones ó por difusión a través de las raíces. La capacidad de tolerar y acumular MP en las plantas depende de la especie vegetal (Huang y Cunningham, 1996; McGrath *et al.*, 2002). Cuando un MP entra a las células de una planta, ocurren numerosas reacciones bioquímicas, de las cuales, la mayoría son producidas por bloqueo de grupos funcionales de las proteínas o por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Figura 3).



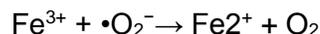
**Figura 3.** Toxicidad ocasionada por los metales pesados sobre las biomoléculas. Tomado de McGrath *et al.*, 2002.

Los mecanismos moleculares de respuesta a MP, incluyen:

(a) Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO); por auto-oxidación y reacciones de Fenton y Haber-Weiss, estas reacciones son típicas para los metales con actividad redox (Fe y Cu). La reacción de Haber-Weiss genera radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) a partir de peróxido de hidrogeno  $H_2O_2$  y superóxido ( $\cdot O_2^-$ ). Esta reacción puede ocurrir en las células vivas y

como consecuencia es una posible fuente de estrés oxidativo. La reacción directa es muy lenta, pero es catalizada por el hierro en estado de oxidación (III).

El primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del catión férrico a catión ferroso:



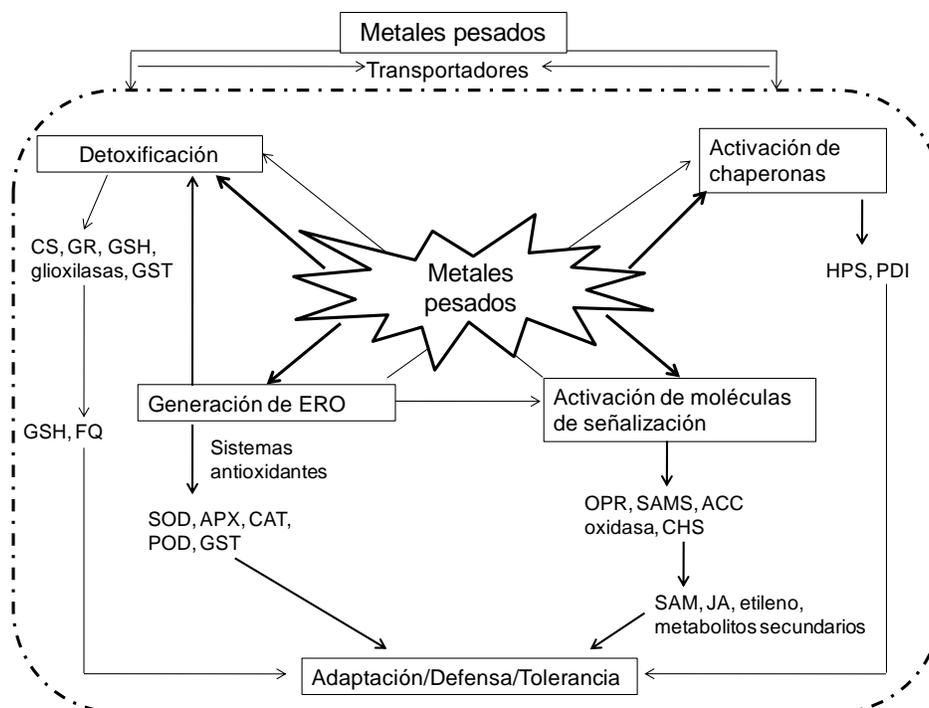
El segundo paso es una reacción de Fenton:



La reacción neta es:



(b) Bloqueo de grupos funcionales esenciales de biomoléculas, que se presenta principalmente con metales no redox (Cd y Hg); y (c) desplazamiento de metales esenciales de biomoléculas (Schützendübel y Polle, 2002). En respuesta al daño ocasionado por los MP, las células activan sus sistemas antioxidantes, producen moléculas encargadas de la detoxificación (glutación, fitoquelatinas y metalotioneínas), así como proteínas capaces de reparar las proteínas dañadas (chaperonas), y activan vías de señalización con el fin de que la célula active todos los mecanismos necesarios para que logre adaptarse, tolerar y defenderse de los MP (Ahsan *et al.*, 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismos de defensa activados por los MP en las células vegetales. CS, cisteína sintasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión; GST, glutatión-S-transferasa; SOD, superóxido dismutasa; APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; POD, peroxidasa; PDI, proteína disulfuro isomerasa; HSP, proteína de choque térmico; OPR, ácido 12-oxo-fitodienoico isomerasa; SAMS, S-adenosil-L-metionina sintetasa; ACC oxidasa, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa; CHS, chalcona sintasa; SAM, S-adenosil-L-metionina; JA, ácido jasmónico. (Ahsan *et al.*, 2009).

A continuación se presenta una descripción de los mecanismos que poseen las plantas para crecer bajo condiciones de estrés por MP.

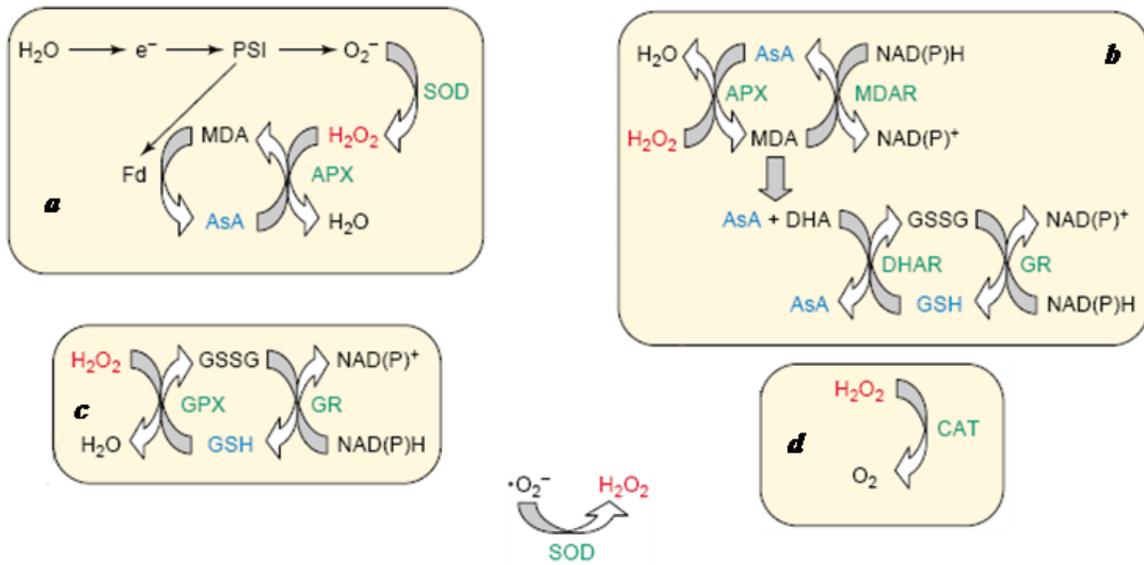
### 2.3.1 Mecanismos de defensa y tolerancia

Las plantas poseen diversos mecanismos celulares involucrados en la detoxificación y tolerancia al estrés provocado por los MP. Estos mecanismos tienen la función de evitar altas concentraciones de iones metálicos en sitios sensibles dentro de la célula. Los mecanismos de tolerancia incluyen el secuestro de metales y la formación de complejos, siendo esta la primera línea de defensa contra la toxicidad provocada por los MP. La segunda línea de defensa incluye un amplio rango de mecanismos indirectos como sistemas antioxidantes celulares, proteínas de estrés térmico y sistemas de reparación de daños celulares (Hall, 2002).

#### 2.3.1.1 Sistemas antioxidantes

Los MP provocan un incremento en el estrés oxidativo por la formación de ERO o por la disminución de las enzimas y moléculas antioxidantes. Los sistemas de defensa de las plantas contra las ERO incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa

(CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) (Verma y Dubey, 2003). La SOD es la primera línea de defensa contra las ERO, el radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) se puede dismutar en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y  $\text{O}_2$  por acción de la SOD; el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado puede ser descompuesto en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  dentro de los peroxisomas, por acción de la CAT, enzima que no requiere un sustrato adicional. Asimismo, la eliminación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  dentro de otros compartimentos celulares depende de distintas peroxidasa, como la guayacol peroxidasa (G-POD) y la ascorbato peroxidasa (APX); ambas enzimas dependen de un sustrato reducido para su actividad. La enzima GR, junto con la dehidroascorbato reductasa (DHAR), se encuentran también involucradas en la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través del ciclo ascorbato – glutatión (Figura 5) (Noctor y Foyer, 1998). La GR también se encarga de mantener la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) alta, lo cual es importante para la protección contra el estrés oxidativo (Asada, 1994).



**Figura 5.** Sistemas antioxidantes para la eliminación de ERO en plantas: (a) Ciclo agua–agua; (b) ciclo ascorbato–glutatión; (c) ciclo glutatión peroxidasa (GPX); (d) acción de la catalasa (CAT) sobre el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Fd, ferredoxina; MDHA, monodehidro-ascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; PSI, fotosistema I; tAPX, APX tilacoidal (Modificado de: Mittler, 2002).

Por otra parte en los tejidos vegetales, las principales moléculas que actúan como eliminadoras de ERO, incluyen el ácido ascórbico (AsA), tocoferoles, carotenoides y aminoácidos no proteicos como el GSH, además de compuestos fenólicos como flavonoides, taninos y precursores de lignina. Todos estos antioxidantes actúan como una red cooperativa que emplea una serie de reacciones de óxido-reducción para evitar el daño

por ERO (Blokhina *et al.*, 2003; Gratão *et al.*, 2005). Uno de los mecanismos de las plantas para soportar el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es a través de su transporte a vacuolas para su detoxificación. Las vacuolas son ricas en flavonoides, poderosos antioxidantes que eliminan varias ERO y peroxinitrito, y también pueden contener altos niveles de AsA, GSH y peroxidasas ubicadas en la superficie interna del tonoplasto (Gechev *et al.*, 2006). El  $\alpha$ -tocoferol se encuentra en altas concentraciones en las membranas fotosintéticas donde es el principal antioxidante lipofílico que interactúa con radicales peroxi- de lípidos y con  $\bullet\text{O}_2^-$ . Los carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides también pueden neutralizar ERO como  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$  y  $^1\text{O}_2$  (Davey *et al.*, 2000).

### 2.3.2 Cromo

El Cr es un MP que se encuentra en la biosfera; en el suelo suele encontrarse en concentraciones de 10 – 50 mg Kg<sup>-1</sup> dependiendo el origen este, llegándose a encontrar concentraciones de Cr en suelo mayores a 125 g Kg<sup>-1</sup> (Adriano, 1986). En agua dulce las concentraciones de Cr oscilan entre 0.1 – 117  $\mu\text{g L}^{-1}$  y en agua marina entre 0.2 – 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . La concentración de Cr en la atmosfera varía ampliamente, encontrándose en un rango entre  $5 \times 10^{-6}$  –  $1.2 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g m}^{-3}$  (Nriagu, 1988).

El Cr puede presentar diferentes estados de oxidación (VI, V, IV, III, II y 0), los cuales le confieren diferentes grados de toxicidad. El Cr metálico no es tóxico y es insoluble en agua, mientras que los compuestos de Cr(VI) son extremadamente tóxicos y carcinogénicos y se disuelven con facilidad en agua. Las intoxicaciones agudas con compuestos de Cr(VI) se manifiestan en lesiones renales, mutaciones en el tracto gastrointestinal así como acumulaciones en el hígado, en el riñón, en la glándula tiroidea y en la médula ósea. En condiciones naturales, la presencia de materia orgánica oxidable reduce rápidamente a compuestos de Cr(VI) a Cr(III), que son más estables y menos hidrosolubles. A bajas concentraciones, el Cr(III) es esencial para la salud de humanos y animales. (Shanker *et al.*, 2009).

El Cr y sus productos tienen múltiples usos industriales; estos son usados en el procesamiento y terminado de pieles (Nriagu, 1988), en la fabricación de aceros al cromo y aceros inoxidables, en aleaciones con cromo y en el cromado galvanizado. Los complejos orgánicos encuentran aplicación como colorantes de revelado en la fotografía-color, los compuestos inorgánicos del cromo se utilizan como pigmentos para pinturas. Los compuestos de Cr(VI) son usados en la industria de blindaje, en el curtido de pieles y en la preservación de la madera (Shanker *et al.*, 2004).

2.3.2.1 Absorción de Cr por las plantas y su efecto sobre el metabolismo

El Cr es un elemento que no es esencial para el crecimiento vegetal, por lo que las plantas no poseen un mecanismo específico para su absorción; la absorción de este metal es a través de transportadores empleados para absorber otros elementos esenciales para la planta. La vía de absorción del Cr(VI) involucra el proceso de absorción y la competencia por transportadores activos para el Fe, S y P (Cervantes *et al.*, 2001); mientras que el Cr(III) ingresa a la célula por transporte pasivo (Figura 6); una vez absorbidos, Cr(VI) y el Cr(III) deben cruzar la endodermis vía simplasto, aunque probablemente el Cr(VI) en las células es reducido a Cr(III) el cual es retenido en las células corticales de la raíz cuando existen bajas concentraciones de Cr(VI), lo cual en parte explica la baja toxicidad del Cr(III) (Cervantes *et al.*, 2001). Skeffington *et al.* (1976) realizando estudios con Cr radioactivo ( $^{51}\text{Cr}$ ) observo que el Cr es principalmente transportado por el xilema de las plantas. Golovatyj *et al.* (1999) encontraron que la absorción del Cr depende de las propiedades del suelo y de la concentración de este elemento; la máxima acumulación de Cr siempre fue encontrada en las raíces y una acumulación menor en la parte aérea.

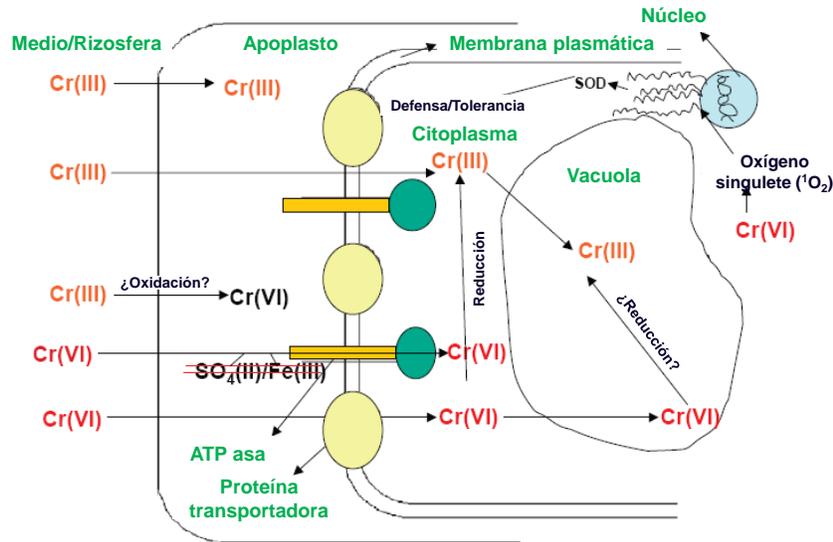


Figura 6. Modelo del transporte y toxicidad del Cr en plantas (Modificado de Shanker *et al.*, 2005).

Los compuestos de Cr son altamente tóxicos en las plantas debido a que ocasionan disminución en el crecimiento y desarrollo vegetal, así como una inhibición de las actividades enzimáticas y en algunos casos mutagénesis. El Cr a nivel celular produce especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); la presencia de estas ERO ocasiona daño

oxidativo a biomoléculas como son lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Shanker *et al.*, 2005).

El estrés por Cr puede inducir tres tipos de modificaciones en las plantas: (i) alteración en la producción de pigmentos involucrados en el mantenimiento del metabolismo de la planta (ej. clorofilas, antocianinas) (Boonyapookana *et al.*, 2002), (ii) incremento en la producción de metabolitos antioxidantes (ej. glutatión, ácido ascórbico) (Shanker, 2004) y (iii) alteraciones en las reservas de los sustratos para la síntesis de metabolitos que confieren resistencia o tolerancia al estrés por Cr (ej. fitoquelatinas, histidina). No obstante, los efectos tóxicos del Cr dependen de su estado de oxidación la cual es determinada durante su absorción, translocación y acumulación, existiendo especies capaces de acumular altas concentraciones de Cr (conocidas como acumuladoras o hiperacumuladoras) (Huang y Cunningham, 1996; McGrath *et al.*, 2002). Zhang *et al.* (2007) encontraron que *Leersia hexandra* es capaz de acumular hasta 2978 mg Cr·Kg<sup>-1</sup> peso seco (PS) en sus hojas cuando crece en suelos con concentraciones de Cr de 52 mg·Kg<sup>-1</sup>; Rai *et al.* (2004) mostraron que *Ocimum tenuiflorum* acumuló en sus raíces hasta 419.5 mg Cr·Kg<sup>-1</sup>PS cuando fue expuesta a 5.2 mg L<sup>-1</sup> de Cr durante 72h. Uno de los trabajos más recientes de acumulación de Cr en plantas es el realizado por Buendía-González *et al.* (2010), en el que cultivaron *Prosopis laevigata in vitro* con 3.4 mM de Cr(VI) cuya acumulación de Cr en tallos y raíces fue de 5461 y 8090 mg Cr·Kg<sup>-1</sup>PS, respectivamente.

### 2.3.3 Plomo

El Pb, al ser uno de los elementos más tóxicos y abundantes en el ambiente, afecta la salud humana y la vida silvestre, tiene una baja solubilidad y se clasifica como carcinogénico y mutagénico (Liu *et al.*, 2008). Este elemento se encuentra en la naturaleza principalmente como Pb<sup>2+</sup> y forma compuestos poco solubles en agua. El mineral de Pb más abundante en la naturaleza es la galena (PbS sulfuro de plomo II), de donde habitualmente se extrae dicho metal. Como contaminante, el Pb se libera al ambiente principalmente en forma de PbSO<sub>4</sub> y PbCO<sub>3</sub>. Aunque forma compuestos poco solubles, este metal es movilizado en los ecosistemas causando efectos tóxicos en especies terrestres y acuáticas. Una vez en el suelo, el Pb no se distribuye uniformemente en los horizontes, ya que se asocia con hidróxidos, especialmente de Fe y Mn y también se puede concentrar en partículas de fosfatos o carbonatos. El Pb generalmente se acumula cerca de la superficie de los suelos debido a su sorción en las partículas que componen la materia orgánica. Este metal se moviliza lentamente, pero algunas características del suelo, como el incremento en la

acidez y la formación de complejos orgánicos pueden incrementar su solubilidad (Liu *et al.*, 2008).

#### 2.3.3.1 *Absorción del plomo por las plantas*

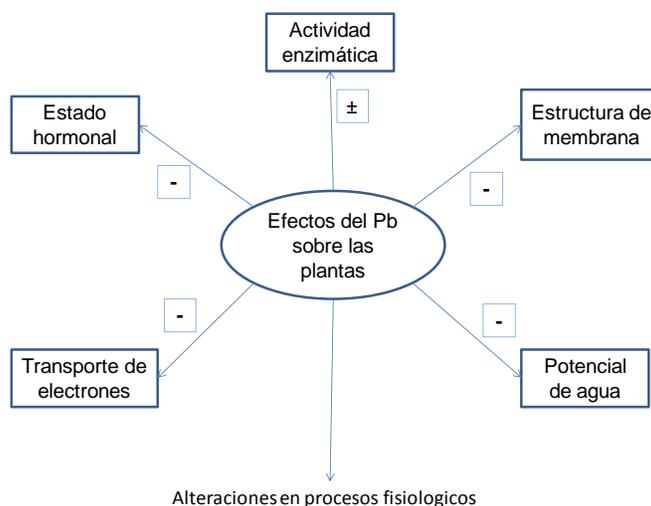
El Pb, aunque no es un elemento esencial para las plantas, éstas lo absorben con facilidad; su entrada a la planta y su acumulación ocurre directamente, cuando es absorbido a través de las raíces junto con otros minerales y agua (Sengar *et al.*, 2008). El Pb se absorbe por las raíces, a través de los pelos radiculares hasta alcanzar el sistema vascular, lo que permite su translocación a las estructuras aéreas de la planta, como yemas y hojas (Jarvis y Leung, 2002). Sin embargo, el transporte de este metal desde las raíces a la parte aérea es limitado debido a la barrera que existe en la endodermis de las raíces. Dicha barrera es la banda de Caspary, que es el principal factor que restringe el transporte del metal hacia los haces vasculares (Seregin *et al.*, 2004). La banda de Caspary fuerza al agua y los minerales a atravesar las membranas celulares y el citoplasma de las células endodérmicas, en lugar de pasar a través de las paredes celulares o entre ellas. De esta manera, las membranas celulares de la endodermis controlan el tipo y la cantidad de nutrientes minerales que circulan entre el córtex y el tejido vascular (Nabors, 2005).

