



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Obtención de líneas celulares de *Nicotiana glauca* Graham
hiperacumuladoras de cadmio por mejoramiento de cultivos
in vitro.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga
P R E S E N T A:

Tanni Guerrero Torres



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. María Isabel Saad Villegas
2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Guerrero
Torres
Tanni
56556818
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301501286

2. Datos del tutor

Dra
Saad
Villegas
María Isabel

3. Datos del sinodal 1

Dr
Manuel
Jiménez
Estrada

4. Datos del sinodal 2

Dra
Virginia
Cervantes
Gutiérrez

5. Datos del sinodal 4

M. en. C
Laura Patricia
Olguín
Santos

6. Datos del sinodal 5

M. en B.
María Eugenia
Muñíz
Díaz de León

7. Datos del trabajo escrito

Obtención de líneas celulares de *Nicotiana glauca* Graham hiperacumuladoras de cadmio por mejoramiento de cultivos *in vitro*.

79 p
2010

Esta investigación se realizó en el Taller de Biología Molecular de la Célula I y II, de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Isabel Saad Villegas.

Agradecimientos

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León por su asesoría y por facilitarnos el uso de su laboratorio.

Este proyecto fue realizado con el apoyo de DGAPA, UNAM, proyecto PAPIIME PE206605.

Dedicatoria

A mis padres: Por todo el amor y el apoyo brindado.

A mis amigos y amigas: Por todos los momentos compartidos.

Índice

	Página
Introducción	1
Resumen	3
Antecedentes	5
2.1 Contaminación ambiental	5
2.2 Metales	5
2.3 Contaminación con metales pesados tóxicos	6
2.4 Cadmio	7
2.5 Biotecnología ambiental	12
2.6 Biorremediación	12
2.6.1 Bioabsorción	13
2.6.2 Bioacumulación	14
2.7 Fitorremediación	14
2.7.1 Extracción	15
2.7.2 Estabilización	15
2.7.3 Inmovilización	15
2.7.4 Volatilización	16
2.7.5 Filtración	16
2.7.6 Hiperacumulación	16
2.8 Biotecnología vegetal	18
2.9 Mejoramiento con cultivo de tejidos vegetales	19
2.10 <i>Nicotiana glauca</i> Graham.	21
2.10.1 Descripción botánica	21
2.10.2 Usos	22

2.11 Fitorremediación con <i>Nicotiana glauca</i> Graham y <i>Nicotiana tabacum</i> .	24
Objetivos	25
Justificación	26
Metodología	27
5.1 Estrategia desarrollada	27
5.1.2 Primera etapa	27
5.1.3 Segunda etapa	29
5.1.4 Tercera etapa	29
Resultados y Discusión	33
6.1 Primera etapa	34
6.2 Tercera etapa	41
Conclusiones	64
Anexos	66
Referencias	68

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Tratamientos aplicados para la inducción de brotes de <i>Nicotiana glauca</i> .	31
Tabla 2. Ejemplares de referencia de <i>Nicotiana glauca</i> presentes en el Herbario Nacional, UNAM (MEXU).	36
Tabla 3. Tratamientos aplicados para la inducción de rizogénesis en <i>Nicotiana glauca</i> .	54

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Estrategia General	28
Figura 2. Germinación de semillas de <i>Nicotiana glauca</i> .	42
Figura 3. I, II, y III Desarrollo de los brotes de <i>Nicotiana glauca</i> .	45
Figura 4. Inducción de brotes de <i>Nicotiana glauca</i> . Biomasa.	48
Figura 5. Inducción de brotes de <i>Nicotiana glauca</i> . Número de brotes.	50
Figura 6. Estadística descriptiva de la inducción de brotes de <i>Nicotiana glauca</i> .	51
Figura 7. Rizogénesis de <i>Nicotiana glauca</i> .	53
Figura 8. Aclimatización de <i>Nicotiana glauca</i> .	55
Figura 9. Plantas de <i>Nicotiana glauca ex vitro</i> .	56
Figura 10. Sistema de selección <i>in vitro</i> de <i>Nicotiana glauca</i> . Número de brotes.	58

Figura 11. Sistema de selección <i>in vitro</i> de <i>Nicotiana glauca</i> . Biomasa.	59
Figura 12. Selección <i>in vitro</i> de brotes de <i>Nicotiana glauca</i> tolerantes a cadmio.	60
Figura 13. Selección de individuos de <i>Nicotiana glauca</i> tolerantes a cadmio.	62

1. Introducción

La contaminación con metales tóxicos en la biosfera se ha acelerado rápidamente desde el apogeo de la revolución industrial, los metales pesados provocan problemas ambientales y de salud mayores (Gisbert *et al.*, 2003). Actualmente se ha demostrado que la contaminación con metales y xenobióticos es un problema ambiental global (Krämer, 2005). Dentro de los diferentes elementos clasificados como metales pesados, el cadmio es considerado un serio contaminante ambiental, debido a su amplio uso industrial (subproducto en la obtención de zinc y plomo y galvanoplastia) (Pereira y Nefussi, 1986). Particularmente el cadmio es peligroso porque pertenece a los metales cuyos iones son más rápidamente tomados por las raíces de las plantas (Clemens, 2006). El cadmio ocasiona grandes problemas a la salud humana ya que se va acumulando en el medio ambiente y pasa a través de la cadena trófica (Lodeiro *et al.*, 2005). Es un metal tóxico que ha sido clasificado para el humano como un agente carcinogénico (Lugon-Moulin *et al.*, 2006). Por lo cual es importante estudiar estrategias que permitan su remoción del ambiente.

Ante los crecientes problemas de contaminación en suelo y agua por metales pesados, recientemente han surgido enfoques tecnológicos tendientes a aminorar o eliminar en su totalidad estos problemas. La fitorremediación es una tecnología emergente y de bajo costo que utiliza plantas para remover, transformar o estabilizar contaminantes localizados en agua, sedimentos o suelos (Gisbert *et al.*, 2003). Una gran ventaja que tiene la fitorremediación es

que es efectiva, económicamente viable y ambientalmente no destructiva (Zhu *et al.*, 1999). Dentro de la fitorremediación se encuentra la fitoextracción que implica el cultivo de las plantas tolerantes a contaminantes del suelo para que los concentren en sus tejidos. Al fin del periodo de crecimiento, la biomasa de la planta se cosecha, se seca o se incinera o se deposita en un fundidor (Raskin *et al.*, 1995).

La vegetación que crece en sitios contaminados ha desarrollado mecanismos de tolerancia a los ambientes inadecuados, por lo tanto es flora bien adaptada, el hecho de que sean tolerantes a éstas condiciones edafoclimáticas es un instrumentos básico para la fitorremediación. Un fitoextrator ideal debe cumplir con los siguientes requisitos: 1) presentar crecimiento rápido, 2) tener alta biomasa, 3) tolerar y acumular altas concentraciones de metales pesados y 4) contener sustancias que alejen a los herbívoros evitando así que los metales pesados no se transfieran a niveles superiores de la cadena alimenticia (Gisbert *et al.*, 2003).

En el presente estudio se generó un protocolo de micropropagación para *Nicotiana glauca* Graham y un sistema de selección a partir de semillas y de brotes para obtener variedades vegetales hiperacumuladoras de cadmio.

Resumen

Nicotiana glauca Graham, es una planta perteneciente a la familia Solanaceae, con una amplia distribución en México y el mundo. Es una especie con rápido crecimiento y alta producción de biomasa que produce alcaloides repelentes de herbívoros. Esta planta se comporta como pionera en ecosistemas perturbados y resiste concentraciones elevadas de diversos contaminantes. Existen varios estudios que reportan su capacidad de retener en sus tejidos altas concentraciones de Pb, Zn, Cd y Co. Por estas características, *N. glauca*, es considerada un modelo ideal para llevar a cabo estudios de fitorremediación. Con la intención de obtener plantas hiperacumuladoras de metales pesados por selección masal de cultivos *in vitro*, se desarrolló un protocolo de micropropagación para la especie, vía organogénesis. Se colectaron semillas de la planta en dos localidades contaminadas con metales pesados: en la zona chinampera del pueblo de San Luis Tlaxialtemalco en la delegación Xochimilco, D.F. y en la planta abandonada de Cromatos de México, Tultitlán, Edo de México. Las semillas se germinaron en condiciones estériles en medio MS (Murashige & Skoog, 1962). Para la inducción de brotes se probó el efecto de diferentes concentraciones de dos citocininas (K y BAP), solas y en combinación con dos auxinas (ANA, 2-4D); se utilizaron como explantes hojas de dos meses de edad. El mejor resultado se obtuvo en medio MS adicionado con 2mgL^{-1} de BAP. Para el desarrollo de raíces en los brotes se probaron diferentes concentraciones de IBA. Se obtuvieron raíces vigorosas en medio nutritivo, sin reguladores de crecimiento, con la mitad de las sales del medio MS. Las plantas enraizadas se transplantaron a macetas con suelo y fueron aclimatizadas en condiciones de invernadero, por disminución gradual de la

humedad relativa y se obtuvo un 98% de sobrevivencia. Para el establecimiento de un sistema de selección *in vitro* se añadieron al medio MS distintas concentraciones de cloruro de cadmio. Se consiguió la inducción de brotes en presencia de cadmio. En todas las concentraciones probadas germinaron las semillas de *N. glauca*. De estos dos resultados coincide y se concluye que la dosis letal media esta por debajo de los 50 μM de CdCl_2 y que 25 μM de CdCl_2 es una concentración adecuada para iniciar la selección tanto de semillas como de brotes para obtener plantas hiperacumuladoras de cadmio.

2. Antecedentes

2.1 Contaminación ambiental

Los problemas ambientales resultan de la combinación de diferentes factores: tecnologías inadecuadas, el crecimiento de la población, la economía de consumo y el mal uso de los recursos naturales. Se demanda mucho de la naturaleza y muy rápido y en cada caso se producen desperdicios. El acelerado desarrollo industrial del último siglo demostró que la capacidad de regeneración atmosférica, terrestre, y acuática del planeta es limitada, y ahora nos enfrentamos con alteraciones ecológicas globales causadas por la enorme producción de desechos tóxicos (Balbás, 2002). Los efectos antropogénicos son evidentes en cada ecosistema de la Tierra donde habitan humanos (Vitousek *et al.*, 1997).

2.2 Metales

Los metales pueden dividirse en cuatro grandes categorías, con base en sus propiedades químicas, efectos fisiológicos y aplicaciones: 1) metales pesados tóxicos, 2) metales estratégicos, 3) metales preciosos y 4) radionúcleos (Puranik y Paknikar, 1999).

Varios metales son esenciales para las plantas, algas, animales y microorganismos (Clemens, 2006). Estos elementos han sido empleados en el curso de la evolución por sus propiedades químicas tales como su actividad redox dentro de condiciones fisiológicas (Cu, Fe) o la fuerza ácida de Lewis (Zn). Los metales pueden ser clasificados en tres tipos dependiendo de su reactividad con los grupos funcionales de las biomoléculas. *Metales Clase A* (Al^{3+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) muestran más reactividad con el oxígeno ($\text{O} > \text{N} > \text{S}$);

metales Clase B (Cu^{1+} , Hg^{2+} , Ag^{1+}) prefieren el azufre ($\text{S} > \text{N} > \text{O}$): y los *metales Clase C* (Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}) que tienen una afinidad intermedia (Mendoza-Cozátl *et al.*, 2005). Estas mismas propiedades que hacen a los iones de metales de transición indispensables para la vida, son las que los convierten en tóxicos cuando están presentes en exceso (Clemens, 2006). El rango fisiológico entre deficiencia y toxicidad para los metales de transición esenciales es por lo tanto extremadamente estrecho y una red controlada de homeostasis de los metales es necesaria para todos los organismos puedan ajustar las fluctuaciones en la disponibilidad de estos micronutrientes (Clemens, 2006).

2.3 Contaminación con metales pesados tóxicos

Los metales pesados tóxicos pueden definirse como los elementos químicos con una densidad mayor a 5 mgL^{-1} .

La contaminación con metales tóxicos en la biosfera se ha acelerado rápidamente desde el apogeo de la revolución industrial (Gisbert *et al.*, 2003).

Durante los pasados 200 años las emisiones tóxicas de metales pesados se han incrementado mucho y han excedido las emisiones significativamente de las fuentes naturales, prácticamente para todos los metales (Clemens, 2006).

El esparcimiento de metales pesados en el ambiente terrestre es atribuido a actividades como el riego con aguas residuales, las actividades industriales y la eliminación de productos tóxicos contenidos en la basura doméstica (Kovalchuk *et al.*, 2001).

La movilidad de los metales pesados en el ambiente es muy alarmante en plantas, animales, humanos y para otras formas de vida debido a la toxicidad de estos metales (Puranik y Paknikar, 1999; Barazani *et al.*, 2004).

De mayor preocupación son los metaloides como el arsénico (As) y el selenio (Se) y los metales como el cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) (Clemens, 2006). Los riesgos en la salud humana y animal por estos metales pesados se agravan más por su larga persistencia en el ambiente. Por ejemplo, el Pb es uno de los metales más persistentes, se estima un tiempo de retención en el suelo de 150 a 5000 años. El promedio de la vida media biológica del cadmio ha sido estimada en 18 años (Gisbert *et al.*, 2003).

Los efectos tóxicos de los metales pesados en los organismos dependen del tiempo de exposición y de la concentración a la cual están expuestos. La mayoría de los efectos están relacionados con las interacciones que se establecen con los grupos carboxilo y tiol de las proteínas, con sus propiedades ionofóricas, y con su habilidad de generar radicales libres directa o indirectamente y por lo tanto inducir estrés oxidativo (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Algunos reportes han demostrado que la exposición de metales tóxicos a corto o largo plazo, da como resultado la reducción en la diversidad y actividad microbiana en el suelo (McGrath *et al.*, 2001).

