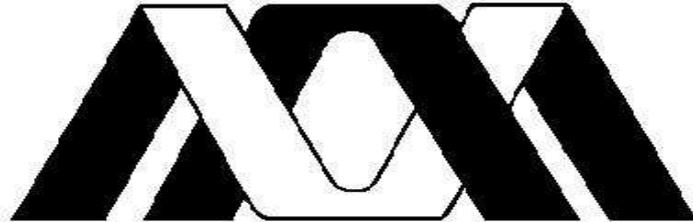


UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

Tolerancia a metales en cultivos celulares de *Buddleja cordata* (tepozán)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

MIREYA MARTÍNEZ LEGARIA

Co- Directores de tesis

Dr. Francisco Cruz Sosa

Dra. Leticia Buendía González

Mexico, D.F.

Noviembre del 2010

26 de Noviembre del 2010

El Jurado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación idónea de los resultados

“Tolerancia a metales en cultivos celulares de *Buddleja cordata* (tepozán)”

Que presentó la alumna: Mireya Martínez Legaria

Co-dirección: Dr. Francisco Cruz sosa



Dra. Leticia Buendía González



Lector: Dra. Ma. Elena Estrada Zúñiga



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Cruz Sosa por haberme apoyado y brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Agradezco especialmente a la Dra. Ma. Elena Estrada Zúñiga, por su apoyo permanente, perseverancia, paciencia y comprensión para la realización del proyecto.

A la Dra. Leticia Buendía González por sus valorables sugerencias para la realización de este proyecto.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio R-003, que siempre me han apoyado y me han impulsan a salir adelante.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa que me brindó la oportunidad de realizar mis estudios de la Especialidad en Biotecnología.

Con mucho amor y cariño le dedico todo mi esfuerzo y trabajo a mi mamá Noemí Priscila Legaria Solano.

A Miriam Gonzales Torres, Francisco Carbajal y Jorge Alberto Luna Ponce, mis mejores amigos, gracias por su apoyo, sus consejos y por enseñarme a nunca darme por vencida.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	v
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Contaminación ambiental por metales y sus efectos sobre la salud del ser humano.....	2
1.1.1 Manganeso (Mn).....	3
1.1.2 Cinc (Zn).....	4
1.1.3 Níquel (Ni).....	4
1.1.4 Cobre (Cu).....	5
1.1.5 Magnesio (Mg).....	6
1.1.6 Hierro (Fe).....	7
1.2 Nutrición mineral en plantas.....	7
1.2.1 Mecanismos de transporte y detoxificación a metales.....	8
1.2.2 Metabolitos secundarios.....	10
1.3 Fitorremediación.....	13
1.4 Biotecnología.....	16
1.4.1 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	16
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Género <i>Buddleja</i>	17
2.1.1 <i>Buddleja cordata</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS.....	20

	Pág.
5. OBJETIVOS.....	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos particulares.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1 Establecimiento de cultivos de células en suspensión y condiciones de incubación	21
6.2 Tolerancia a Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ y Mn ²⁺	21
6.2.1 Determinación de peso seco y viabilidad celular.....	22
6.2.2 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	22
6.2.3 Determinación de azúcares totales y pH.....	23
6.3 Análisis Estadístico.....	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
7.1 Crecimiento y tolerancia a los metales por cultivos de células en suspensión de <i>B. cordata</i>	23
7.2 Producción de fenoles totales a la presencia del metal	30
8. CONCLUSIONES.....	32
9. PERSPECTIVAS.....	32
10. BIBLIOGRAFÍA.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Tolerancia a metales por <i>B. cordata</i> y otras especies.....	30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Umbral de metales permisibles en plantas y suelo	3
Cuadro 2 Elementos químicos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas: macronutrientes y micronutrientes.....	8
Cuadro 3 Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	14
Cuadro 4 Tipos de fitorremediación.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1 Mecanismos de transporte y detoxificación de las células vegetales frente a metales pesados	9
Fig. 2 Rutas de biosíntesis de fenoles.....	10
Fig. 3 Estructura química del alcaloide reticulina y compuestos derivados...	11
Fig. 4 Rutas de biosíntesis de terpenos y su clasificación.....	12
Fig. 5 Fenograma por el método de agrupamiento (UPGMA) para 41 especies del género <i>Buddleja</i>	18
Fig. 6 Morfología y distribución geográfica de <i>Buddleja cordata</i>	19
Fig. 7 Filtrado al vacío de cultivo de células en suspensión de <i>Buddleja cordata</i> después de 18 días de incubación.....	22
Fig.8 Características de la biomasa obtenida de los tratamientos con metales que afectaron el crecimiento.	24

ÍNDICE DE GRAFICOS

		Pág.
Grafico 1	Biomasa de cultivos en suspensión de <i>B. cordata</i> después de 18 días de exposición a metales.....	25
Grafico 2	Índice de tolerancia de cultivos en suspensión de <i>B. cordata</i> después de 18 días de exposición a metales.....	26
Grafico 3	Viabilidad de células en suspensión de <i>B. cordata cordata</i> tratadas con metales.....	27
Grafico 4	Valores de pH del medio de cultivo residual de cultivos de <i>B. cordata</i> tratados con metales.....	28
Grafico 5	Contenido de azúcares totales del medio de cultivo residual de cultivos de <i>B. cordata</i> tratados con metales.....	29
Grafico 6	Producción de fenoles totales de cultivos de <i>B. cordata</i> tratados con metales.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ANA	Ácido naftalenacético
AO	Ácidos orgánicos
AT	Contenido de azucares totales
2,4-D	Ácido 2,4-diclofenoxiacético
FQ	Fitoquelatinas
FT	Fenoles totales
IT	Índice de tolerancia
KIN	6 furfuril aminopurina ó Cinetina
Me	Metales pesados
Ox	Oxigenasa
PS	Peso seco
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
VC	Viabilidad celular

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos por metales es un problema que se ha incrementado durante las últimas décadas debido principalmente a la creciente actividad antropogénica, cuyo efecto genera serios problemas de salud al ser humano (Tsao, 2003). Dicha contaminación no sólo afecta la salud del ser humano, sino también genera condiciones de estrés a las plantas las cuales en última instancia le pueden amenazar su supervivencia (Buchanan y col. 2000). Las plantas requieren de nutrientes minerales esenciales, incluyendo los metales, para su crecimiento y desarrollo, los cuales son adquiridos del suelo por el sistema radicular y luego transportados al resto de la planta vía xilema. Sin embargo, la entrada excesiva de metales por estar éstos contenidos en el suelo, puede ocurrir durante la deficiencia de los minerales esenciales o por causa zonas altamente contaminadas (Tsao, 2003). No obstante, existen algunas plantas que pueden crecer y desarrollarse bajo altas concentraciones de metales. Por tanto el uso de dichas plantas para la restauración de suelos representa una tecnología (fitoremediación) que es amigable, sencilla y de bajo costo. Uno de los acometidos de la fitoremediación es la búsqueda de plantas capaces de crecer y acumular altas concentraciones de metales por lo que durante los últimos la investigación en este campo ha tomado una gran relevancia (Pilon-Smits, 2005). El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una técnica que ha contribuido de manera significativa en dicho sentido a través de la elucidación de los procesos involucrados en la capacidad de la planta para tolerar y acumular metales (Doran, 2009). Además, la presencia de altas concentraciones de metal induce estrés oxidativo, y ante dicho estrés, como mecanismo de defensa de la planta, se induce la producción de metabolitos secundarios como lo son los alcaloides, los terpenos y los fenoles (Buchanan y col., 2000). Este mecanismo ha sido explotado por el CTV con la finalidad incrementar la productividad de metabolitos secundarios de gran interés para la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética (Bourgaud y col., 2001). *Buddleja cordata* es una planta ampliamente distribuida en el territorio de México con particular distribución en zonas perturbadas, tal como zonas contaminadas con metales cuya producción de fenoles ha sido asociada a la movilización de metales (Quiroz y col., 2007). Existe un reporte sobre la producción de fenoles en cultivos de células en suspensión (CCS) de *B. cordata* (Estrada-Zúñiga y col., 2009), por lo que dicho sistema fue empleado como modelo para evaluar la tolerancia y la elicitación de fenoles por CCS crecidas bajo altas concentraciones de metales.

1.1 Contaminación ambiental por metales y sus efectos sobre la salud del ser humano

Un metal es un elemento químico que se caracteriza por tener una estructura compacta, un brillo metálico, y por poseer un peso específico generalmente elevado. Químicamente los metales se combinan con oxígeno para dar óxidos que, al reaccionar con agua se convierten en hidróxidos o bases. Algunos metales son esenciales para la nutrición del ser humano, así también son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Morgan, 2003). No obstante, la contaminación del agua, aire y suelo por metales esenciales y no esenciales es uno de los problemas ambientales más severos (Acosta y col., 2007). En México, como consecuencia del desarrollo industrial, la contaminación ambiental ha ido en aumento, sobre todo por la intensa explotación petrolera y por la actividad minera. La industria minera es una de las actividades económicas de mayor tradición en el país, la cual es mayoritariamente metálica y se dedica principalmente a la producción de cobre (Cu), cinc (Zn), manganeso (Mn), magnesio (Mg), níquel (Ni), plata (Ag) y plomo (Pb). Esta actividad tiene un alto impacto ambiental, ya que produce desechos que incluyen una variedad de productos químicos como los metales pesados y compuestos orgánicos, entre otros, afectando desde el subsuelo hasta la atmósfera, incluyendo suelos y cuerpos de agua (Volesky, 2004). Dicha situación referente a contaminación por metales provoca primeramente severos daños a las plantas, así mismo provoca severos efectos nocivos sobre la salud al ser humano ante un la exposición, contacto y consumo frecuente de metales. Por lo que desde 1970, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha estado trabajando por un ambiente más limpio y más saludable; trabaja para desarrollar y hacer cumplir regulaciones que implantan leyes ambientales establecidas por el Congreso. La EPA es responsable por investigar y establecer estándares nacionales para una variedad de programas ambientales, y delegar a estados y tribus las responsabilidades para otorgar permisos, supervisar y hacer cumplir los acatamientos de los estándares permisibles en suelos y plantas (Cuadro 1), la EPA puede emitir sanciones y tomar otras medidas para alcanzar los niveles deseados de calidad ambiental.

Cuadro 1 Umbral de metales permisibles en plantas y suelo (EPA, 2003)

Elemento	Plantas mg/kg	Suelo mg/kg
Cr ²⁺	0.03-10	100
Cu ²⁺	0.03-10	40-50
Fe ²⁺	70-700	-----
Mn ²⁺	20-700	500
Mg ²⁺	-----	-----
Ni ²⁺	1-5	1,600
Zn ²⁺	20-400	200

1.1.1 Manganeseo (Mn)

El manganeso es un elemento que se encuentra en la mayoría de los suelos a concentraciones que incluyen niveles de 40 hasta 900 ppm, con un promedio de 330 ppm. Además, este elemento se encuentra de manera natural en muchos tipos de rocas, no tiene olor ni sabor, en su estado puro es un metal de color plateado, puede cambiar de un compuesto a otro, no se degrada ni desaparece del ambiente. Las rocas con altas concentraciones de compuestos de manganeso se minan y usan para producir manganeso metálico. El manganeso metálico se mezcla con hierro para manufacturar varios tipos de aceros. Algunos compuestos de manganeso se usan en la producción de baterías, suplementos dietéticos, y como ingredientes en ciertas cerámicas, plaguicidas y abonos. Las fuentes de manganeso en el aire incluyen plantas que producen hierro y acero (ATSDR, 2008).

El cuerpo humano contiene pequeñas cantidades de manganeso pues es esencial para la nutrición; La concentración normal de manganeso en la sangre varía entre 4 y 14 µg/L, 0.97 a 1.07 µg/L en la orina y 0.15 a 2.65 µg/L. Debido a que el exceso de manganeso generalmente es eliminado del cuerpo en unos pocos días, es difícil medir su exposición si ha pasado mucho tiempo. No obstante, altos niveles de polvo en la industria del acero provocan a los mineros alteraciones mentales y en dosis altas puede llegar a ocasionar daño cerebral permanente, y también puede dañar los testículos. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha determinado que el manganeso no es clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos. Además, la EPA reporta que los niveles

adecuados de manganeso en el agua potable no deben exceder la concentración de 0.05 ppm. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha establecido el mismo nivel (≤ 0.05 ppm) para agua embotellada. La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de 5 mg/m^3 para la cantidad promedio de manganeso en el aire del trabajo durante una jornada de 8 horas diarias (ATSDR, 2008).