Hasta ahora no se sabe exactamente cómo el Pb unido a las partículas del suelo queda disponible para ser absorbido por las plantas. Davies (1995), reportó que sólo alrededor de 0.005-0.13% del Pb se encuentra soluble en el suelo y está disponible para su absorción por las plantas. Sin embargo, existen varios factores que afectan su entrada a las plantas, entre ellos se encuentran el tamaño de partícula, la capacidad de intercambio catiónico y pH del suelo, así como la superficie de la raíz, los exudados de las raíces y la presencia de ciertos microorganismos, como los hongos micorrícicos. El transporte de este metal dentro de las plantas, así como su localización celular, son factores que determinan las manifestaciones tóxicas que presentan las plantas; por ejemplo, el almacenamiento de Pb en las vacuolas puede evitar efectos dañinos en la planta. Este metal puede también acumularse en los espacios intercelulares, retículo endoplásmico, dictiosoma y vesículas dictiosómicas y, eventualmente, en el núcleo celular. Puede unirse fuertemente a grupos carboxilo de los ácidos galacturónico y glucorónico de la pared celular, restringiendo su transporte apoplástico (Sharma y Dubey, 2005).

### 2.3.3.2 Efecto del plomo sobre las plantas

El Pb ocasiona fitotoxicidad a través de eventos como: (i) reacciones con grupos sulfhidrilo y ligandos de nitrógeno con cationes; (ii) afinidad para reaccionar con grupos fosfato del ADP o ATP, y (iii) sustitución ó deficiencia de metales esenciales (Kucera *et al.*, 2008).

En particular el Pb, ocasiona efectos adversos en la morfología, crecimiento y fotosíntesis en las plantas, inhibe algunas actividades enzimáticas y altera el balance de agua, además de ocasionar alteraciones en la permeabilidad de la membrana y en la absorción de minerales (Figura 7). Dentro de los síntomas visibles de fitotoxicidad por Pb se encuentran: necrosis, clorosis y el oscurecimiento y disminución de la longitud de raíces. La fitotoxicidad ocasiona una disminución en el potencial de agua, altera la permeabilidad de la membrana, disminuye la producción de hormonas y el transporte de electrones, mientras que las actividades enzimáticas pueden incrementar o inhibirse. Todos estos eventos finalmente ocasionan alteraciones en diversos procesos fisiológicos (Sharma y Dubey, 2005).



**Figura 7.** Vista general de los efectos tóxicos causados por el plomo en las plantas. Todos estos eventos relacionados con la fototoxicidad finalmente ocasionan alteraciones en diversos procesos fisiológicos. Los signos “+” y “-” indican efectos positivos y negativos, respectivamente (Sharma y Dubey, 2005).

Hasta ahora se han encontrado algunas especies vegetales con potencial para acumular e hiperacumular Pb. *Sesbania drummondii* es capaz de acumular el 1% de Pb en sus tallos (Sahi *et al.*, 2002). Estudios de campo han demostrado que *Buddleja asiática* posee una extraordinaria capacidad para tolerar el Pb, en sus tallos acumula hasta 4335 mg Kg<sup>-1</sup> PS cuando crece en suelos contaminados (Waranusantigul *et al.*, 2008). *Fagopyrum esculentum* cuando fue cultivado en suelos contaminados mostro que acumula una gran cantidad de Pb en hojas (8,000 mg Kg<sup>-1</sup> PS), tallos (2,000 mg Kg<sup>-1</sup> PS) y raíces (3,300 mg Kg<sup>-1</sup> PS) sin presentar daños evidentes (Tamura *et al.*, 2005). He *et al.* (2002) encontraron

que *S. alfredii* también es capaz de acumular Pb en tallos (514 mg Kg<sup>-1</sup> PS) y raíces (13,922 mg Kg<sup>-1</sup> PS). Por último, Buendía-González *et al.* (2010) cultivaron *in vitro*, *Prosopis laevigata* en medio MS conteniendo 3.0 mM de Pb(II) cuya acumulación de Pb en tallos y raíces fue de 27 300 y 40 666 mg Kg<sup>-1</sup> PS respectivamente.

#### **2.4 Generalidades de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst.**

Se han descrito alrededor de 50 especies del género *Prosopis* en todo el mundo (Figueiredo, 1990), de estas, 42 están presentes en el continente Americano en dos grandes localidades: Norte América (México y el Sur-Oeste de los Estados Unidos) y Sur América (Argentina, Paraguay y Chile). También han sido introducidas en zonas áridas del Este de la India, Australia, África y principalmente en Hawaii (Vernon-Carter *et al.*, 2000). En nuestro país están presentes 10 especies pertenecientes al género *Prosopis*, que crecen en las áreas de la costa del océano Pacífico (Sinaloa) y continúan hasta Panamá, en Sonora, la Península de Baja California y en el centro y sur del País. Entre estas especies se encuentra *Prosopis laevigata*, que predomina en la meseta del Norte y Centro de México.

La clasificación taxonómica de esta especie es la siguiente:

**Familia:** Fabaceae (alt. Leguminosae)

**Subfamilia:** Mimosoidae

**Género:** *Prosopis*

**Especie:** *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst.

**Sinonimias:** *Prosopis dulcis* Kunth, *Algorobia dulcis* (Kunth) Benth, *Mimosa rotundata* Sessé et Moc., *Neltuma laevigata* (Willd.) Britt. et Rose.

De acuerdo a la región en donde crece recibe diferentes nombres comunes: Mezquite (es el mayormente utilizado); útu (huasteco); chúcata, tiritzecua (tarasca) en Michoacán; algarrobo en Colima, Jalisco y Nayarit.

*P. laevigata* es un árbol o arbusto que se desarrolla preferentemente en zonas áridas y semiáridas, se puede encontrar a diferentes altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2050 msnm, alcanza alturas hasta de 13 m con lo que crea bajo su copa condiciones muy favorables para el desarrollo de otras plantas herbáceas, está asociado simbióticamente con bacterias del género *Rhizobium* por lo que es considerado como un organismo fijador de nitrógeno. Forma parte del matorral espinoso o “Selva baja espinosa

subcaducifolia”. También se distribuye en forma aislada entremezclado con plantíos o cultivos anuales como el maíz y alfalfa, así como en laderas riolíticas o en terrenos aluviales con vegetación muy alterada. Su madera es dura y pesada, en el centro es café o negra muy durable por su dureza y consistencia. Las hojas son bipinadas, las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias en espigas, son sumamente pequeñas y producen un aroma y néctar agradable para la polinización. Su fruto es una vaina, en donde se alojan las semillas que tienen el tamaño menor al de un frijón, en forma aplastada o aplanada. Sus ramas presentan espinas laterales (<http://www.rlc.fao.org/redes/sisag/arboles/Mex-pr-l.htm>).

*P. laevigata* es una especie con alto grado de agresividad o capacidad colonizadora en áreas perturbadas, por lo que su regeneración puede darse por rebrote o retoño y por semilla. Ese último mecanismo se ve favorecido ya que generalmente cada año se producen grandes cantidades de vainas y semillas, lo que ayuda a la dispersión natural de la especie a través de la diseminación zocora y endozoica, es decir, a través del aparato digestivo de animales como borregos y cabras (<http://www.rlc.fao.org/redes/sisag/arboles/Mex-pr-l.htm>).

Prácticamente toda la planta y sus productos son aprovechados, la madera es utilizada para fabricar duela, madera aserrada y parquet, para hacer mangos de herramientas, hormas para zapatos en escala industrial, y como leña y carbón de muy buena calidad por su alto poder calorífico. Las hojas y vainas se utilizan como forraje para el ganado, las vainas tienen un alto valor nutritivo y de ellas se puede obtener harina que en una proporción de entre el 20 y 60% es mezclada con harina de maíz, alfalfa, zacate, salvado, alfalfa molida, pasta de cacahuete o linaza y se adiciona al forraje. De la corteza se extraen curtientes, además los troncos y ramas se usan como postes para cercas (<http://www.rlc.fao.org/redes/sisag/arboles/Mex-pr-l.htm>).

El mezquite también es apreciado como planta melífera y se ha reportado que tiene usos medicinales. La goma diluida en agua se usa para hacer gárgaras y contra la disentería, el cocimiento de las hojas y de renuevos o el zumo de éstos, se emplea contra las inflamaciones de los ojos. También la infusión para el tratamiento de salpullidos. El cocimiento de la corteza de las ramas jóvenes (en agua o leche), se da a tomar a los bebés para aliviar los cólicos (<http://www.rlc.fao.org/redes/sisag/arboles/Mex-pr-l.htm>).

#### **2.4.1 Cultivos *in vitro* de *P. laevigata***

Los reportes del cultivo *in vitro* del género *Prosopis* para diferentes fines son escasos, algunos de los antecedentes al respecto son los trabajos publicados por Trejo-Espino *et al.* (2011) donde describe el establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *P. laevigata* como estrategia para la obtención de goma de mezquite. Buendía-González *et al.* (2007; 2010, 2012) describen la propagación clonal de plantas de *P. laevigata* a través de nodos cotiledonales, embriogénesis somática y la acumulación de cromo, cadmio, plomo y níquel en plántulas de *P. laevigata* generadas y cultivadas *in vitro*.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

### 3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental con metales pesados, como Cr, Cd, Hg, Pb y As representa un problema de salud, ambiental y económico de grandes proporciones. La fitorremediación es una alternativa ecológicamente viable que puede implicar mayor efectividad que métodos fisicoquímicos utilizados tradicionalmente para la remediación de suelos contaminados con dichos elementos. Sin embargo, el avance de la fitorremediación se ha retardado debido, en parte, a la falta de conocimiento acerca de mecanismos involucrados en dicho proceso, como son la captación, movilización, inmovilización y metabolismo de estos metales en las plantas, adicionalmente existe la necesidad de la búsqueda de especies vegetales con potencial para fitorremediar sitios contaminados en las condiciones climatológicas y geográficas particulares de México. Una posible planta con potencial fitorremediador es *Prosopis laevigata* (Fabaceae) ya que es una especie que se desarrolla en zonas templadas, áridas y semiáridas de México, en las cuales se encuentran principalmente los sitios contaminados con metales pesados.

Por otro lado, la técnica de cultivo de tejidos es una herramienta para identificar mecanismos de tolerancia a metales pesados en plantas, dentro de las ventajas de este tipo de cultivos se encuentran: crecimiento reproducible durante largos periodos de tiempo, cultivos estériles, control de las condiciones ambientales, aislamiento y análisis de metabolitos relativamente sencillo. Con base en lo anterior, en este trabajo se pretende generar información que contribuya al conocimiento sobre el crecimiento, la tolerancia y la capacidad de remoción de Cr(VI) y Pb(II) en cultivos de células en suspensión de *Prosopis laevigata*.

## **4 HIPOTESIS**

#### 4. HIPÓTESIS

Plántulas de *Prosopis laevigata* han demostrado la capacidad de tolerar y acumular altas concentraciones de cromo y plomo, por lo que células en suspensión de la especie vegetal, poseen también, los mecanismos para tolerar y remover el cromo y plomo, en un medio de cultivo.

## **5.OBJETIVO**

## 5 OBJETIVO

### 5.1 General

Determinar el efecto del Cr(VI) y Pb(II) sobre las células en suspensión de *Prosopis laevigata*

### 5.2 Específicos

- Evaluar el efecto de reguladores del crecimiento vegetal (2,4-D, BA y Kin) y el tipo de explante (cotiledón, hipocótilo y raíz) en la inducción de callo de *P. laevigata*
- Seleccionar los mejores tratamientos de inducción de callo, para la obtención de líneas celulares
- Establecer cultivos de células en suspensión de líneas celulares seleccionadas
- Caracterizar el crecimiento de las células en cultivos en suspensión
- Evaluar el efecto de Cr(VI) y Pb(II) en el crecimiento de cultivos de células en suspensión
- Determinar la capacidad de remoción de Cr(VI) y Pb(II) por células en suspensión
- Evaluar la competencia del Cr(VI) por los transportadores de Mn(II)
- Evaluar la competencia del Pb(II) por los transportadores de Zn(II)
- Caracterizar la superficie (SEM, XPS) de las células en suspensión expuestas a Cr(VI) y Pb(II)

## **6 MATERIALES Y METODOS**

## 6 MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Material vegetal

Las vainas maduras de árboles de mezquite (*Prosopis laevigata*) fueron colectadas en Julio de 2009 en los Ejidos de San Bartolo y Llanos de la Angostura, ambas localidades pertenecientes al Municipio de Río Verde, San Luís Potosí, México. Las semillas fueron separadas de las vainas y se sometieron a un proceso de escarificación mecánica, mediante la remoción de un pequeño fragmento lateral de la cubierta de la semilla. Las semillas escarificadas fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas en una solución de etanol al 70% por 30 s, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 0.6% y Tween 20 (3 gotas por cada 100 mL de solución) durante 30 min en agitación continua, finalmente fueron lavadas cinco veces con agua destilada esterilizada. Las semillas asépticas fueron sembradas en tubos de cultivo (25 x 150 mm) conteniendo 15 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) gelificado y estéril, adicionado con sacarosa al 3% (p/v) y solidificado con fitagel 0.2% (p/v). Antes de la esterilización, los medios de cultivo fueron ajustados a pH 5.8 HCl 0.1 N ó NaOH 0.1 N. Las semillas fueron germinadas a una temperatura de 25°C ± 2°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad con lámparas fluorescentes (irradiancia de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### 6.2 Inducción de callo

Las plántulas de 15 d de edad se usaron como fuente de explantes (cotiledón, hipocótilo y raíz) para la inducción de callo. El medio de cultivo empleado fue MS a la mitad de su concentración y fue suplementado con distintas combinaciones y concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal (RCV). En la Tabla 4 se presentan las “Claves” de todos los tratamientos derivados de las diferentes concentraciones de las citocininas (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup>) cinetina (KIN) y/o 6-bencilaminopurina (BAP) y sus combinaciones con 1.5 mg L<sup>-1</sup> de la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Cada tratamiento se realizó por triplicado con lotes de 5 tubos y cada tubo con un explante. Los datos de porcentaje de inducción para cada tratamiento se determinó a los 30 días de incubación, y los resultados son expresados como una relación de los explantes con formación de callo con respecto al total de explantes evaluados.

**Tabla 4.** Tratamientos empleados para la inducción de callo

RCV (mg L <sup>-1</sup> )		Tratamiento (Clave)
Auxina	Citocinina	
2,4-D	BAP	
0.0	0.0	Control, D <sub>0</sub> B <sub>0</sub>
0.0	0.5	D <sub>0</sub> B <sub>0.5</sub>
0.0	1.0	D <sub>0</sub> B <sub>1.0</sub>
0.0	1.5	D <sub>0</sub> B <sub>1.5</sub>
1.5	0.0	D <sub>1.5</sub> B <sub>0</sub>
1.5	0.5	D <sub>1.5</sub> B <sub>0.5</sub>
1.5	1.0	D <sub>1.5</sub> B <sub>1.0</sub>
1.5	1.5	D <sub>1.5</sub> B <sub>1.5</sub>
2,4D	KIN	
0.0	0.0	Control, D <sub>0</sub> K <sub>0</sub>
0.0	0.5	D <sub>0</sub> K <sub>0.5</sub>
0.0	1.0	D <sub>0</sub> K <sub>1.0</sub>
0.0	1.5	D <sub>0</sub> K <sub>1.5</sub>
1.5	0.0	D <sub>1.5</sub> K <sub>0</sub>
1.5	0.5	D <sub>1.5</sub> K <sub>0.5</sub>
1.5	1.0	D <sub>1.5</sub> K <sub>1.0</sub>
1.5	1.5	D <sub>1.5</sub> K <sub>1.5</sub>

### 6.3 Establecimiento de los cultivos de células en suspensión

Se transfirieron 1.5 g de callo friable cotiledonar provenientes del tratamiento D<sub>1.5</sub>K<sub>1.0</sub> a matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio líquido con la formulación del tratamiento D<sub>1.5</sub>K<sub>1.0</sub> pero libre de fitagel, se incubaron bajo las mismas condiciones de fotoperiodo, intensidad luminosa y temperatura, bajo agitación continua a 110 rpm. Se realizaron subcultivos cada 15 d durante tres meses. Con el fin de obtener un cultivo homogéneo, las células se tamizaron a través de filtros de nylon de 200 μm. El cultivo fue mantenido durante seis meses subcultivándose cada 15 d en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio, inoculados con biomasa vegetal, siendo el tamaño de inóculo del 6% (p/v). Para realizar la cinética de crecimiento, las células en suspensión de 10 días de cultivo se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo líquido conteniendo la formulación del tratamiento D<sub>1.5</sub>K<sub>1.0</sub> enriquecido con 5 % (v/v) de agua de coco, conservando el tamaño del inóculo, 6 % (p/v). Las células se cosecharon cada 2-3 d, para determinar el crecimiento, durante 21 días. Para determinar el peso fresco, la biomasa se cosecho usando filtros de celulosa (Whatman No.1), se determinó el peso (PF), posteriormente se secó en una estufa a 70°C durante 72 h para obtener el peso seco (PS). La velocidad específica de crecimiento (μ), definida como el

incremento en la masa celular por unidad de tiempo, fue calculada a través de graficar el logaritmo natural de los datos de crecimiento contra el tiempo. De la gráfica se obtuvo una línea recta en la fase exponencial de crecimiento. La pendiente de la sección lineal del gráfico correspondió a la tasa de crecimiento específico de las células (Capataz-Tafur *et al.*, 2010). La viabilidad celular se determinó de manera indirecta a través de la integridad de la membrana, medida por el método del azul de Evans (Rodríguez-Monroy y Galindo 1999). Una alícuota de 2 ml de muestra con células de cada punto de muestreo se incubaron con 0.25% de azul de Evans durante 5 min y se observaron al microscopio. El porcentaje de viabilidad de la muestra se determinó tomando como base el número de células no teñidas (células viables). Una vez que se estableció el cultivo de células en suspensión, se realizó una cinética de crecimiento en medio de cultivo conteniendo MP (1.0 mM de Cr o Pb) siguiendo el procedimiento previamente descrito. Los experimentos fueron realizados por duplicado con tres matraces cada uno (n=6).

#### **6.4 Evaluación de MP en cultivos de células en suspensión de *P. leavigata*.**

Tres experimentos de MP fueron evaluados en los cultivos de células en suspensión: 1) Cr (VI) o Pb(II); 2) Mn(II) y/o Cr(VI); y 3) Zn(II) y/o Pb(II). En el primer experimento, se usaron concentraciones de 0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mM de Cr o Pb para observar la tolerancia de los cultivos, mientras que para el segundo y tercer experimento todos los MP se usaron concentraciones de 0.0, 0.5 y 1.0 mM para evaluar la competencia entre Cr y Mn, y del Pb con el Zn (Tabla 5). En todos los experimentos de MP, 1.5 g de células fueron transferidos a matraces de 125 ml de capacidad conteniendo 25 ml de medio de cultivo líquido MS, 5% (v/v) de agua de coco, y con la formulación  $D_{1.5}K_{1.0}$ , y se mantuvieron durante 18 días de incubación en agitación constante a 110 rpm a  $25 \pm 2^{\circ}C$  bajo un fotoperiodo de 16 h luz a  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron cosechados y filtradas a través de un filtro Whatman No. 1, realizando tres lavados con agua desionizada para eliminar los metales extracelulares adsorbidos. Se determinó el peso fresco (PF) de las muestras y posteriormente se secaron hasta peso constante (PS) en una estufa a  $70^{\circ}C$  durante 72 h.