2.4 Cadmio

El cadmio no es muy abundante en la corteza terrestre. En la mayoría de las formaciones rocosas está asociado con un vasto exceso de Zn (Clemens, 2006). El cadmio se encuentra naturalmente en los suelos en diferentes concentraciones, que pueden depender del tipo del suelo de cual se este haciendo referencia, usualmente en un rango de 0.1-2 ppm (Clemens, 2006), pero usualmente es menor a 1 ppm en suelos no contaminados (Lugon-Moulin *et al.*, 2006). Muchos factores como el pH del suelo y el contenido de la materia

orgánica tienen una fuerte influencia en el tamaño de la fracción disponible de Cd (Clemens, 2006).

Los principales problemas ambientales que genera el cadmio se pueden dividir en cuatro áreas: riesgos ocupacionales, contaminación de aguas, contaminación del aire y contaminación del suelo (Pereira y Nefussi, 1986).

Los procesos industriales o actividades que generan el cadmio son:

- subproducto en la refinación de zinc.
- producción y refinación de zinc y plomo, litoponio, óxido de zinc y otros metales (Pereira y Nefussi, 1986).

El cadmio está cercanamente relacionado con el Zn en sus propiedades químicas y se encuentra como contaminante en muchos minerales que contienen Zn (Bhamra, R y M. Costa, 1992).

De acuerdo a Pereira y Nefussi (1986) los usos principales del cadmio son los siguientes:

- la deposición electrolítica en galvanoplastia
- las aleaciones con plata, cobre, latón y bronce
- la producción de pigmentos, esmaltes y lacas
- la fabricación de acumuladores de cadmio-níquel
- la manufactura de barras de control de reactores nucleares
- la fabricación de compuestos de cadmio
- la soldadura

El enriquecimiento de los suelos para la agricultura con cadmio se ha debido principalmente al uso frecuente de fertilizantes que contienen grandes concentraciones de este metal y a la aplicación de aguas residuales, así también como de los depósitos atmosféricos, cuyo principal ejemplo en éste último caso son las industrias (Lugon-Moulin *et al.*, 2006). Además los usos industriales del cadmio cada vez son más grandes, principalmente destaca la industria galvánica, y por mencionar otros como la industria encargada de hacer placas eléctricas, pigmentos para pintura, plásticos, aleación, minería, cerámica y plata-cadmio (Lodeiro *et al.*, 2005).

Ya que este metal se encuentra en los cultivos y las plantas lo absorben, es importante eliminarlo, ya que el hombre consume muchos de los productos que se obtienen de la actividad agrícola (Lugon-Moulin *et al.*, 2006). El cadmio es particularmente peligroso porque pertenece a los metales cuyos iones son más rápidamente tomados por las raíces de las plantas (Clemens, 2006) y es transportado o translocado al tallo y puede llegar a las hojas y frutos, como en el caso de la planta del tabaco, por varios sistemas de transporte que no son específicos para el cadmio. Durante este proceso de transporte, el cadmio puede competir con otros elementos que igual que él son transportados como nutrientes (Lugon-Moulin *et al.*, 2006).

Se ha reportado que el cadmio induce estrés oxidativo mediante la generación de radicales libres y especies tóxicas de oxígeno. Estas especies reaccionan con lípidos, proteínas, pigmentos, y ácidos nucleicos y causan peroxidación lipídica, daño en la membrana e inactivación de enzimas, esto afectando la viabilidad de la célula (Singh *et al.*, 2006).

El cadmio puede reemplazar al zinc como nutriente en plantas y animales (Lodeiro *et al.*, 2005). La interacción del cadmio con otros elementos puede ser dependiente de la concentración. Por ejemplo se sabe que hay interacciones entre el zinc y el cadmio los cuales son químicamente cercanos. Se ha reportado que estos iones no permiten la toma de cada uno en la membrana plasmática de la raíz de semillas húmedas (Lugon-Moulin *et al.*, 2006). La entrada del cadmio a las células de las plantas es mediante la vía de los transportadores del Zn^{2+} , Fe^{2+} y Ca^{2+} (Clemens, 2006).

El cadmio es un metal tóxico ha sido por mucho el más estudiado en plantas y algas. Es un contaminante relevante y tiene biodisponibilidad que es por mucho mayor que la del plomo, el arsénico y el mercurio. Es fácil trabajar con él en el laboratorio. En contraste con el plomo, por ejemplo, el cadmio puede ser añadido a un medio de crecimiento como una simple sal de cloruro o sulfato y puede permanecer en solución en las condiciones más pertinentes (Clemens, 2006).

El cadmio plantea grandes problemas a la salud humana ya que se va acumulando en el medio ambiente y pasa a través de la cadena trófica (Lodeiro *et al.*, 2005). Los límites permisibles para el plomo y el cadmio en agua potable son de 0.05 y 0.01 mgL^{-1} respectivamente en la mayoría de los países (Puranik y Paknikar, 1999).

El cadmio es un metal potencialmente tóxico que ha sido clasificado para el humano como un agente carcinogénico por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (Lugon-Moulin *et al.*, 2006).

Alguno de sus perjuicios para la salud es que en altas concentraciones de este metal, puede causar daño renal y testicular en animales. El cadmio se acumula tanto en el riñón como en el hígado. Sin embargo en el hígado, el cadmio es sujetado por las metalotioneínas, mientras en el riñón, las metalotioneínas son rotas por los lisosomas lo cual permiten que el cadmio se acumule (Moore, 2002).

De acuerdo a Pereira y Nefussi (1986) los principales signos y síntomas de la intoxicación en el hombre son:

En la inhalación de aerosoles:

- irritación de las vías respiratorias
- enfisema y fibrosis pulmonar progresiva

En la ingestión de bebidas y alimentos contaminados:

- salivación, náuseas, vómitos y diarrea
- debilidad, fatiga y anorexia
- dolores abdominales y musculares
- severas alteraciones hepáticas y renales

Los límites de tolerancia en humanos son:

Polvos y sales = 0.05 mg/m^3 ; humos de CdO = 0.05 mg/m^3 (valor umbral)

Cadmio en la sangre LTB = $1 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ mL}$; cadmio en la orina LTB = $10 \text{ } \mu\text{g}/\text{g}$ de creatinina; metalotioneína en la orina; proteínas de bajo peso molecular en la orina.

El único caso masivo de muerte por toxicidad con cadmio fue reportado en 1950 en Japón, debido al consumo de arroz con grandes cantidades de

cadmio, ya que los campos de arroz habían sido irrigados con agua contaminada con un alto contenido de Cd, provenientes de una mina cercana de Zn (Aoshima *et al.*, 2006).

2.5 Biotecnología ambiental

Las tecnologías convencionales usadas para remediación de ecosistemas *in situ* y *ex situ* son destructivas ambientalmente y son altamente costosas (Gisbert *et al.*, 2003). Existen varias tecnologías físico-químicas para el tratamiento de suelos contaminados con material orgánico o peligroso. Estas incluyen: extracción por vapor, estabilización, solidificación, tratamiento de suelo, lavado de suelo, desorción térmica, vitrificación e incineración (Zappi *et al.*, 1996; Balba *et al.*, 1998). La implementación a gran escala de éstas son muy costosas, requieren de un continuo monitoreo y control para su óptimo desempeño; además, generalmente no eliminan completamente los contaminantes (Yerushalmi *et al.*, 2003).

Una gran variedad de estrategias tecnológicas se están desarrollando para el tratamiento de estos productos, incluyendo esquemas biotecnológicos que remuevan las sustancias xenobióticas¹ que envenenan el ambiente (Balbás, 2002).

2.6 Biorremediación

La biorremediación es la remoción de elementos contaminantes del suelo y el agua (Eapen y D'Souza, 2005). El uso de materiales biológicos para limpiar suelos contaminados con metales pesados ha sido determinado como una forma eficiente y oportuna de biorremediación (Gisbert *et al.*, 2003).

¹ El término xenobiótico se refiere a sustancias no naturales, sintéticas o extrañas que no se producen en la naturaleza (Balbás, 2002).

Los organismos poseen diversos mecanismos para mantener concentraciones libre de metales a niveles que no excedan los requerimientos celulares. Estos mecanismos incluyen la cubierta de la pared celular, los cambios en la permeabilidad de iones, extrusión activa, biotransformación, quelación extra e intracelular, y compartimentalización (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Se utilizan bacterias, hongos, algas y plantas para recuperar metales de suelos y aguas en sitios como minas metálicas, industrias metal-mecánicas y cromadoras, entre otras, que generan enormes problemas de contaminación (Balbás, 2002)

Ante los problemas de contaminación en suelo y agua, recientemente han surgido varias áreas de estudio dentro de la biotecnología con el objetivo de aminorar o eliminar en su totalidad estos problemas, a continuación se resumen los procesos más importantes.

2.6.1 Bioabsorción

La bioabsorción puede ser considerada como una técnica alternativa para remover contaminantes tóxicos de aguas contaminadas. Es un proceso pasivo en el cual los tejidos de algunos organismos pueden retener relativamente altas cantidades de iones metálicos en molécula orgánicas particulares. La capacidad de bioabsorción de cualquier molécula depende de varios factores: el número de sitios del material bioabsorbente (grupos carboxilo, hidroxilo, amino, carbonilo, etc), su accesibilidad, su estado químico, y la afinidad entre los sitios activos de la molécula absorbente y el metal (Lodeiro *et al.*, 2005).

Algunas bacterias, algas y plantas son capaces de unir a sus células metales como oro, zinc, cobre, plomo, níquel, aluminio, cadmio, bismuto, mercurio y

plata. Este proceso involucra dos grupos de moléculas dependiendo del metal particular: fitoquelatinas y metalotioneínas. Las fitoquelatinas son moléculas orgánicas que generalmente atrapan cadmio, mercurio y arsénico. Las metalotioneínas son proteínas de alto peso molecular que pueden ser muy selectivas en la acumulación de metales como plomo y zinc. Se han generado metalotioneínas sintéticas gracias a la tecnología del ADN recombinante, ya que se han construido genes híbridos que contienen los dominios de unión del metal junto con proteínas que forman la membrana de los organismos (Balbás, 2002).

2.6.2 Bioacumulación

La bioacumulación es un proceso activo de acumular metales por células vivas de plantas, algas y bacterias, las cuales dependen de las rutas metabólicas de la célula (Lodeiro *et al.*, 2005). El proceso involucra quelación de los metales en moléculas orgánicas, transporte y translocación de los complejos a órganos específicos, compartimentalización subcelular en vacuolas y la eventual transformación de estado de oxidación de los metales.

2.7 Fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología emergente que utiliza plantas para remover, transformar o estabilizar contaminantes localizados en agua, sedimentos o suelos (Gisbert *et al.*, 2003). Las grandes ventajas que tiene la fitorremediación es que es efectiva, económicamente viable y ambientalmente no destructiva (Zhu Yong *et al.*, 1999).

Las plantas tienen la habilidad única de concentrar elementos esenciales y no esenciales del suelo a través de las raíces (Eapen y Souza, 2005). La hipertolerancia a los metales se presenta sólo en ciertas especies de plantas,

aunque existe una tolerancia basal baja en prácticamente todas las especies de plantas (Clemens, 2006).

La vegetación que crece en sitios contaminados ha desarrollado mecanismos de tolerancia a los ambientes inadecuados, por lo tanto es flora bien adaptada, tolerante a condiciones edafoclimáticas particulares. Por lo cual resulta muy útil para la fitorremediación (Gisbert *et al.*, 2003).

La estrategia de la fitorremediación que se adopta para la recuperación de ecosistemas particulares puede ocupar dependiendo del contaminante en cuestión, cinco procesos fundamentales:

2.7.1 Extracción

La fitoextracción es el uso de plantas acumuladoras de contaminantes. El proceso se sustenta en que las plantas tienen la capacidad de translocar los contaminantes a las partes aéreas (Fitz y Wenzel, 2002). Esto lo logran aprovechando el sistema de adquisición de nutrientes de las plantas para conseguir la máxima acumulación en los tejidos de elementos traza que se encuentran por debajo del suelo (Krämer y Chardonnens, 2001).

2.7.2 Estabilización

La fitoestabilización consiste en la estabilización física de tierras contaminadas, por medio del uso de plantas hipertolerantes a contaminantes orgánicos. Su finalidad es amortiguar la dispersión de contaminantes tóxicos a través de prevenir una mayor erosión del suelo, reducir el transporte por el aire, y evitar la filtración a los mantos acuíferos (Fitz y Wenzel, 2002).

2.7.3 Inmovilización

La fitoinmovilización es el uso de plantas para disminuir la movilidad y bioviabilidad de las sustancias tóxicas en el suelo. Este proceso se lleva a cabo

mediante la alteración de propiedades físicas y químicas del suelo con el fin de disminuir la movilidad del contaminante, por la formación de precipitados y de compuestos insolubles y por la absorción en raíces (Fitz y Wenzel, 2002).

2.7.4 Volatilización

La fitovolatilización es un proceso en el cual, los tejidos de las plantas, en lugar de acumular los metales traza los transforman enzimáticamente en sustancias volátiles, que posteriormente son liberadas a la atmósfera. El mercurio y el selenio son metales que son transformados por esta vía (Krämer y Chardonnens, 2001).