1.1.2 Cinc (Zn)

Uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre es el cinc. Se encuentra en el aire, el suelo y el agua, y está presente en la mayoría de los alimentos. El cinc en su estado de pureza es un metal brillante blanco-azulado. El cinc tiene muchos usos comerciales como revestimiento para prevenir corrosión, en compartimientos de baterías secas y mezclado con otros metales es utilizado para fabricar aleaciones como el latón y bronce. Una aleación de cinc y cobre se usa para fabricar las monedas de un centavo en los Estados Unidos. Algunos compuestos comunes de cinc que se encuentran en sitios de desechos peligrosos incluyen al cloruro de cinc, óxido de cinc, sulfato de cinc y sulfuro de cinc. Los compuestos de cinc son ampliamente usados en la industria para fabricar pinturas, caucho y preservativos entre otros (ATSDR, 2005a).

Aunque es un elemento esencial para el ser humano, en grandes cantidades puede causar calambres estomacales, náusea y vómitos, en periodos más prolongados pueden causar anemia y disminución de los niveles del tipo de colesterol que es beneficioso. La inhalación de grandes cantidades de polvos o vapores de cinc puede producir una enfermedad de corta duración llamada fiebre de vapores de metal. No se tienen datos de cuáles serían los efectos a largo plazo de respirar altos niveles de cinc. La EPA recomienda que el agua potable no exceda los 5 miligramos de cinc por litro de agua (5 mg/L). La OSHA ha establecido un límite de 1 miligramo por metro cúbico de aire (1 mg/m^3) para vapores de cloruro de cinc y de 5 mg/m^3 para óxido de cinc (polvos o vapores) en el aire de trabajo; se recomiendan jornadas de trabajo de 8 horas diarias y 40 horas a la semana (ATSDR, 2005a).

1.1.3 Níquel (Ni)

El níquel se encuentra en todos los suelos y es liberado por emisiones volcánicas; también se encuentra en meteoritos. Se combina con otros elementos, como por ejemplo

cloro, azufre y oxígeno para formar compuestos de níquel que se usan en niquelado, para colorear cerámicas, para fabricar baterías y como catalizadores, éstos últimos son sustancias que aceleran las reacciones químicas. El níquel y sus compuestos no tienen olor ni sabor característicos. En su estado puro, éste es un metal duro, blanco-plateado que puede combinarse con otros metales, tales como el hierro, cobre, cromo y cinc para formar aleaciones. Estas aleaciones se usan para fabricar monedas, joyas, y artículos tales como válvulas e intercambiadores de calor. La mayor parte del níquel se usa para fabricar acero inoxidable (ATSDR, 2005b).

El níquel es indispensable para el funcionamiento del páncreas en el ser humano, pero el efecto adverso más común de la exposición al níquel en seres humanos es una reacción alérgica. No obstante, se ha reportado que los trabajadores de refinerías de níquel o plantas que procesan níquel han desarrollado bronquitis crónica, alteraciones del pulmón, dolores de estómago y efectos adversos en la sangre y los riñones. (SSPAST, 2005). Los niveles permisibles de la EPA para el agua potable son 0.1 miligramos de níquel por litro de agua (0.1 mg/L). La OSHA ha establecido un límite de 1 miligramo de níquel por metro cúbico de aire (1 mg/m³) para níquel metálico y compuestos de níquel en el aire del trabajo durante jornadas de 8 horas diarias, 40 horas a la semana. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y La Agencia de Protección Ambiental (EPA) han determinado que algunos compuestos de níquel son carcinogénicos en seres humanos (ATSDR, 2005b).

1.1.4 Cobre (Cu)

El cobre es un metal que se encuentra en rocas, el suelo, el agua y el aire. Se usa para fabricar muchos productos diferentes, como por ejemplo, alambres, cañerías y láminas de metal. Las monedas de 1 centavo de EE. UU. fabricadas antes del año 1982 son hechas de cobre. El cobre también se combina con otros metales para fabricar cañerías y grifos de latón y bronce. Los compuestos de cobre son usados comúnmente en la agricultura para tratar enfermedades de las plantas, como el moho, para tratar agua, y como preservativos para alimentos, cueros y telas (ATSDR, 2004).

El cobre es un elemento esencial para seres humanos y la inhalación de niveles altos de cobre puede producir irritación de la nariz y la garganta. La ingestión de niveles altos de cobre puede producir náusea, vómitos y diarrea. Cantidades muy altas de cobre pueden dañar el hígado y los riñones y pueden aun causar la muerte. La EPA plantea que el agua

potable no contenga más de 1.3 miligramos de cobre por litro de agua (1.3 mg/L). El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MGAP) de EE. UU. recomienda una dosis diaria de 900 microgramos de cobre (900 µg/día) para personas mayores de 80 años de edad. La OSHA ha establecido un límite para vapores de cobre en el aire de 0.1 miligramos por metro cúbico (0.1 mg/m³) y 1 mg/m³ para polvos de cobre (ATSDR, 2004).

1.1.5 Magnesio (Mg)

El magnesio es esencial para el funcionamiento del cuerpo humano participa en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas que afectan al crecimiento y desarrollo. Es el cuarto mineral más abundante y constituye aproximadamente el 0.05% del peso corporal. Se encuentra en los huesos, dientes, músculos, tejidos del cerebro y corazón, además está presente en el tejido extracelular, pues es el promotor de cientos de reacciones bioquímicas involucradas en la producción de energía (ATP) y la activación de enzimas ATP-dependientes, quienes llevan a cabo reacciones importantes en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas y la síntesis de ADN. Algunos ejemplos de las enzimas de Mg activa incluyen ATPasas, ribulosa- 1,5-bisfosfato (RuBP) carboxilasa, la RNA polimerasa y las proteínas quinasas (Marschner, 1995; Shaul, 2002). El cuerpo puede absorber el 25% a 75% de magnesio en la dieta, dependiendo de las necesidades del cuerpo y hábitos alimentarios. Los síntomas por toxicidad incluyen debilidad muscular, fatiga, somnolencia o hiper excitabilidad, debido a la depresión del sistema nervioso central. Además, puede haber dificultad para respirar y presión arterial muy baja e irregular, en estados extremos esto puede causar la muerte (CFNI, 2005).

El magnesio juega un papel clave en la fotosíntesis. Actividad de muchas enzimas clave implicadas en el carbono fotosintético el metabolismo se ve muy afectada por las variaciones pequeñas en Mg concentración. Varios informes han demostrado que el Mg deficiencia en los resultados de las hojas en una marcada reducción de tasa de fotosíntesis (Fischer y Bremer, 1993; Hermans y col., 2004; Peaslee y Moss, 1966; Sun y Payn, 1999).

1.1.6 Fierro (Fe)

El hierro en exceso es tóxico. El hierro reacciona con peróxido y produce radicales libres. La dosis letal de hierro en un niño de 2 años es de unos 3 g. 1 g puede provocar un envenenamiento importante. El hierro en exceso se acumula en el hígado y provoca daños en este órgano. La inhalación crónica de concentraciones excesivas de vapores o polvos de óxido de hierro puede resultar en el desarrollo de una neumoconiosis. El óxido de hierro es un cristal negro o polvo marrón rojizo. Se usa en compuestos pulidores, pigmentos y en metalurgia. El humo del óxido de hierro se produce cuando los materiales que contienen hierro se calientan, como en las soldaduras con arco. El óxido ferroso (FeO) puede formarse en atmósferas con niveles limitados de oxígeno, en el gas de combustión y en la purificación del gas de hulla. El óxido de hierro (gastado) o el hierro esponjoso se produce cuando se calienta el mineral de hierro por debajo del punto de fusión del hierro. Con más procesamiento, puede convertirse en hierro pudelado (Barba, 1991)

1.2 Nutrición mineral en plantas

Las plantas requieren para su crecimiento y desarrollo de nutrientes minerales esenciales tales como el nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), fosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} o PO_4^{3-}), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), sulfato (SO_4^{2-}), fierro (Fe^{2+} o Fe^{3+}), cloro (Cl^-), Zinc (Zn^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), cobre (Cu^+ o Cu^{2+}), borato (BO_3^{3-} o $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$) y molibdato (MoO_4^{2-}). Dichos minerales se clasifican en dos grupos de acuerdo a la concentración requerida por la planta (Cuadro 2), siendo éstos adquiridos del suelo por el sistema radicular y luego transportados al resto de la planta vía xilema (Tsao, 2003). No obstante, algunos metales no sólo son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino también son importantes para su defensa ante el ataque de agentes patógenos (Morgan, 2003).

Cuadro 2 Elementos químicos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas:
macronutrientes y micronutrientes

Macronutrientes	Materia seca
• Nitrógeno (N)	C -----48.6%
• Fósforo (P)	O-----21.6%
• Potasio (K)	N-----0.84%
• Calcio (Ca)	K-----0.18%
• Magnesio (Mg)	Mg-----0.05%
• Azufre (S)	P-----0.05 %
	S-----0.04%
	Fe-----0.01%
	Otros -----0.07%
Micronutrientes	
• Hierro (Fe)	
• Zinc (Zn)	
• Manganeso (Mn)	
• Boro (B)	
• Cobre (Cu)	
• Molibdeno (Mo)	
• Cloro (Cl)	

1.2.1 Mecanismos de transporte y detoxificación a metales

El incremento de la actividad antropogénica ha propiciado que existan diversas zonas altamente contaminadas por metales, provocando en las plantas cambios en el metabolismo celular; eventos de señalización son desencadenados para activar y/o sobreexpresar de mecanismos de reparación de macromoléculas dañadas, los cuales pueden conducir a la adaptación y sobrevivencia (Sharma y Karl-Josef, 2008). Avances significativos en el estudio sobre la medición de tolerancia a altas concentraciones de metales por algunas especies, incluyendo plantas transgénicas, han asociado la capacidad de acumular metales a la sobreexpresión de péptidos, fitoquelatinas o ácidos orgánicos quelantes del metal y su compartimentalización (Sharma y Karl-Josef, 2008; Pilon-Smits, 2005). La fitotoxicidad de metales se atribuye a tres causas principales: (I) la interacción directa con las proteínas debido a su afinidad por grupos histidil y carboxilo, alterando así las funciones de la proteína; (II) la generación estimulada de especies reactivas del oxígeno (ROS) que provocan estrés oxidativo y modifican la defensa antioxidante (enzimática y no enzimática) (Sharma y Karl-Josef, 2008).

El mecanismo de transporte y detoxificación de las células vegetales frente a metales implica (Fig. 1): (a) Inmovilización de metales en la pared celular y membrana plasmática (plasmalema); por acción de pectinas, proteínas, aminoácidos y otros componentes, (b) Transporte activo de metales (re-exportación) por proteínas acarreadoras específicos a nivel de membrana, (c) Ingreso por pared (apoplasto) y membrana (simplasto) con posible formación de radicales libres en citosol, (d) Ingreso y fijación de metales pesados a fitoquelatinas (FQ) en el citosol formando compuestos quelados inocuos / fijación a polisacáridos y glicoproteínas en citosol / ingreso a vacuola, (e) Conversión e Ingreso de complejos de metal con FQ o ácidos orgánicos (AO, por ejemplo malato, succinato, citrato, etc.) y compartimentación en vacuola, (f) Fijación de metales pesados a glicoproteínas y polisacáridos en el citosol / ingreso a vacuola, (g) Fijación de metales pesados a ácidos carboxílicos (AO) directamente en el citosol / ingreso a vacuola, (h) Acción de sistemas de defensa antioxidante en pared / membrana (Zimmermann, 2001).