**Tabla 5.** Tratamientos para evaluar la competencia entre Mn y Cr, y del Zn con el Pb

Tratamiento	Cr(VI) (mM)	Mn(II) (mM)	Tratamiento	Pb(II) (mM)	Zn(II) (mM)
<b>Cr<sub>0.0</sub>Mn<sub>0.0</sub></b>	0.0	0.0	<b>Pb<sub>0.0</sub>Zn<sub>0.0</sub></b>	0.0	0.0
<b>Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.0</sub></b>	0.5	0.0	<b>Pb<sub>0.0</sub>Zn<sub>0.5</sub></b>	0.0	0.5
<b>Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.5</sub></b>	0.5	0.5	<b>Pb<sub>0.0</sub>Zn<sub>1.0</sub></b>	0.0	1.0
<b>Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>0.0</sub></b>	1.0	0.0	<b>Pb<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.0</sub></b>	0.5	0.0
<b>Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>1.0</sub></b>	1.0	1.0	<b>Pb<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.5</sub></b>	0.5	0.5
			<b>Pb<sub>0.5</sub>Zn<sub>1.0</sub></b>	0.5	1.0
			<b>Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>0.0</sub></b>	1.0	0.0
			<b>Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>0.5</sub></b>	1.0	0.5
			<b>Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>1.0</sub></b>	1.0	1.0

### 6.5 Cuantificación de metales (Cr, Pb, Zn y Mn) en biomasa vegetal

A 100 mg de biomasa (PS) se le adicionó 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y 4 mL de agua desionizada para su digestión en un horno de microondas (CEM MARS-Xpress, CEM Corporation Mathews North Carolina) a 1600 W durante 15 min, después las muestras se aforaron a 10 mL con agua desionizada y se filtraron empleando una membrana de 0.45 µm (GN-6 *Metricell*).

El contenido total de Cr, Pb, Mn y Zn se cuantificó mediante un espectrómetro de absorción atómica *Shimadzu* (AA-6300), por el método de flama. Las longitudes de onda empleadas fueron 357.9 nm (Cr), 283.3 nm (Pb), 279.5 nm (Mn) y 213.9 nm (Zn) . Las soluciones estándar se prepararon con Cr, Pb, Mn y Zn (J.T. Baker, Xalostoc México) para realizar las curvas de calibración hasta obtener un coeficientes de correlación (r<sup>2</sup>) mayor a 0.99. Todo el material de vidrio y aparatos fueron lavados con HNO<sub>3</sub> 0.1N antes y después de ser usados.

### 6.6 Estimación de índices y coeficientes

**Crecimiento relativo (CR).** La tasa de crecimiento relativo es la medida principal del análisis de crecimiento. Con el PS obtenido se determinó el crecimiento relativo (CR), de acuerdo a Baker (1987), el cual se define como:

$$CR = \frac{\text{biomasa con MP}}{\text{biomasa sin MP (control)}} \times 100$$

**Concentración crítica.** La concentración crítica (CC) se determinó a partir de una curva de crecimiento de células en suspensión de *P. laevigata* en medios con diferente concentración de cromo y plomo. La CC indica la concentración de contaminante en la cual la producción de la biomasa de las células disminuye 50% con respecto al tratamiento control (0 mg/L):

$$CC = \frac{(50\% \text{ de la máxima biomasa} + O)}{P}$$

Donde *O* es la ordenada al origen y *P* es la pendiente

En este caso, se seleccionó el incremento en la biomasa celular como la principal medida del efecto tóxico de la concentración de Cr y Pb sobre las células, debido a que éstas son particularmente sensibles a la presencia de toxinas y contaminantes (Deng *et al.* 2004).

**Factor de bioconcentración.** El factor de bioconcentración (FB) indica la eficiencia de acumulación de MP por una especie vegetal. Valores mayores a uno indican que la planta es potencialmente hiperacumuladora del MP (Audet y Charest, 2007):

$$FBC = \frac{[MP]_{\text{células en suspensión}}}{[MP]_{\text{medio de cultivo}}}$$

## 6.7 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las células de los tratamientos control, 1.0 mM de Cr ó Pb fueron cosechadas del medio de cultivo a los 18 d de incubación, centrifugando 1.0 mL de medio de cultivo a 1000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y a las células se les agrego una solución de glutaraldehído al 2% (p/v), para su fijación, durante 24 h. a 4°C. Posteriormente se retiró el fijador, haciendo lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 2 mM a pH 7.2. Eliminado el primer fijador, las muestras fueron sumergidas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% (p/v), empleado como una segunda fase de fijación durante 2 h. Transcurrido el tiempo de inmersión, el fijador fue desechado y se inició el proceso de deshidratación de las muestras, a través de inmersiones sucesivas en soluciones de etanol en concentraciones del 30 al 100% durante 20 min en cada solución). Al finalizar la deshidratación, las muestras fueron desecadas a punto crítico con CO<sub>2</sub> (Samdri-780B). Finalmente, las muestras se recubrieron con una capa de carbón y oro con un equipo Denton Vacuum Desk III (Bozzola y Russell, 1991). Las muestras se observaron y

analizaron en un microscopio electrónico de barrido (JOEL JSM-5900 LV) equipado con un sistema de microanálisis por energía dispersiva de rayos-X (Oxford).

### **6.8 Análisis estadístico**

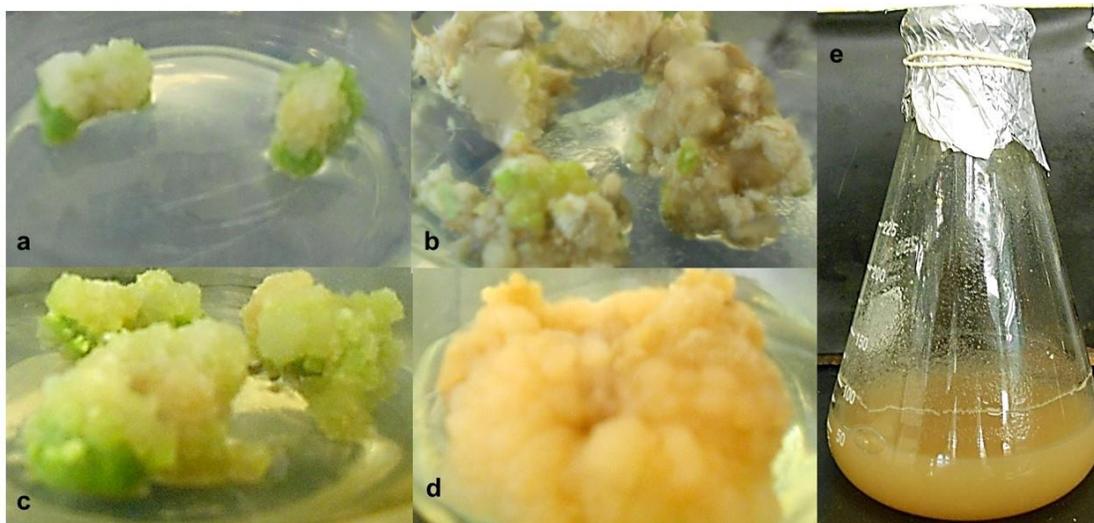
Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias por el método de Duncan ( $\alpha = 0.05$ ) para establecer diferencias significativas, empleando el software NCSS versión 5.0.

## **7. RESULTADOS**

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Inducción de callo

El 100% de las semillas germinaron a los 3-5 días (d) después de la siembra. Las plántulas de 15 d de edad se emplearon como fuente de explante para la inducción de callo. La inducción de callo en los cotiledones, hipocótilos y raíces varió desde un 28 a 100% y se presentó a los 10 d de cultivo. Los callos fueron de distinta morfología según el tipo de explante (Figura 8), es decir, los callos de los cotiledones fueron de aspecto friable y color beige; los callos de los hipocótilos presentaron una apariencia esponjosa, y otros callos friables de color verde-amarillo y beige; mientras que los callos obtenidos de la raíz fueron de color blanquecino y beige y presentaron zonas esponjosas y friables, en los tratamientos  $D_{1.5}B_0$ ,  $D_{1.5}B_{0.5}$ ,  $D_{1.5}B_{1.0}$ ,  $D_{1.5}B_{1.5}$ ,  $D_{1.5}K_{0.5}$ ,  $D_{1.5}K_{1.0}$ ,  $D_{1.5}K_{1.5}$  (28-100% de inducción). La combinación de  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D con  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  KIN ( $D_{1.5}K_{1.0}$ ) o con BAP ( $D_{1.5}B_{1.0}$ ) presentaron significativamente el mayor porcentaje de inducción de callo (100%) así como las mejores características de friabilidad y rápido crecimiento (Tabla 6). En los reportes existentes para la inducción de callo en especies relacionadas, *P. juliflora* (Nandwani y Ramawat, 1991), *P. tamarugo* (Nandwani y Ramawat, 1991) y *P. laevigata* (Trejo-Espino *et al.*, 2011), ha sido necesario el uso de la combinación de auxinas y citocininas para la obtención de callo.



**Figura 8.** Callo inducido en diferentes explantes de *P. laevigata*: a) callo beige de apariencia friable inducido de hipocotilo ( $D_{1.5}K_{1.0}$ , 30 d); b) callo obtenido de raíz color blanquecino/beige de apariencia esponjosa y friable ( $D_{1.5}K_{1.0}$ , 30 d); c) callo friable de color verde-amarillo y beige obtenido a partir de cotiledón ( $D_{1.5}B_{1.0}$ , 30); d) callo beige friable inducido de cotiledón ( $D_{1.5}K_{1.0}$ , 30d); e) cultivo de células en suspensión obtenido a partir de callo inducido de cotiledón ( $D_{1.5}K_{1.0}$ , 18 d)

La inducción de callo se vio significativamente afectada por el tipo de explante (cotiledón, hipocótilo y raíz). El cotiledón presentó mejor inducción de callo, principalmente cuando se usaron los tratamientos D<sub>1.5</sub>B<sub>1.0</sub> y D<sub>1.5</sub>K<sub>1.0</sub> (Tabla 6). Sin embargo, con el tratamiento D<sub>1.5</sub>K<sub>1.0</sub> se produjo el callo más friable y de color beige. La biomasa de esta línea celular se incrementó, y fue seleccionada para establecer el cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*.

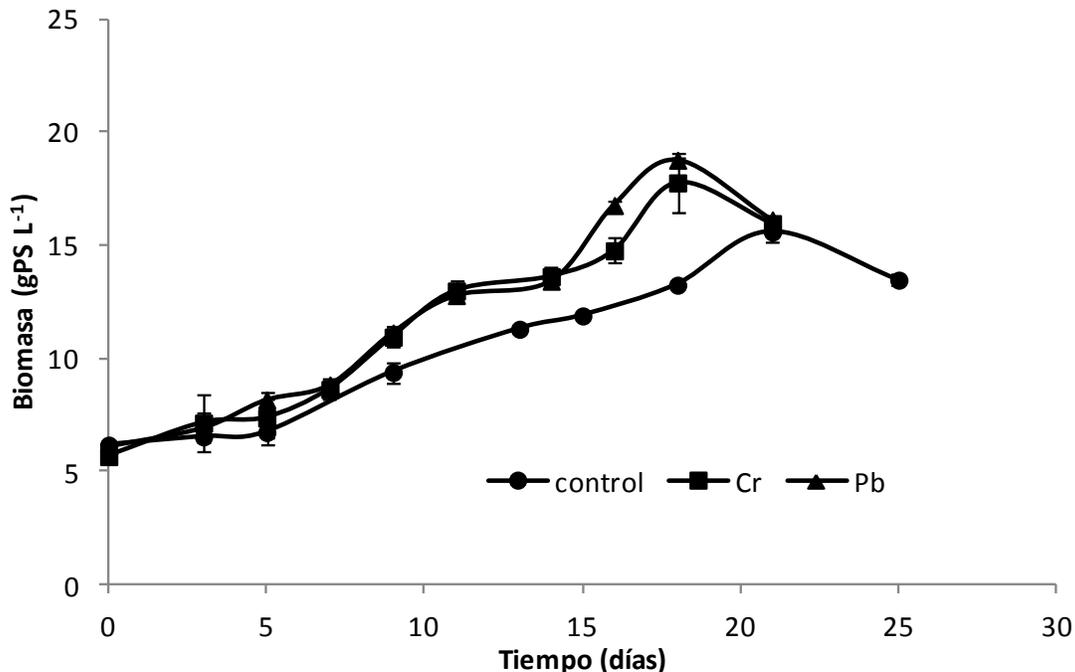
**Tabla 6.** Efecto de los diferentes reguladores de crecimiento y tipo de explante de *P. laevigata* en la inducción de callo

Tratamiento	Cotiledón	Hipocótilo	Raíz
D <sub>0</sub> B <sub>0</sub>	0.00	0.00	0.00
D <sub>0</sub> B <sub>0.5</sub>	0.00	0.00	0.00
D <sub>0</sub> B <sub>1.0</sub>	0.00	0.00	0.00
D <sub>0</sub> B <sub>1.5</sub>	0.00	0.00	0.00
D <sub>0</sub> K <sub>0.5</sub>	0.00	0.00	0.00
D <sub>0</sub> K <sub>1.0</sub>	0.00	0.00	0.00
D <sub>0</sub> K <sub>1.5</sub>	0.00	0.00	0.00
D <sub>1.5</sub> B <sub>0</sub>	80.63 ± 0.0	40.16 ± 9.7	66.67 ± 14.8
D <sub>1.5</sub> B <sub>0.5</sub>	93.33 ± 11.5	32.48 ± 1.5	45.67 ± 3.1
D <sub>1.5</sub> B <sub>1.0</sub>	100.00 ± 0.0	45.24 ± 4.1	28.00 ± 4.0
D <sub>1.5</sub> B <sub>1.5</sub>	81.67 ± 3.5	32.59 ± 12.2	43.33 ± 5.8
D <sub>1.5</sub> K <sub>0.5</sub>	91.53 ± 7.5	46.29 ± 3.2	43.33 ± 5.8
D <sub>1.5</sub> K <sub>1.0</sub>	100.00 ± 0.0	50.00 ± 0.0	46.67 ± 11.5
D <sub>1.5</sub> K <sub>1.5</sub>	70.33 ± 2.5	42.43 ± 2.3	49.44 ± 22.4

## 7.2 Establecimiento de cultivos en suspensión y cinética de crecimiento

En la Figura 9 se muestra la curva de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*. En los primeros cinco días se observó la fase de crecimiento *lag* en la cual la biomasa (PS) fue de 6.7 g L<sup>-1</sup>; la fase de crecimiento exponencial termino en el día 21, en el cual se encontró la máxima producción de biomasa (15.6 g L<sup>-1</sup>). El tiempo de duplicación (td) para esta línea celular fue de 14.1 días y la  $\mu$  fue de 0.0491 d<sup>-1</sup>. La línea celular obtenida en el presente trabajo, tuvo un crecimiento más lento que el obtenido por Trejo-Espino *et al.* (2011) quienes cultivaron células de *P. laevigata* en un biorreactor obteniendo una  $\mu$  de 0.14 d<sup>-1</sup> y un td de 6.6 d. Las diferencias en biomasa máxima, perfil de crecimiento, viabilidad y parámetros cinéticos entre matraces y biorreactor se deben principalmente a los distintos tipos de mezclado y suministro de oxígeno que se presentan en ambos sistemas (Pan *et al.*, 2000). Por otro lado, la viabilidad celular fue alrededor del 80% a los 21 días de cultivo,

lo que se confirma que el establecimiento del cultivo de células en suspensión de *P. laevigata* fue exitoso, ya que, cuando la viabilidad celular es menor del 50%, se considera que el cultivo de células en suspensión no se logró (Qui *et al.*2009).



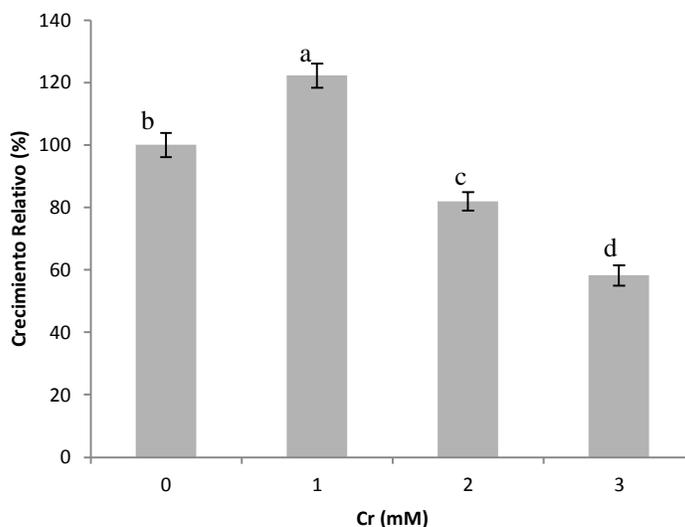
**Figura 9.** Curva de crecimiento de líneas celulares en suspensión de *P. laevigata*, cultivadas en medio MS.

Una vez que los cultivos de células en suspensión fueron establecidos, fueron usadas para la evaluación de los MP, adicionando 1mM de Cr(VI) o Pb(II) y se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes. En la Figura 8 se presentan las curvas de crecimiento de cultivos en suspensión adicionados de 1mM de Cr(VI) o Pb(II), en estos cultivos la fase de crecimiento exponencial terminó en el día 18, obteniéndose la máxima acumulación de biomasa en peso seco (17.78 g L<sup>-1</sup> y 18.78 g L<sup>-1</sup>) para las células cultivadas con 1.0 mM de Cr(VI) y con 1mM de Pb(II), respectivamente. La  $\mu$  para el Cr(VI) fue de 0.0633 d<sup>-1</sup>, mientras que para Pb(II) fue de 0.0620d<sup>-1</sup>. El  $t_d$  obtenido fue de 10.94 d y 11.17 d para el Cr(VI) y Pb(II), respectivamente. El incremento en la biomasa celular, así como el menor  $t_d$  en las células cultivadas en presencia de Cr(VI) y Pb(II) se puede explicar por el hecho de que las células al ser expuestas a MP inician una serie de mecanismos celulares involucrados en la detoxificación y tolerancia al estrés provocado por los MP (Hall, 2002). Wierzbicka (1998), encontró que la presencia de Pb aumentó el peso de tallos y raíces en plántulas de *Allium*

cepa, con respecto a plantas crecidas sin el metal; este resultado se atribuyó a un aumento en la síntesis de polisacáridos en la pared celular.