2.7.5 Filtración

La rizofiltración es la acumulación de metales en las raíces de la planta. Esta estrategia es útil para remover metales pesados de cuerpos de agua, de sedimentos y de suelos contaminados. Los procesos que se llevan en la rizósfera se consideran que juegan un papel clave en la mejora de las tecnologías de fitorremediación (Fitz y Wenzel, 2002).

2.7.6 Hiperacumulación

Nadie sabe por qué algunas plantas acumulan metales en lugar de mantenerlos fuera de ellas. Una teoría es que los metales mantiene a las plagas de insectos alejados impidiéndoles alimentarse (Gisbert *et al.*, 2003). Las plantas que tienen estas capacidades pueden resultar muy útiles en procesos de biorremediación, en particular las plantas hiperacumuladoras.

El término hiperacumulador se usa en plantas que pueden acumular altas concentraciones de metales en cualquier tejido (Eapen y D'Souza, 2005). Acumulan concentraciones entre uno y tres órdenes mayores de magnitud, que

aquellas plantas con tolerancia basal (Krämer y Chardonnens, 2001). Se sabe que las plantas hiperacumuladoras son capaces de crecer en suelos contaminados con metales tóxicos y acumular extraordinarios niveles de éstos (más de 0.1% de metales pesados por peso seco en el tejido de la planta², 0.01% para cadmio). Hasta la fecha más de 500 especies hiperacumuladoras han sido identificadas (Gisbert *et al.*, 2003). Ha sido confirmada la hiperacumulación para cadmio (más de 0.2% Cd en biomasa seca de brote), cobalto (mayor a 1.2% Co en biomasa seca de brote), níquel (más de 3.8% Ni en biomasa seca de brote) y zinc (más de 4% Zn en biomasa seca de brote) (Baker y Brooks, 1989; Lombi *et al.*, 2000). Hay poblaciones de *Thlaspi caerulescens*, planta conocida en el sur de Francia, que exhiben una hiperacumulación de cadmio de 0.3% de peso seco en sus hojas (Clemens, 2006).

Las plantas hiperacumuladoras pueden resultar muy útiles en operaciones de limpieza de sitios contaminados con metales pesados. Ya que las plantas pueden almacenar metales pesados en tallos, hojas y raíces, resulta relativamente sencillo cosechar las plantas, secarla y después por procesos químicos recuperar el metal y en algunos casos reciclarlos. Algunas de las plantas hiperacumuladoras que han sido identificadas, tienen baja biomasa y lento crecimiento y si se utilizaran para descontaminar un lugar contaminado tomaría muchos años recuperar un ecosistema (Gisbert *et al.*, 2003). Por lo cual resulta indispensable localizar plantas con potencial de utilización en proceso de fitorremediación.

² El porcentaje de acumulación en peso seco en el tejido de la planta depende del metal particular y del autor.

Un fitoextractor ideal debe cumplir con los siguientes requisitos:

- tener crecimiento rápido
- presentar alta biomasa
- tolerar y acumular altas concentraciones de metales pesados
- contener sustancias que alejen a los herbívoros (Gisbert *et al.*, 2003).
- presentar alta producción de semillas
- que exista la translocación de los metales a la parte aérea de la planta

2.8 Biotecnología vegetal

La biotecnología vegetal utiliza diferentes técnicas como el cultivo de tejidos, la variación somaclonal y la selección *in vitro*, para desarrollar germoplasma mejorado. La variación somaclonal y la selección *in vitro* han demostrado ser una opción apropiada para el desarrollo de nuevas variedades de plantas hiperacumuladoras de metales pesados (Nehnevajova *et al.*, 2007).

Se han reportado líneas celulares de tomate con alta tolerancia a cadmio y cobre; plantas de *Ginkgo biloba* acumuladoras de cadmio (Nehnevajova *et al.*, 2007); variedades de tabaco resistentes a manganeso, plomo, cadmio y cobre (Santandrea *et al.*, 2000)

Una alternativa de mejoramiento es la utilización de ingeniería genética para obtener variedades vegetales con grandes capacidades de acumulación de metales pesados. Se aíslan e insertan genes de resistencia o de acumulación en plantas no acumuladoras, que presentan otras características de interés como alta biomasa y rápido crecimiento (Gisbert *et al.*, 2003). Por ejemplo el equipo de investigación Zhu *et al.* (1999), sobre expresaron el gen de *Escherichia coli* gsh1 que codifica para la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS),

en *Brassica juncea*. Las líneas de semillas transgénicas mostraron un incremento en la tolerancia a cadmio. Por otro lado Mendoza-Cózatl *et al.* (2005) modificaron plantas de tabaco con el gen γ -glu-cys-gly; GSH y obtuvieron un aumento de 15% de acumulación de cadmio en vacuolas.

Las plantas acuáticas también pueden llevar a cabo fitorremediación. Singh *et al.* (2006) estudiaron la habilidad de una macrofita acuática, *Bacopa monnieri* para acumular cadmio en raíces y hojas. Encontraron que se presenta una mayor acumulación en raíces hasta concentraciones de 200 μ M de cadmio, pero también presenta un decaimiento en la producción de clorofila y contenidos proteínicos

2.9 Mejoramiento con Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo *in vitro* es una de las herramientas clave de la biotecnología vegetal que explota la totipotencialidad³ natural de las células de las plantas. El cultivo de tejidos, alternativamente llamado cultivo celular de tejidos y órganos se realiza en condiciones ambientales y nutricionales controladas y asépticas (Debergh y Read, 1991). Esta técnica puede ser empleada para propagación de clones libre de enfermedades a gran escala, para la conservación del pool genético de las especies, para la producción de plantas ornamentales y para la realización de estudios bioquímicos y moleculares de plantas. Tiene también una importancia central en procesos de mejoramiento genético de plantas cultivadas y silvestres.

³ La totipotencialidad es un concepto propuesto por Haberlandt (1902) e inequívocamente demostrado, por primera vez, por Steward, *et al.*, (1958).

Algunos tejidos de las plantas presentan crecimiento indeterminado como es el caso de tallos y raíces, ya que los meristemas que los producen pueden proliferar indefinidamente, siempre y cuando las condiciones sean favorables. Las plantas conservan células totipotenciales durante todo su ciclo de vida, lo cual les brinda la capacidad de regeneración completa a partir de pequeñas porciones de la planta (Balbás, 2002).

El cultivo de células vegetales presenta ventajas como: las células presentan rápido crecimiento en comparación con las plantas en suelo, son sistemas controlados, puede obtenerse una respuesta inmediata a las variables demandas, pueden aislarse metabolitos novedosos (Thorpe, 2007).

Un medio de cultivo contiene generalmente reguladores de crecimiento, en su mayoría auxinas y citocininas, muchos estudios se enfocan en determinar las interacciones entre estas y otras sustancias activas de crecimiento (Kumar *et al.*, 1998).

La reproducción de plantas *in vitro* puede darse por dos rutas: organogénesis y embriogénesis somática. En la organogénesis las plantas se reproducen por formación secuencial de órganos vegetales. Primero tallo y hojas y después raíces. La organogénesis puede llevarse a cabo de manera directa e indirecta. La embriogénesis somática involucra la formación embriones bipolares, semejantes a los cigóticos, a partir de una célula somática. Estos embriones pueden germinar y formar plantas completas (Thorpe, 2007). La embriogénesis puede llevarse a cabo de manera directa e indirecta.

Las condiciones de organogénesis y embriogénesis *in vitro*, son variables para cada especie vegetal (Balbás, 2002) y están influenciadas por los siguientes factores: reguladores de crecimiento como la auxina y la citocinina, luz, temperatura y carbohidratos (Pasqua *et al.*, 2002).

El cultivo de tejidos vegetales ha resultado una herramienta muy valiosa para la propagación comercial de cultivos industriales, plantas ornamentales y hortalizas. Las condiciones son variables para cada especie vegetal (Debnath *et al.*, 2006).

La micropropagación es un método alternativo de propagación vegetativa, el cual es muy adecuado para la multiplicación de clones élite. De acuerdo con Rout *et al.* (2006) la micropropagación ocurre en cuatro diferentes etapas:

- iniciación de cultivos (depende del tipo de explante o la etapa fisiológica de la planta donante al tiempo de corte)
- multiplicación de brotes (se alcanza utilizando reguladores de crecimiento)
- enraizamiento (la inducción de raíces puede ser *in vitro* o *ex vitro*)
- aclimatización gradual de las plantas en condiciones de laboratorio e invernadero

2.10 *Nicotiana glauca* Graham

2.10.1 Descripción botánica

Nicotiana glauca Graham pertenece a la familia Solanaceae. Es un arbusto que alcanza alturas hasta de 7 metros. Son arbustos poco ramificados, que

presentan hojas simples lanceoladas, alternas, de 3 a 25 cm de longitud, con un pecíolo de 4 a 5 cm de longitud; tienen tallo glabro, glauco, verdoso o azul-púrpura; tienen flores que forman inflorescencias paniculiformes terminales, hermafroditas, actinomorfas, pentámeras, de forma tubular-acampanada, de 2.5 a 3 cm de longitud, de color amarillo y agrupadas en panículas. Su fruto, es una cápsula de 0.8-1.0 cm de longitud, pardusca, erguida, con numerosas semillas de pequeño tamaño con testa reticulada. La planta florece durante casi todo el año, aunque con mayor abundancia en los meses de verano (Rojo y Rodríguez, 2002).

N. glauca es nativa de Argentina y Uruguay (Rojo y Rodríguez, 2002), frecuentemente es una planta pionera en muchos ecosistemas perturbados y en sitios húmedos con desechos. Tiene un amplio rango de distribución a lo ancho del mundo. Por lo tanto, la podemos encontrar creciendo en caminos, muros, casas abandonadas, escombreras, sitios áridos y pedregosos (López, 2002).

2.10.2 Usos

Su uso medicinal como sustancia tópica varía en las diferentes culturas. Las hojas sin la capa epidérmica, se emplean para el tratamiento de las paperas, molidas se aplican en forma de emplastos para curar granos infectados y piquetes de hormiga, calientes o maceradas en un poco de alcohol, se aplican en las sienes para mitigar el dolor de cabeza, machacadas se aplican con un poco de alcohol o manteca a manera de cataplasma para tratar los dolores reumáticos. También se utilizan las ramas y las hojas hervidas o en alcohol

para el dolor de muelas, granos, reumas, estómago inflamado y dolor por golpes (Juscafresa, 1995). Sin embargo, se sabe que es una planta tóxica, ya que contiene al igual que *N. tabacum*, alcaloides como nicotina y anabasina (Solt *et al.*, 1960; López, 2002).

Esta planta presenta rápido crecimiento, alta producción de biomasa (Barazani *et al.*, 2004) y sintetiza sustancias repulsivas a herbívoros (Gisbert *et al.*, 2003). Por estas características *N. glauca*, es considerada un modelo ideal para llevar a cabo estudios de fitorremediación.

En diferentes estudios con esta planta se ha observado que tiene tolerancia a metales pesados como plomo, zinc y cobalto. Recientemente se ha aislado de esta planta un gen de una metalotioneína NgMTP1, que ha sido relacionado en levaduras con quelación de zinc y cobalto (Baranzani *et al.*, 2004; Shingu *et al.*, 2005).

Nicotiana glauca tiene un gran potencial para utilizarse en procesos de fitorremediación. Tiene un poderoso sistema de raíces capaz de atrapar metales de suelos muy profundos, bajos requerimientos de nutrientes, resistencia a la sequía y a los metales pesados, adaptación a amplias áreas geográficas (América continental, Australia y partes de Europa), produce alta biomasa (aproximadamente 10 veces más que *Brassica juncea*), es fácil de cosechar, presenta altas capacidades de multiplicación vegetativa y producción de metabolitos secundarios que repelen herbívoros (Gisbert *et al.*, 2003).

2.11 Fitorremediación en *Nicotiana glauca* Graham y *Nicotiana tabacum*

El grupo de Gisbert *et al.* (2003) llevó a cabo los primeros pasos de la ingeniería a la tolerancia en metales pesados en varias plantas silvestres seleccionadas, *Nicotiana glauca* Graham fue una de ellas. La tolerancia se obtuvo a partir de la transformación de las plantas con el gen PC sintetasa (TaPCS1) y su subsecuente determinación específica para plomo y cadmio para acumular estos metales pesados (Gisbert *et al.*, 2003).

Los mecanismos fisiológicos, genéticos y moleculares de las plantas tolerantes al manganeso no son claros aún. El grado de tolerancia o de toxicidad varía generalmente en diferentes especies y ambientes. En la lechuga y en la soya parecer ser controlado por varios genes (Santandrea *et al.*, 2000).

Un factor importante de la toxicidad por manganeso es representado por la interacción con otros elementos minerales y particularmente con hierro. El manganeso parece interferir en el metabolismo de hierro, ya que al incrementar el contenido de éste en el suelo decrece la toma de manganeso al mismo tiempo. (Santandrea *et al.*, 2000).

En una investigación realizada por Santandrea *et al.* (2000) el proceso gradual en condiciones *in vitro* les permitieron obtener líneas regeneradas de plantas de *Nicotiana tabacum* que crecen en presencia de 2 μ M y 5 μ M de manganeso. Estas plantas muestran varias diferencias tanto morfo-fisiológicas como citológicas.

3. Objetivos

Objetivo general

Obtener líneas celulares hiperacumuladoras de cadmio de *Nicotiana glauca* Graham a través de selección masal en cultivos *in vitro*.

Objetivos particulares

- Establecer un sistema de micropropagación para la especie.
- Determinar dosis letal media de cadmio *in vitro*.
- Establecer un sistema de selección *in vitro*.
- Obtención de líneas celulares hiperacumuladoras de cadmio.