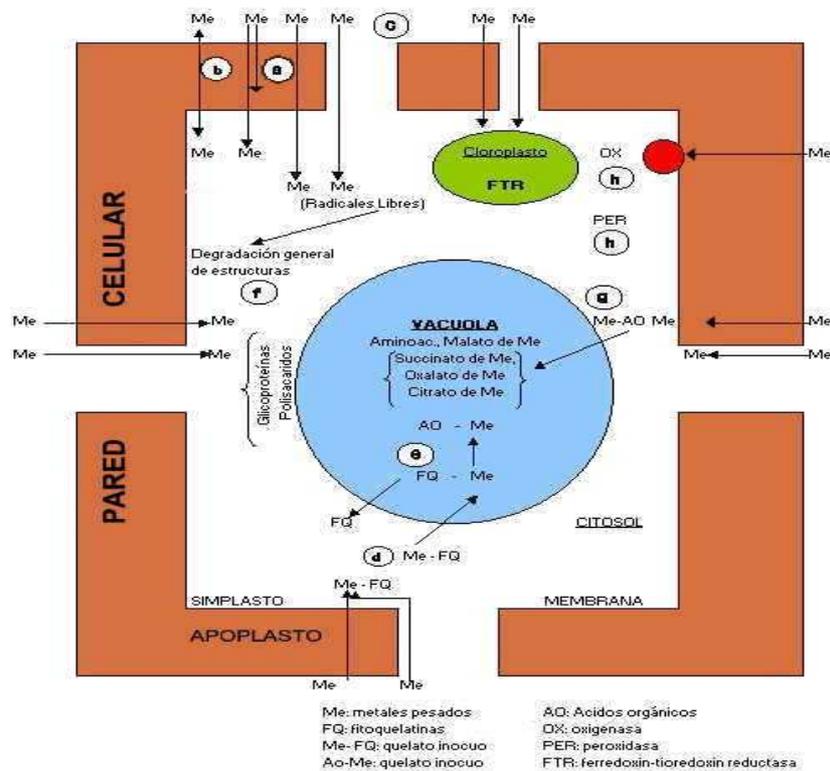


Fig. 1 Mecanismos de transporte y detoxificación de las células vegetales frente a metales pesados (Zimmermann, 2001)

1.2.2 Metabolitos secundarios

La mayor parte de las plantas vasculares, producen varios tipos de metabolitos secundarios para los cuales se ha demostrado que la mayoría de los metabolitos secundarios tienen una función protectora contra organismos patógenos o depredadores, entre otras funciones que le sirven a la planta para su interacción con el medio ambiente. Además, el metabolismo secundario se activa como mecanismo de defensa ante la exposición a metales pues estos provocan estrés oxidativo (Cronquist, 1995). Los metabolitos secundarios se clasifican de acuerdo a la ruta de biosíntesis en: a) fenoles, b) alcaloides y c) terpenos (Buchanan y col., 2000).

a) Fenoles: Compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, es decir un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional hidroxilo. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades de uniones redox, que pueden desempeñar un papel importante en la absorción y neutralización de los radicales libres (Javanmardia y col., 2003). Algunos compuestos fenólicos presentando dicha propiedad son: cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico (Fig. 2). (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

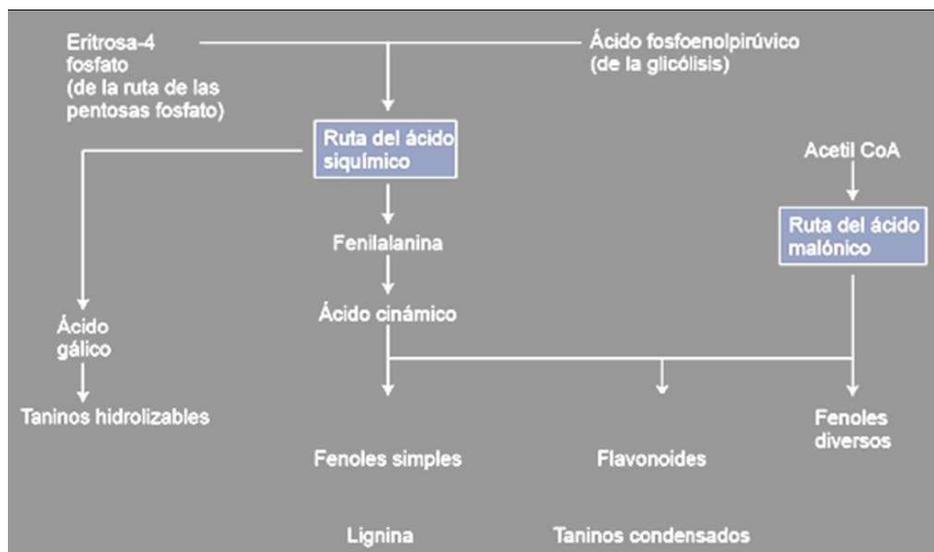


Fig. 2 Rutas de biosíntesis de fenoles

b) Alcaloides: son compuestos orgánicos cristalinos, insolubles y venenosos que se encuentran en algunas plantas. Contienen nitrógeno (Fig. 3) y aparecen generalmente como sales de ácidos (como el cítrico, el málico y el succínico). Algunos ejemplos importantes son la quinina, la nicotina, la atropina, el opio la morfina la codeína y la estrictina entre otros (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los alcaloides se sintetizan de diferentes rutas y de ahí que se clasifican en (Kegg pathway database):

1. Alcaloides derivados de ornitina
2. Alcaloides derivados de lisina
3. Alcaloides derivados de ácido nicotínico
4. Alcaloides derivados de tirosina
5. Alcaloides derivados de triptófano y ácido antranílico
6. Alcaloides derivados de histidina
7. Alcaloides derivados de reacciones de aminación
8. Otros

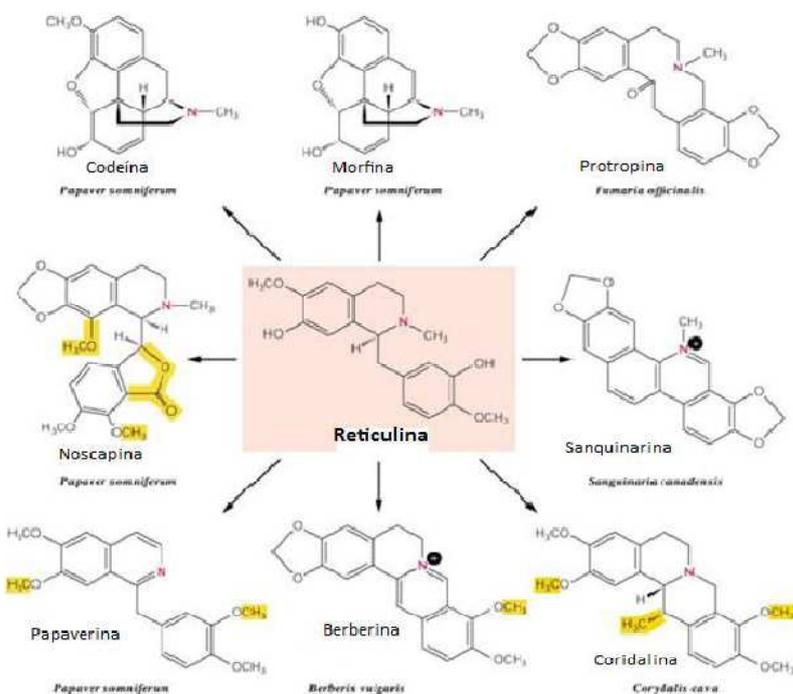


Fig. 3 Estructura química del alcaloide reticulina y compuestos derivados

C) Terpenos o terpenoides: son compuestos orgánicos que tienen como fundamental al isopreno (C_5H_8) y son derivados de dos rutas: a) del ácido mevalónico y b) del metileritritol fosfato (Fig. 4). Se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno en: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) (Fig. 4). Los terpenos de C_{10} - C_{20} se encuentran en los aceites esenciales y le dan su olor característico a algunas plantas. Algunas hormonas, pigmentos y vitaminas, como la “vitamina A” son compuestos del tipo terpeno que juegan un papel muy activo en el metabolismo de la planta (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

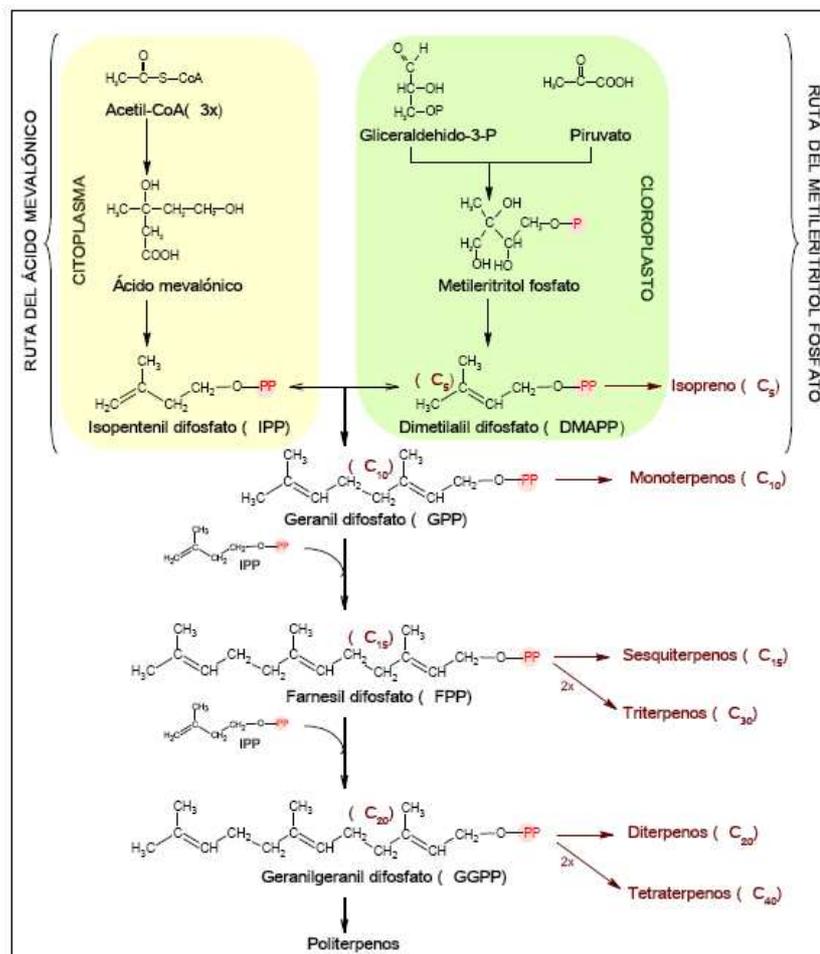


Fig. 4 Rutas de biosíntesis de terpenos y su clasificación

1.3 Fitorremediación

La fitoremediación es una tecnología que consiste en utilizar las plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos contaminados, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ* (Agudelo y col., 2005), por lo tanto es una tecnología que es amigable, sencilla y de bajo costo. La fitorremediación posee una serie de ventajas y desventajas (Cuadro 3). Está conformada de seis procesos básicos que representan los tipos de fitorremediación (Cuadro 4) a través de los cuales las plantas pueden contribuir a la recuperación de suelos, sedimentos y aguas contaminadas. Dichos procesos darán lugar a 1) la contención o a 2) la eliminación de los contaminantes; la fitoestabilización y la fitoinmovilización corresponden a procesos de contención, mientras que la fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización y rizofiltración representan procesos de eliminación (Cuadro 4) (Bernal y col., 2007). Una planta ideal con fines de fitorremediación de contaminantes inorgánicos, como lo son los metales, debe tener un crecimiento rápido con alta acumulación de biomasa, tolerar y acumular altas concentraciones de metales, translocar concentraciones altas de metal en sus partes aéreas y ser fácilmente cosechable (Pilon-Smits, 2005, Tsao, 2003). De acuerdo a la capacidad de remover altas concentraciones de determinado metal, las plantas pueden ser clasificadas en acumuladoras o hiperacumuladoras (Pilon-Smits, 2005). Esta tecnología explota la capacidad que algunas plantas han desarrollado para poseer mecanismos de tolerancia y detoxificación de contaminantes, los cuales involucran estrategias de:

- a) Exclusión: involucra un sistema de reflujo o liberación de metales desde el interior de la planta hasta el exterior, para evitar o minimizar la acumulación en sus tejidos.
- b) Redistribución y acumulación: es la distribución del metal alrededor de toda la planta a sus diferentes partes desde la raíz hasta sus partes aéreas.
- c) Mineralización: este proceso reduce la biodisponibilidad de los metales, y por tanto éstos no pueden ser absorbidos por la planta
- d) Reducción: implica la transformación de especies químicas altamente tóxicas a especies menos tóxicas
- e) Quelación: es la capacidad de una molécula para formar un complejo con un metal y así formar un nuevo compuesto con propiedades químicas diferentes del original. La quelación es un proceso homeostático en el que participan dos tipos de

moléculas: (1) moléculas transportadoras, encargadas de transferir iones específicos de metales a organelos particulares como las vacuolas, los cloroplastos y las mitocondrias que los requieran; y (2) los ligandos de alta afinidad como las fitoquelatinas, las metalotioneinas, los ácidos orgánicos, las proteínas de estrés térmico y los aminoácidos, los cuales contribuyen a la desintoxicación, a la vez que mantienen estable la concentración de iones de metales en el citosol (Clemens, 2001)

- f) Eliminación: involucra un sistema de reflujo o liberación de metales desde el interior de la planta hasta el exterior, para evitar o minimizar la acumulación en sus tejidos
- g) Solubilización: La solubilización está relacionada con la transformación del metal insoluble a una forma soluble, es decir, su transformación de una forma no asimilable a una asimilable (Núñez-López y col., 2004).