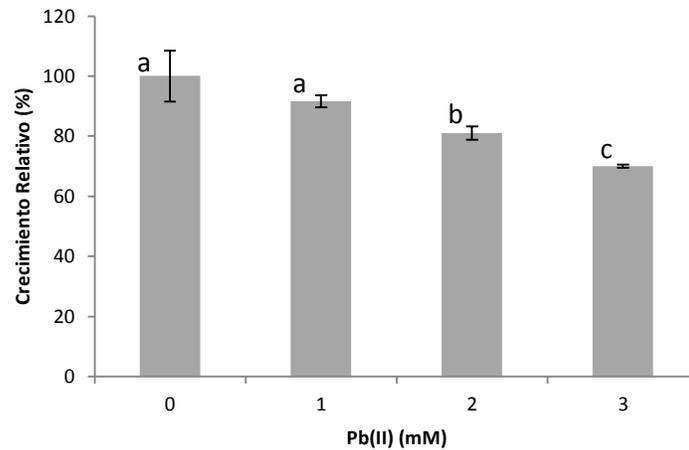
### **7.3 Efecto de Cr(VI) y Pb(II) sobre el crecimiento de cultivos en suspensión**

En este trabajo se cultivaron células en suspensión de *P. laevigata* en presencia de Cr(VI) o Pb(II). Se sabe que los compuestos de Cr son altamente tóxicos en las plantas debido a que ocasionan disminución en el crecimiento y desarrollo vegetal, así como una inhibición de las actividades enzimáticas y en algunos casos mutagénesis. En la Figura 10 se presentan los resultados de crecimiento de las células en suspensión cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de Cr(VI) (0 - 3mM). El crecimiento se expresó como crecimiento relativo (CR), y se observa que en las células cultivadas con 1.0 mM de Cr(VI) el CR fue significativamente mayor (122%) que el control; mientras que el CR de las células cultivadas con 2.0 y 3.0 mM de Cr(VI) fue menor que en el tratamiento control (81% y 58%, respectivamente). Estos resultados son similares a los reportados por Buendía-González *et al.* (2010) quienes encontraron una disminución del crecimiento en plántulas de *P. laevigata* cultivadas en medio adicionado de 2.0 y 3.4 mM de Cr(VI). Hasta ahora, diversos estudios han demostrado que distintas especies vegetales expuestas a Cr presentan una disminución en el crecimiento. De acuerdo con Nichols *et al.* (2000) la disminución en la producción de biomasa puede ser atribuida a una disminución en la asimilación de CO<sub>2</sub> debido a que el Cr provoca una reducción de los pigmentos fotosintéticos. Además, el Cr provoca también una disminución en el crecimiento porque interfiere con otros procesos celulares, como son alteraciones en la cadena de transporte de electrones (respiración) mitocondrial (Dixit *et al.*, 2002).



**Figura 10.** Efecto del cromo (VI) en el crecimiento relativo de células en suspensión de *P. laevigata* a los 18 días de cultivo.

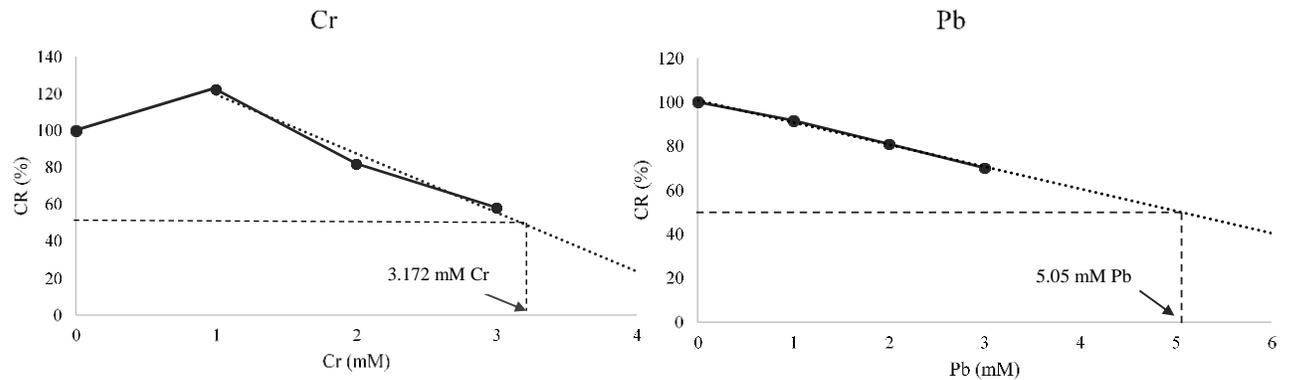
En la Figura 11 se presentan los resultados de crecimiento de las células en suspensión cultivadas con diferentes concentraciones de Pb(II) (0 – 3 mM). Se observa que las células cultivadas en presencia de 1.0 mM de Pb(II) no mostraron diferencias significativas en el crecimiento con respecto al control, en el caso de las células cultivadas con 2.0 y 3.0 mM de Pb(II) el crecimiento fue significativamente menor que en el control (81% y 70% respectivamente). Un estudio previo realizado por Buendía-González *et al.* (2010) quienes evaluaron el efecto del Pb(II) sobre el crecimiento en plántulas de *P. laevigata* obtuvieron CR de 84.59% y 77.72% cuando fueron cultivadas con 1.5 y 3.0 mM de Pb(II) respectivamente. La inhibición del crecimiento por efecto del Pb ha sido reportada previamente en otras especies como son *Triticum aestivum* y *Spinacia oleracea* (Lamhamdi *et al.*, 2013). Efectos similares también se han descrito para *Plantago major* (Kosobrukhov *et al.*, 2004), donde se observó una reducción considerable en el peso seco de la planta bajo el tratamiento con Pb. De manera similar, en plántulas de tomate la biomasa fresca y seca de raíces, tallos y hojas se vieron afectados negativamente por el incremento de la concentración de Pb (Akinci *et al.*, 2010). Algunos trabajos indican que uno de los efectos del Pb sobre los cultivos es la pérdida de los pigmentos fotosintéticos, lo que provoca una disminución en la producción de biomasa (Wu Yongsheng *et al.* 2011); mientras que otros trabajos mencionan que estos síntomas pueden atribuirse esencialmente a una deficiencia de macroelementos (K, P, Ca y Mg), inhibiendo su absorción por la presencia de Pb (Lamhamdi *et al.*, 2013).



**Figura 11.** Efecto del plomo (II) en el crecimiento relativo de células en suspensión de *P. laevigata* a los 18 días de cultivo.

Estos resultados sugieren que las células en suspensión de *P. laevigata* toleran hasta 1.0 mM de Cr(VI) y Pb(II) sin mostrar signos de fitotoxicidad. Para conocer la concentración de Cr(VI) y Pb(II) con la cual el crecimiento de las células en suspensión disminuye 50% con respecto al tratamiento control (0 mM) se determinó la concentración crítica (CC) de Cr(VI) y Pb(II) (Figura 12). La CC se calculó a partir de una curva de crecimiento relativo (CR); encontrando valores de 3.17 y 5.05 mM para Cr(VI) y Pb(II), respectivamente. La CC de un MP para una especie vegetal es aquella que ocasiona una disminución de 50% en la producción de biomasa, con respecto a la biomasa producida en ausencia del MP (Deng, 2004).

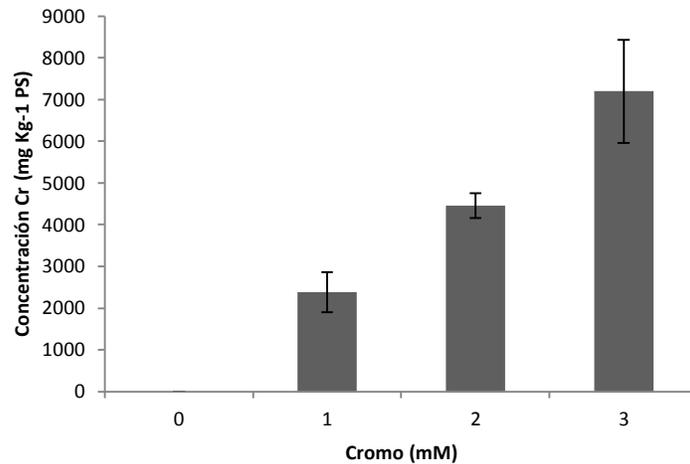
El Task Group (1973) y el Task Group on Metal Toxicity (1976) definen a la CC a nivel celular como la concentración de un metal que produce en la célula cambios funcionales indeseables, reversibles o irreversibles (OPS-OMS, 1980). En este trabajo se encontró que a concentraciones de 2.0 y 3.0 mM de Cr(VI) o Pb(II), las células en suspensión de *P. laevigata* muestran signos de fitotoxicidad, lo cual indica que existen cambios en la fisiología de las células.



**Figura 12.** Cálculo de la concentración crítica (CC) de Cr(VI) y Pb(II) para *P. laevigata* a partir del crecimiento relativo (CR), a los 18 días de crecimiento.

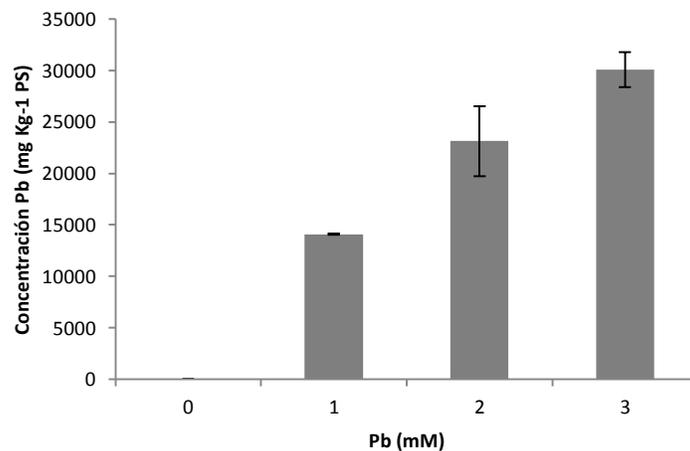
#### 7.4 Acumulación de Cr y Pb en cultivos de células suspensión

En la Figura 13 se muestran los resultados de la acumulación de Cr(VI) en las células en suspensión de *P. laevigata* cultivadas en medio MS adicionado de Cr(VI) (0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mM); la concentración de Cr en la biomasa estuvo en un rango de 2379 a 7194 mg Kg<sup>-1</sup> peso seco (PS). Además, se observa que conforme se incrementaba la concentración Cr(VI) en el medio la acumulación de este metal en la biomasa era mayor. Buendía-González *et al.*, (2010) reportaron que en las raíces de plántulas de *P. laevigata* cultivadas con 2.0 y 3.4 mM de Cr(VI) se acumulaban 5035 y 8090 mg Kg<sup>-1</sup> de Cr, respectivamente. Además, en plantas de *Prosopis spp.* cultivadas en agar con 125 ppm de Cr(VI) (~2.4mM) el Cr era acumulado en raíces (10983 mg Kg<sup>-1</sup>), tallos (2262 mg Kg<sup>-1</sup>) y hojas (991 mg Kg<sup>-1</sup>) (Aldrich *et al.*, 2003). Una de las razones por las cuales el Cr se acumule en las células vegetales es debido a que el Cr es inmovilizado en las vacuolas con lo cual este resulta menos tóxico para las células (Shanker *et al.*, 2005).



**Figura 13.** Acumulación de cromo en células en suspensión de *P. laevigata* cultivadas con diferentes concentraciones de Cr(VI) durante 18 días de cultivo.

En la Figura 14 se muestran los resultados de la acumulación de Pb por células en suspensión de *P. laevigata* cultivadas en medio MS adicionado de Pb(II) (0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mM); encontrándose de 14086 a 30079 mg Pb Kg<sup>-1</sup> en biomasa, y conforme se incrementó la concentración de Pb(II) en el medio de cultivo, la acumulación de Pb también aumentó en la biomasa. Buendía-González *et al.* (2010) reportaron que plántulas de *P. laevigata*, cultivadas *in vitro* en medio MS adicionado de diferentes concentraciones de Pb, las plántulas mostraron una acumulación en tallos y raíces de 27300 y 40666 mg Pb Kg<sup>-1</sup>, cuando fueron cultivadas con 3.0 mM de Pb.



**Figura 14.** Acumulación de plomo en células en suspensión de *P. laevigata* cultivadas con diferentes concentraciones de Pb(II) durante 18 días de cultivo.

En general, la cantidad de Cr y Pb acumulada en las células dependió de la concentración inicial del metal en el medio, es decir, a mayor concentración de Cr o Pb en el medio de cultivo, mayor acumulación Cr o Pb fue observada en la biomasa.

Con los resultados de acumulación de Cr y Pb se determinó la capacidad relativa que las células poseen para absorber Cr o Pb del medio de cultivo. Para lo anterior, se estimó el factor de bioconcentración (FBC), que es una relación entre la concentración del MP en la célula y el MP en el medio donde ésta crece (Tabla 7).

**Tabla 7.** Factor de Bioconcentracion (FBC) de células en suspensión de *P. laevigata*, 18 días de cultivo

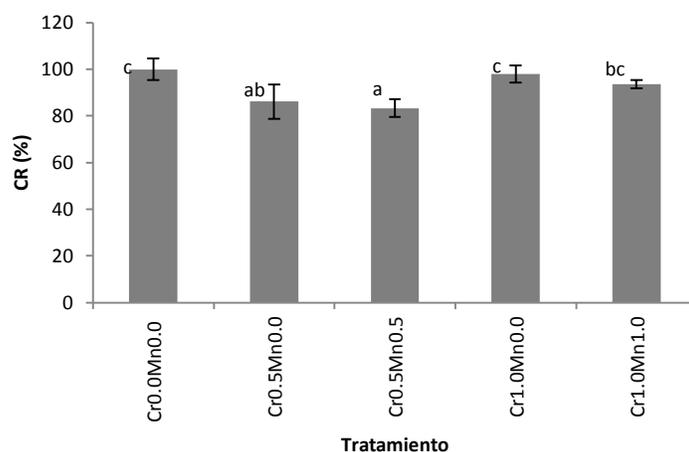
Concentración MP (mM)	Cr	Pb
1	45.76 ± 9.16	67.98 ± 0.26
2	42.84 ± 2.91	55.82 ± 8.22
3	46.13 ± 7.92	48.38 ± 6.53

Audet y Charest (2007) mencionan que si el valor del FBC es mayor a 1, la acumulación del metal por la planta es eficiente, lo que es un indicador para considerar a la especie con potencial para acumular MP. Los valores del FBC para *P. laevigata* fueron en todos los casos mayores a 1 (Tabla 7), indicando que *P. laevigata* es una especie con gran potencial para acumular Cr y Pb en sus tejidos. De acuerdo con Neumann *et al.* (1994), un valor alto en el FBC se puede explicar debido a mecanismos específicos en algunas plantas que ayudan a detoxificar la presencia de altas concentraciones de MP acumulados en sus células. Entre los mecanismos que permiten una elevada bioacumulación de MP, se encuentran los ligandos, los cuales pueden formar complejos como aminoácidos, el ácido cítrico, el ácido málico y las fitoquelatinas, por efecto de los MP.

### **7.5 Efecto de la competencia de Cr(VI) por los transportadores de Mn(II) de células en suspensión de *P. laevigata***

Al evaluar el efecto del Cr(VI) y Mn(II) sobre el crecimiento de células en suspensión de *P. laevigata* se observó que a los 18 días de cultivo, el CR de los tratamientos Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.0</sub> (86.18%) y Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.5</sub> (83.35%) fue significativamente menor que el de los tratamientos Cr<sub>0.0</sub>Mn<sub>0.0</sub> (100%), Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>0.0</sub> (97.97%) y Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>1.0</sub> (93.59%) (Figura 15). Estos resultados son menores a los reportados en plántulas *in vitro* de *P. laevigata* cultivadas con 2.0 y 3.4 mM Cr(VI), donde los valores de CR obtenidos fueron del 50 y 77% respectivamente (Buendía-González *et al.*, 2010). Sihna *et al.* (2006) reportaron que la presencia de Cr y Mn

provoca una disminución en el crecimiento de *Vigna radiata*. Por otro lado, los tratamientos en los que se adiciono 1.0 mM de Cr(VI) ( $Cr_{1.0}Mn_{0.0}$  y  $Cr_{1.0}Mn_{1.0}$ ) el CR fue estadísticamente similar al del tratamiento control ( $Cr_{0.0}Mn_{0.0}$ ). El Mn es un elemento esencial en la nutrición vegetal, y existen algunos reportes en los que se emplean bajas concentraciones de Cr para favorecer el crecimiento de algunos cultivos (Liu *et al.*, 2008; Barcelo *et al.*, 1993; Bonet *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2004), ya que el Cr en algunas especies incrementa la absorción de ciertos nutrientes minerales. En nuestro trabajo, probablemente el Cr favoreció el crecimiento de las células en suspensión de *P. laevigata* debido a que, el estrés provocado incrementó la absorción de algunos nutrientes minerales, lo que pudo resultar en un mejor crecimiento de las células.



**Figura 15.** Efecto del Mn y Cr en el crecimiento de células en suspensión de *P. laevigata* durante 18 días de cultivo

En las células en suspensión de *P. laevigata* cultivadas en medio adicionado con Cr(VI) (0.5 y 1.0 mM) y Mn(II) (0.5 y 1.0 mM) se observó que la acumulación de Cr y Mn aumentaba conforme la concentración de ambos metales se incrementaba en el medio de cultivo (Tabla 8). Sin embargo, la acumulación de Cr se vio afectada por la presencia de 0.5 mM de Mn(II) en el medio de cultivo ya que en el tratamiento  $Cr_{0.5}Mn_{0.5}$  ( $843.91 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) la acumulación de Cr en la biomasa fue significativamente menor que en el tratamiento  $Cr_{0.5}Mn_{0.0}$  ( $1277.18 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). En el caso del Mn se observó que la presencia de Cr en el medio de cultivo indujo un incremento en la acumulación de Mn en la biomasa, y la acumulación de Mn aumento conforme la concentración de Cr se incrementó en el medio de cultivo (Tabla 8). La acumulación de Cr en las células en suspensión de *P. laevigata* fue mayor que para el Mn cuando el medio de cultivo contenía solo Cr o en combinación con Mn. Hasta ahora los reportes que existen sobre el efecto del Cr en la absorción de

nutrientes en plantas son contradictorios. De acuerdo con Barcelo *et al.* (1985) el Cr disminuye la absorción K, N y Fe, e incrementa la absorción de Mn y Ca en las raíces del frijol. Dube *et al.* (2009) reportaron que el Cr (0.5 mM) disminuye la absorción de Fe, S y P en brotes de zanahoria. Por otra parte, Zeng *et al.* (2009) encontraron que el Cr afecta la acumulación de nutrientes en arroz y varía dependiendo de la concentración de Cr. A bajas concentraciones de Cr (10 µM) la absorción de nutrientes se incrementaba mientras que con niveles altos de Cr (50 y 100 µM) la absorción de nutrientes se inhibe. En este trabajo se encontró que las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM de Cr(VI) incrementan la absorción de Mn por las células en suspensión de *P. laevigata* independientemente de la cantidad de Mn(II) que haya en el medio de cultivo.

**Tabla 8.** Acumulación y Factores de Bioconcentración para el Cr y Mn en células en suspensión de *P. laevigata*, a los 18 días de cultivo

Tratamiento	Cr		Mn	
	Acumulación (mg Kg <sup>-1</sup> )	FBC	Acumulación (mg Kg <sup>-1</sup> )	FBC
<b>Cr<sub>0.0</sub>Mn<sub>0.0</sub></b>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	80.69 ± 11.44 <sup>a</sup>	14.67 ± 2.08 <sup>a</sup>
<b>Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.0</sub></b>	1277.18 ± 62.22 <sup>c</sup>	49.12 ± 2.57 <sup>d</sup>	114.03 ± 18.55 <sup>a</sup>	20.73 ± 3.37 <sup>b</sup>
<b>Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.5</sub></b>	843.91 ± 41.19 <sup>b</sup>	32.46 ± 1.76 <sup>c</sup>	389.30 ± 59.56 <sup>c</sup>	11.81 ± 1.8 <sup>a</sup>
<b>Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>0.0</sub></b>	1429.66 ± 135.44 <sup>d</sup>	27.43 ± 0.69 <sup>b</sup>	152.90 ± 2.90 <sup>b</sup>	27.80 ± 0.52 <sup>c</sup>
<b>Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>1.0</sub></b>	1447.68 ± 53.91 <sup>d</sup>	27.84 ± 1.04 <sup>b</sup>	871.98 ± 10.89 <sup>d</sup>	14.43 ± 0.18 <sup>a</sup>

Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones por tratamiento ± DE. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son diferentes estadísticamente.