4. Justificación

Ante la enorme problemática que representa la presencia de suelos contaminados con metales pesados en México resulta muy importante generar tecnologías para remover estos contaminantes de los ecosistemas.

Nicotiana glauca es una planta que posee características muy favorables para ser empleada en procesos de limpieza ambiental: rápido crecimiento, alta biomasa, produce sustancias herbicidas, se adapta a una amplia gama de condiciones ambientales, resiste altas concentraciones de diversos contaminantes, acumula en sus tejidos altas concentraciones de metales pesados. Además es una planta con grandes capacidades regenerativas, que la hacen una planta muy adecuada para establecer con ella un protocolo de micropropagación. Por estas razones fisiológicas, morfológicas y prácticas, *N. glauca* es una planta ideal para llevar a cabo esta investigación con fines de fitorremediación.

Para desarrollar todo el potencial genético de esta especie con fines de fitorremediación, es necesario establecer procesos de mejoramiento genético con esta planta. El mejoramiento genético *in vitro* puede resultar muy adecuado porque acorta los tiempos de selección y las condiciones de cultivo por sí mismas generan variación somaclonal, que permite a su vez obtener individuos élite. Con la intención de colaborar en este sentido se realizó la presente investigación planteando los objetivos que a continuación se anotan.

5. Metodología

5.1 Estrategia desarrollada

Esta investigación se realizó en tres etapas (**Figura 1**), en la primera etapa se hizo trabajo de gabinete, la segunda consistió en trabajo de campo y la tercera fue de trabajo en el laboratorio.

5.1.2 Primera etapa

En esta etapa, se realizaron tres actividades: se estableció el estado del arte de la fitorremediación, de la propagación de la planta, y de los procesos de mejoramiento *in vitro*; se realizó un estudio de herbario y se elaboró una base de datos. Para establecer el estado del arte se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos especializadas y en Internet de *N. glauca*. Se hizo un estudio en el Herbario Nacional de la UNAM (MEXU) de todas las carpetas existentes de *N. glauca* para establecer su distribución en el territorio nacional y las condiciones edáficas y climáticas en las que se desarrolla. Se elaboró una base de datos de *N. glauca* con la información obtenida en el estudio de herbario.

Estudio de herbario

La investigación de herbario se realizó en el mes de agosto del 2006 en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (MEXU). Se revisaron las 20 carpetas existentes de colectas nacionales de *N. glauca*. Con la información recabada se elaboró una base de datos, la cual incluyó los siguientes rubros: localización, altitud, tipo de suelo, usos, hábitat y altura de la planta.

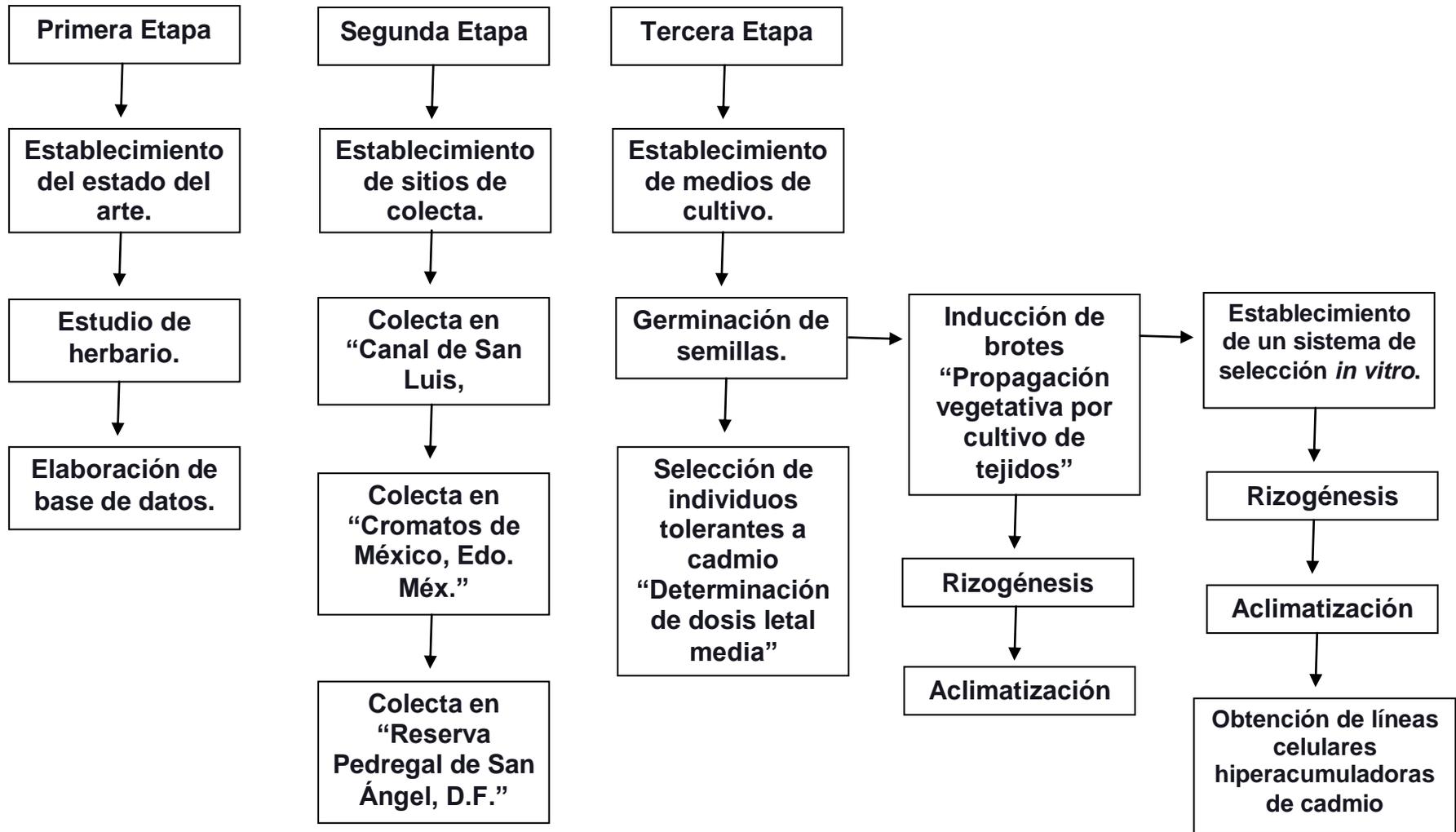


Figura 1. Estrategia General.

5.1.2 Segunda etapa

En esta etapa se establecieron los sitios de muestreo y se llevó a cabo la recolección de semillas en dos localidades del país: El Canal de San Luis en Xochimilco, D.F y la planta abandonada de Cromatos de México, en el municipio de Tultitlán Edo. De México. Debido a que se agotaron las semillas de estos sitios de muestreo al terminar los primeros dos experimentos, se realizó una colecta más, pero esta vez en la Reserva del Pedregal de San Ángel. Es importante aclarar entonces que para los experimentos de **“selección de individuos tolerantes a cadmio”** y para el **“establecimiento de un sistema de selección *in vitro*”** se utilizaron semillas de un sitio no contaminado.

Material vegetal

Las semillas de *N. glauca* que se emplearon en este trabajo se colectaron en dos localidades: La Ex planta de Cromatos de México, localizada en Tultitlán, Edo de México y la zona chinampera del pueblo de San Luis Tlaxialtemalco, en la delegación Xochimilco, D.F. Las semillas se colectaron en el mes de julio del 2007, se limpiaron y se almacenaron a 4°C. La colecta de semillas de la Reserva del Pedregal de San Ángel se realizó en el mes de abril del 2008.

5.1.3 Tercera etapa

En la etapa de laboratorio, se determinaron las condiciones óptimas de germinación para la especie, se hicieron experimentos para establecer un protocolo de micropropagación para la especie, vía organogénesis, se estableció un sistema de selección *in vitro* de somaclonas de *N. glauca*, hiperacumuladoras de cadmio y se seleccionaron individuos resistentes a cadmio a partir de semilla.

Medios de cultivo

El medio básico utilizado para todos los experimentos realizados durante esta investigación fue Murashige-Skoog, 1962 (MS), adicionado con 30 gL⁻¹ de sacarosa y 8 gL⁻¹ de agar. Se ajustó el pH a 5.7 con KCl y KOH 1N. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C (1.5 Kg/cm² de presión) (Ver Anexo 1).

Germinación de semillas

Las semillas se desinfectaron con el siguiente procedimiento: se colocaron en un microtubo de 1.5 mL con una solución jabonosa ligera y se agitaron durante 1 minuto, para eliminar basura y polvo; con ayuda de una jeringa hipodérmica se retiró la solución jabonosa; y después se enjuagaron con agua corriente también con ayuda de una jeringa hipodérmica (este paso se realizó tres veces); se agregó a las semillas alcohol al 70% durante un minuto para eliminar aceites, grasas y ceras; después las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (a partir de la solución comercial) durante 20 minutos, en agitación constante. En la campana de flujo laminar se removió la solución bajo condiciones estériles con ayuda de una jeringa hipodérmica estéril. Las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril empleando una jeringa estéril. Se sembraron veinte semillas en frascos de vidrio con capacidad de 125 mL con 25 mL de medio MS. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Los frascos con las semillas se mantuvieron en una incubadora a 25 °C ± 1, bajo una radiación de 0.1 watt/m², en fotoperiodo largo (16 h luz, 8 h de oscuridad). Estas condiciones ambientales se mantuvieron para todos los experimentos. Los datos obtenidos fueron procesados por estadística descriptiva.

Inducción de brotes

Se probó el efecto de diferentes concentraciones de dos citocininas: Kinetina (K) y 6-bencilaminopurina (BAP), solas y en combinación con dos auxinas: ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4-D), para la inducción de brotes en hojas de *N. glauca*. Se utilizaron como explantes porciones de hoja de 1.5 cm² de plantas de dos meses de edad, germinadas *in vitro*. Se probaron doce tratamientos (Tabla 1). Se colocaron cuatro explantes en frascos de vidrio de 125 mL con 25 mL de medio de cultivo. Se hicieron cinco repeticiones por tratamiento. Los experimentos se repitieron dos veces. Los frascos se colocaron en las condiciones antes mencionadas. La respuesta se evaluó después de 45 días de tratamiento por el número de brotes por explante y por el peso fresco de brotes por explante. Los datos obtenidos fueron procesados por estadística descriptiva.

Tabla 1. Tratamientos aplicados para la inducción de brotes de *Nicotiana glauca*.

Tratamiento	Citocinina (mgL ⁻¹)	Auxina (mgL ⁻¹)
1	K 1	0
2	K 2	0
3	K 1	ANA 0.1
4	K 2	ANA 0.2
5	K 1	2,4-D 0.1
6	K 2	2,4-D 0.2
7	BAP 1	0
8	BAP 2	0
9	BAP 1	ANA 0.1
10	BAP 2	ANA 0.2
11	BAP 1	2,4-D 0.1
12	BAP 2	2,4-D 0.2

Rizogénesis

Para inducir la formación de raíces en los brotes obtenidos, se probó el efecto del ácido indolbutírico (IBA) a dos concentraciones distintas (0.00, 0.50 y 1.00 mgL⁻¹). Se colocaron cuatro brotes de *N. glauca* (obtenidos con 2 mgL⁻¹ de BAP) en frascos de vidrio de 125 mL con 25 mL de medio MS. Se hicieron diez repeticiones por tratamiento y los experimentos se repitieron dos veces. Los frascos se mantuvieron en las condiciones ambientales antes descritas. La respuesta se evaluó, después de cuatro semanas de tratamiento, visualmente considerando presencia y el grado de desarrollo de las raíces.

Aclimatización

Las plantas enraizadas se transplantaron a macetas una mezcla de agrolita y tierra negra. Esta mezcla se colocó en macetas y en vasos de unicel, posteriormente se colocaron las plantas enraizadas. Se mantuvo la humedad relativa alta y se fue reduciendo ésta paulatinamente, mediante la implementación de una bolsa de plástico a la cual se le hicieron agujeros paulatinamente. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero.

Establecimiento de un sistema de selección in vitro

Con la finalidad de obtener brotes con una alta capacidad de resistencia al cadmio, se establecieron experimentos de inducción de brotes en presencia de diferentes concentraciones del contaminante (CdCl₂). Las concentraciones probadas de cloruro de cadmio fueron las siguientes: 25, 50, 100, 150, 175, 200, 300 y 400 μM. Se empleó como medio de inducción: medio MS con la mitad de los macronutrientes, 4 gL⁻¹ de sacarosa y con 2 mgL⁻¹ de BAP. Se utilizaron explantes de hojas de dos meses de edad de *N. glauca* germinadas *in vitro*. Se colocaron cuatro explantes en cajas Magenta GA7 con 25 mL de

medio MS. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Los frascos se mantuvieron en las condiciones ambientales antes descritas. La respuesta se evaluó después de 45 días de tratamiento por el número de brotes por explante y por el peso fresco de brotes por explante. Los datos obtenidos fueron procesados por estadística descriptiva.

Selección de individuos tolerantes a cadmio

Para identificar la concentración de CdCl_2 adecuada para la selección de individuos tolerantes, se probó el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 175 μM , 200 μM , 300 μM y 400 μM) sobre la germinación de las semillas. Las semillas se desinfectaron con el procedimiento antes descrito. Se sembraron veinte semillas en frascos con 25 mL de medio MS adicionado con la mitad de los macronutrientes, con 4 gL^{-1} de sacarosa y con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (CdCl_2). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Los frascos se mantuvieron en las condiciones antes descritas. Después de 7 días se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas y se consideraron germinadas aquellas con la radícula emergida. Los datos obtenidos fueron procesados por estadística descriptiva.