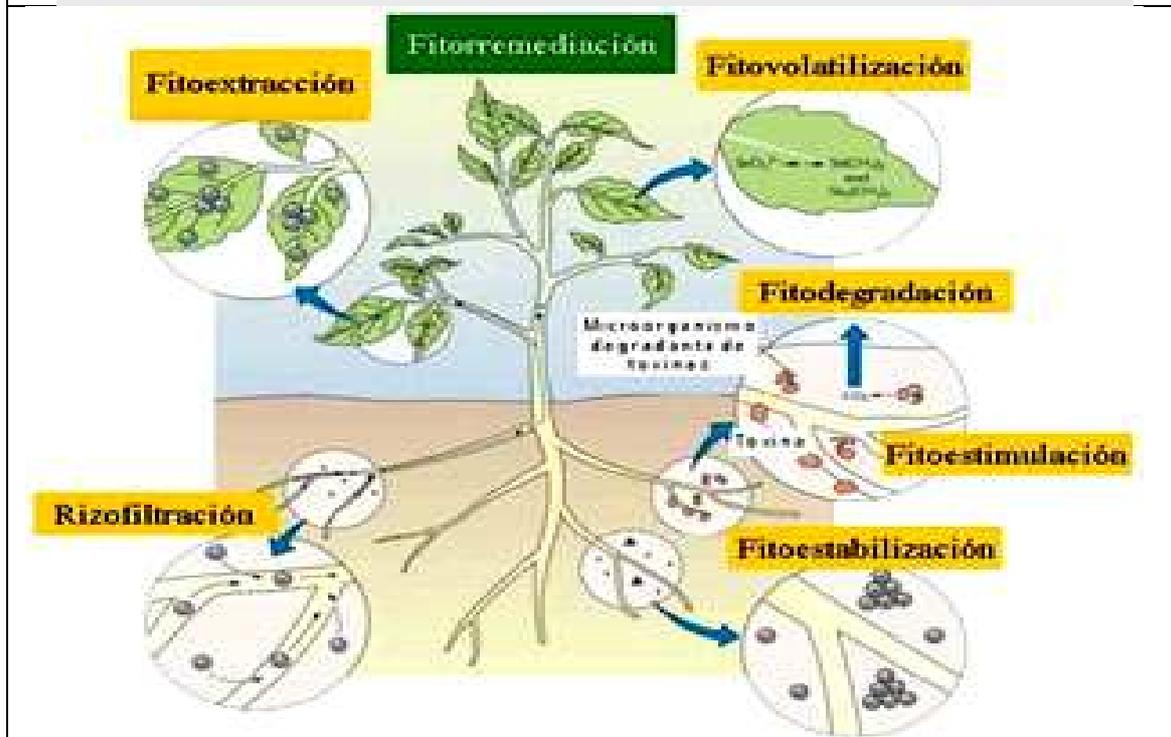
Cuadro 3 Ventajas y desventajas de la fitorremediación

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Es una tecnología sustentable • Es eficiente para tratar diversos tipos de contaminantes <i>in situ</i> • Es aplicable a ambientes con concentraciones de contaminantes de bajas a moderadas • Es de bajo costo, no requiere personal especializado para su manejo ni consumo de energía • Es poco perjudicial para el ambiente • No produce contaminantes secundarios y por lo mismo no hay necesidad de lugares para desecho • Tiene una alta probabilidad de ser aceptada por el público, ya que es estéticamente agradable • Evita la excavación y el tráfico pesado • Tiene una versatilidad potencial para tratar una gama diversa de materiales peligrosos • Se pueden reciclar recursos (agua, biomasa, metales) 	<ul style="list-style-type: none"> • Es un proceso relativamente lento (cuando las especies son de vida larga, como árboles o arbustos) • Es dependiente de las estaciones • El crecimiento de la vegetación puede estar limitado por extremos de la toxicidad ambiental • Los contaminantes acumulados en las hojas pueden ser liberados nuevamente al ambiente durante el otoño (especies perennes) • Los contaminantes pueden acumularse en maderas para combustión • No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras • La solubilidad de algunos contaminantes puede incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de contaminantes • Se requieren áreas relativamente grandes • Pudiera favorecer el desarrollo de mosquitos (en sistemas acuáticos)

(Polprasert, 1996; Brooks, 1998; Raskin y Ensley, 2000)

Cuadro 4 Tipos de fitorremediación.

Tipo	Proceso involucrado	Contaminación tratada
Fitoextracción	Las plantas se usan para concentrar metales en las partes cosechables (principalmente, la parte aérea).	Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Se^{2+} , Zn^{2+} .
Rizofiltración	Las raíces de las plantas se usan para absorber, precipitar y concentrar metales pesados a partir de efluentes líquidos contaminados.	Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Se^{2+} , Zn^{2+} .
Fitoestabilización	Las plantas tolerantes a metales se usan para reducir la movilidad de los mismos y evitar el pasaje a napas subterráneas o al aire. Contribuyen a estabilizar el suelo.	Lagunas de deshecho de yacimientos mineros. Propuesto para fenólicos y compuestos clorinados.
Fitoestimulación	Se usan los exudados radiculares para promover el desarrollo de microorganismos degradativos (bacterias y hongos).	Hidrocarburos poliaromáticos, benceno, tolueno, etil benceno, xileno, hidrocarburos del petróleo, perciorato, atrazina, ataclor, bifenilos policlorinados, otros compuestos orgánicos.
Fitovolatilización	Las plantas captan y modifican metales pesados o compuestos orgánicos y los liberan a la atmósfera con la transpiración.	Hg^{2+} , Se^{2+} y solventes clorinados (tetraclorometano y triclorometano).
Fitodegradación	Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos no tóxicos o menos tóxicos.	Explosivos (TNT, DNT, RDX, nitrobenzeno, ácido picrico, nitrotolueno, nitrometano, nitroetano). Atrazina, solventes clorinados, bromuro de metilo, tetrabromoetano, tetracloroetano, DDT, pesticidas fosfatados, bifenoles policlorinados, fenoles y nitritos.



(Tomado de McCutcheon, 1998)

1.4 Biotecnología

La biotecnología, es una ciencia interdisciplinaria que se puede definir como la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios. Por poseer un carácter multidisciplinario, la biotecnología implica el conocimiento de la Bioquímica, la Microbiología, la Genética, la Biología celular, la Química, la Ingeniería bioquímica, la Ingeniería mecánica, Ciencia y Tecnología de alimentos, la Electrónica, la Informática, entre otras (Smith, 1996). Una rama de la biotecnología de suma importancia es la Biotecnología Vegetal, cuya herramienta principal se fundamenta en la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales.

1.4.1 Cultivo de Tejidos Vegetales

Esta técnica consiste en cultivar bajo condiciones asépticas, nutricionales y fitohormonales y ambientales controladas una parte de una planta (comúnmente conocido como explante). Ésta se define como un conjunto de técnicas con las cuales se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo. De acuerdo al material vegetal usado, suele dividirse la técnica de cultivo en cinco clases: a) cultivo de callos, b) cultivo de células en suspensión, c) cultivo de órganos, d) cultivo de meristemas y morfogénesis para el propósito de propagación y e) cultivo de protoplasto (Gamborg y col., 1995). El cultivo de células, tejidos u órganos vegetales ha tomado significativa relevancia durante las últimas décadas no sólo por su amplia gama de aplicaciones sino también por ser un sistema controlable, de rápido crecimiento (comparado con el desarrollo de una planta completa), escalable y que evita la devastación de las poblaciones naturales de plantas (Bougard y col., 2001). Entre una de las aplicaciones se haya la producción de metabolitos secundarios, por lo que una creciente investigación para la optimización de las condiciones de cultivo está siendo efectuada a nivel mundial, como por ejemplo la elicitación de metabolitos secundarios con factores bióticos y abióticos. Existen reportes donde, a través de dicha creciente investigación, se ha logrado una producción mucho más alta en células cultivadas que en plantas intactas, tal es el caso de los ginsenósidos por *Panax ginseng*, ácido rosmarínico por *Coleus bluemei*, shikonina por *Lithospermum rythrorhizon*, ubiquinona-10 por *Nicotiana tabacum*, berberina por *Coptis japonica* (Mulabagal y Tsay, 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 Género *Buddleja*

El género *Buddleja*, a veces *Buddleia*, perteneciente a la familia Buddlejaceae, anteriormente conocida como Loganiaceae (homónima), comprende especies de arbustos ornamentales de hojas grises lanceoladas y flores panículas de color lila o amarillo, según las especies. Entre las especies más conocidas de este género están *B. davidii* Franch., *B. alternifolia* Maxim., *B. farreri* Balf, *B. globosa* Hope y *B. cordata* Kunth (Romero y Fernández, 1999). *Buddleja* tienen muy pocos caracteres únicos que los distinguen; sin embargo los caracteres cualitativos como características morfológicas que comprenden la forma de la hoja, el color de la flor o la pubescencia, y cuantitativos que son las características morfológicas que pueden ser contadas o medidas, ambos caracteres permiten diferenciar las especies en grupos (Fig. 5). En el grupo I se asocian las especies que presentan vasos anchos con diámetro mediano (34 a 66 μm), fibras con punteaduras semiareoladas cuyo diámetro es pequeño (8 a 15 μm) y longitud mediana (385 a 767 μm). El grupo II incluye 24 especies que se separan en dos subgrupos. En el subgrupo IIA se asocian 13 especies por la presencia de engrosamientos helicoidales, la ausencia de anillos de crecimiento evidentes en la mayoría de las especies y fibras más largas. En el subgrupo IIB se asocian 11 especies con base principalmente en las punteaduras simples en fibras y el parénquima axial raro o escaso (Romero y col., 2003). El 50% de los taxa de *Buddleja* crece en el continente Americano y México, existen aproximadamente 15 especies que se encuentran distribuidos ampliamente en la Republica Mexicana (Norman, 2000).

2.1.1 *Buddleja cordata*

Buddleja cordata Kunth, comúnmente conocida como “tepozán”, es una planta arbórea de 1 a 10 m de altura (Fig. 6A). Esta especie presenta hojas de color verde claro por arriba y blancas, grisáceas o lanudo-tomentosas en el envés, su longitud es de 10 a 15 cm, de base ancha generalmente redondeada, borde entero o aserrado, esparcidamente pubescentes en el haz (Fig. 6A). La corola es amarillenta, generalmente con un toque anaranjado en la garganta, sus flores son pequeñas, amarillas y aromáticas dispuestas en cabezuelas cortamente pedunculadas, agrupadas en amplias panículas terminales (Figura

6B) (Martínez, 1989). Frutos capsulares con dehiscencia loculicida y septicida o indehiscentes; semillas aladas, pequeñas de 1-1.5mm x 0.1mm y numerosas.