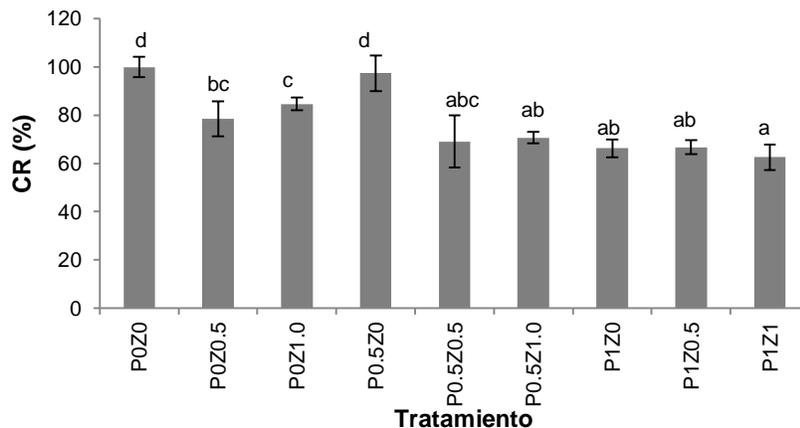
Los valores del FBC en las células en suspensión de *P. laevigata* fueron mayores para el Cr que para el Mn en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>0.0</sub> en el cual el FBC para ambos metales fue similar (Tabla 9). Los valores del FBC para el Cr disminuyeron conforme se incrementó la concentración de Cr en el medio de cultivo. Además, en el tratamiento Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.5</sub> (32.46) la presencia de Mn provocó una disminución en el FBC para el Cr con respecto al tratamiento Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.0</sub> (49.12), lo que sugiere una competencia entre los transportadores de membrana del Mn por parte del Cr, es decir, a una concentración de 0.5 mM de Mn, la célula tiene menos afinidad por la absorción y por lo tanto acumulación de Cr. Sin embargo, en los tratamientos Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>0.0</sub> y Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>1.0</sub> se observó que la presencia de 1.0 mM de Mn(II) no tuvo ningún efecto significativo sobre el valor de FBC comparado con el tratamiento en el que solo se adicionó 1.0 mM de Cr(VI). En el caso de los valores de FBC para el Mn se observó que en los tratamientos Cr<sub>0.5</sub>Mn<sub>0.0</sub> (20.73) y Cr<sub>1.0</sub>Mn<sub>0.0</sub> (27.80) se incrementó el valor del FBC con respecto al tratamiento

control (14.67). Mientras que en los tratamientos  $\text{Cr}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}$  (11.81) y  $\text{Cr}_{1.0}\text{Mn}_{1.0}$  (14.43) los valores del FBC no presentaron ninguna diferencia significativa con respecto al tratamiento control (14.67). Se sabe que el Mn es un micronutriente esencial para el crecimiento de las células vegetales, además tiene un papel importante en la activación de enzimas, participa en procesos de óxido-reducción y en los procesos de eliminación de radicales libres (Marschner, 1995). Nuestros resultados nos indican que la presencia solo de Cr(VI) (0.5 y 1.0mM) favorece la acumulación de Mn por la célula, mientras que la presencia de ambos metales (Cr y Mn) disminuyen la capacidad de la célula para acumular Mn. Existen algunos reportes en los que se muestra que el Mn disminuye la toxicidad provocada por los MP, e. g., Ramos *et al.* (2002) cultivaron *Lactuca sp* en presencia de Cd encontrando un incremento en la acumulación de Mn, mientras que los efectos tóxicos del Cd no fueron evidentes

#### **7.6 Efecto de la competencia de Pb(II) por los transportadores de Zn(II) de células en suspensión de *P. laevigata***

Al evaluar el efecto del Pb(II) y Zn(II) sobre el crecimiento de células en suspensión de *P. laevigata* se encontró que a los 18 días de cultivo, los tratamientos  $\text{Pb}_{0.0}\text{Zn}_{0.5}$  (78%),  $\text{Pb}_{0.0}\text{Zn}_{1.0}$  (85%),  $\text{Pb}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}$  (74%),  $\text{Pb}_{0.5}\text{Zn}_{1.0}$  (71%),  $\text{Pb}_{1.0}\text{Zn}_{0.0}$  (66%),  $\text{Pb}_{1.0}\text{Zn}_{0.5}$  (67%) y  $\text{Pb}_{1.0}\text{Zn}_{1.0}$  (63%) presentaron un menor crecimiento relativo (CR) que los tratamientos control (100%) y  $\text{Pb}_{0.5}\text{Zn}_{0.0}$  (98%) (Figura 16). A pesar de que el Zn es un micronutriente esencial, se sabe que en altas concentraciones resulta dañino a las células vegetales, por lo que si además del Pb agregamos Zn la célula presenta los efectos tóxicos de ambos metales por lo que su crecimiento disminuye. Resultados similares fueron reportados en plántulas de *P. laevigata* cuando fueron cultivadas con 1.5 y 3.0 mM de Pb, el CR fue de 84.59% y 77.72% respectivamente (Buendía-González *et al.*, 2010). Hu *et al.* (2012) encontraron que en plántulas de *Chenopodium album* el crecimiento disminuyó cuando fueron expuestas a 15 mg L<sup>-1</sup> Pb (~ 0.7 mM). Muschitz *et al.* (2009) reportaron que el crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* disminuyó cuando la concentración de Zn fue mayor que 0.5 mM, mientras que el crecimiento de células de *Arabidopsis thaliana* disminuyó con la adición de 30 µM de Zn (Klein *et al.*, 2008). También, Azooz *et al.* (2011) reportaron que en plántulas de *Hibiscus esculentus*, disminuyó el crecimiento cuando fueron expuestas a Pb y/o Zn. La inhibición en el crecimiento y la disminución en la producción de biomasa son consideradas como una respuesta de las plantas a la toxicidad provocada por los MP. La disminución en la producción de biomasa en parte puede ser explicada por la

inhibición en la elongación y división celular (Arduini *et al.*, 1994; Ouariti *et al.*, 1997). Por otro lado, en el tratamiento  $Pb_{0.5}Zn_{0.0}$  no hubo diferencias en el CR con respecto al control (Figura 15); este comportamiento sugiere que las células poseen un mecanismo de tolerancia contra los efectos adversos de la concentración de 0.5 mM de Pb(II). El hecho de que haya un crecimiento similar al control se puede atribuir a un fenómeno conocido como hormesis, que se define como un proceso en el cual la exposición a bajas dosis de un agente ambiental tóxico, que es dañino en altas concentraciones, induce un efecto adaptativo sobre las células u organismos (Mattson, 2008). Por lo que es posible que una concentración de 0.5 mM de Pb(II) induzca niveles bajos de estrés ocasionando una activación de mecanismos celulares y moleculares que incrementan la capacidad de las células para evitar un daño mayor en la misma.



**Figura 16.** Efecto del Zn y Pb en el crecimiento de células en suspensión de *P. laevigata* durante 18 días de cultivo

En las células en suspensión de *P. laevigata* cultivadas en medio adicionado de Pb (0.5 y 1.0 mM) y Zn (0.5 y 1.0 mM), se observó que la acumulación de Pb aumentó conforme la concentración de ambos metales se incrementó en el medio de cultivo, con excepción del tratamiento  $Pb_{1.0}Zn_{1.0}$  (Tabla 10). Sin embargo, la absorción de Zn presentó variación entre los diferentes tratamientos. En los cultivos tratados solo con Pb (0.5 y 1.0 mM) la concentración del Zn en la biomasa disminuyó significativamente comparado con el tratamiento control, mientras que los tratamientos conteniendo únicamente Zn (0.5 y 1.0 mM), mostraron un incremento en el contenido de Zn. Al combinar ambos metales, en el tratamiento  $Pb_{0.5}Zn_{0.5}$  la concentración de Zn disminuyó significativamente con respecto al tratamiento conteniendo únicamente 0.5 mM Zn ( $Pb_{0.0}Zn_{0.5}$ ). En los tratamientos  $Pb_{0.5}Zn_{1.0}$ ,  $Pb_{1.0}Zn_{0.5}$ , y  $Pb_{1.0}Zn_{1.0}$  el Pb indujo una mayor absorción de Zn, ya que la acumulación de

Zn aumento conforme la concentración de Pb se incrementó en el medio de cultivo (Tabla 10). La acumulación de Pb en las células en suspensión de *P. laevigata* fue mayor (7-101 veces) que para el Zn cuando el medio de cultivo contenía solo Pb o en combinación con el Zn.

El factor de bioconcentración (FBC) ha sido empleado como una medida para evaluar la eficiencia de la acumulación de un MP. Audet y Charest (2007), consideran que valores mayores a 1 en el FBC, indican que la especie vegetal posee potencial para considerarse hiperacumuladora. Los valores del FBC en las células en suspensión de *P. laevigata* fueron mayores para el Zn que para el Pb en los tratamientos control y Pb<sub>0.0</sub>Zn<sub>0.5</sub>, Pb<sub>0.0</sub>Zn<sub>1.0</sub>. Sin embargo, los valores de FBC para el Zn disminuyeron drásticamente conforme aumentaba las concentraciones de Pb y Zn en el medio de cultivo (Pb<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.0</sub>, Pb<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.5</sub>, Pb<sub>0.5</sub>Zn<sub>1.0</sub>, Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>0.0</sub>, Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>0.5</sub>, y Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>1.0</sub>) comparado con los tratamientos control, Pb<sub>0.0</sub>Zn<sub>0.5</sub>, y Pb<sub>0.0</sub>Zn<sub>1.0</sub> (Tabla 9). Con respecto a los valores de FBC para el Pb, se observó que el FBC se incrementó conforme la concentración de ambos metales (Pb y Zn) en el medio aumentaba, excepto para el tratamiento Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>1.0</sub> donde el valor de FBC fue significativamente menor que el del tratamiento Pb<sub>1.0</sub>Zn<sub>0.5</sub>; lo cual sugiere que la concentración de 1.0 mM de Zn(II) disminuye la acumulación de Pb en las células en suspensión de *P. laevigata*.

**Tabla 9.** Acumulación y Factores de Bioconcentración para el Pb y Zn en células en suspensión de *P. laevigata*, a los 18 días de cultivo

Tratamiento	Pb		Zn	
	Acumulación (mg Kg <sup>-1</sup> )	FBC	Acumulación (mg Kg <sup>-1</sup> )	FBC
Pb <sub>0.0</sub> Zn <sub>0.0</sub>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	368.44 ± 68.17 <sup>b</sup>	153.13 ± 28.33 <sup>c</sup>
Pb <sub>0.0</sub> Zn <sub>0.5</sub>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	641.74 ± 43.07 <sup>c</sup>	266.72 ± 17.90 <sup>d</sup>
Pb <sub>0.0</sub> Zn <sub>1.0</sub>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	1184.33 ± 68.73 <sup>d</sup>	492.23 ± 28.57 <sup>e</sup>
Pb <sub>0.5</sub> Zn <sub>0.0</sub>	1481.87 ± 48.15 <sup>b</sup>	14.30 ± 0.46 <sup>b</sup>	190.92 ± 53.48 <sup>a</sup>	5.44 ± 1.52 <sup>a</sup>
Pb <sub>0.5</sub> Zn <sub>0.5</sub>	5788.03 ± 40.97 <sup>c</sup>	55.87 ± 0.40 <sup>c</sup>	384.69 ± 57.84 <sup>b</sup>	10.96 ± 1.65 <sup>ab</sup>
Pb <sub>0.5</sub> Zn <sub>1.0</sub>	13399.44 ± 48.84 <sup>d</sup>	129.34 ± 0.47 <sup>g</sup>	1834.82 ± 27.49 <sup>f</sup>	52.28 ± 0.78 <sup>b</sup>
Pb <sub>1.0</sub> Zn <sub>0.0</sub>	14086.05 ± 54.33 <sup>e</sup>	67.98 ± 0.26 <sup>d</sup>	138.46 ± 35.91 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.53 <sup>a</sup>
Pb <sub>1.0</sub> Zn <sub>0.5</sub>	25990.94 ± 49.65 <sup>g</sup>	125.44 ± 0.24 <sup>f</sup>	1007.62 ± 45.88 <sup>d</sup>	14.86 ± 0.68 <sup>ab</sup>
Pb <sub>1.0</sub> Zn <sub>1.0</sub>	18286.21 ± 63.37 <sup>f</sup>	88.25 ± 0.31 <sup>e</sup>	1383.03 ± 45.65 <sup>e</sup>	20.40 ± 0.67 <sup>ab</sup>

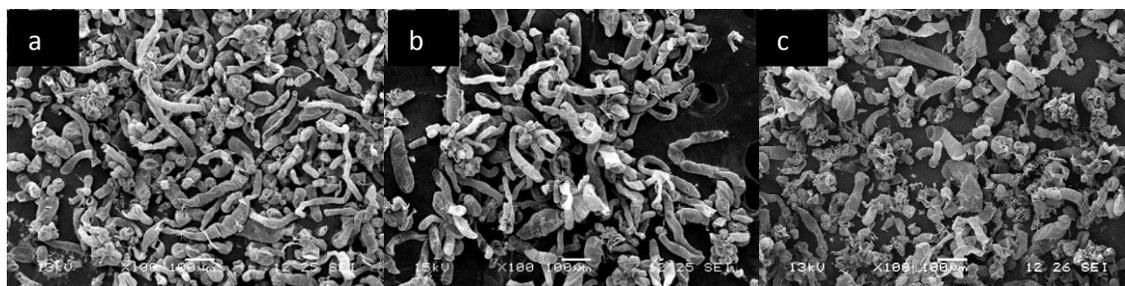
Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones por tratamiento ± DE. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son diferentes estadísticamente.

Nuestros resultados muestran que el Pb es acumulado más eficientemente que el Zn en las células en suspensión de *P. laevigata*, y los valores de FBC fueron mayores para el Pb (2 - 33 veces) que para el Zn, lo que sugieren que el Pb compite por los canales transportadores

del Zn. Hasta ahora se ha reportado que en *Phaseolus vulgaris*, la adición de Zn al medio favorece la acumulación de Pb (Geebelen *et al.*, 2007), por otro lado el Zn disminuye la absorción de Pb en *Brassica rapa*, *Latuca sativa* (He *et al.*, 2004) y en plantas de *Elsholtzia argyi* (Islam *et al.*, 2011). En células de *Dunaliella tertiolecta* un pretratamiento con Zn incrementa la tolerancia al Pb de las células (Tsuji *et al.*, 2002)

### 7.7 Análisis por microscopía electrónica de barrido y energía dispersiva de rayos X

Las micrografías de las células de *P. laevigata* en suspensión cultivadas con 0.0 y 1mM de Cr(VI) o Pb(II) se presentan en la Figura 17. En general, las células en ambos cultivos, con o sin MP fueron de mayor tamaño y alargadas que las reportadas por Trejo-Espino *et al.* (2011) quienes obtuvieron un cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*, cuyas células fueron pequeñas y formaron agregados celulares.



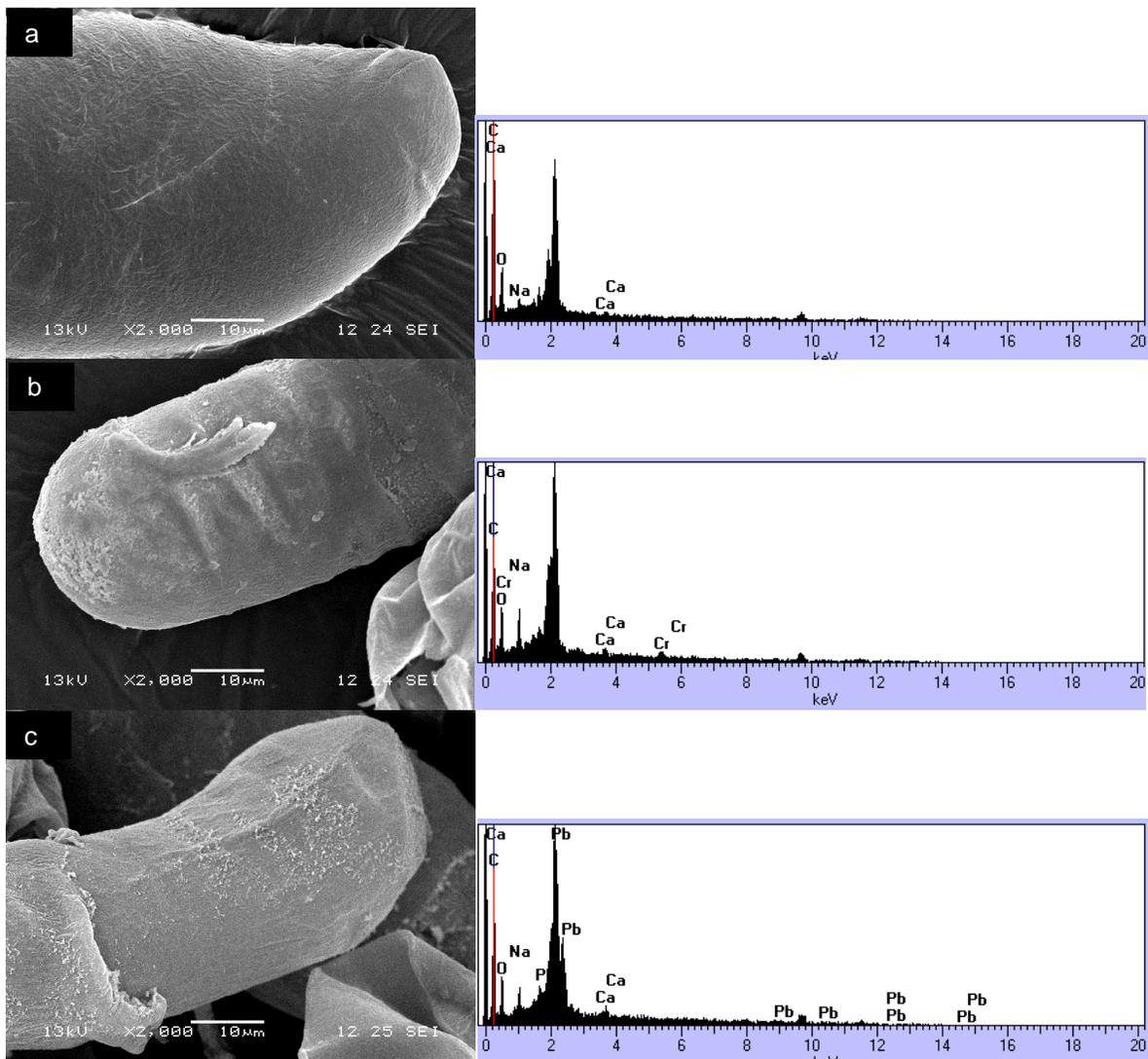
**Figura 17.** Células en suspensión de cultivos de *P. laevigata*: (a) células del tratamiento control (b) células cultivadas con 1mM Cr(VI), y (c) células cultivadas con 1mM Pb(II) (Magnificación 100x).