6. Resultados y Discusión

6.1 Primera etapa

Estudio de herbario

El resultado de la investigación de herbario realizada en el MEXU mostró que *Nicotiana glauca* Graham presenta una amplia distribución en el país. Se le encuentra creciendo en diversos sitios con condiciones edáficas y climáticas muy diversas. Ésta especie ha sido colectada en 26 entidades federativas (**Tabla 2**), localizadas en el norte, centro y sur de la República Mexicana. La planta se desarrolla desde los 5 hasta los 2650 m.s.n.m. Los ejemplares pueden alcanzar hasta 10 m de altura. Los resultados obtenidos de esta sección coinciden con lo descrito en la literatura sobre *N. glauca* (Juscafresca, 1995; Rojo y Rodríguez, 2002; López, 2002).

N. glauca es una planta con amplias capacidades ecológicas, se encuentra en matorrales, pastizales, dunas, bosques mixtos, y bosques templados, especialmente en sitios con disturbio. (**Tabla 2**). La especie puede adaptarse a ambientes edáficos muy diversos, con diferentes texturas, grados de humedad y salinidad. Es una planta ruderal y oportunista de ambientes con disturbio. Se encuentra creciendo en lugares inhóspitos, tales como coladeras, avenidas, terrenos baldíos, efluentes contaminados, tiraderos de basura, a la orilla de carreteras y laderas y zonas agrícolas abandonadas.

Con el estudio de herbario realizado se puede señalar que la especie aprovecha aquellos sitios vacíos en los ambientes que presentan disturbios. No podríamos afirmar que *N. glauca* sea una planta que desplace a otras

especies, pero sí nos muestra que probablemente sea una especie indicadora de ambientes con disturbio, con afectaciones variables y a distinto nivel de magnitud, y de sitios contaminados. Sería muy interesante comprender si existe una relación con el grado de disturbio del ambiente y la abundancia de la planta.

Tabla 2. Ejemplares de referencia de *Nicotiana glauca* presentes en el Herbario Nacional, UNAM (MEXU). Se resumen las características documentadas en las etiquetas de los ejemplares. SD (Sin Datos).

Estados	Número de ejemplares colectados	Altitud (m.s.n.m)	Altura de los ejemplares (m)	Características del sitio de colecta
Aguascalientes	1	1700	10	-Zonas perturbadas de bosque esclerófilo. -Regosol eutríco. -Cambisol eutríco.
Baja California	15	720	3.5	-Suelos arenosos salitrosos. -En un estacionamiento. -En los márgenes de la carretera. -Al margen de dunas de arena
Baja California Sur	1	SD	SD	-Vegetación secundaria de bosque de <i>Quercus castanea</i>
Chihuahua	2	1680; 1720	2.2	-Zonas perturbadas de selva baja caducifolia. -Suelos yesosos. -En áreas de cultivo abandonadas y con especies introducidas de <i>Taxodium</i> , <i>Populus</i> y <i>Eucalyptus</i> .
Coahuila	6	6500 ¹	SD	-Zonas perturbadas de bosque de encino-pino. -Zonas perturbadas de matorral xerófilo con presencia de tezontle. -En dunas de arena de Bilbao. -En los márgenes de la carretera.
Colima	1	SD	SD	SD
Distrito Federal	23	1530;	SD	-En orillas de canales y caminos de terracería.

¹ Este dato no concuerda con la elevación más alta reportado para México, la cual es el Pico de Orizaba con 5610 m.s.n.m.

		1320; 5000 ²		-Asociada a pastos y en el Jardín Botánico de la delegación Iztapalapa. -Al oriente del río Magdalena y al sur del Pedregal de San Ángel.
Durango	11	1000; 1400; 2242; 18; 980; 1675	5; 8	-En matorral con vegetación perturbada. -En suelo húmedo. -Nitosoles -En orillas de canales de riego.
Estado de México	24	2140; 1390; 2160; 2470	SD	-En vegetación perturbada con bosques bajos con <i>Fouquieria</i> , <i>Cordia</i> , <i>Acacia</i> , y <i>Coursetia</i> . -En áreas perturbadas con Palmar y con <i>Juniperus</i> . -En terreno baldío. -En la orilla de canales en Texcoco. -Alrededores de la Presa Madin, Naucalpan. -Zona de relleno sanitario.
Guanajuato	7	1970	SD	-Sobre roca caliza. -Sobre roca volcánica.
Guerrero	8	5; 680	0.6; 3	-En áreas con vegetación de compuestas y gramíneas. -Zonas perturbadas de bosque de <i>Quercus</i> -Zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio. -Regosoles.
Hidalgo	18	800; 1920; 1880; 2250; 900; 5300	4	-Zonas perturbadas de bosque de <i>Juniperus-Quercus</i> . -En laderas, suelos pedregosos y deslaves. -Pastizal alterado y maleza al margen de la carretera. -Zonas perturbadas de bosque de <i>Yucca</i> y <i>Larrea</i> .

² Este dato no concuerda con la elevación más alta reportado para el Distrito Federal, la cual es 3930 m.s.n.m.

Jalisco	13	1250; 1620	7	-Zonas perturbadas de bosque caducifolio espinoso. -En orillas de canales de riego. -Suelo amarillo pedregoso.
Michoacán	15	1100; 2170	6	-En matorral con vegetación perturbada. -Entre cultivos abandonados de maíz.
Morelos	10	1850; 2050; 8	SD	-Zonas perturbadas de bosque secundario con <i>Cupressus</i> . -En pastizal perturbado a la orilla de caminos con disturbios. -Suelo erosionado. -Litosoles.
Nayarit	1	SD	SD	SD
Nuevo León	8	5500; 2025	SD	-En terrenos baldíos con escombros -Cerca de agua para riego.
Oaxaca	43	200; 2000; 1795; 1860	2	-Orillas de arroyos y charcas en las inmediaciones a terrenos de cultivo de temporal. -En matorral con vegetación perturbada. -Dunas de arena. -Sobre rocas calizas. -Suelos arenosos.
Puebla	12	549; 2015; 1900; 2200	2.5	-Zonas perturbadas de matorral xerófilo. -Áreas con acahual. -Zonas perturbadas de bosque mixto con <i>Quercus</i> , <i>Yucca</i> , <i>Cordia</i> , <i>Sapium</i> . -En los márgenes de la carretera y de ríos. -Litosoles. -Sobre rocas ígneas.
Querétaro	5	1990; 2243	SD	-En cultivos abandonados. -Zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio con <i>Thevetia</i> , <i>Zapoteca</i> , <i>Plumeria</i> , y <i>Cardiospermum</i> . -Suelos pedregosos.

				-En matorral con vegetación perturbada, junto a márgenes de río.
San Luis Potosí	15	SD	SD	-Área experimental forestal de Zonas Áridas "La Pila". -Suelo volcánico subalpino. -En matorral con vegetación perturbada.
Sinaloa	11	6600 ³ ; 7000 ⁴ ; 2500; 2580; 2100; 2240; 2200; 55; 2000; 1950	SD	-Zonas perturbadas de pastizal. -Suelo volcánico subalpino. -Vegetación secundaria. -A la orilla del camino. -En terrenos de cultivo abandonados. -Zonas perturbadas de bosque templado.
Sonora	14	2155; 2240; 2400; 2450; 2550; 2580; 2600; 2700; 3000	SD	-Vegetación halófito con algunos elementos de selva baja caducifolia. -Vegetación halófito de mangles y chamizos. - Zona perturbada de bosque de encino-pino. -Vegetación perturbada por la agricultura con dominancia de malezas. -Zonas perturbadas de matorral subinermes con <i>Juniperus</i> , <i>Fouquieria</i> , <i>Opuntia</i> , y <i>Acacia</i> .

³ Este dato no concuerda con la elevación más alta reportado para México, la cual es el Pico de Orizaba con 5610 m.s.n.m.

⁴ Íbid.

Tamaulipas	5	130; 870; 1800	1; 4.5; 0.3	-En terrenos de cultivo abandonados. -Zonas perturbadas de matorral espinoso. -En terrenos baldíos. -Suelos salitrosos. -Suelos limo-arenosos. -Suelos rojos arcillosos.
Veracruz	6	SD	SD	SD
Zacatecas	6	SD	SD	SD
Total	281			

6.2 Tercera etapa

Germinación de semillas

El sistema de germinación utilizado fue muy eficiente. Se consiguieron porcentajes de germinación del 100% y con un tiempo de germinación muy corto (10 días). La viabilidad de las semillas provenientes de las poblaciones colectadas fue alta, se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 98 ± 2.738 para las semillas provenientes de la Ex planta de Cromatos de México y un 99 ± 2.236 para las de la zona chinampera de Xochimilco. Para las semillas procedentes de la Reserva del Pedregal de San Ángel no se obtuvo un porcentaje alto de germinación porque las semillas tenían un alto grado de contaminación por hongos fitopatógenos.

Después de dos meses se obtuvieron plantas jóvenes, de las cuales se hizo uso de sus hojas como explantes para las siguientes etapas experimentales. Las hojas no presentaron ningún daño en sus tejidos, por el contrario, eran hojas y raíces muy resistentes, incluso para estar en condiciones *in vitro* (Figura 2).

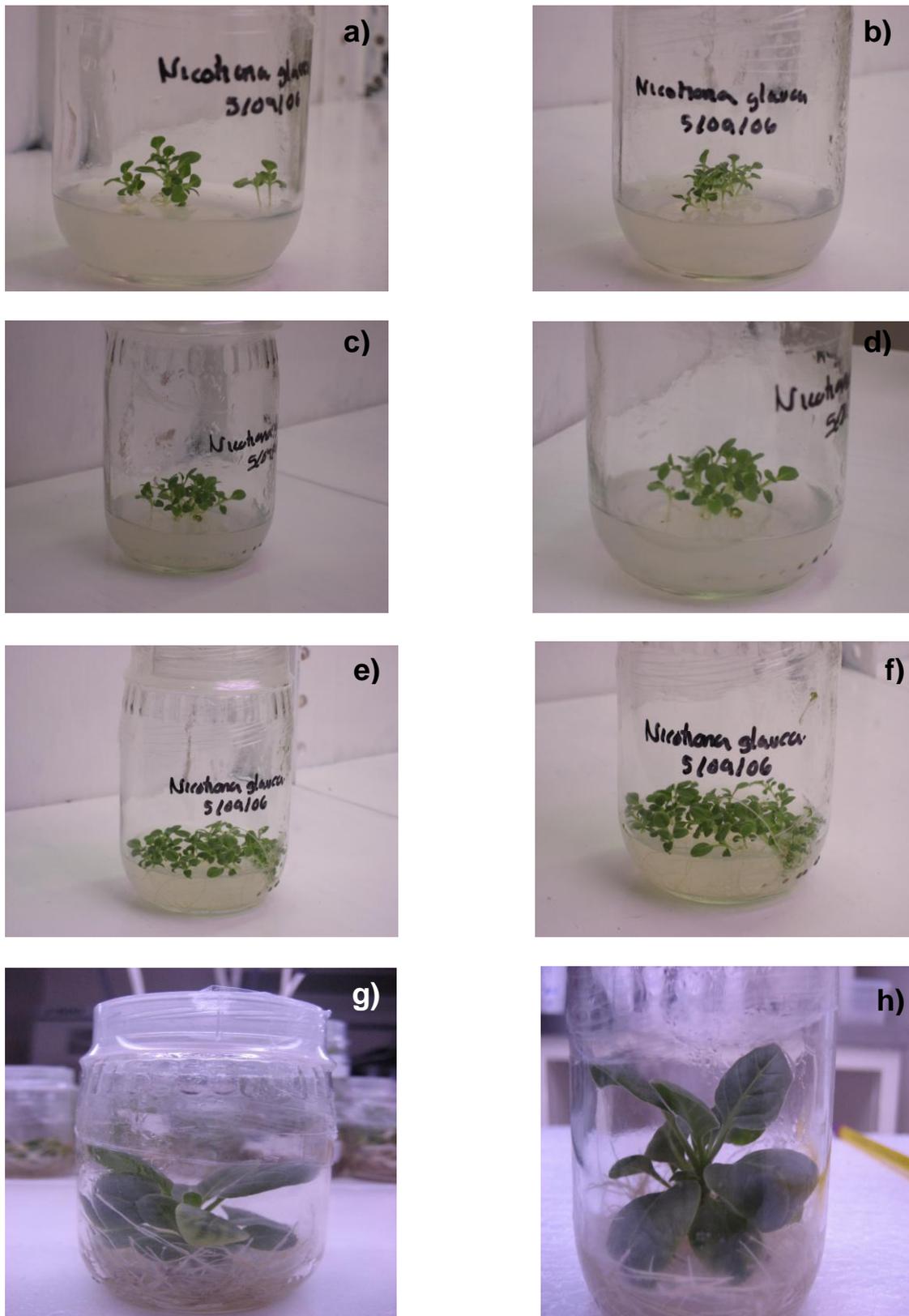


Figura 2. Germinación *in vitro* de semillas de *Nicotiana glauca*: a) y b) a los diez días con semillas de Cromatos de México, Edo. Méx. y Canal de San Luis, Xochimilco, D.F., respectivamente; c) y d) plantas de 15 días; e) y f) plantas a los 20 días; g) y h) plantas de 2 meses.