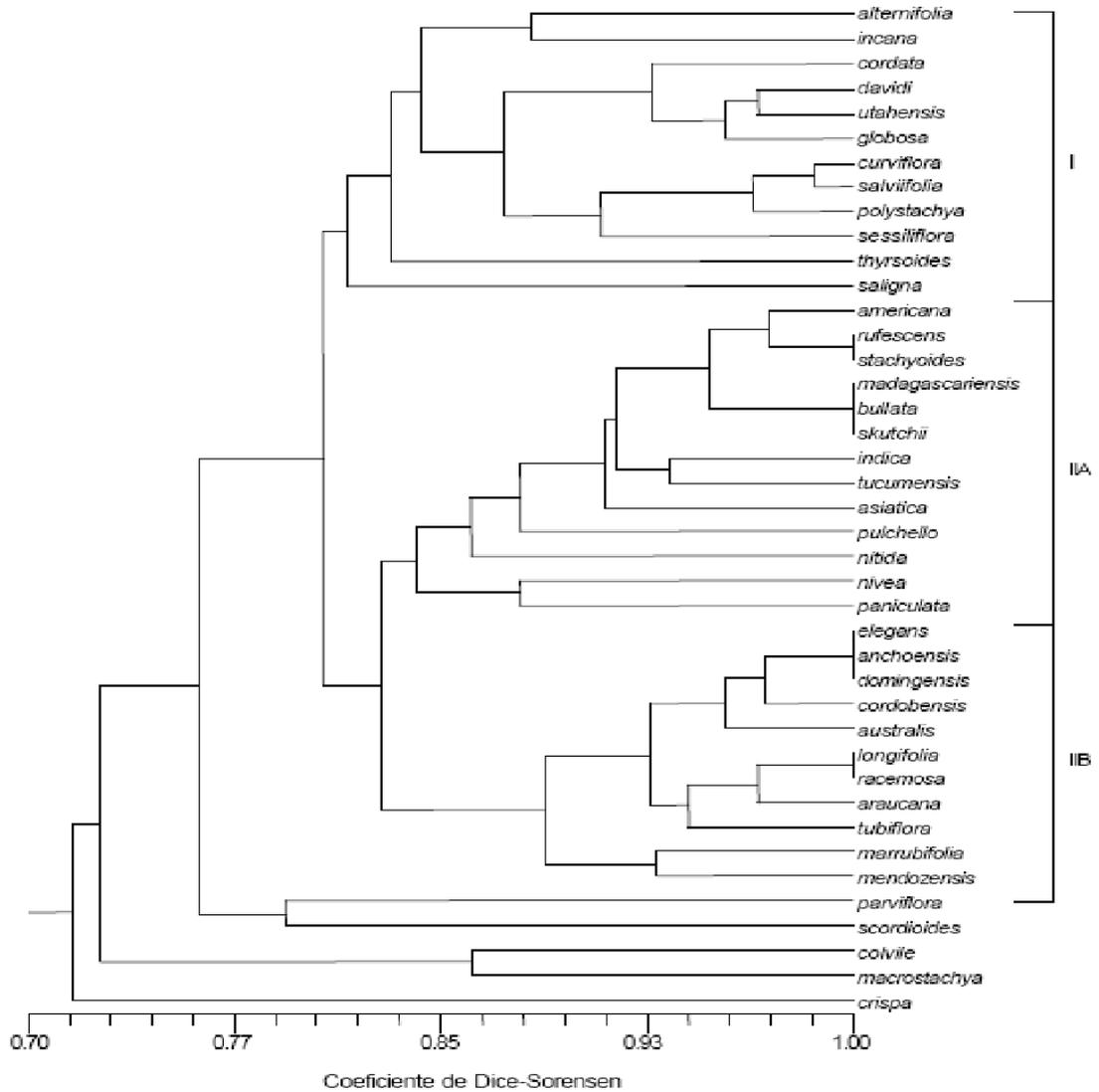


Fig. 5 Fenograma por el método de agrupamiento (UPGMA) para 41 especies del género *Buddleja*

En México la distribución territorial de *B. cordata* va de norte a sur: desde Chihuahua a Tamaulipas hacia el sur hasta Chiapas y Oaxaca (Fig. 6C), encontrándosele en lugares particularmente perturbados y secos, entre los 2 050 – 3 100 m sobre el nivel del mar

(msnm) (Aguilar-Rodríguez y col., 2006). En la medicina tradicional de México, *Buddleja cordata* tiene diversos usos; propiedad curativa que ha sido atribuida a compuestos fenólicos, los cuales son producidos en significativa concentración en cultivos *in vitro* de *B. cordata* (Estrada-Zúñiga y col., 2009). Quiroz y col. (2002) reportó que la producción de compuestos fenólicos por *B. cordata* favorece la movilización de metales pesados. Por lo que el cultivo de tejidos vegetales de *B. cordata* representa un sistema versátil para evaluar la tolerancia a metales pesados por la planta.

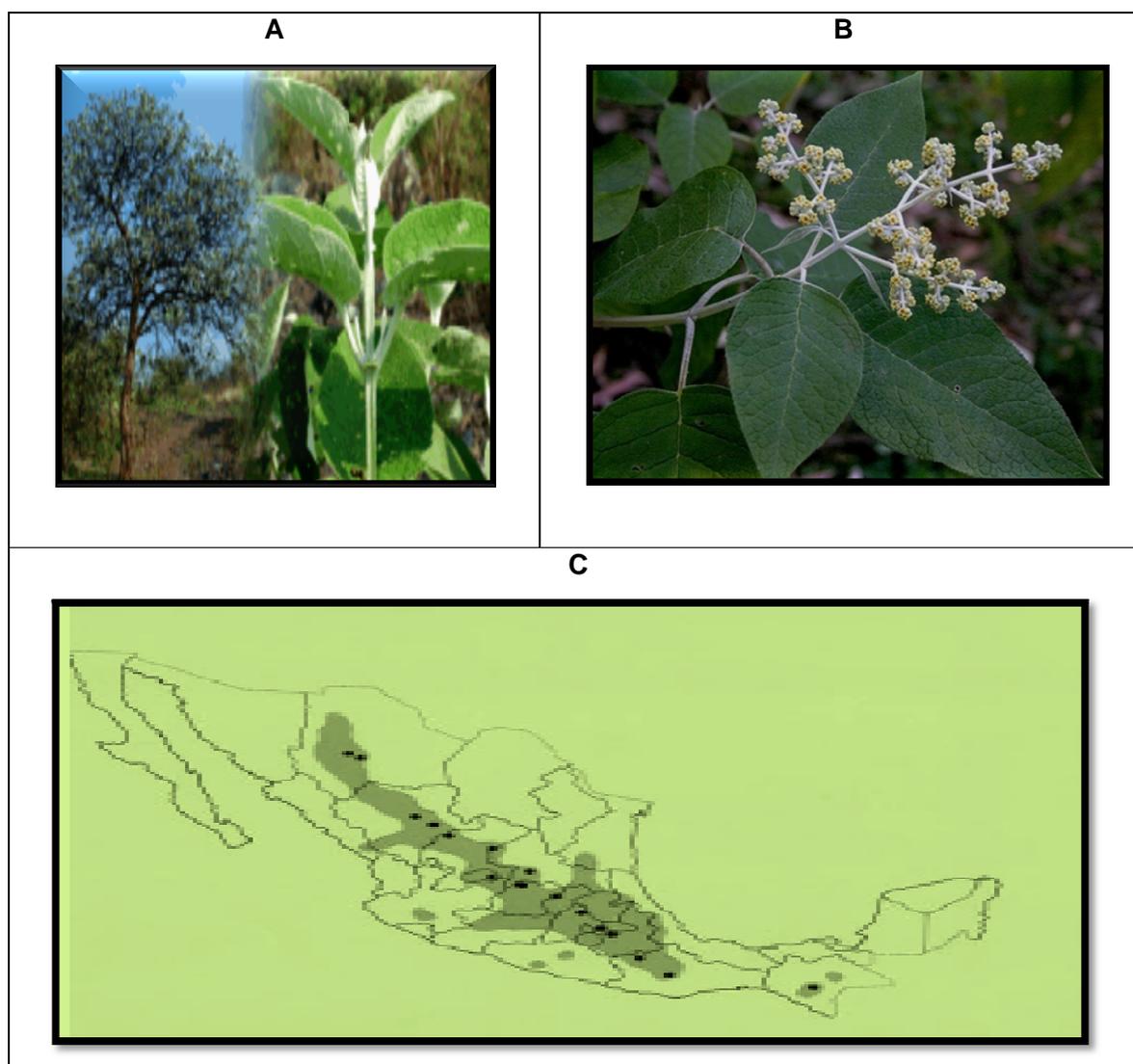


Fig. 6 Morfología y distribución geográfica de *Buddleja cordata*. **A, B** Ejemplares de planta con sus órganos **C** Distribución territorial en la Republica Mexicana

3. JUSTIFICACIÓN

La alta actividad antropogénica ha generado un panorama de suma preocupación en el sector ambiental, ya que se sabe que el medio ambiente está siendo alterado y sumamente contaminado. Uno de los principales contaminantes vertidos al medio ambiente y de efecto sumamente tóxico al ser humano son los metales, tales como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Por otro lado, se ha observado que *B. cordata* es capaz de crecer en zonas que contienen significativas concentraciones de metales, cuya movilidad de metales es asociada con compuestos fenólicos. Dichos compuestos han sido reportados ser producidos por cultivos de células en suspensión, por lo tanto este sistema puede representar un modelo de estudio sobre la capacidad de tolerancia y crecimiento de *B. cordata* ante altas concentraciones de metales.

4. HIPÓTESIS

Buddleja cordata tiene la capacidad de crecer en zonas perturbadas y remover metales, capacidad que es asociada a la producción de compuestos fenólicos, por lo tanto cultivos de células en suspensión productores de fenoles serán capaces de tolerar y crecer en medios suplementados con metales (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+}).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

- ❖ Evaluar la capacidad de cultivos celulares de *B. cordata* para tolerar concentraciones altas de los metales Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , suplementadas en el medio de cultivo.

5.2 Objetivos Particulares:

- ❖ Establecer cultivos de células en suspensión de *B. cordata*.
- ❖ Evaluar el efecto de los metales Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} sobre el crecimiento de células en suspensión de *B. cordata*.
- ❖ Evaluar el contenido de fenoles totales acumulados por efecto de los tratamientos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Establecimiento de cultivos de células en suspensión y condiciones de incubación

Para establecer los cultivos de células en suspensión, se inocularon 3 g de callo fresco en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo. El medio basal consistió de MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, conteniendo 30 g l⁻¹ de sacarosa, 100 y 150 mg l⁻¹ de ácido cítrico y ascórbico, respectivamente, y los reguladores de crecimiento vegetal 2,4-D y KIN a las concentraciones de 0.45 µM y 2.32 µM. Los matraces fueron incubados en un agitador orbital a 110 rpm, bajo un fotoperíodo de 16 h luz fluorescente a 25 ± 2°C. Una vez transcurridos 18 días de cultivo, se seleccionaron los matraces que presentaron mejor crecimiento y adaptación (no se observaron oxidados), tomándose 3 g (peso fresco) de biomasa para su subcultivo. Posteriormente, 6 g de biomasa fueron empleados para inocular matraces de 500 ml conteniendo 100 ml del mismo medio de cultivo descrito anteriormente, con la finalidad de propagar la biomasa, subcultivándolos cada 18 días durante 4 ciclos.

6.2 Tolerancia a Cu²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ y Mn²⁺

Se adicionó al medio de cultivo basal: 0.0325 y 0.065 mM de Cu²⁺ y Ni²⁺; 0.5 y 1.0 mM de Fe²⁺, 1.0 y 1.5 mM de Zn²⁺, y 1.0 y 2.0 mM de Mg²⁺ y Mn²⁺, y sus respectivos controles de SO₄²⁻. Las sales fuente de los metales y control fueron CuSO₄, NiSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, MgSO₄, MnSO₄ y (NH₄)₂SO₄, respectivamente. Matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo conteniendo los metales fueron inoculados con 3 g de biomasa fresca (proveniente de matraces de 500 ml con tiempo de cultivo de 18 días). Los cultivos se incubaron bajo un fotoperíodo de 16 h, 110 rpm y 25 ± 2°C durante 18 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las células fueron filtradas al vacío (Fig. 7), separándose la biomasa del medio de cultivo. La biomasa fue empleada para determinar peso seco (PS), viabilidad celular (VC), fenoles totales (FT), mientras que al medio de cultivo se le determinó el pH y el contenido de azúcares totales (AT). Todas las mediciones fueron hechas por triplicado.