El análisis por SEM/EDS de la superficie de las células en suspensión mostraron diferencias significativas en la composición elemental de la pared celular entre los tratamientos control, 1.0 mM de Cr(VI) y 1.0 mM de Pb(II) (Tabla 10). En el tratamiento control el Cr no fue detectado en la pared celular, mientras que en las células cultivadas con 1.0 mM de Cr(VI), se encontró que en la composición de la pared celular estaba presente el Cr en un 1.22% (Figura 18). En el caso de las células cultivadas con Pb(II) se encontró que la pared celular estaba compuesta de 13.92% de Pb mientras que en el tratamiento control el Pb no fue detectado en la pared celular (Figura 18). Además se observa que la superficie de las células cultivadas con 1.0 mM de Cr(VI) o 1.0 mM de Pb(II), era diferente respecto a las células control. Las células del tratamiento control presentaban una superficie lisa (Figura 18a) mientras que la superficie de las células cultivadas con 1.0 mM de Cr(VI) se observó rugosa y con presencia de depósitos (Figura 18b). Por último, en la superficie de las células

cultivadas con 1.0 mM de Pb(II) se observó la presencia de múltiples protuberancias vellosas (Figura 18c). Un trabajo similar, es el de Kartosentono *et al.* (2002) quienes cultivaron células en suspensión de *Agave amaniensis* en medio adicionado con Cu, encontraron que el Cu incrementa el grosor y rugosidad de la pared celular. También se sabe que las células vegetales pueden recurrir a varios mecanismos de defensa en respuesta al estrés provocado por los MP como son la exclusión, inmovilización, quelación y compartimentalización de iones metálicos, además las células vegetales previenen el exceso de MP en el citosol forzando a estos a estar en un área limitada, e.g. la pared celular (Liu y Kottke, 2003). Cantidades significativas de Cr y Pb se han encontrado en las paredes celulares de muchas especies vegetales y esto es atribuido a los mecanismos de detoxificación de estos metales. De hecho, se ha sugerido que el Pb es adsorbido en primer lugar en la pared celular mediante la unión a grupos carboxilo, seguido de la captación celular, donde el retículo endoplásmico forma vesículas capaces de almacenar el Pb y a su vez estas pueden participar en la reparación de la membrana plasmática o ser secretadas a través del plasmalema y fusionado con la pared celular (Jiang y Liu, 2010).

**Tabla 10.** Composición elemental (%) de la pared celular (EDS) de *P. laevigata*

Elemento	Control	1.0mM Cr(VI)	1.0 mM Pb (II)
	%	%	%
C	57.52 ± 4.40	51.27 ± 3.02	57.94 ± 3.43
O	37.75 ± 6.42	42.83 ± 3.4	32.32 ± 9.10
Na	4.73 ± 2.12	3.57 ± 2.28	3.66 ± 1.21
Ca	--	2.24 ± 0.21	1.38 ± 0.44
<b>Cr</b>	--	1.22 ± 0.79	--
<b>Pb</b>	--		13.92 ± 5.48



**Figura 18.** Células en suspensión de *P. laevigata* cultivadas en medio MS adicionado de: (a) sin MP; (b) 1.0 mM Cr(VI) y 1.0 mM Pb(II) (SEM magnificación 2,000 X).

## **8. CONCLUSIONES**

## 8 CONCLUSIONES

Las células en suspensión de *P. laevigata* pueden crecer en concentraciones de hasta 1 mM de Cr(VI) o Pb(II) sin presentar efectos fitotóxicos visibles. Con base en lo anterior se estimaron las concentraciones críticas de Cr(VI) (3.17 mM) y Pb(II) (5.05 mM). Por otro lado, las células en suspensión de *P. laevigata* acumularon Cr en rangos de 2379 a 7194 mg Kg<sup>-1</sup> y Pb de 14086 a 30079 mg Kg<sup>-1</sup>, y se observó que la acumulación de ambos metales es dependiente de la concentración inicial de MP en el medio de cultivo. Es decir, a mayor cantidad de MP en el medio, mayor acumulación en las células, siendo el Pb el que se acumuló en mayor cantidad en las células; los valores de FBC fueron en todos los casos mayores a 1. Lo anterior indica que los cultivos de células en suspensión de *P. laevigata* poseen gran potencial para acumular Cr y Pb. Por otro lado, se encontró que para la concentración de 0.5 mM Cr(VI) y Mn(II) hubo una disminución en el FBC para el Cr lo que sugiere que existe una competencia entre los transportadores de membrana del Mn por parte del Cr. Además, los valores de FBC fueron mayores para el Pb (2-33 veces) que para el Zn, lo que nos sugieren que el Pb compite con el Zn por los canales transportadores. Estos resultados confirman también que tanto el Cr como el Pb compiten con los transportadores de membrana para ingresar al interior celular. Por último, el análisis de los cultivos de células en suspensión mediante SEM/EDS demostró que el Cr y el Pb se acumulan en la pared celular, siendo esta una manera en que la células se protegen contra el daño que pueda ocasionar un MP. Estos resultados proporcionan información sobre los mecanismos de tolerancia y acumulación de Cr y Pb que poseen los cultivos de células en suspensión de *P. laevigata*.

## **9. RECOMENDACIONES**

## 9 RECOMENDACIONES

Es necesario realizar estudios más profundos sobre los mecanismos que poseen las células en suspensión de *P. laevigata* para tolerar la presencia de Cr y Pb sin presentar signos de fitotoxicidad, por lo que se sugiere cuantificar el estrés oxidativo, e. g. lipoperoxidación y oxidación proteica; así como, determinar la actividad de enzimas antioxidantes bajo estrés por MP, ya que la presencia de MP en la célula provoca un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, para conocer otros mecanismos de tolerancia y detoxificación de Cr y Pb en *P. laevigata*, es recomendable determinar el efecto del Cr y Pb en la producción de fitoquelatinas (FQ) y metalotioneínas (MT). Y por último, con el fin de conocer los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia y detoxificación de Cr y Pb en *P. laevigata*, es conveniente conocer los grupos de proteínas involucradas en estos procesos.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriano, D. C. 1986. Trace Elements in the Terrestrial Environment. New York: Springer Verlag. p. 105 – 123.
- Ainza, C., Trevors, J., Saier, M., 2010. Environmental mercury rising. *Water Air Soil Pollut.* 205: 47–48.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A. 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91:869 – 881.
- Asada, K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH, Mullineaux PM (ed) *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, CRC Press, Boca Raton, pp. 77-104.
- Aslan, M., Orhan, D.D., Orhan, N., Sezik, E. y Yesilada, E. 2007. In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp *plicatum* capitulurns in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 54-59
- Awofolu, O., 2005. A survey of trace metals in vegetation, soil and lower animal along some selected major roads in metropolitan city of Lagos. *Environ. Monit. Assess.* 105: 431–447.
- Baker A. J. M., McGrath S. P., Reeves R.D. 2000. Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. In: Terry N, Banuelos G, editors. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Boca Raton: Lewis Publishers. pp. 85–108.
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81–126.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C., 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contrib. Sci.* 2: 333–344
- Benjamins, R., Scheres, B. 2008. Auxin: The looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 59:443-465
- Bhojwani, S. S., Razdan, M. K. 1983. *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier Science Publishers, New York, U.S.A.
- Boonyapookana, B., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Pokethitayook, P., Singhakaew, S. 2002. Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *International Journal of Phytoremediation*, 4: 87 – 100.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plants Physiologists, Maryland USA
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C.E., Vernon-Carter, E. J. 2010. *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, 101: 5862–5867.
- Cakmak, I., Oztürk, L., Karanlik, S., Marschner, H., Ekiz, H. 1996. Zinc-efficient wild grasses enhance release of phytosiderophores under zinc deficiency. *Journal of Plant Nutrition* 19: 551–563.

- Cardoza, V. 2008. Tissue culture: The manipulation of plant development. En: Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications. CN Stewart Jr (Ed). John Wiley and Sons, Inc. Knoxville, Tennessee. pp. 113-134.
- Cervantes, C., Garcia, J. C., Devars, S., Corona, F.G., Tavera, H. L., Torres-Guzman, J. 2001. Interactions of chromium with micro-organisms and plants. FEMS Microbiology Reviews, 25:335–347.
- Chaney, R. L., Malik, M., Li, Y. M, Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., Baker, A. J. M. 1997. Phytoremediation of soils metals. Current Opinion in Biotechnology, 8: 279-284.
- Chaudhry, T.M., Hayes, W.J., Khan, A.G., Khoo, C.S., 1998. Phytoremediation-focusing on accumulator plants that remediate metal-contaminated soils. Aust. J. Ecotoxicol. 4: 37–51.
- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta, 212: 475-486.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., Kramer, U. 2002 A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends in Plant Science, 7: 309-315.
- Couselo, J. L., Corredoira, E., Vieitez, A. M., Ballester, A. 2012. Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. Methods Mol Biol., 877:247-63.
- Cunningham, S. D., Berti, W. R. 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: An overview. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 29 (4): 207–212.
- Cunningham, S. D., Berti, W. R., Huang, J. W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. Trends in Biotechnology, 13 (9): 393–397.
- Das, K., Das, S., Dhundasi, S., 2008. Nickel, its adverse health effects and oxidative stress. Indian J. Med. Res. 128: 412–425.
- Davies, P. J. 1995. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic publishers, Netherlands
- Degraeve, N., 1981. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. Mut. Res. 86: 115–135.
- Dinelli, E., Lombini, A., 1996. Metal distributions in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variations. Applied Geochemistry 11: 375-385.
- Doran, P. M. 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and Limitations. Biotechnology and Bioengineering, 103:60-76
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28:350–356.
- Erakhrumen, A.A., 2007. Phytoremediation: an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. Edu. Res. Rev. 2: 151–156.
- Ernst, W.H.O., 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. Applied Geochemistry, 11: 163-167.
- Gamborg, O. L., Phillips, G.C. 1995. Plant cell, tissue and organ culture, fundamental methods. Springer-Verlag, Alemania

- Garbisu, C., Alkorta, I., 2003. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *Eur. J. Miner. Process. Environ. Prot.* 3: 58–66.
- George, E. F., Davis, W. 2008. Effects of the physical environment. En: *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. EF George, MA Hall, GJ De Klerk (Eds). 3ra Edición. Springer. The Netherlands.
- Ghosh, S., 2010. Wetland macrophytes as toxic metal accumulators. *Int. J. Environ. Sci.* 1: 523–528.
- Govindasamy, C., Arulpriya, M., Ruban, P., Francisca, L.J., Ilayaraja, A., 2011. Concentration of heavy metals in seagrasses tissue of the Palk Strait, Bay of Bengal. *Int. J. Environ. Sci.* 2: 145–153.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1-11.
- Hassinen, V. H., Tuomainen, M., Peraniemi, S., Schat, H., Karenlamp, S. O., Tervahauta, A. L. 2009. Metallothioneins 2 and 3 contribute to the metal-adapted phenotype but are not directly linked to Zn accumulation in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot*, 60:187–196
- Herman, E. B. 2000. Recent advances in plant tissue culture, vol 6, regeneration and micropropagation: techniques, systems and media 1997-1999. Agritech Consultants, Inc., United States of America
- Hess, R., Schmid, B., 2002. Zinc supplement overdose can have toxic effects. *J. Paediatr. Haematol. Oncol.* 24: 582–584.
- Huang, J. W., Cunningham, S. D. 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, 134: 75–84.
- Iqbal, M.P., 2012. Lead pollution—a risk factor for cardiovascular disease in Asian developing countries. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25: 289–294.
- Lawton, K., Uknes, S., Ward, E., Ryals, J. 1992. Plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 3:171-175
- Lombini A, Llugany M, Poschenrieder CH, Dinelli E, Barcelo J. 2003. Influence of the Ca/Mg ratio on Cu resistance in three *Silene armeria* ecotypes adapted to calcareous soil or to different, Ni- or Cu-enriched, serpentine sites. *J Plant Physiol*, 160:1451–1456
- Ma, J. F., Nomoto, K. 1996. Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiol. Plant.* 97:609–617
- Maathuis, F. J. M., y Sanders, D. 1994. Mechanism of high affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9272-9276.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Ed., Academic Press, San Diego, New York.
- McGrath, S. P., Zhao, F. J. Lombi, E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advances in Agronomy.* 75: 1–56.
- Meagher, R.B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:153-162.
- Memon, A.R., Schroder, P., 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 162–175.
- Mench, M., Schwitzgebel, J.-P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S., 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake,

- detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 876–900.
- Moulder, J. F., Stickler, W. F., Sobol, P. E, Bomben, K. D. 1992. *Handbook of X-Ray Photoelectron*
- Mukhopadhyay, S., Maiti, S.K., 2010. Phytoremediation of metal enriched mine waste: a review. *Global J. Environ. Res.* 4: 135–150.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Navarro-Aviño, J. P., Aguilar-Alonso, I., López-Moya, J. R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16: 10-25.
- NCSS, 2001. NCSS – Number Cruncher Statistical Software. Kaysville, Utah, USA.
- Neustadt, J., Pieczenik, S., 2007. Toxic-metal contamination: mercury. *Integr. Med.* 6: 36–37.
- Nezbedova, L., Hesse, M., Dusek, J., Werner, C. 1999. Chemical potential of *Aphelandra* sp. cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58:133–140.
- Noctor G., Foyer, CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- Nriagu, J. O. Production and uses of chromium. *Chromium in natural and human environment*. New York, USA: John Wiley and Sons. p. 81– 105.
- Padmavathamma, P. K., Li, L. Y. 2007. Phytoremediation technology: hyper-accumulation of metals in plants. *Water Air Soil Pollution*, 184: 105–126.
- Padmavathamma, P.K., Li, L.Y., 2007. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut.* 184: 105–126.
- Pellet, D. M., Grunes, D. L., Kochian, L. V. 1995. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 196:788–795
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Mundi-Prensa, España
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56:16-39.
- Pina, L. J.A. 2008. Propagación de plantas. Universidad Politécnica de Valencia, España
- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A., Smith, J.A.C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 539–566.
- Prasad, M. N. V., Freitas H. M. D. 2003. Metal hyperaccumulation in plants—Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol.* 93(1): 285–321.
- Pulford, I., Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environ. Int.* 29: 529–540.
- Pulford, I.D., Watson, C., McGregor, S. D. 2001. Uptake of chromium by trees: prospects for phytoremediation. *Environ Geochem Health*; 23:307– 11.
- Quintero, R. 1993. Ingeniería bioquímica. Alhambra mexicana, México
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S. N., Mehrotra, S. 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science* ,167: 1159–1169.

- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J.J., Gárate, A. 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca sp.* Cd–Mn interaction. *Plant Sci*; 162: 761–767.
- Raskin, I., Smith, R., Salt, D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8221-8226
- Reeves, R.D., 1992. Hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. In: Baker, A.J.M., Proctor, J., Reeves, R.D. (Eds.). *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*. Intercept, Andover UK, pp. 253–277.
- Rodrigues, S., Henriques, B., Reis, A., Duarte, A., Pereira, E., Romkens, P.F.A.M., 2012. Hg transfer from contaminated soils to plants and animals. *Environ. Chem. Lett.*, 10: 61–67.
- Rosselli, W., Keller, C., Boschi, K. 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil*; 256:265–72.
- Salem, H.M., Eweida, E.A., Farag, A., 2000. Heavy Metals in Drinking Water and their Environmental Impact on Human Health. ICEHM2000, Cairo University, Egypt, pp. 542–556.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. 1998. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 49: 643-668.
- Shanker, A. K, Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C. N., Pathmanabhan, G. 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L) R Wilczek, cv CO4) roots. *Plant Science*, 166: 1035 – 1043.
- Sheoran, V., Sheoran, A., Poonia, P., 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41: 168–214.
- Singh, S., 2012. Phytoremediation: a sustainable alternative for environmental challenges. *Int. J. Gr. Herb. Chem.* 1: 133–139.
- Skeffington, R. A., Shewry, P. R., Petersen, P. J. 1976. Chromium uptake and transport in barley seedlings *Hordeum vulgare*. *Planta*, 132: 209–214.
- Staden, J., Zazimalova, E., George, E. F. 2008. Plant Growth Regulators II: Introduction; Cytokinins, their Analogues and Antagonists In: Edwin F. George, Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1. The Background*. The Netherlands: Springer, pp 205-226.
- Stoltz, E., Greger, M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 47:271–80.
- Tariq, M., Ali, M., Shah, Z., 2006. Characteristics of industrial effluents and their possible impacts on quality of underground water. *Soil Environ.* 25: 64–69.
- Thangavel, P., Subbhuraam, C., 2004. Phytoextraction: role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part B* 70, 109–130.
- Trigiano, R. N., Gray, D. J. 2000. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2ª edición, CRC Press. United States of America
- Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J.M., 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol.* 25: 158–165.

- Van Aken, B., 2009. Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 231–236.
- Van Deuren, J.; Wang, Z. y Ledbetter, J. 1997. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D., Mench, M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 765–794.
- Vasil, I. K. 1991. Plant tissue culture and molecular biology as tools in understanding plant development and in plant improvement. *Current Opinion in Biotechnology*, 2:158-163
- Verma, S., Dubey, R. S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164: 645-655.
- Vishnoi, S.R., Srivastava, P.N., 2008. Phytoremediation-green for environmental clean. In: The 12th World Lake Conference, pp. 1016–1021
- White, M.C., Chaney, R., L. 1980. Zinc, cadmium and manganese uptake by soybean from two zinc and cadmium amended coastal plain soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44:308-313.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 2011, 1–20.





**ESTABLISHMENT OF CELL SUSPENSION CULTURES OF *Prosopis laevigata* (HUMB. & BONPL. EX WILLD) M.C. JOHNST TO DETERMINE THE EFFECT OF ZINC ON THE UPTAKE AND ACCUMULATION OF LEAD**

**ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Prosopis laevigata* (HUMB. & BONPL. EX WILLD) M.C. JOHNST PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL ZINC EN LA ABSORCIÓN Y ACUMULACIÓN DE PLOMO**

A. Maldonado-Magaña<sup>1</sup>, J. Orozco-Villafuerte<sup>2</sup>, L. Buendía-González<sup>3\*</sup>,  
M.E. Estrada-Zúñiga<sup>3</sup>, A. Bernabé-Antonio<sup>4</sup> and F. Cruz-Sosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.  
Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P. 09340, México D.F., México.

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.  
Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120 Toluca, Estado de México, México.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. Campus El Cerrillo,  
Piedras Blancas, Carretera Toluca-Ixtlahuaca km. 15.5, C.P. 50200, Toluca, Estado de México.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
Av. Universidad 1001 Chamilpa 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

Received July 15, 2013; Accepted October 14, 2013

**Abstract**

*In vitro* studies indicate that *Prosopis laevigata* can be considered a potential hyperaccumulator of lead. Likewise, lead uptake has been related to protein transporters for zinc. In this work presents a protocol for the establishment of cell suspension culture to determine the effect of zinc on the uptake and accumulation of lead. A bioassay with  $Pb^{2+}/Zn^{2+}$  (0.0, 0.5, and 1.0 mM) was carried out on cell suspension cultures derived from callus induced in half-strength Murashige and Skoog (MS) medium added with 6.8  $\mu$ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with 4.5  $\mu$ M kinetin (KIN). Cells showed significant tolerance to growth (GR>60%) at all concentrations and combinations of Pb and Zn (0.0, 0.5 and 1.0 mM). When the Pb with or without Zn were added to the culture medium, the cells showed the highest accumulation efficiency for non-essential (lead) metal over essential (zinc) metal (*BF* values for Pb  $\gg$  *BF* values for Zn; 2-33 times). Scanning electron micrographs evidenced the accumulation of Pb in the cells walls. These results provide insights about the tolerance and accumulation mechanisms of Pb occurring in *P. laevigata*.

**Keywords:** *Prosopis laevigata*, lead, zinc, competitive transport, bioaccumulation, phytoremediation.

**Resumen**

Estudios de cultivos *in vitro*, indican que *Prosopis laevigata* puede ser considerada como una especie potencialmente hiperacumuladora de plomo. En este trabajo se presenta un protocolo para el establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *P. laevigata*, para determinar el efecto del  $Zn^{2+}$  sobre la absorción y acumulación de  $Pb^{2+}$ . Se realizó un bioensayo con  $Pb^{2+}/Zn^{2+}$  (0.0, 0.5, and 1.0 mM) en cultivos de células en suspensión establecidos a partir de callos inducidos en cotiledones en medio Murashige & Skoog (MS) a la mitad de su concentración y suplementado con 2,4-D (6.8  $\mu$ M) y KIN (4.5  $\mu$ M). Las células presentaron un crecimiento relativo del 63-98% en todas las concentraciones y combinaciones de Pb y Zn (0.0, 0.5, 1.0 mM). Respecto a la acumulación, cuando el Pb fue adicionado al medio con o sin Zn, las células mostraron mayor eficiencia de acumulación para el metal no esencial (Pb) sobre el metal esencial (Zn) (valores de *BF* para Pb  $\gg$  valores de *BF* para zinc; 2-33 veces). Imágenes de las células observadas con microscopía electrónica de barrido evidencian la acumulación del plomo en la pared celular. Estos resultados proporcionan información sobre los mecanismos de tolerancia y acumulación de plomo que se llevan a cabo en *Prosopis laevigata*.