Inducción de brotes

Se eligió reproducir a *Nicotiana glauca* por organogénesis. La elección de un sistema de propagación *in vitro* por embriogénesis somática u organogénesis para una especie, depende mucho de las capacidades de la especie en cuestión. Generalmente en los diferentes géneros botánicos uno de los dos sistemas es el más adecuado, o incluso, es el único que puede implementarse. Las plantas del género *Nicotiana* pueden reproducirse bien por los dos sistemas, pero el sistema de organogénesis es el más eficiente. Y por esta razón fue el sistema que se eligió (Barazani *et al.*, 2004)

Sin embargo, resultaría muy valioso desarrollar un sistema de micropropagación por embriogénesis somática para esta especie, utilizando raíces como explantes, ya que este tejido se ha reportado en la literatura como el órgano vegetal con las mayores capacidades de extracción y acumulación de metales pesados (Santandrea *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2003). De esta manera podríamos comparar los resultados de mejoramiento *in vitro* por somaclonas con ambos sistemas.

Se presentaron diferencias cualitativas importantes en los tratamientos probados (**Figura 3**). La presencia de cualquiera de las citocininas desencadenó la inducción de brotes, pero tanto el porcentaje de respuesta, como el grado de desarrollo de los brotes fue mucho mejor con BAP. Cuando se empleó citocinina en presencia de 2,4-D la respuesta fue negativa porque se inhibió la inducción de brotes, se generó callo así como un alto grado de oxidación de los tejidos. En cambio cuando se utilizó ANA (0.1 y 0.2 mgL⁻¹), hubo un efecto

positivo sobre la inducción de brotes, aumentando el porcentaje de respuesta de 60 a 100% respectivamente. Cuando se empleó BAP, la presencia de cualquiera de las auxinas no tuvo efecto sobre el sistema, la inducción de brotes fue muy buena. Sin embargo, el grado de desarrollo y el vigor de los brotes fue mucho mejor cuando sólo se utilizó BAP. La mayor diferencia con respecto a la biomasa individual de los brotes la encontramos en los tratamientos que tenían sólo BAP (**Figura 4**). En todos los casos se obtuvo organogénesis directa.

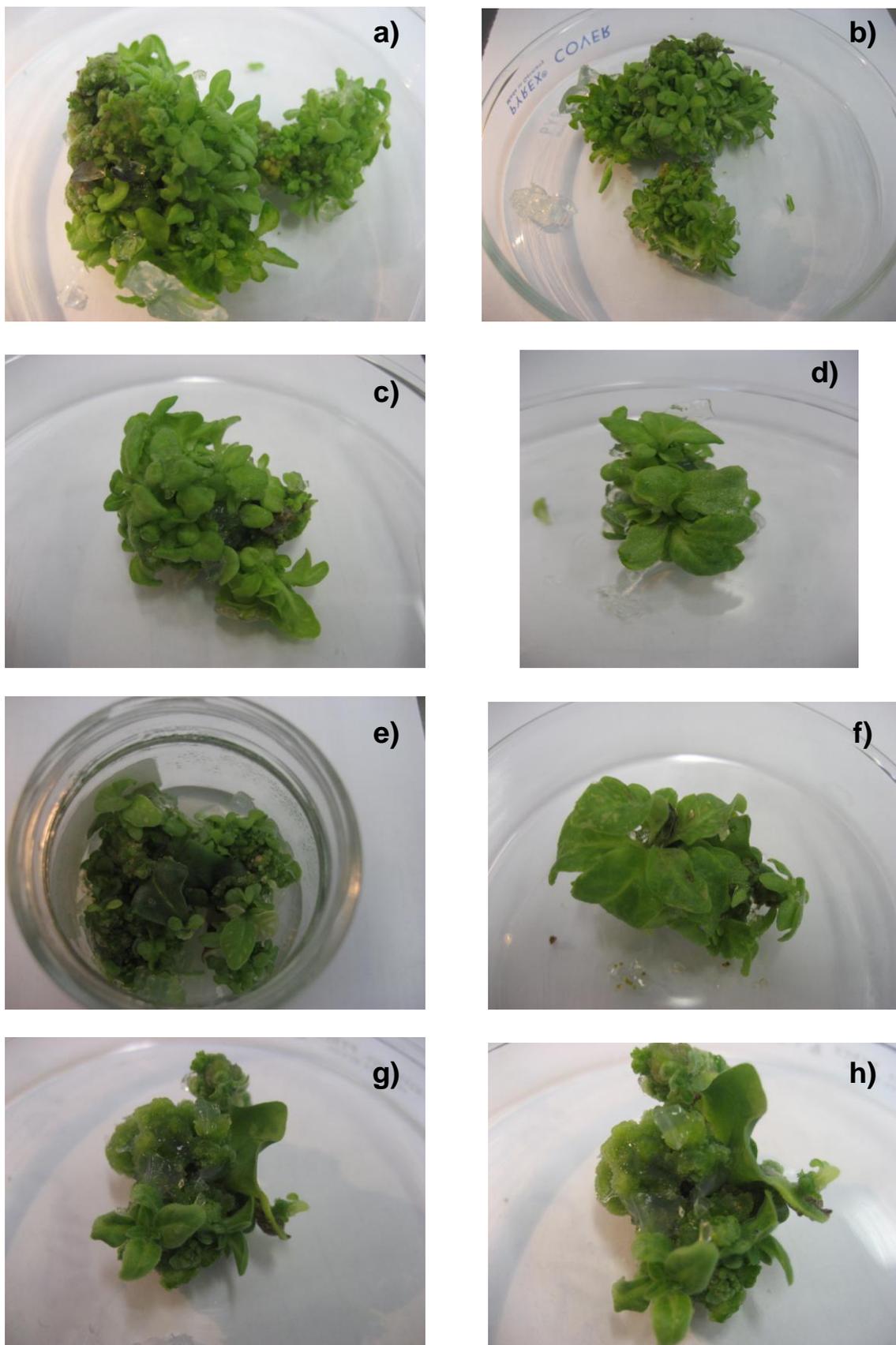


Figura 3. I. Desarrollo de los brotes de *Nicotiana glauca*. Evaluación a los 45 días. a) y b) BAP 2 mgL⁻¹; c) y d) BAP 1 mgL⁻¹; e) y f) K 2 mgL⁻¹/ ANA 0.2 mg/L; g) y h) BAP 2 mgL⁻¹/ 2-4D 0.2 mgL⁻¹.

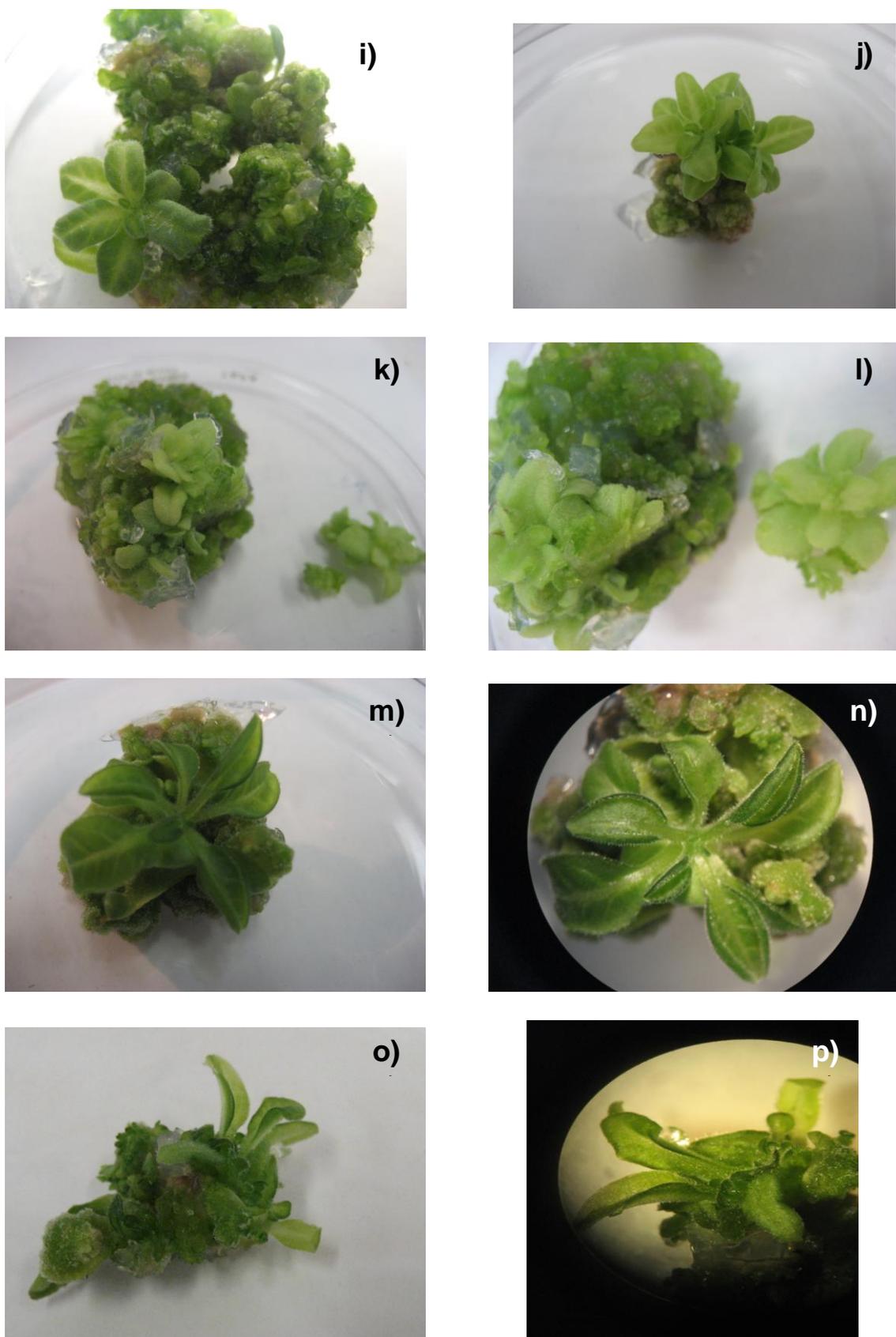


Figura 3. II. Desarrollo de los brotes de *Nicotiana glauca*. Evaluación a los 45 días. i) y j) BAP 1 mgL⁻¹/ ANA 0.1 mgL⁻¹; k) y l) BAP 2 mgL⁻¹/ 2-4D 0.2 mgL⁻¹; m) y n) BAP 2 mgL⁻¹/ ANA 0.2 mgL⁻¹; o) y p) K 1 mgL⁻¹.

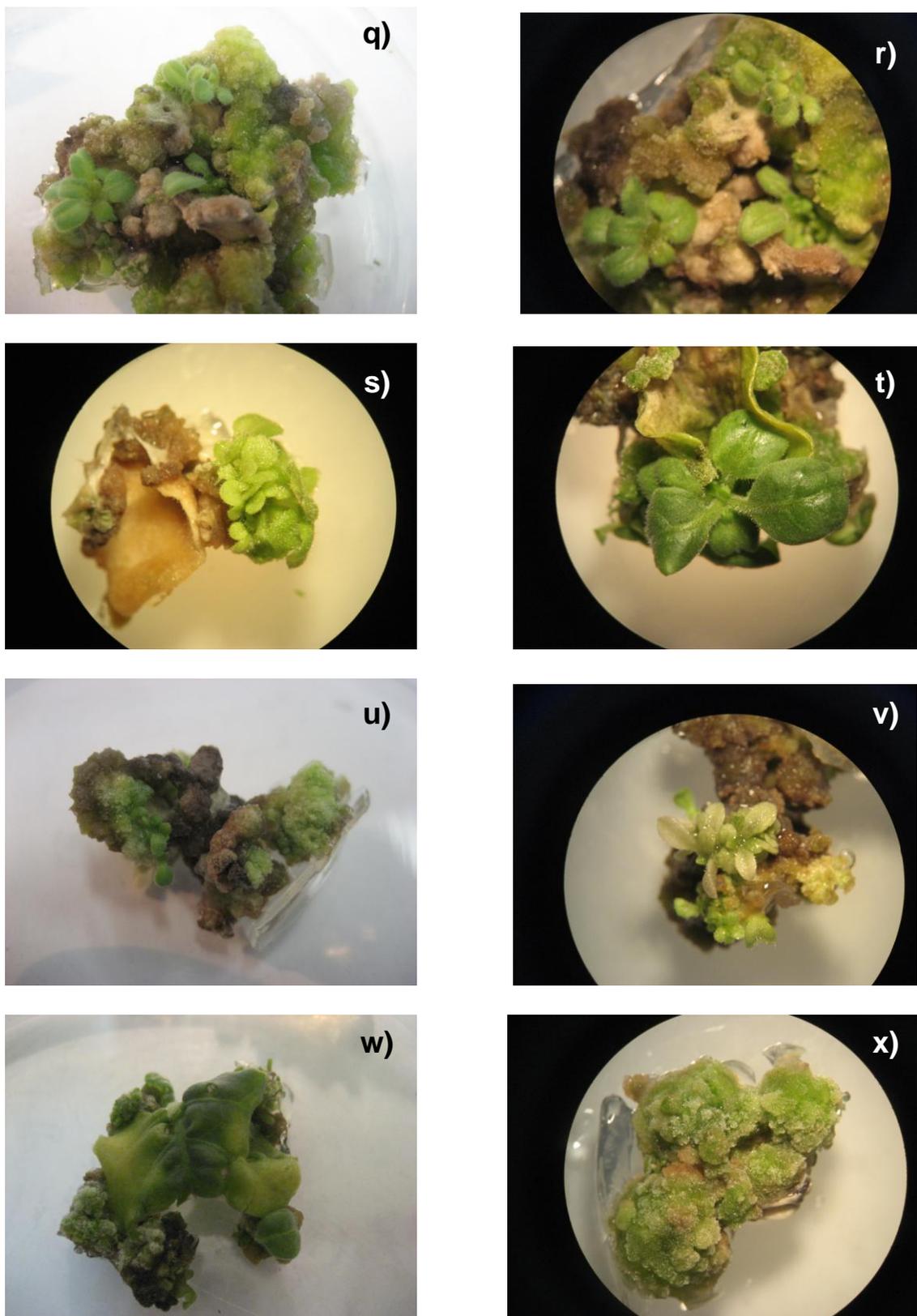
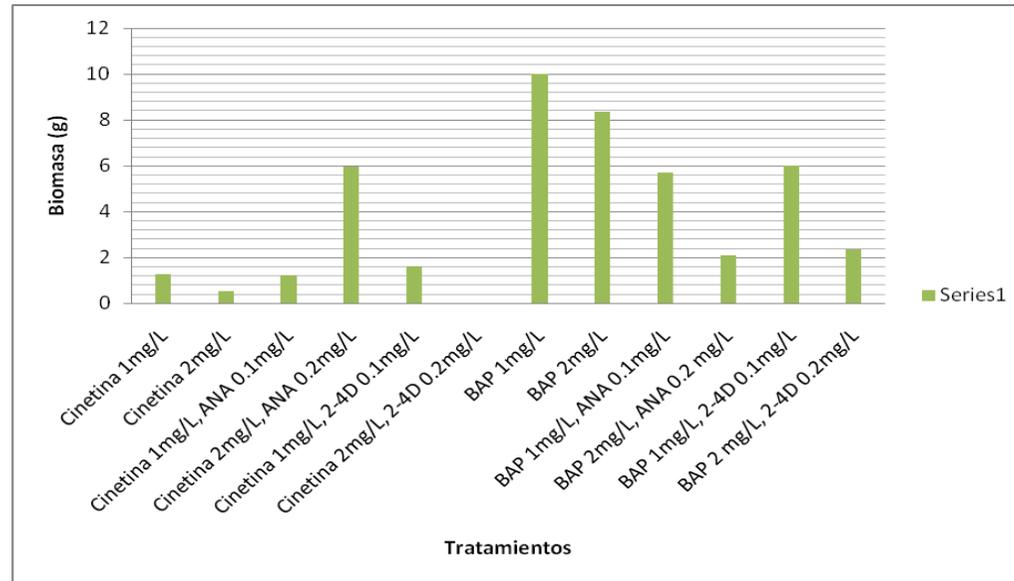