Fig. 7 Filtrado al vacío de cultivo de células en suspensión de *Buddleja cordata* después de 18 días de incubación

6.2.1 Determinación de peso seco y viabilidad celular

La biomasa filtrada fue secada en una estufa a 60°C durante 24 hrs y luego fue pesada en una balanza analítica. Previo al proceso de filtración, de los cultivos celulares se tomó una muestra de 0.5 ml para determinar la viabilidad celular. Se determinó la viabilidad celular en una cámara de Neubauer haciendo uso del reactivo azul de Evans (0.25%), expresándose dicho valor como una razón de [células viables/células totales]. El índice de tolerancia al metal (IT) se expresó como la relación de [cantidad de biomasa producida en presencia del metal / cantidad de biomasa producida en ausencia del metal].

6.2.2 Determinación de compuestos fenólicos totales

La biomasa seca (100 mg) fue extraída con MeOH (50 ml) por reflujo de 30 min, seguida de su filtrado. Dicho concentrado fue empleado para determinar el contenido de fenoles totales mediante la técnica de Folín-Cicalteau (Singleton y Rossi, 1965), empleándose ácido gálico para la construcción de la curva patrón.

6.2.3 Determinación de azúcares totales y pH

Al medio de cultivo residual obtenido del filtrado al vacío le fue medido el pH, y se le determinó el contenido de azúcares totales de acuerdo a la metodología seguida por Dubois (1956). Previo a la determinación de azúcares totales se llevó a cabo una dilución 1:300

6.3 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos para cada una de las mediciones llevadas a cabo fueron expresados como el promedio de los triplicados llevados a cabo y su respectiva desviación estándar. Se empleó el paquete estadístico NCSS para analizar estadísticamente las medias obtenidas, aplicándose un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Cramer con un nivel de significancia del 5%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Crecimiento y tolerancia a los metales por cultivos de células en suspensión de *B. cordata*

Cuando se evaluó el crecimiento, a los 18 días de incubación, de los cultivos de células en suspensión de *B. cordata* cultivadas bajo las distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (tratamientos correspondientes al control de las concentraciones evaluadas de metales: T0, T0S0.03, T0S0.06, T0S0.5, T0S1, T0S1.5 y T0S2, Grafico 1) se encontró que la adición de la sal no tuvo un efecto significativo sobre las mediciones obtenidas para peso seco (PS) (Grafico 1), viabilidad celular (VC), fenoles totales (FT), azúcares totales (AT) y pH, por lo cual estos fueron agrupados y nombrados como “CTS's>” y son descritos de esta manera en el resto del texto.

Cuando se evaluó el crecimiento de los cultivos celulares crecidos en medio de cultivo conteniendo los metales, primeramente se pudo observar durante la etapa de cosecha que aquellos tratamientos que produjeron menor biomasa provocaron una coloración café en la biomasa (Fig. 8). Los resultados mostraron que los metales tuvieron un efecto significativo en la cantidad de biomasa obtenida; encontrándose que la mayor concentración de biomasa ocurrió para el control CTS's> (Grafico 1) y aquellos cultivos tratados con Mg^{2+} y Mn^{2+} a 1.0 y 2.0 mM, Fe^{2+} 0.5 mM, Zn^{2+} 1.0 mM, Cu^{2+} 0.03-0.06 mM, y Ni 0.03 mM. El crecimiento se vio afectado en el siguiente orden Ni^{2+} 0.06 mM < Zn^{2+} 1.5 mM < Fe^{2+} 1.0 mM, siendo la última en la que se presentó la menor biomasa cuando se comparó con el control (Grafico 1). Estos datos fueron similares a los obtenidos con los índices de tolerancia evaluados (Grafico 2). Cuando se evaluó el efecto de los metales Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} en los cultivos de células en suspensión de *B. cordata* los resultados mostraron que éstos tuvieron un efecto significativo sobre las mediciones obtenidas para índice de tolerancia (IT), viabilidad celular (VC), azúcares totales (AT) y pH.

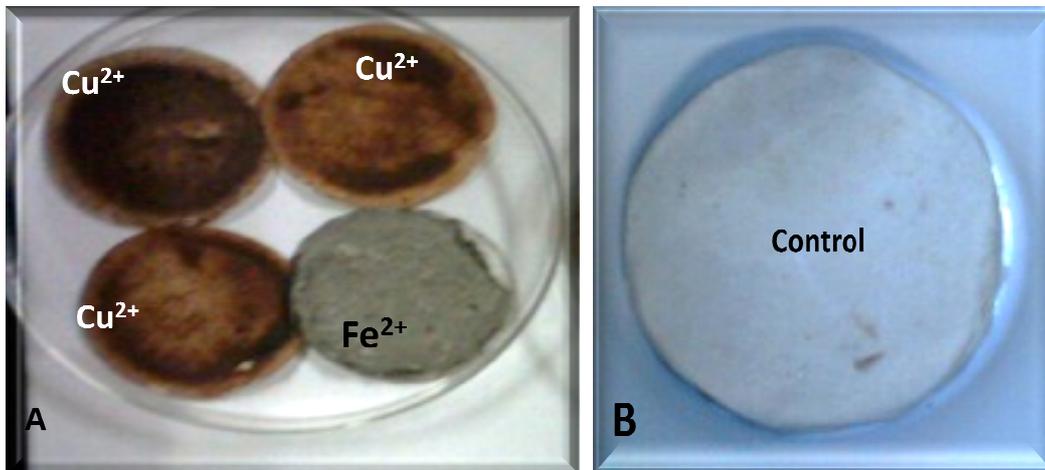


Fig.8 Características de la biomasa obtenida de los tratamientos con metales que afectaron el crecimiento. **A** Cu^{2+} y Fe^{2+} **B** Control

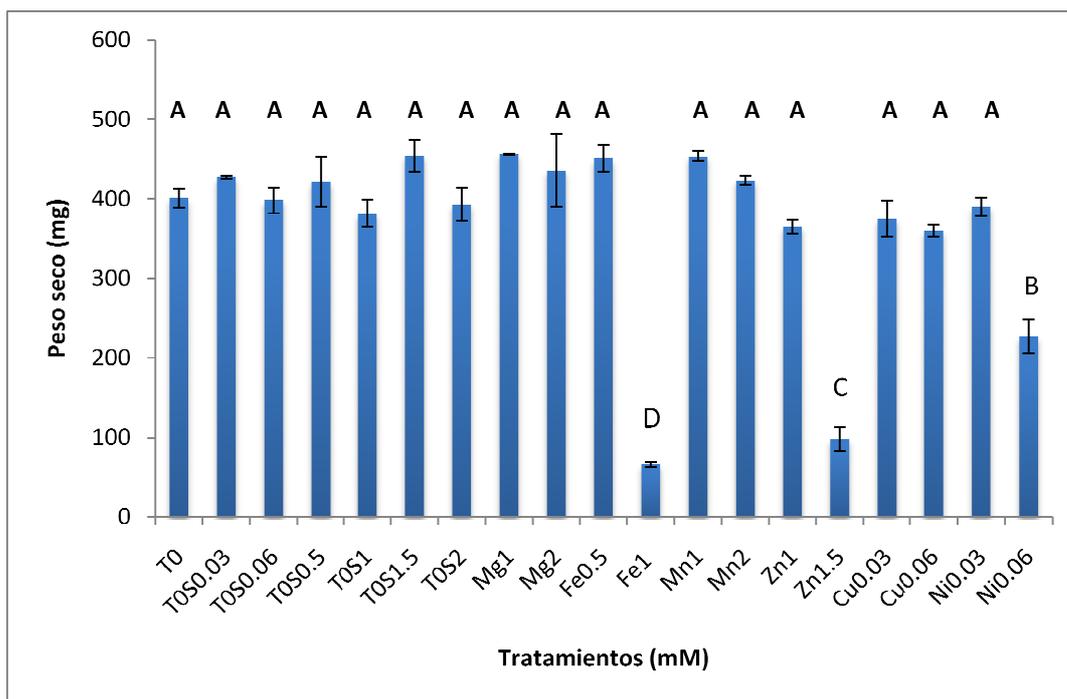


Grafico 1 Biomasa de cultivos en suspensión de *B. cordata* después de 18 días de exposición a metales.

El índice de tolerancia es una medida de la tolerancia de los cultivos sobre el metal porque representa a la biomasa que se obtiene cuando se está tratando con el metal con respecto a la biomasa con el control (Rout y col. 1999). Como se observa en el Grafico 2 el control creció en un 100% (IT = 1), mientras los tratamientos Mg^{2+} 1-2 mM, Fe^{2+} 0.05 mM, Mn^{2+} 1-2 mM toleraron más las concentraciones del metal. Donde hubo más estrés por efecto de los metales se evaluó menor índice de tolerancia como en los tratamientos de Fe^{2+} 1 mM, y Zn^{2+} 1.5 mM.

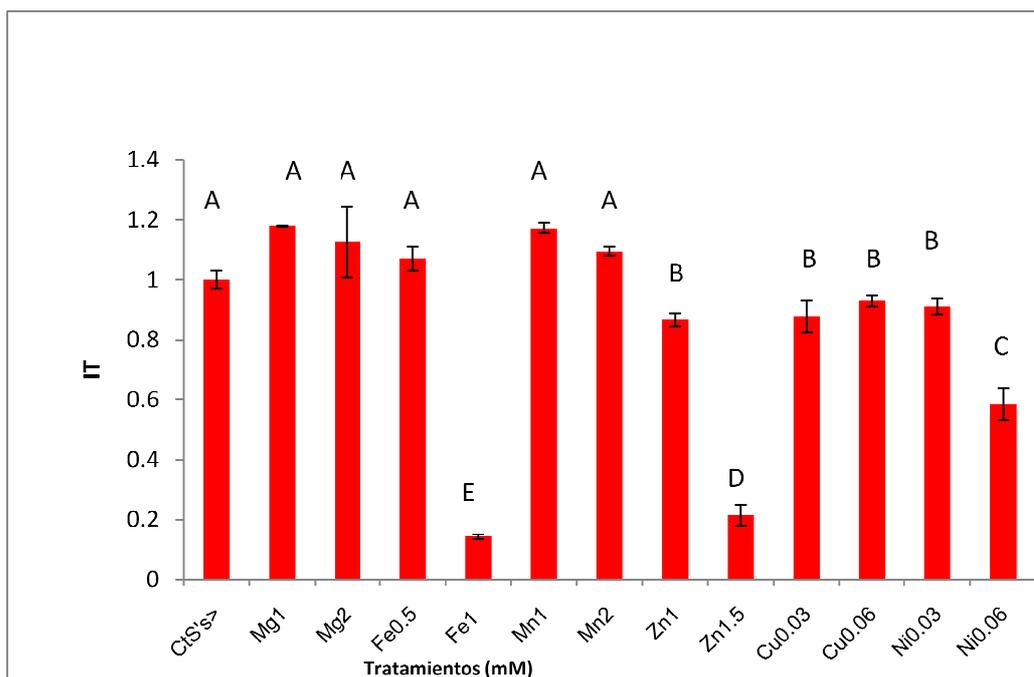


Grafico 2 Índice de tolerancia de cultivos en suspensión de *B. cordata* después de 18 días de exposición a metales.

Los resultados obtenidos para IT indicaron que los cultivos de células que presentaron mayor tolerancia, esto es, que no fueron significativamente distintos al control CTS's> (IT ~ 1) fueron Mg^{2+} 1.0-2.0 mM, Fe^{2+} 0.5 mM, Mn^{2+} 1.0-2.0 mM (Grafico 2). Los metales y las concentraciones que afectaron el crecimiento, esto significa que, provocaron un decremento en los valores de IT fueron: Zn^{2+} 1.0 mM \leq Cu^{2+} 0.0325-0.065 mM \leq Ni^{2+} 0.0325 mM < Ni^{2+} 0.065 < Zn^{2+} 1.5 mM y < Fe^{2+} 1.0 mM (Grafico 2).