**Palabras clave:** *Prosopis laevigata*, plomo, zinc, transporte competitivo, bioacumulación, fitorremediación.

\*Corresponding author. E-mail: lety\_sax@yahoo.com.mx  
Tel. +52-722-296-5556, Fax+52-722-296-5554

## 1 Introduction

Plants have the ability to absorb soluble mineral from soils, including metals such as iron, copper, manganese, zinc, among others, which play a crucial role in metabolic processes and exert a significant impact on vegetal nutrition, growth and development. The uptake of the essential minerals into roots takes place by two main pathways: (i) Entry through cytoplasm of endodermic cells by selectively using a protein transport system which is localized in the plasma membrane and comprehended by channels, carriers and co-transporters (symplastic pathway), or (ii) across the exterior of the plasma membrane by diffusion (apoplastic pathway) (Peer *et al.*, 2006). Besides, mineral uptake involves accumulation of nutrient molecules to higher concentrations than in the surrounding medium, so the primary mechanisms for uptake imply the use of protein transport system. However, in the case of metals, due to the involvement of a nonselective cation uptake mechanism, plants are also able to absorb metals that are non-essential minerals, which can be toxic such as the heavy metal (HM) lead. Competition for transport sites would favor the uptake of this metal at higher concentrations, at the expense of those whose supply is limiting, thereby exacerbating nutrient deficiencies (Reid and Hayes, 2003).

The lead uptake has been associated to transporters implied in zinc and iron entry (Peer *et al.*, 2006). Once lead has been absorbed, this can become toxic causing the inhibition of several metabolic activities in plant cells, e.g., the biosynthesis of nitrogenous compounds and of photosynthetic pigments, carbohydrate metabolism, water absorption, inter alia (Sharma *et al.*, 1995; Azooz *et al.*, 2011). In contrast, there are some species showing few or none phytotoxicity symptoms despite high heavy metal exposure, which are capable to tolerate and grow successfully, as well to accumulate high metal concentrations in shoots (Sarma, 2011). This seems to be the case of *Prosopis laevigata*, a leguminous tree endemic of Mexico capable to grow in mining zones, which has been identified as a potential hyperaccumulator species for chromium, cadmium, nickel, and lead, in *in vitro* experiments (Buendía-González *et al.*, 2010a, 2010b). Due to serious contamination problems, studies on the mechanisms of HM transport are being carried out in hope of developing biotechnological applications to remediate HM contaminated soils. Plant tissue culture is considered an important tool for fundamental studies that provide information about

the plant-contaminant relationships, help to predict plant responses to environmental contaminants, and improve the design of plants with enhanced characteristics for phytoremediation. Callus, cell suspensions, hairy roots, and shoot multiplication cultures are currently used as model systems for understanding the uptake, localization, metabolism, toxicity, and tolerance of pollutants under aseptic conditions. *in vitro* cultures can be propagated indefinitely, are available all year around, and their use enables a great reduction in the amount of whole plant material required for research (Couselo *et al.*, 2012). To our knowledge, there are no studies on the accumulation or tolerance of heavy metals in *Prosopis laevigata* cell suspension cultures.

The aim of this work was establishing *Prosopis laevigata* cell suspension culture to determine the effect of  $Zn^{2+}$  on the uptake and accumulation of lead in cell suspension cultures.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Plant material

Seeds of *P. laevigata* (Hum. and Bonpl. ex Willd M.C. Johnston) were isolated from mature pods which were collected from adult mesquite trees. Seeds were scarified mechanically under laminar flow hood, disinfected by immersing in ethanol, followed by immersion in sodium hypochlorite (Buendía-González *et al.*, 2007). Seeds were carefully rinsed five times with sterile distilled water, and germinated aseptically in culture tubes (25 x 150 mm) containing 15 mL of half-strength Murashige and Skoog medium (MS) (Murashige and Skoog, 1962) added with 3% (w/v) sucrose. At this point it must be stated that half-strength MS contains basal amounts of  $Zn^{2+}$  (0.015 mM), that must be distinguished from the  $Zn^{2+}$  that are further added to MS for bioassay described in section 2.4. Once all the components of medium culture were added, the pH value was adjusted to 5.8 with 1N NaOH or 1N HCl. Phytigel at 0.2% (w/v) was used as a gelling agent. Finally, medium culture was sterilized by autoclaving at 121°C for 18 min. Seedlings (15 days old) were used as source of explants (cotyledon, hypocotyl, and roots). All cultures were maintained at 25±2°C under warm-white fluorescent light at an irradiance of 50  $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 16 h (light)/8 h (dark) photoperiod.

## 2.2 Callus induction

Explants (1.5 cm in length) of hypocotyl, cotyledon or roots from *P. laevigata* seedlings were used to callus induction. Explants were transferred to each culture tube (5 per treatment, 2 replicates) containing half-strength MS medium and supplemented with different combinations and concentrations of plant growth regulators (PGRs): 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; 0.0 and 6.8  $\mu\text{M}$ ) combined with 6-benzyladenine (BA; 0.0, 2.3, 4.5, and 6.8  $\mu\text{M}$ ) or with kinetin (KIN; 0.0, 2.3, 4.5, and 6.8  $\mu\text{M}$ ). All cultures were added with 3% (w/v) sucrose and solidified with 2% (w/v) phytigel. Treatments were coded as  $D_xB_y$  or  $D_xK_y$ , where  $D_x$  stands for the 2,4-D at concentration  $x$ , and  $B_y$  or  $K_y$  for BA or KIN, respectively, at concentration  $y$  (Table 1). Data of percentages of callus induction were recorded at 30 days of culture. These were determined as a ratio of the number of the explants showing callus with respect to total tested explants in each treatment. Callus induced from cotyledons with 6.8  $\mu\text{M}$  2,4-D and 4.5  $\mu\text{M}$  KIN ( $D_{6.8}K_{4.5}$ ) was selected for further experiments as it showed high percentage of callus induction, better growth and friability. Callus derived from  $D_{6.8}K_{4.5}$  treatment were subcultured continuously to propagate biomass and perform further experiments in cell suspension cultures. A subculture cycle consisted of transferring callus to fresh medium culture (same formulation), allowing growing for 30 days.

## 2.3 Establishment of cell suspension cultures and growth kinetics

Friable callus (3 g FW) of 30 days-old induced in cotyledon explants from  $D_{6.8}K_{4.5}$  treatment was transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of callus induction medium (phytagel-free). All cultures were incubated in an orbital shaker at 110 rpm at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  under warm-white fluorescent light at an irradiance of  $30 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 16 h (light) photoperiod. Cultures were subcultured every 15 days for 3 months in liquid MS culture medium with  $D_{6.8}K_{4.5}$  formulation, and supplemented with 5% (v/v) coconut water, and each cycle was passed through a cell dissociation sieve (60 mesh screen; Sigma Chemical Co., USA) in order to get homogeneous cultures. The resulting cultures were transferred (6% (w/v) of inoculum) into Erlenmeyer flasks of 500 mL containing 100 mL of MS liquid culture medium with  $D_{6.8}K_{4.5}$  formulation, and supplemented with 5% (v/v) coconut water and subcultured every 15

days for 6 months. Suspension cell cultures of the latter subcultured (10 days-old) were used to perform growth kinetics and also for heavy metal bioassays. Erlenmeyer flasks of 125 mL containing 25 mL of MS liquid medium culture with  $D_{6.8}K_{4.5}$  formulation and 5% (v/v) coconut water were inoculated with 6% (w/v) cell biomass. Harvesting of cells was made during 21 days at intervals of two or three days. At every interval, the cells were separated from liquid medium culture by filtering, and the recovered cells were weighed (fresh weight, FW), dried into an oven at  $70^\circ\text{C}$  for 24 h and weighed (dry weight, DW). The specific cell growth rate ( $\mu$ ), defined as the increase in cell mass per unit time, was calculated by plotting the cell growth data in the form of natural logarithm versus time. This yields a straight line over the exponential phase growth. The slope of the linear part of the plot corresponds to specific cell growth rate and is given in 1 per units of time (Trejo-Espino *et al.*, 2011). The time required for biomass to double (doubling time,  $t_d$ ) was computed from the  $\mu$  experimental data. All experiments were done in duplicate with three replicates each.

## 2.4 Bioassay of $\text{Pb}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$

In order to evaluate the effect of zinc in the accumulation of Pb, the cell suspension cultures were grown in liquid MS medium with  $D_{6.8}K_{4.5}$  formulation, and supplemented with 5% (v/v) coconut water. Cultures were supplied with Pb (0.0, 0.5 and 1.0 mM) combined with the essential ion  $\text{Zn}^{2+}$  (0.0, 0.5 and 1.0 mM). These treatments were coded as the  $\text{Pb}_x\text{Zn}_y$ , where  $\text{Pb}_x$  stands for the lead at concentration  $x$  and  $\text{Zn}_y$  for essential ion ( $\text{Zn}^{2+}$ ) at concentration  $y$ . The  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Baker Analyzed, Phillipsburg NJ) salts were used as the source of the corresponding metal, and thus the appropriate stock solution ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was prepared with deionized water. The respective aliquots of metal stock solutions were added to achieve the desired concentrations. Every experiment was done in duplicate with three replicates. Cultures were incubated for 10 days and were simultaneously harvested. Cell biomass was filtered, washed (three times with deionized water to remove extracellular adsorbed metals) and then was dried at  $70^\circ\text{C}$  for 24 h. The DW measurements were used to determine the growth ratio (GR) defined as (Baker, 1987):

$$GR = \frac{\text{Plant biomass with Pb and/or Zn (DW)}}{\text{Plant biomass without Pb (control; DW)}} \times 100 \quad (1)$$

Moreover, the harvested biomass (*DW*) was used to determine the metal content.

## 2.5 Analysis of Pb and Zn content in biomass

Dry biomass was weighed (100 mg), powdered and digested with concentrated HNO<sub>3</sub> (5 mL) and deionized water (4 mL) in a microwave (MARS-Xpress, CEM corporation, Mathews, North Carolina) and the final sample volume was adjusted to 10 mL with deionized water, filtered (0.45 μM, GN-6, Metricell) and placed in high density polyethylene (HDPE) flasks. The metal concentration was analyzed from digested samples using a Varian Spectra AA-220 FS Atomic Absorption Spectrometer (Varian, Australia). The concentration of metals (Pb and Zn) was determined by calibration curves obtained using standards solutions of pure metal ions (Baker Analyzed, Phillipsburg, NJ). The standard calibration curves had correlation coefficients (*r*<sup>2</sup>) of 0.99 or better. All glassware and apparatus were washed with 0.1 N HNO<sub>3</sub> before their use. Metal concentration measurements were used for evaluating the bioconcentration factor (*BF*); which estimates the efficiency of a plant in taking up heavy metals from medium culture and is defined as the ratio of metal concentration in plant tissues ([Pb or Zn]<sub>biomass</sub>) to *HM* concentration in medium ([Pb or Zn]<sub>medium culture</sub>) (Audet and Charest, 2007):

$$BF = \frac{[Pb \text{ or } Zn]_{biomass}}{[Pb \text{ or } Zn]_{medium \text{ culture}}} \quad (2)$$

## 2.6 Surface cellular wall analysis by scanning electron microscopy (SEM-EDS)

Biomass samples from the control or Pb-treated cell suspension cultures were analyzed using a SEM (JEOL JSM-5900 LV, Oxford, Japan), equipped with energy-dispersive X-rays spectroscopy (EDS 7274, England). Samples of cell suspension cultures (1 mL) were removed from flasks before filtering procedure and were centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and cells were fixed by adding a solution of glutaraldehyde 2% (v/v) for 24 h at 4°C. Samples were carefully rinsed with a buffer solution (phosphate 2 mM, pH 7.2) to remove the fixer, followed by immersion in 1% (w/v) osmium tetroxide solution for 2 h, dehydrated through a graded ethanol series (30-100%, v/v) sequentially for

20 min at each step. All dehydrated samples were desiccated at critic point with carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) (Samdri-795, USA). The samples were covered with a layer of carbon and gold (Bozzola and Russell, 1999) with a Denton Vacuum Desk III equipment (Denton, USA). Lastly, the samples were observed, analyzed and photographed in SEM-EDS (2000x).

## 2.7 Statistical analysis

The results were subjected to variance analysis and Tukey's multiple range test (*P* ≤ 0.05) with NCSS version five statistical software (Wireframe Graphics, Kaysville, UT) in order to determine significant differences.

# 3 Results and discussion

## 3.1 Callus induction

All the immature *P. laevigata* explants tested showed the callus development after 10 days of culture. The phenotypic characteristics of callus corresponded to green or beige color and friable or compact morphology. The percentages of callus induction from *P. laevigata* were significantly affected by the type of explant and PGRs (*P* ≤ 0.05) (Table 1). The cotyledon and the auxin 2,4-D were the prime factors promoting the callus response. Also, the combination of 2,4-D with cytokinin (BA or KIN) increased the percentages of callus induction compared to the treatment consisting of only 2,4-D. The highest percentage (100%) of callus induction occurred in cotyledon explants treated with 6.8 μM 2,4-D combined with 4.5 μM of BA or 4.5 μM KIN (D<sub>6.8</sub>B<sub>4.5</sub> or D<sub>6.8</sub>K<sub>4.5</sub>, respectively) (Table 1). However, the cotyledons from the treatment containing 6.8 μM 2,4-D with 4.5 μM KIN produced a beige callus (D<sub>6.8</sub>K<sub>4.5</sub>), and showed better growth and friability. Therefore, the cotyledon cultures from D<sub>6.8</sub>K<sub>4.5</sub> were selected for propagating the cellular line and to establish the cell suspension cultures. In contrast, in a study conducted by Trejo-Espino *et al.* (2011) reported low *P. laevigata* callus induction (≤ 18.7%) from cotyledons when treated with 5.0 μM 2,4-D without/with *KIN* or *BA* (5.0 μM). Nevertheless, these same authors achieved high callus induction (100%) from hypocotyls treated with 5.0 μM 2,4,5-T plus 5.0 μM *KIN* or 5.0 μM *BA*. The differences found between this work and that by Trejo-Espino *et al.* (2011) can probably be attributed to genetic factors and the age of explants, as in the former

Table 1 Callus induction percentage in *Prosopis laevigata* explants treated with different Plant Growth Regulators (PGRs) after 30 days of culture.

Treatments	Callus induction in explants (%)		
	Cotyledon	Hypocotyl	Root
D <sub>0</sub> B <sub>0</sub> K <sub>0</sub> (Control)	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0</sub> B <sub>2.3</sub>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0</sub> B <sub>4.5</sub>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0</sub> B <sub>6.8</sub>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0</sub> K <sub>2.3</sub>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0</sub> K <sub>4.5</sub>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0</sub> K <sub>6.8</sub>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
D <sub>6.8</sub> B <sub>0</sub> K <sub>0</sub>	80.63±0.0 <sup>c</sup>	40.16±9.7 <sup>bc</sup>	66.67±14.8 <sup>d</sup>
D <sub>6.8</sub> B <sub>2.3</sub>	93.33±11.5 <sup>de</sup>	32.48±1.5 <sup>b</sup>	45.67±3.1 <sup>c</sup>
D <sub>6.8</sub> B <sub>4.5</sub>	100.00±0.0 <sup>e</sup>	45.24±4.1 <sup>c</sup>	28.00± 4.0 <sup>b</sup>
D <sub>6.8</sub> B <sub>6.8</sub>	81.67±3.5 <sup>c</sup>	32.59±12.2 <sup>b</sup>	43.33±5.8 <sup>c</sup>
D <sub>6.8</sub> K <sub>2.3</sub>	91.53±7.5 <sup>d</sup>	46.29±3.2 <sup>c</sup>	43.33±5.8 <sup>c</sup>
D <sub>6.8</sub> K <sub>4.5</sub>	100.00±0.0 <sup>e</sup>	50.00±0.0 <sup>c</sup>	46.67±11.5 <sup>c</sup>
D <sub>6.8</sub> K <sub>6.8</sub>	70.33±2.5 <sup>b</sup>	42.43±2.3 <sup>c</sup>	49.44±22.4 <sup>c</sup>

The data correspond to the average of five repetitions by treatment ± SD. The values with the same letter in columns are not statistically different (Tukey's range test cotyledon  $p = 1.89e^{-26}$ ; hypocotyls  $p = 7.23e^{-16}$ ; root  $p = 4.26e^{-14}$ ). Critical Value = 5.1766

study the germination of *P. laevigata* seeds took place between 3 and 5 days and in the latter study between 5 and 7 days. Burbulis and Blinstrubiené (2011) reported that a specific combination of PGR was necessary for callus induction of *Linum usitatissimum* according genotype. Likewise, the age of different *Amaranthus* species explant tissues produced different *in vitro* responses (Bovelli et al., 2001). Other *Prosopis* species such as *P. juliflora* and *P. tamarugo* required the combination of auxins with cytokinins to develop callus in hypocotyl explants (Nandwani and Ramawat, 1991; Nandwani and Ramawat, 1992).

### 3.2 Growth kinetics of cell suspension cultures

*P. laevigata* cell suspension culture was established and the growth curve is shown in Fig. 1. The lag phase lasted 5 days, followed by an exponential phase, which ended after 21 days of culture, and the maximum accumulated biomass (MAB) was produced (15.61 g DW L<sup>-1</sup>). The duplication time ( $t_d$ ) was 14.1 days, and specific growth rate ( $\mu$ ) was 0.049 days<sup>-1</sup>. However, studies conducted by Trejo-Espino et al. (2011) in a *Prosopis laevigata* cell suspension culture reported a lower MAB (11.9 g DW L<sup>-1</sup>).

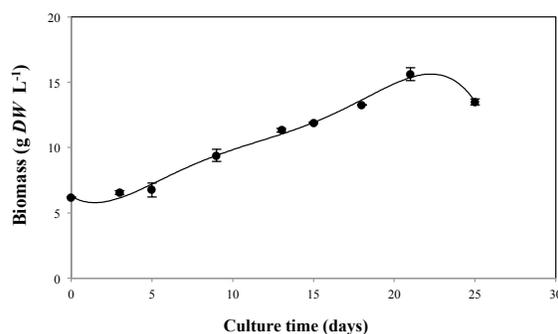


Fig. 1. *Prosopis laevigata* cell suspension cultures growth kinetics. Vertical bars denote SD.  $y = -3 \times 10^{-5}x^5 + 0.0016x^4 - 0.0346x^3 + 0.3198x^2 - 0.7345x + 6.2745$ ;  $R^2 = 0.9927$ .

Instead the  $t_d$  (6.6 days) and  $\mu$  (0.104 days<sup>-1</sup>) were higher than those found in this study. Tissue culture and plant cells are more likely possess good phytoremediation potential if they exhibit high growth rate parameters (Doran, 2009). Izquierdo et al. (2004) pointed out that to avoid incurring in the erroneous measurements of the heavy metal net effect on the metabolism of cells, sampling should be performed before reaching the end of exponential stage of growth since by this time, substrate depletion may commence or toxic products accumulated.

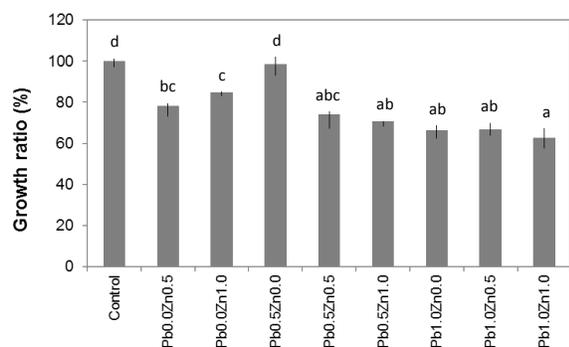


Fig. 2. Growth ratio (GR) of *Prosopis laevigata* cell suspension cultures treated with different concentrations of  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ . The data correspond to the average of three repetitions by treatment  $\pm$  SD. Vertical bars denote SD. The values with the same letter in columns are not statistically different (Tukey's range test;  $p = 7.12 \times 10^{-9}$ ). Critical Value = 4.9552.