Figura 3. III. Desarrollo de los brotes de *Nicotiana glauca*. Evaluación a los 45 días. q) y r) $K 1 \text{ mgL}^{-1} / 2\text{-4D } 0.1 \text{ mgL}^{-1}$; s) y t) $K 1 \text{ mgL}^{-1} / \text{ANA } 0.1 \text{ mgL}^{-1}$; u) y v) $K 2 \text{ mgL}^{-1}$; w) y x) $K 2 \text{ mgL}^{-1} / 2\text{-4D } 0.2 \text{ mgL}^{-1}$.



Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Biomasa (g)	1.29	0.53	1.23	5.98	1.61	0.0	10.02	8.36	5.7	2.08	6.03	2.34
Media / Desviación Estándar.	0.257 ± 0.282	0.106 ± 0.071	0.246 ± 0.191	1.195 ± 0.463	0.322 ± 0.586	0 ± 0	2.004 ± 1.471	1.672 ± 1.549	1.141 ± 0.350	0.415 ± 0.386	1.205 ± 0.560	0.469 ± 0.328
Porcentaje de respuesta*	60%	80%	100%	100%	60%	0%	100%	100%	100%	80%	100%	80%

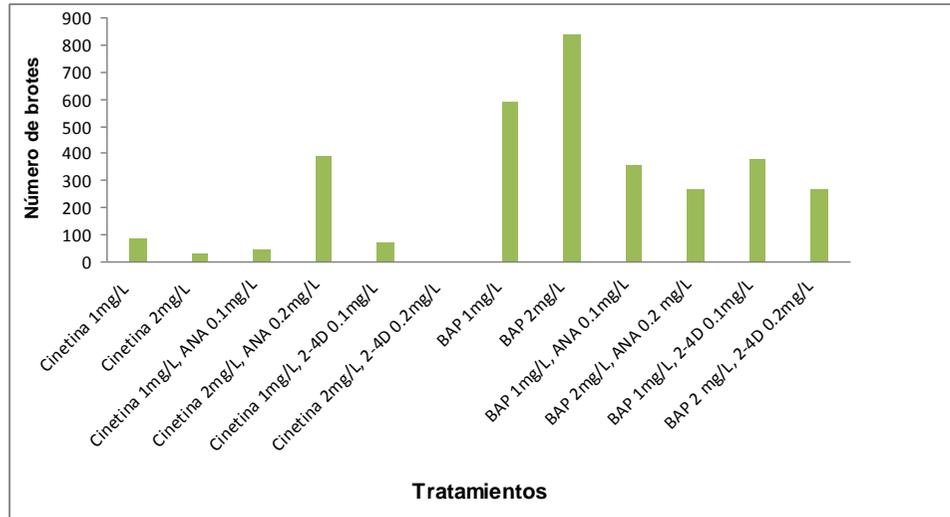
Figura 4. Inducción de brotes de *Nicotiana glauca*. Biomasa.* El porcentaje de respuesta se tomo en cuenta como presencia o ausencia de brotes en las cinco repeticiones por tratamiento.

Con respecto al número de brotes por explante, se obtuvo una diferencia muy importante en la respuesta, dependiendo de la citocinina empleada (**Figura 5**). El número de brotes obtenido fue mucho mayor cuando se empleó BAP y la variación dentro de los tratamientos fue mucho menor.

Las hojas resultaron ser un excelente explante para la micropropagación de la especie, como ocurre con otras plantas de este género (Santandrea *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2003; Clemens, 2006). *N. glauca* produjo brotes enraizados con un alto desarrollo a los diez días en el medio de cultivo. En comparación con las hojas de *Nicotiana tabacum*, que generan brotes de 4 a 6 días y sus raíces en un día (Compton y Koch, 2001), los resultados obtenidos con la especie utilizada en este estudio, fueron muy buenos. Además de esto, la organogénesis directa es una mejor opción que la indirecta porque genera menor variación fisiológica y en este caso puede ser una ventaja, pensando en términos de líneas de mejoramiento.

En el diagrama de cajas y brazos (**Figura 6**) que compara los diferentes tratamientos probados, con la biomasa de los brotes, se observa que existe dos tratamientos (BAP 1 mgL⁻¹ y BAP 2mgL⁻¹) que sobresalen, es decir, son estos tratamientos los que presentan una menor variación en la respuesta.

Se eligió como el mejor tratamiento 2mgL⁻¹ de BAP porque presentó la mejor relación entre el número de brotes por explante (56 brotes), por tratamiento (836 brotes) y la biomasa de los explantes individuales (**Figuras 4 y 5**).



Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Número de brotes	84	28	43	388	68	0	590	836	354	265	375	267
Media / Desviación Estándar	16.8 ± 31.603	5.6 ± 5.366	8.6 ± 3.847	77.6 ± 36.569	13.6 ± 19.692	0 ± 0	118 ± 99.521	167 ± 86.097	70.8 ± 38.147	53 ± 41.563	75 ± 16.703	53.4 ± 39.506
Promedio del Desarrollo de los brotes	1	1	1	2	1	0	3	2	2	1	2	1

Figura 5. Inducción de brotes de *Nicotiana glauca*. Número de brotes. a) brotes con K 2 mgL⁻¹ y b) brotes con BAP 2 mgL⁻¹ Donde: 0 = nulo; 1 = muy bajo; 2 = bajo; 3=alto; 4= muy alto.

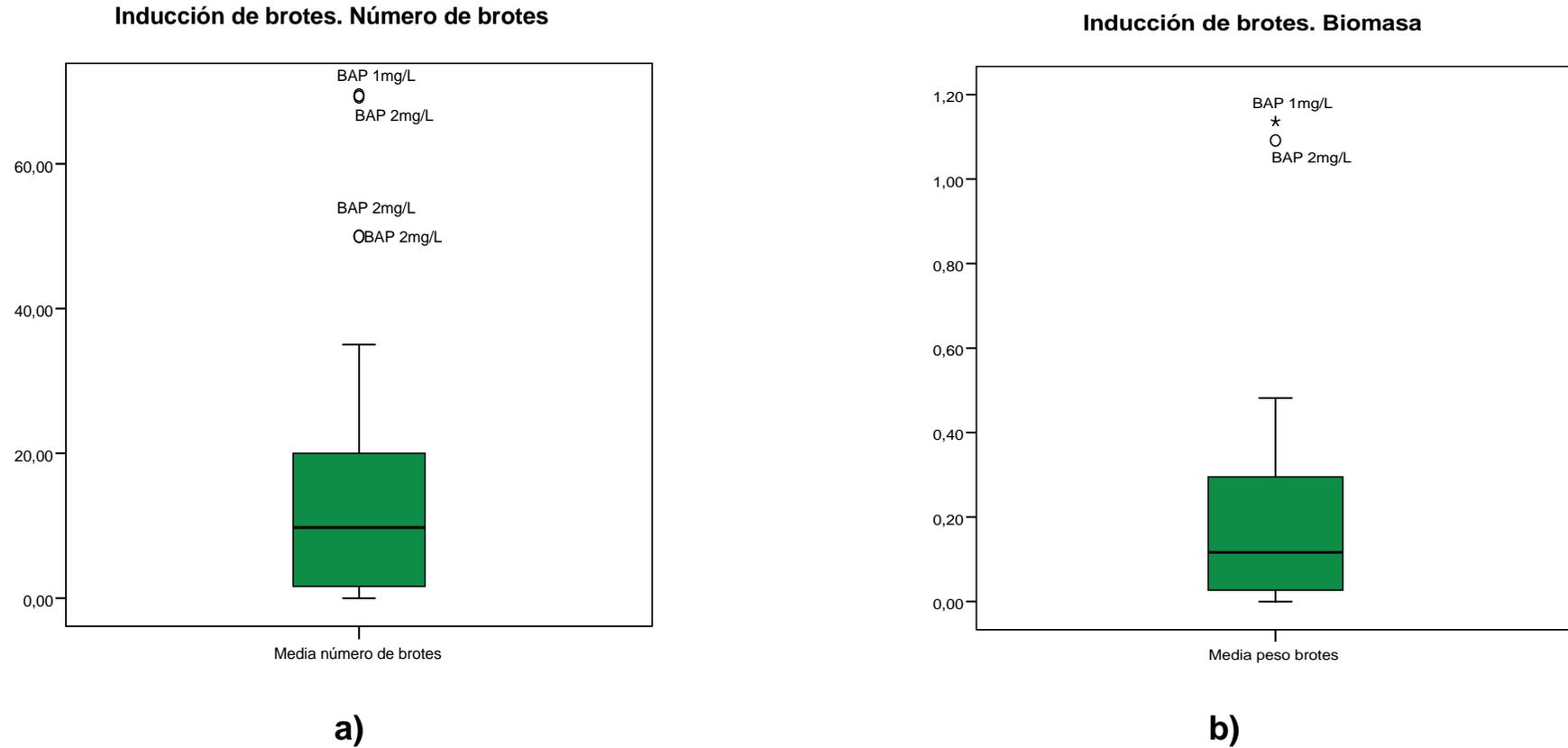


Figura 6. Estadística descriptiva de la inducción de brotes de *Nicotiana glauca*. Medias de todos los tratamientos. a) medias para el número de brotes; b) medias para la biomasa.

Rizogénesis

Para la inducción de raíces se empleó el ácido indolbutírico (IBA) porque es una auxina que estimula la formación de raíces de forma muy eficiente en la mayor parte de las especies. En *N. glauca*, con todos los tratamientos probados se generaron redes de raíces muy vigorosas (**Figura 7**). Se obtuvo una muy buena respuesta de rizogénesis adicionando 1 mgL^{-1} de IBA; sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron cuando no se utilizó ningún regulador de crecimiento (**Tabla 3**). Es mejor entonces no adicionar al medio ningún inductor. Lo cual aminora precios por ahorro de reactivos y no hay una saturación de hormonas que puedan repercutir en el desarrollo de la planta.

Nicotiana glauca igual que *Nicotiana tabacum*, tienen capacidad natural para inducir raíces adventicias. Los brotes producidos *in vitro*, generan espontáneamente raíces adventicias en nudos y hojas en el medio nutritivo sin hormonas. El sistema de raíces que se generan en estas condiciones hace que el tabaco sea una especie modelo en numerosos estudios donde utilizan como explante raíces jóvenes para la obtención de embriogénesis somática (Compton y Koch, 2001; Lugon-Moulin *et al.*, 2006) Representa una ventaja para *Nicotiana glauca* formar redes de raíces ya que durante el proceso de aclimatización desempeñaran un papel muy importante en cuanto a la mejora en toma de nutrientes, sostén y el desarrollo de nuevas raíces.