Dicho comportamiento fue similar al observado para las determinaciones de VC y pH; la tolerancia se asocio a la viabilidad celular y pH, donde a mayor tolerancia mayor viabilidad celular y valores de pH más altos (Grafico 3 y 4, respectivamente). Los tratamientos con mayor VC obtenida fueron Mg^{2+} 1 mM, Cu^{2+} 0.03 mM, Ni^{2+} 0.03 mM y Ni^{2+} 0.06 mM, seguidos de Mg^{2+} 2 mM, Fe^{2+} 0.5 mM, Mn^{2+} 1-2 mM, y Cu^{2+} 0.06 mM que obtuvieron una viabilidad del 64 a 69% y finalmente Zn^{2+} 1 mM, Fe^{2+} 1 mM y Zn^{2+} 1.5 mM presentaron los valores correspondientes a las viabilidades menores (Gráfico 3). Se observó que en los tratamientos donde hubo una mayor tolerancia no hubo cambios de pH (Mg^{2+} 1.0-2.0 mM,

Fe²⁺ 0.05 mM , Mn²⁺ 1.0-2.0 mM, Cu²⁺ 0.03 mM, Ni²⁺ 0.03-0.06 mM) comparados con el control. Sin embargo en aquellos donde la tolerancia empezó a verse disminuida se vio que la acidez incremento conforme la tolerancia fue decreciendo obteniendo los valores más acidos para el caso de Fe²⁺ 1.0 mM y Zn²⁺ 1.5 mM donde se obtuvo menos crecimiento (Gráfico 1-4). Los tratamientos con mayores valores de pH, que no fueron estadísticamente distintos a CTS's> fueron Mg²⁺ 1.0-2.0 mM, Fe²⁺ 0.05 mM , Mn²⁺ 1.0-2.0 mM, Cu²⁺ 0.03 mM, Ni²⁺ 0.03-0.06 mM, incrementándose la acidez en Cu²⁺ 0.06 < Zn²⁺ 1 < Fe²⁺ 1 mM ≤ Zn²⁺ 1.5 mM (Gráfico 4). De manera contraria a VC y pH, el contenido de AT fue bajo cuando IT fue alto. Los tratamientos con menores valores de AT, que no fueron estadísticamente distintos a CTS's> fueron Mg²⁺ 1-2 mM, Fe²⁺ 0.5 mM, Mn²⁺ 1-2 mM, cuyo contenido se vio afectado para Ni²⁺ 0.03 mM < Cu²⁺ 0.03 mM < Zn²⁺ 1 mM < Ni²⁺ 0.06 mM < Cu²⁺ 0.06 < Zn²⁺ 1.5 mM < Fe²⁺ 1 mM (Gráfico 5).

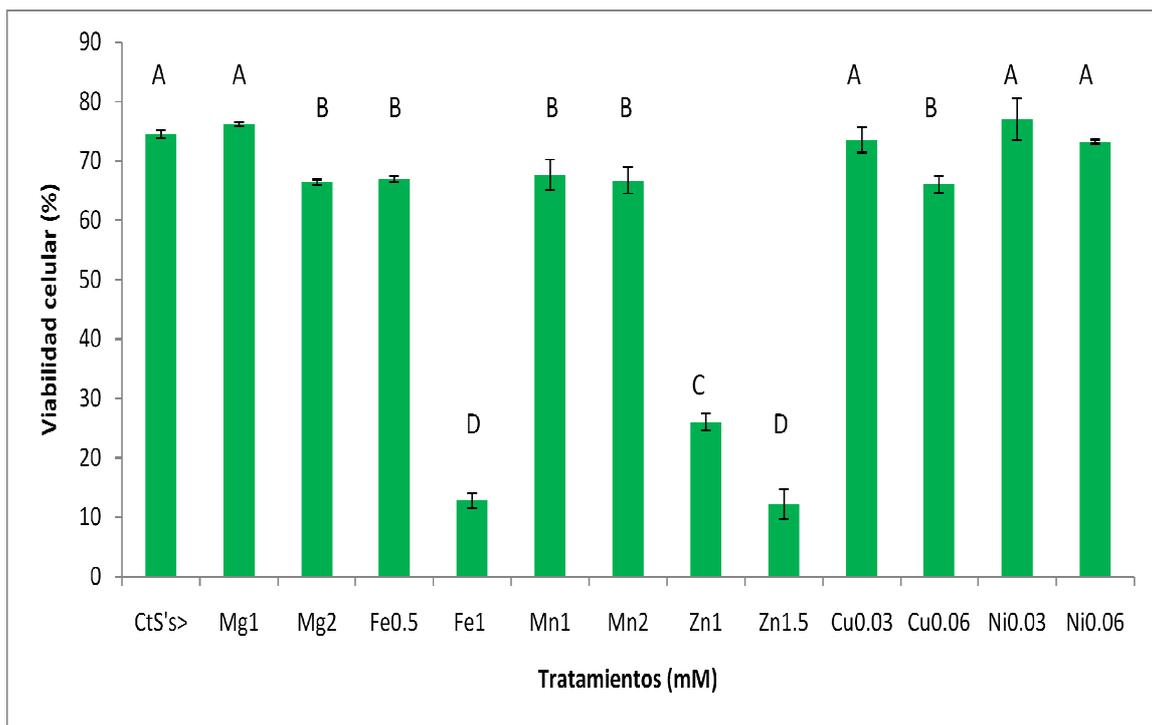


Gráfico 3 Viabilidad de células en suspensión de *B. cordata cordata* tratadas con metales

Los resultados obtenidos corroboran el hecho de que la viabilidad celular es la capacidad de la célula para sobrevivir, va acompañada por un aumento en la biomasa del cultivo

celular, algunos factores que influyen son, el descenso de temperatura o la utilización de reactivos que actúen como inhibidores del metabolismo tal como los metales los cuales pueden provocar una disminución de la biomasa (Malinin y Perry, 1967).

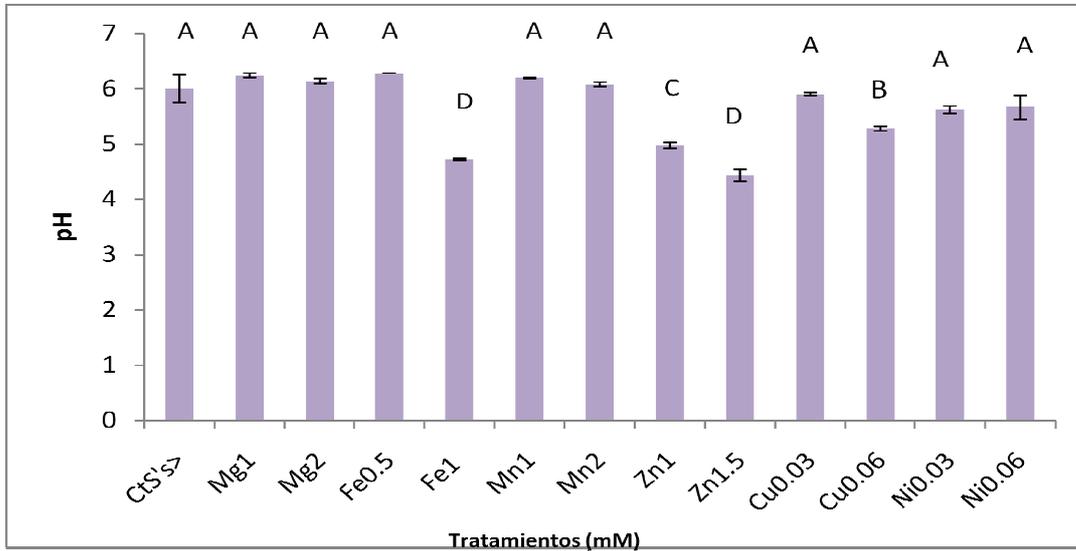


Grafico 4 Valores de pH del medio de cultivo residual de cultivos de *B. cordata* tratados con metales

La acidificación de la rizosfera por efecto de la planta ocurre porque excretan ácidos orgánicos para poder solubilizar nutrientes no biodisponibles o poder remover los metales (Lopez-Martínez y col., 2005). En aquellos tratamientos donde hubo mayor tolerancia no hubo cambios significativos en el valor del pH obtenido para el medio de cultivo (Grafico 4), sin embargo en cuanto fue siendo menos tolerado el metal la acidez se fue haciendo más evidente, como ocurrió para los tratamientos Cu²⁺ 0.06 mM, Zn²⁺ 1.0 mM, Fe²⁺ 1.0 mM y Zn²⁺ 1.5 mM.

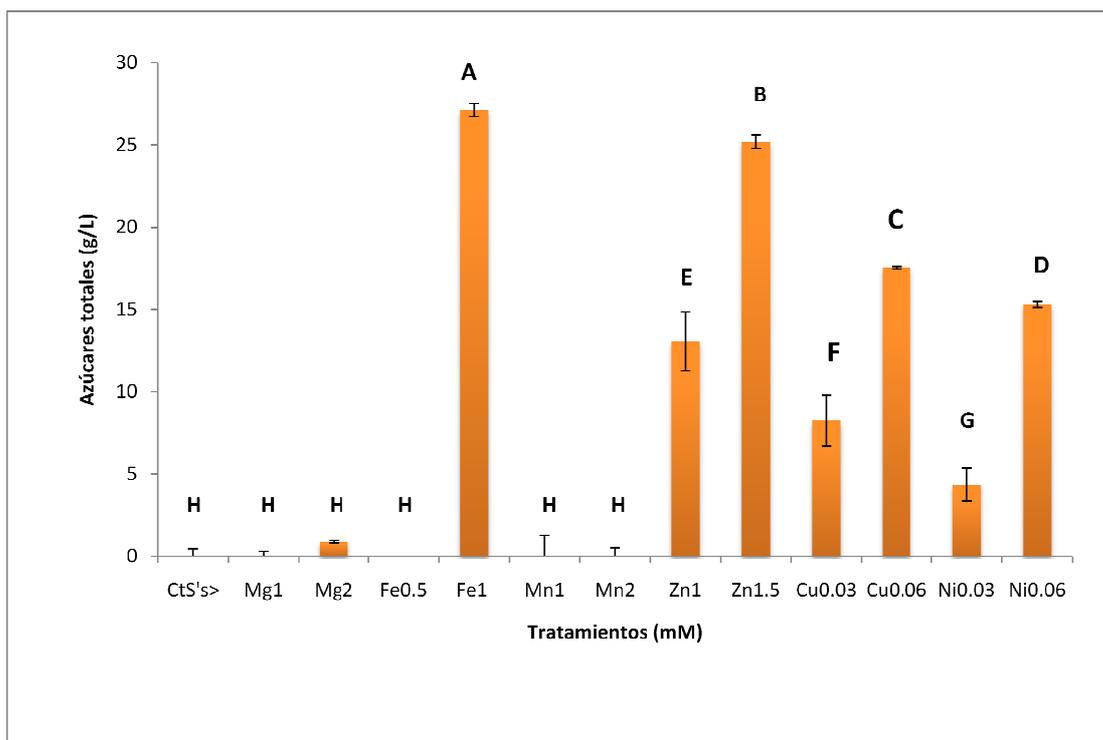


Grafico 5 Contenido de azúcares totales del medio de cultivo residual de cultivos de *B. cordata* tratados con metales

Otra forma de evaluar la eficiencia del sistema, es cuantificar el contenido de azúcares residuales que se encuentra en el cultivo (Davies y col., 1969; Kramer y Kozlowski, 1979). Como se observa, los valores de azúcares totales más bajos coinciden con los mayores rendimientos de biomasa en los tratamientos y en aquellos tratamientos que presentaron los valores más altos de IT se determinó que los azúcares totales se consumió casi en su totalidad toda el azúcar, lo que indica que las células utilizaron el azúcar para su crecimiento y esto a su vez nos señala que el sistema de los cultivos de células en suspensión de *B. cordata* fue eficiente a pesar de la exposición a dichos metales.

Los resultados obtenidos muestran que el cultivo de células en suspensión de *B. cordata* presentó para varios tratamientos de metales una alta tolerancia al metal y comparado con otras especies, presenta mediciones de crecimiento similares e inclusive mejores (Tabla 1).