### 3.3 Tolerance to lead and competitive transport between $Pb^{2+}$ and $Zn^{2+}$ in cell suspension cultures

The cell suspension cultures exposed to  $Pb_{0.0}Zn_{0.5}$  (78%),  $Pb_{0.0}Zn_{1.0}$  (85%),  $Pb_{0.5}Zn_{0.5}$  (74%),  $Pb_{0.5}Zn_{1.0}$  (71%),  $Pb_{1.0}Zn_{0.0}$  (66%),  $Pb_{1.0}Zn_{0.5}$  (67%), and  $Pb_{1.0}Zn_{1.0}$  (63%) showed significant lower growth ratio (GR) than the control (100%) and  $Pb_{0.5}Zn_{0.0}$  (98%) treatments (Fig. 2). Similar results were reported for *P. laevigata* seedlings, where the exposition to 1.5 (84.59%) and 3.0 mM (77.72%)  $Pb^{2+}$  induced a GR reduction (Buendía-González *et al.*, 2010b). Hu *et al.* (2012) reported that *Chenopodium album* seedlings showed decreased growth (FW) when exposed to 150 mg L<sup>-1</sup>  $Pb^{2+}$  (~0.7 mM); Muschitz *et al.* (2009) reported that the growth of seedlings from *Solanum lycopersicum* was decreased when the concentration of Zn was higher to 0.5 mM, whereas the growth of cells from *Arabidopsis thaliana* was decreased by adding over 30  $\mu$ M of Zinc (Klein *et al.* 2008). Also, Azooz *et al.* (2011) reported that *Hibiscus esculentus* seedlings showed decreased growth when exposed to  $Pb^{2+}$  and/or  $Zn^{2+}$ . Growth inhibition and reduction of biomass production are considered as general responses of higher plants to heavy metal toxicity. Inhibition of both cell elongation and division by heavy metals could explain, in part, the decline in biomass production (Arduini *et al.*, 1994; Ouariti *et al.*, 1997). However, in the treatment with  $Pb_{0.5}Zn_{0.0}$ , there were no differences among GR and the control

(Fig. 2). This behavior suggests the operation of a tolerance mechanism against adverse effects of lead at concentration of 0.5 mM. The effect might be attributed to a phenomenon known as hormesis, an adaptive response characterized by increasing and reducing responses at low and high concentrations, respectively, of a given pollutant (Calabrese *et al.* 2007). Thus, based on the above considerations, it is possible that a lead concentration of 0.5 mM could induce low levels of stress by activating the cellular and molecular mechanisms enhancing the ability of this species to with stand more severe stresses.

*P. laevigata* cell suspension cultures treated with both  $Pb^{2+}$  (0.5 and 1.0 mM) and  $Zn^{2+}$  (0.5 and 1.0 mM) showed that lead accumulation increased as the concentration of both metals increased (Table 2). Moreover,  $Zn^{2+}$  absorption vary among the different treatments. In cultures treated only with  $Pb^{2+}$  (0.5 and 1.0 mM), the concentration of Zn in biomass was decreased significantly compared with to the control. Whereas, in cultures with  $Pb_{0.5}Zn_{0.5}$ , the concentration of Zn in biomass decreased significantly with respect to  $Pb_{0.0}Zn_{0.5}$  treatment. However, the Pb does not affect the absorption of Zn when the cells were treated with  $Pb_{1.0}Zn_{0.5}$  or  $Pb_{1.0}Zn_{1.0}$ . This is because the concentration of Zn was increasing as the concentration of Pb in the medium was also increased (Table 2). The accumulation in *P. laevigata* cell suspension was greater for Pb (7-101 times) than Zn, when the culture media containing Pb with or without Zn.

The bioconcentration factor (*BF*) has been used as a measure of the metal accumulation efficiency. In accordance to Audet and Charest (2007), *BF* values higher than 1 are indicative of potential hyperaccumulator species. The *BF* values were greater for Zn than Pb for the *P. laevigata* cell suspension cultures, when the medium was supplemented only with  $Zn^{2+}$  or in the control treatment. However, *BF* values for Zn drastically decreased as the combined  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  concentration increased ( $Pb_{0.5}Zn_{0.0}$ ,  $Pb_{0.5}Zn_{0.5}$ ,  $Pb_{0.5}Zn_{1.0}$ ,  $Pb_{1.0}Zn_{0.0}$ ,  $Pb_{1.0}Zn_{0.5}$  and  $Pb_{1.0}Zn_{1.0}$ ) with respect to control,  $Pb_{0.0}Zn_{0.5}$  and  $Pb_{0.0}Zn_{1.0}$  treatments (Table 2). With respect to *BF* values for Pb, the showed that *BF* value increased as the concentration of both metals increased, except to  $Pb_{1.0}Zn_{1.0}$  treatment where *BF* was significantly lower than  $Pb_{1.0}Zn_{0.5}$  treatment, which suggests that the Zn (1.0mM) decreases Pb accumulation in cell suspension.

Table 2. Accumulation and bioconcentration factors (BF) for Pb and Zn in cell suspension cultures of *Prosopis laevigata*, after 10 days of culture.

Treatment	Pb		Zn	
	Accumulation (mg kg <sup>-1</sup> )	BF	Accumulation (mg kg <sup>-1</sup> )	BF
Control	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	368.44 ± 68.17 <sup>b</sup>	153.13 ± 28.33 <sup>c</sup>
Pb <sub>0,0</sub> Zn <sub>0,5</sub>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	641.74 ± 43.07 <sup>c</sup>	266.72 ± 17.90 <sup>d</sup>
Pb <sub>0,0</sub> Zn <sub>1,0</sub>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	00.00 ± 00.00 <sup>a</sup>	1184.33 ± 68.73 <sup>d</sup>	492.23 ± 28.57 <sup>e</sup>
Pb <sub>0,5</sub> Zn <sub>0,0</sub>	1481.87 ± 48.15 <sup>b</sup>	14.30 ± 0.46 <sup>b</sup>	190.92 ± 53.48 <sup>a</sup>	5.44 ± 1.52 <sup>a</sup>
Pb <sub>0,5</sub> Zn <sub>0,5</sub>	5788.03 ± 40.97 <sup>c</sup>	55.87 ± 0.40 <sup>c</sup>	384.69 ± 57.84 <sup>b</sup>	10.96 ± 1.65 <sup>ab</sup>
Pb <sub>0,5</sub> Zn <sub>1,0</sub>	13399.44 ± 48.84 <sup>d</sup>	129.34 ± 0.47 <sup>s</sup>	1834.82 ± 27.49 <sup>f</sup>	52.28 ± 0.78 <sup>b</sup>
Pb <sub>1,0</sub> Zn <sub>0,0</sub>	14086.05 ± 54.33 <sup>e</sup>	67.98 ± 0.26 <sup>d</sup>	138.46 ± 35.91 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.53 <sup>a</sup>
Pb <sub>1,0</sub> Zn <sub>0,5</sub>	25990.94 ± 49.65 <sup>s</sup>	125.44 ± 0.24 <sup>f</sup>	1007.62 ± 45.88 <sup>d</sup>	14.86 ± 0.68 <sup>ab</sup>
Pb <sub>1,0</sub> Zn <sub>1,0</sub>	18286.21 ± 63.37 <sup>f</sup>	88.25 ± 0.31 <sup>e</sup>	1383.03 ± 45.65 <sup>e</sup>	20.40 ± 0.67 <sup>ab</sup>

The data correspond to the average of three repetitions by treatment ± SD. The values with the same letter in columns are not statistically different (Tukey's range test; Pb  $p = 6.04e^{-42}$ ; Pb BF  $p = 6.16e^{-40}$ ; Zn  $p = 1.20e^{-18}$ ; Zn BF  $p = 1.43e^{-18}$ ). Critical Value = 4.9552

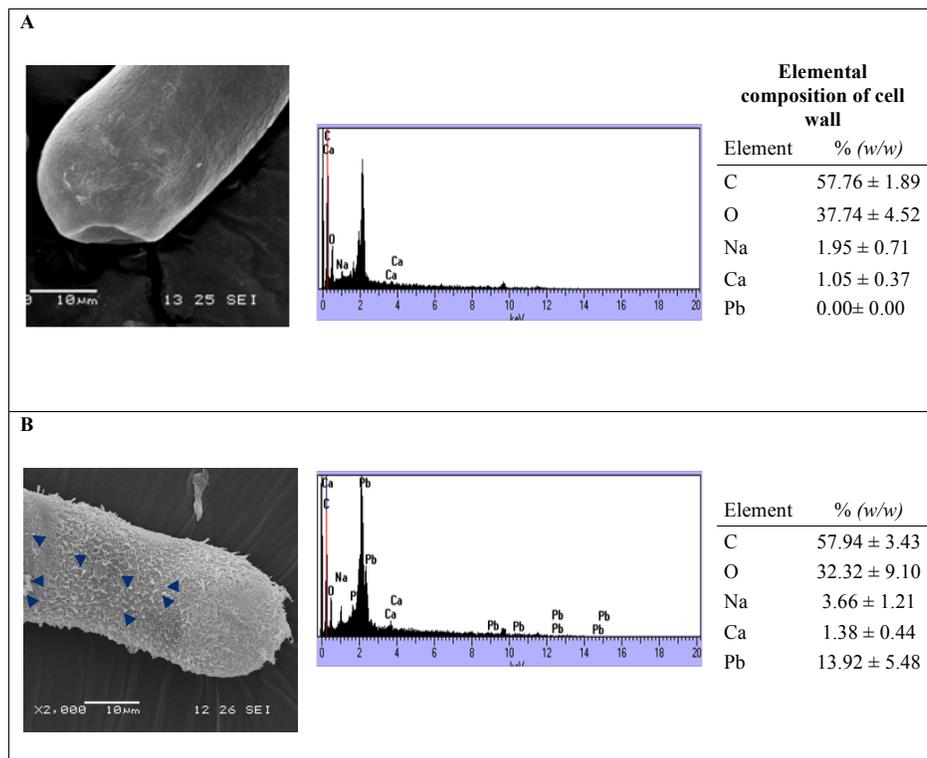


Fig. 3. Micrographs (SEM 2,000x magnification) of *Prosopis laevigata* cell suspension cultures grown in: (A) without heavy metals and (B) with Pb<sup>2+</sup> 1.0 mM. The arrows indicate the Pb deposition.

Our results show that the Pb was accumulated more efficiently than Zn. The BF values were greater for Pb (2-33 times) than Zn for the *P. laevigata* cell suspension cultures. These results imply that competitive transport of both metals occurs through

transporter channels, with saturation occurring at higher metals concentrations. It has been reported that Zn supply increased Pb uptake in *Phaseolus vulgaris* plants (Geebelen et al., 2007), but reduced Pb uptake in *Brasica rapa*, *Lactuca sativa* (He et al., 2004) and

in *Elsholtzia argyi* plants (Islam et al., 2011). In the first case, Pb increase caused a decrease of Zn uptake (Geebelen et al., 2007). A pre-treatment with Zn in *Dunaliella tertiolecta* cells resulted in a significant improvement to tolerance capability for Pb (Tsuji et al., 2002).

### 3.4 Surface cellular wall analysis by SEM-EDS

SEM micrographs of cells suspension culture of *P. laevigata* treated with 0.0 and 1.0 mM Pb<sup>2+</sup>, displayed elongated morphology cells (Fig. 3A-B). The SEM-EDS analysis showed significant differences in the elemental composition of the cellular wall between the control and the 1.0 mM Pb<sup>2+</sup> treatments (Fig. 3A-B). While in the control treatment Pb was not detected, 13.92% Pb was found in the Pb<sup>2+</sup> treatment, those were observed as such deposits or aggregates (Fig. 3B, arrows). Furthermore, the surface morphology of the cells treated with 1.0 mM Pb<sup>2+</sup> showed substantial differences from that of the control treatment. While control treatment exhibited a smooth surface (Fig. 3A), the 1.0 mM Pb<sup>2+</sup> treatment was characterized by a multitude hairy-like protuberances or bumps (Fig. 3B). Plant cells can resort to several defense mechanisms in response to HM stress including exclusion, immobilization, chelation and compartmentation of metal ions. Also, the plant cells can prevent HM excess entry to cytosol and force them into a limited area e.g. cell wall (Liu and Kottke, 2003). Significant amounts of Pb have been found in the cell walls of many plant species, and this has been attributed to Pb detoxification mechanism. It has been suggested that Pb is adsorbed firstly in cell wall by its union to carboxyl groups, followed by cell uptake, where endoplasmic reticulum vesicles are formed, which can participate in the repair of plasma membrane or be secreted through plasmalemma and fused with the cell wall (Jiang and Liu, 2010). It has been suggested that Pb deposition in cell walls was the main mechanism for tolerance and detoxification to this HM in two species of *Lespedeza* (Zheng et al., 2012).

## Conclusions

Cell suspension cultures of *P. laevigata* showed significant tolerance to growth at different Pb<sup>2+</sup> concentrations. The cells showed a growth ratio for heavy metal greater than 63%, and also a

capacity to uptake Pb. Additionally, the cells showed the highest accumulation efficiency for non-essential metal over essential metal. Scanning electron micrographs evidenced the accumulation of Pb in the cells walls. These results provide insights about the tolerance and accumulation mechanisms of lead occurring in *P. laevigata*.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Programa para el Mejoramiento del Profesorado for the partial financing of this project through grant PROMEP/103.5/12/3510. Also, author AM-M thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship received.

## Notation

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	6-benzyladenine
BF	bioconcentration factor
DW	dry weight; mg
FW	fresh weight; mg
GR	growth ratio; %
HDPE	high density polyethylene
HM	heavy metal
KIN	kinetin
MAB	maximum accumulated biomass (g DW L <sup>-1</sup> )
MS	murashige and Skoog medium
PGRs	plant growth regulators
SEM-EDS	scanning electron microscopy equipped with energy-dispersive X-rays spectroscopy
$t_d$	duplication time; days
$\mu$	growth specific rate; days <sup>-1</sup>

## References

- Audet, P. and Charest, C. (2007). Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution* 147, 231-237.
- Azooz, M.M., Youssef, M.M. and Al-Omair, M.A. (2011). Comparative evaluation of zinc and lead and their synergistic effects on growth and some physiological responses of Hassawi okra (*Hibiscus esculentus*) seedlings. *American Journal of Plant Physiology* 6, 269-282.

- Baker, A.J.M. (1987). Metal tolerance. *New Phytologist* 106, 93-111.
- Bovelli, R., Schiff, S. and Bennici, A. (2001). Callogenesis and organogenesis in species and different varieties of the genus *Amaranthus*. *Informatore Botanico Italiano* 33, 63-66.
- Bozzola, J.J. and Russell, L.D. (1999). *Electron Microscopy: principles and techniques for biologists*. Pp. 16-47. Jones and Bartlett Publishers, England.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C.E. and Vernon-Carter, E.J. (2010a). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology* 101, 5862-5867.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Ávila, V.M. and Vernon-Carter, E.J. (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston). I. Via cotyledonary nodes. *in vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43, 260-266.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Estrada-Zúñiga, M.E., Barrera Díaz, C.E., Vernon-Carter, E.J. and Cruz-Sosa, F. (2010). *in vitro* lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 1-9.
- Burbulis, N. and Blinstrubiené, A. (2011). Genotypic and exogenous factors affecting linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *Journal of Food Agriculture and Environment* 9, 364-367.
- Calabrese, E.J., Bachmann, K.A., Bailer A.J., Bolger, P.M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M.G., Chiueh, C.C. and Clarkson, T.W. (2007) Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222, 122-128.
- Capataz-Tafur, J., Hernández-Sánchez, A.M., Rodríguez-Monroy, M., Trejo-Tapia, G. and Sepúlveda-Jiménez, G. (2010). Sucrose induces arabinogalactan protein secretion by *Beta vulgaris* L. cell suspension cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* 32, 757-764.
- Couselo, J.L., Corredoira, E, Vieitez, A.M. and Ballester, A. (2012) Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. *Methods in Molecular Biology* 877, 247-63.
- Doran, P.M. (2009). Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 60-76.
- Geebelen, W., Vangronsveld, J., Adriano, D.C., Van Poucke, L.C. and Clijsters, H. (2002). Effects of Pb-EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 115, 377-384.
- He, P.P., Lv, X.Z. and Wang, G.Y. (2004). Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. *Environment International* 30, 167-172.
- Hu, R., Sun, K., Su, X., Pan, Y.X., Zhang, Y.F. and Wang, X.P. (2012). Physiological responses and tolerance mechanisms to Pb in two xerophils: *Salsola passerine* Bunge and *Chenopodium album* L. *Journal of Hazardous Materials* 205-206, 131-138.
- Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Khan, M.A., Mahmood, Q., Hayat, Y. and Imtiaz, M. (2011). Effect of Pb toxicity on the growth and physiology of two ecotypes of *Elsholtzia argyi* and its alleviation by Zn. *Environmental Toxicology* 26, 403-416.
- Izquierdo, J.F., Cunill, F., Tejero, J., Iborra, M. and Fité, C. (2004). *Cinética de las reacciones químicas*. Ediciones Universitat de Barcelona, España.
- Jiang, W. and Liu, D. (2010). Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biology* 10, 40.
- Klein, M.A., Sekimoto, H., Milner, M.J. and Kochian, L.V. (2008). Investigation of heavy metal hyperaccumulation at the cellular level: development and characterization of *Thlaspi caerulescens* suspension cell lines. *Plant Physiology* 147, 2006-2016.

- Liu, D. and Kottke, I. (2003). Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI. *Cell Biology and Toxicology* 19, 299-311.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Muschitz, A., Faugeron, C. and Morvan, H. (2009). Response of cultured tomato cells subjected to excess zinc: role of cell wall in zinc compartmentation. *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 1197-1204
- Nandwani, D. and Ramawat, K.G. (1992). High frequency plantlets regeneration from seedling explants of *Prosopis tamarugo*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 29, 173-178.
- Nandwani, D. and Ramawat, K.G. (1991). Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Indian Journal of Experimental Biology* 29, 523-527.
- Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L. and Murphy, A.S. (2006) Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In: *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. Topics in Current Genetics Vol. 14*, (M.J. Tamás and E. Martinoia, eds.), Pp. 299-340. Springer-Verlag, Berlin.
- Reid, R. and Hayes, J. (2003). Mechanisms and control of nutrient uptake in plants. *International Review of Cytology* 229, 73-114.
- Sarma, H. (2001). Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology* 4, 118-138.
- Sharma, D.C., Chatterjee, C. and Sharma, C.P. (1995). Chromium accumulation and its effects on wheat (*Triticum aestivum* L. cv. HD 2204) metabolism. *Plant Science* 111, 145-151.
- Trejo-Espino, J.L., Rodríguez-Monroy, M., Vernon-Carter, E.J. and Cruz-Sosa, F. (2011). Establishment and characterization of *Prosopis laevigata* (Humb.& Bonpl.exWilld) M.C. Johnst. cell suspension culture: a biotechnology approach for mesquite gum production. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 1687-1695.
- Tsuji, N., Hirayanagi, N., Okada, M., Miyasaka, H., Hirata, K., Zenk, M.H. and Miyamoto, K. (2002). Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochememical and Biophysical Research Communications* 293, 653-659.
- Zheng, L., Peer, T., Seybold, V. and Lütz-Meindl, U. (2012). Pb-induced ultrastructural alterations and subcellular localization of Pb in two species of *Lespedeza* by TEM-coupled electron energy loss spectroscopy. *Environmental and Experimental Botany* 77, 196-206.