Tabla 1 Tolerancia a metales por *B. cordata* y otras especies

Cultivos de Células en Suspensión de <i>B. cordata</i>	
Zn	0.015 (control), 1.015 y 1.515 mM... Crecimiento: IT = 1, 0.8664-0.215
Mn	0.05 (control), 1.05 y 2.05 mM... Crecimiento: IT = 1, 1.18-1.08
Ni	0 (control), 0.0325 y 0.065 mM... Crecimiento: IT = 1, 0.91, 0.56
Fe	0.05 (control), 0.55 y 1.05 mM... Crecimiento: IT =1, 1.07, 0.14
Mg	0.75 (control), 1.75 y 2.75 mM... Crecimiento: IT = 1, 1.19, 1.11
Cu	0.0001 (control), 0.0326 y 0.0651 mM... Crecimiento: IT = 1, 0.90,0.87
Otras especies	
Cultivo de callo de <i>Brassica</i> spp. (Tolerante a Zn y Mn; acumulando 1- 3.83 mg/kg)	
Zn	0.03 (control), 0.06, 0.12, 0.24 y 0.48 mM.... Crecimiento: IT= 0.773-0
Mn	0.1 (control), 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM.... Crecimiento: IT = 0.732-0
Cultivo de Células en Suspensión de <i>Picea rubens</i> (Productor de fitoquelatinas) Zn	
	0.015 (control), 0.05, 0.1, 0.2 , 0.4 y 0.8 mM
Cultivos de Raíces de <i>Alyssum bertolonii</i> (acumulando 7.2 mg/g)	
	20-100 ppm (0.3 – 1.52 mM) de Ni... Crecimiento IT = 1 - 0.34
Cultivos de Raíces de <i>Nicotiana tabacum</i>	
	20-100 ppm (0.3 – 1.52 mM) de Ni... Crecimiento IT = 0
Cultivo de Células en Suspensión de <i>Silene vulgaris</i> 0.1 mM Cu acumulando (10 mg/Kg).	

Thangavel 2007 y Tatjana V. 2001

7.2 Producción de fenoles totales en cultivos tratados con metal

Los resultados obtenidos mostraron que el metal afectó la concentración de fenoles totales producidos, encontrándose diferencias significativas en los valores promedio evaluados (Gráfico 6). El tratamiento en el que los metales Mg^{2+} 2 mM, Mn^{2+} 2 mM, Cu^{2+} 0.06 mM, Ni^{2+} 0.03-0.06 mM fueron adicionados se observó una mayor producción de fenoles, siendo mayor a la observada para el control (Gráfico 6). En los tratamientos conteniendo Fe^{2+} 1 mM y Zn^{2+} 1.0-1.5 mM la determinación de fenoles totales fue muy

baja, posiblemente debido a que el estrés oxidativo fue muy intenso, provocándoles que presentaran un crecimiento nulo y consecuentemente valores de IT bajos.

Se observa de dichos resultados que los metales activaron el mecanismo de defensa de manera distinta (metabolismo de los fenoles), los cuales fueron independientes del crecimiento en términos de biomasa y que hasta hubo mayor producción de fenoles hasta sobre el control, o sea hubo elicitación de fenoles por efecto del metal. Los elicitors son compuestos señal que estimulan la aparición de cualquier respuesta defensiva, los elicitors son factores químicos o físicos que inducen cambios fisiológicos en el en las plantas (Arias y col. 2009).

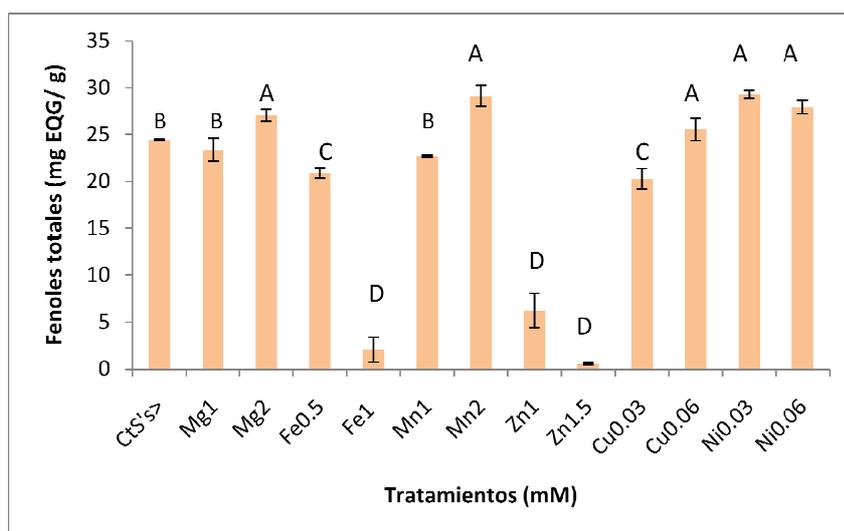


Grafico 6 Producción de fenoles totales de cultivos de *B. cordata* tratados con metales

CONCLUSIONES

- Los cultivos de células en suspensión de *B. cordata* fueron capaces de crecer y tolerar los metales Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} siendo mejor tolerados los metales Mg^{2+} y Mn^{2+} a las concentraciones de 1 y 2 mM, y Fe^{2+} 0.5 mM, ya que no mostraron diferencias sobre el crecimiento con respecto al control (IT ~ 1, $P \leq 0.05$), además de observarse similitudes en el consumo de azúcares totales y viabilidad celular.
- La capacidad de tolerancia a los metales fue seguida por Zn^{2+} 1.0 mM \leq Cu^{2+} 0.0325-0.065 mM \leq Ni^{2+} 0.0325 mM $<$ Ni^{2+} 0.065 mM $<$ Zn^{2+} 1.5 mM y $<$ Fe^{2+} 1.0 mM
- Se asoció el contenido de fenoles totales a la presencia del metal, siendo favorecido por: Mg^{2+} 2 mM, Mn^{2+} 2 mM, Cu^{2+} 0.06 mM, Ni^{2+} 0.03-0.06 mM quienes fueron elicitores de la producción de fenoles

PERSPECTIVAS

- Evaluar la concentración del metal acumulado en los cultivos de células en suspensión de *B. cordata*.
- Evaluar otras concentraciones de los metales que fueron mejor tolerados por arriba de las evaluadas en este trabajo
- Evaluar la capacidad de tolerancia de cultivos de células en suspensión de *B. cordata* bajo otros metales tóxicos como Pb, Cr, Cd, etc.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta I, Moctezuma-Zárate MG, Cárdenas JF, Gutiérrez C (2007). Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomasa fúngica. *Inf Tec* 18: 9-14

Agudelo LM, Macías KI, Suárez AJ (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación* 2: 57-60

Aguilar-Rodríguez S, Terrazas T, López-Mata L (2006). Anatomical wood variation of *Buddleja cordata* (Buddlejaceae) along its natural range in Mexico. *Trees* 20: 253-261

Arias Y, González I, Rodríguez M, Rosales C, Suárez Z, Peteira B (2009). General aspects of the interaction tomato (*Solanum lycopersicon* L.) - *Meloidogyne incognita*. *Rev Protección Veg* 24:1-13

ATSDR (2005a). ToxFAQs™ for Cinc; Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts60.pdf>

ATSDR (2005b). ToxFAQs™ for Niquel; Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts15.pdf>

ATSDR (2004). ToxFAQs™ for Copper; Agency for Toxic Substances and Disease Registry. http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs132.pdf

ATSDR (2008). ToxFAQs™ for Manganese; Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts151.pdf>

Ávalos A, Pérez-Urria E, (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal* 2:119-145.

Barba L, Rodríguez R, Córdoba JL (1991). Manual de técnicas microquímicas de campo para la arqueología, IIA, Editorial UNAM, México

Bernal MP, Clemente R, Vazquez S, Walker DJ (2007). Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistemas* 2:68-82

Bourgand F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851

Brooks RR (1998). Plants that hyperaccumulate heavy metals. 1ª. edición, CABI, Cambridge, USA.

Buchanan BB, Gruisem W, Jones RL (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plants Physiologists, Maryland USA

CFNI (2005). Nyam news: Magnesium, nutrition and health. Caribbean Food and Nutrition Institute 1,2: 1-5. ISSN 0255-8203. <http://www.paho.org/english/cfni/nyamnewsaug1-205.pdf>

Clemens S (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homesostasis. *Planta* 212:475-486.

Cronquist A (1995). Botánica básica. Segunda edición, CECSA, México.

Davies D, Giovanel J, Rees TA (1969). Bioquímica Vegetal. Ediciones Omega S.A, Barcelona, España

Doran PM (2009). Application of Plant Tissue Cultures in Phytoremediation Research: Incentives and Limitations. *Biotechnology and Bioengineering* 103:60-76.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Reber PA, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chemistry* 28:350-356.

Estrada-Zúñiga ME, Cruz-Sosa F, Rodríguez-Monroy M, Verde-Calvo JR, Vernon-Carter EJ (2009). Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 97: 39-47

Fischer ES, Bremer E (1993) Influence of magnesium deficiency on rates of leaf expansion, starch and sucrose accumulation and net assimilation in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* 89: 271–276

Hermans C, Johnson GN, Strasser RJ, Verbruggen N (2004) Physiological characterization of magnesium deficiency in sugar beet: acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. *Planta* 220: 344–355.

Gamborg O, Phillips GC (1995). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Fundamental Methods)*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg, 45-90.

Javanmardia J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 83:547–550

Kramer PJ, Kozlowski TT (1979). *Physiology of woody plants*. Academic Press, New York.
López-Martínez S, Gallegos-Martínez ME, Perez-Flores LJ, Gutiérrez-Rojas M (2005). Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Rev Int Contam Ambient* 21:91-100

Malinin TI, Perry VP (1967). A review of tissue and organ viability assay. *Cryobiology* 4:104-115.

Marschner H (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2ª edición. Academic Press, San Diego, CA.

Martínez M (1989). *Las plantas medicinales de México*. 6ª edición, Ediciones Botas. México, D.F. p.309-316

McCutcheon SC (1998). *Phytoremediation: Applications and limitations*. Plant Biotechnology Institute Bulletin, National Research Council of Canada, Sept.

Morgan TD, y col. (2003). Metals in mandibles of stored product insects: do zinc and manganese enhance the ability of larvae to infest seeds. *J Stored Prod Res* 39:65–75

Mulabagal V, Tsay HS (2004). Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2(1): 29-48

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 155:473-497

Norman, M. (2000). "Buddlejaceae", In: J.L. Luteyn, M. Flagler Cary y S. Rob Gradstein. Eds. *Flora Neotropica*, Monograph 81. The New York Botanical Garden. Bronx. New York. 225 pp.

Núñez-López RA, Meas-Vong Y, Ortega R, Olguín E (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia* 55:69-82

Peaslee DE, Moss DN (1966) Photosynthesis in K and Mg-deficient maize (*Zea mays*) leaves. *Soil Sci Soc Am Proc* 30: 220–223

Pilon-Smits E (2005). Phytoremediation. *Anu Rev PPlant Biol* 556: 15-39

Polprasert C (1996). Organic waste recycling, technology and management. 2a edición, Wiley, Ontario, Canadá.

Quiroz A, Espinosa-García F, Ilangovan K (2002). Effects of natural hydrosoluble chelates of three plant species on the mobilization of heavy metals. *Bull Environ Contam Toxicol* 68: 862-869

Raskin I, Ensley BD (2000). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. John Wiley & Sons, New York.

Romero S, Aguilar S, Rojas EC (2003). *Buddleja cordata* H.B.K. ssp *cordata* (Buddlejaceae): Propagación y anatomía de la madera, *Polibotánica* 016: 63-77

Romero L, Fernández R (1999). Diccionario de ciencias hortícolas. Mundi-Prensa, Madrid, España

Rout GR, Samantaray S, Das P (1999). *In vitro* selection and biochemical characterization of zinc and manganese adapted callus lines in *Brassica* spp. *Plant Science* 137:89-100

Sharma SS, Karl-Josef D (2008). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* 14:43-50

Shaul O (2002). Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* 15: 309–323

Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am.J. Enol. Vitic.* 16: 144-158

Smith JE (1996). *Biotechnology: studies in biology*. 3ª edición, Cambridge University Press.

Sun OJ, Payn TW (1999) Magnesium nutrition and photosynthesis in *Pinus radiata*: clonal variation and influence of potassium. *Tree Physiol* 19: 535–540.

Tatjana V, Pauline M, Doran (2001). Hyperaccumulation of Nickel by Hairy Roots of Alyssum Species: Comparison with Whole Regenerated Plants. *Biotechnol Prog* 17: 752-759.

Thangavel P, Long S, Minocha R (2007) .Changes in phytochelatins and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg.) *Plant Cell Tiss Organ Cult* 88:201–216

Tsao DT. Overview of phytotechnologies. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003; 78: 1-50

Volesky B (2004). *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 408 pp

Zimmermann MJ (2001). Adaptaciones de plantas a estrés abiótico que les permiten vivir y prosperar en diferentes condiciones ambientales. *Creces Ciencia y Tecnología*. <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=++%3E++16&tc=3&nc=5&art=1105>