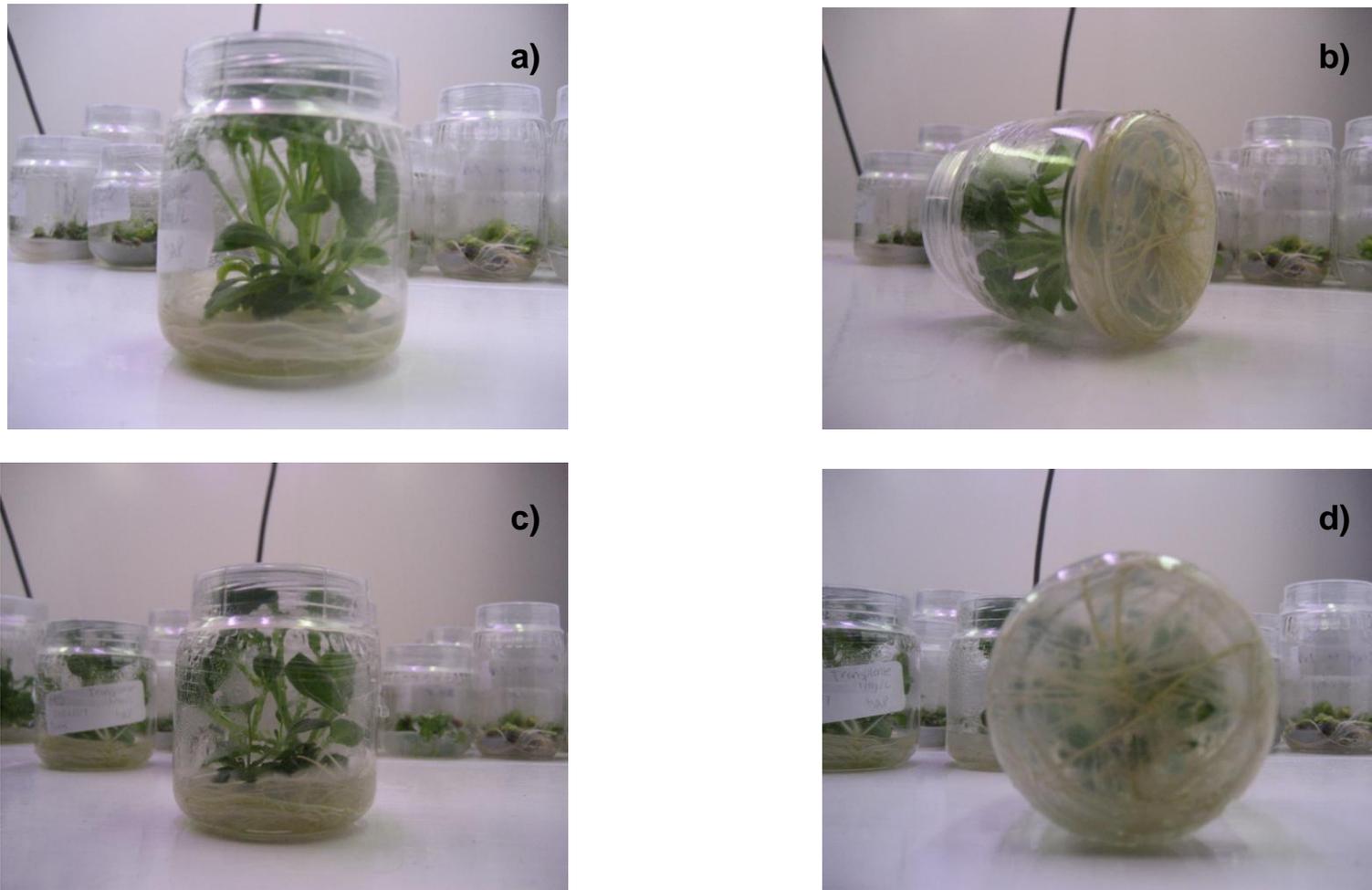


Figura 7. Rizogénesis de *Nicotiana glauca*. a) y b) control evaluado a los 45 días, c) y d) brotes a 1 mgL^{-1} de IBA evaluados a los 45 días.

Tabla 3. Tratamientos aplicados para la inducción de raíces en *Nicotiana glauca*. Efecto de distintas concentraciones de IBA. Donde: 0 = nulo; 1 = muy bajo; 2 = bajo; 3=alto; 4= muy alto.

Tratamiento	IBA (mgL ⁻¹)	Presencia de raíces	Grado de desarrollo
1	0	87%	4
2	0.5	77%	3
3	1	88%	3

Aclimatización

La aclimatización es el proceso mediante el cual las especies micropropagadas en condiciones *in vitro* pasan a condiciones *ex vitro*. El 90% de las plantas de *N. glauca* sometidas a este proceso, se adaptaron a las nuevas condiciones de cultivo (**Figuras 8 y 9**). Este porcentaje de sobrevivencia es muy alto. El éxito de sobrevivencia en el proceso de aclimatización se considera muy bueno si está por arriba de del 50%. En la mayoría de los estudios, el porcentaje de sobrevivencia oscila entre 75-85% (Debnath *et al.*, 2006)

La sobrevivencia depende del estado fisiológico de las plantas y del sistema que se implementa. El adecuado manejo y control de la reducción gradual de la humedad, la temperatura y contaminación juegan un papel trascendental en el proceso de aclimatización.

El proceso de aclimatización es difícil, las plantas se enfrentan a cambios morfológicos y fisiológicos tales como desarrollo de nuevas hojas, síntesis de cera cuticular, aumenta la captación de CO₂, autotroficación, aumento del área de superficie de las hojas, aumento de los pelos epidérmicos, aumento de clorofila *a* y *b*, decrecimiento de la densidad de estomas, entre otras.

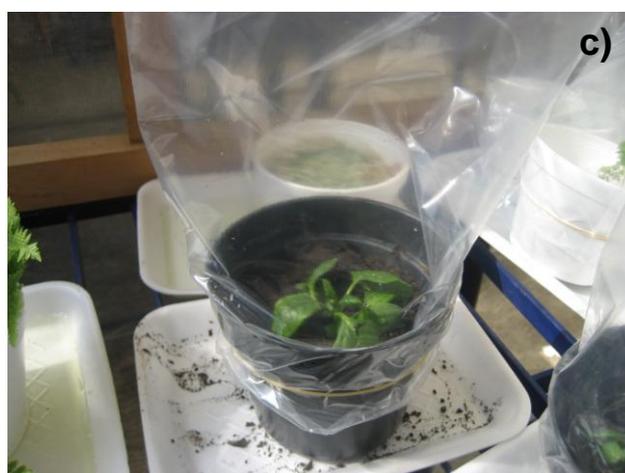


Figura 8. Acimatización de *Nicotiana glauca*. a), b) y c) evaluación a los 20 días.

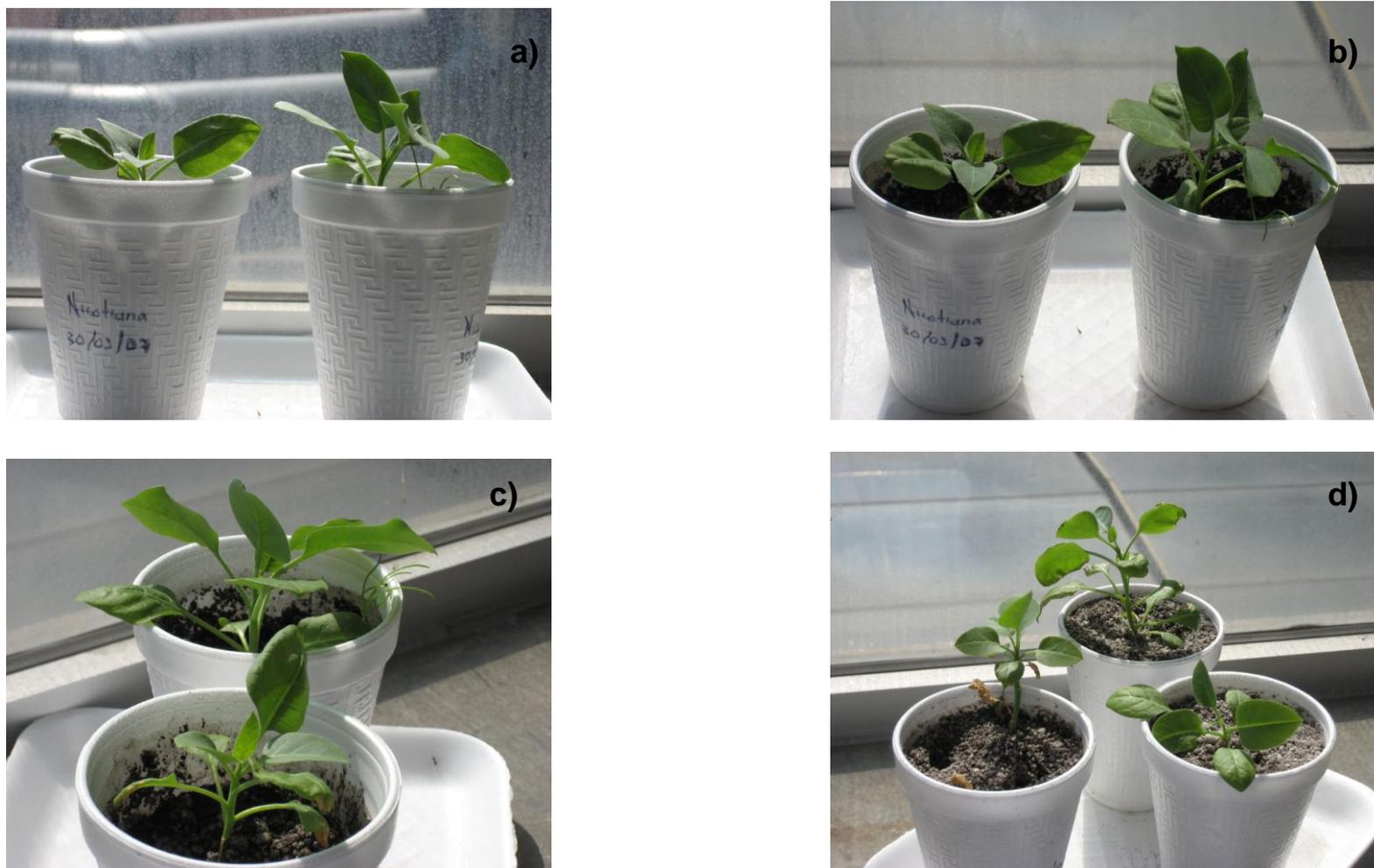
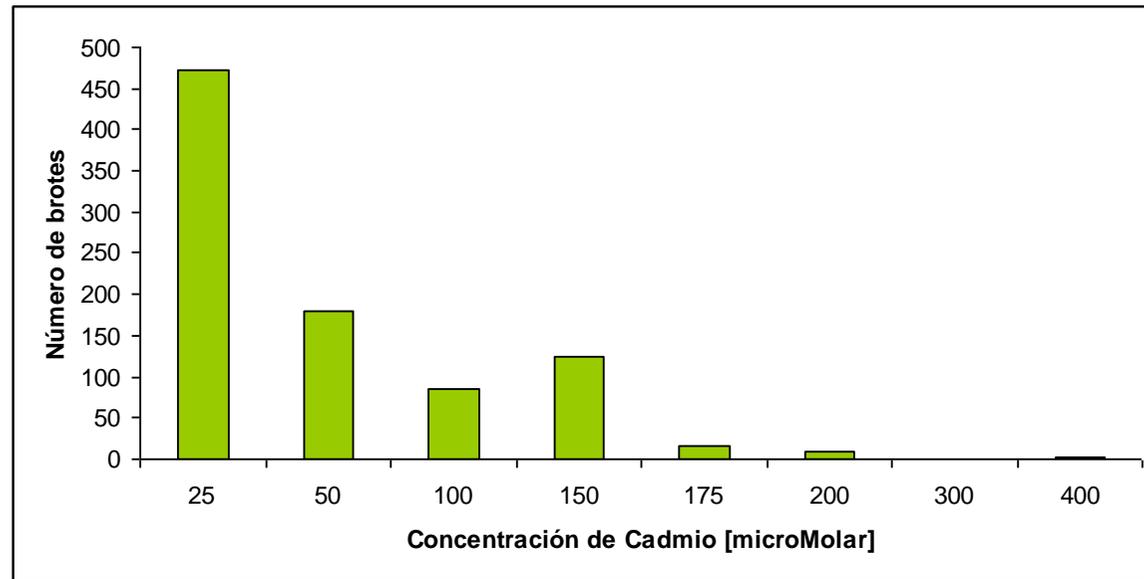


Figura 9. Plantas de *Nicotiana glauca ex vitro*. a), b), c) y d) evaluación a los 20 días.

Inducción de brotes en presencia de cadmio.

Se produjeron brotes de *N. glauca*, en presencia de cadmio en todas las concentraciones probadas, incluso en 400 μM de CdCl_2 (**Figura 10**). Sin embargo, a medida que la concentración del metal aumentó, se presentaron signos de estrés de forma creciente, el número de brotes y la biomasa decreció conforme se aumentó la concentración del contaminante. Las hojas resultaron ser muy sensibles al cadmio. La dosis letal media se obtuvo por debajo de 50 μM de CdCl_2 . Aunque en un principio la biomasa de los brotes obtenidos fue similar (**Figura 11**) y no se encontraron diferencias significativas sino hasta concentraciones superiores a 150 μM de CdCl_2 , a partir de 50 μM , los brotes detuvieron su desarrollo, presentaron clorosis y finalmente murieron. Por lo cual, en un programa de mejoramiento genético para esta especie, el proceso de selección debe iniciar en 25 μM de CdCl_2 , porque es en esa concentración donde se pueden obtener individuos resistentes a este metal.

Se seleccionaron los tratamientos de 25 y 50 μM de CdCl_2 como la mejor respuesta y los brotes obtenidos fueron transplantados a medio fresco para inducir la formación de raíces. Las plántulas alcanzaron un buen tamaño y no presentaron daño en tejidos, ni disminución en el tamaño de las hojas y raíces (**Figura 12**).



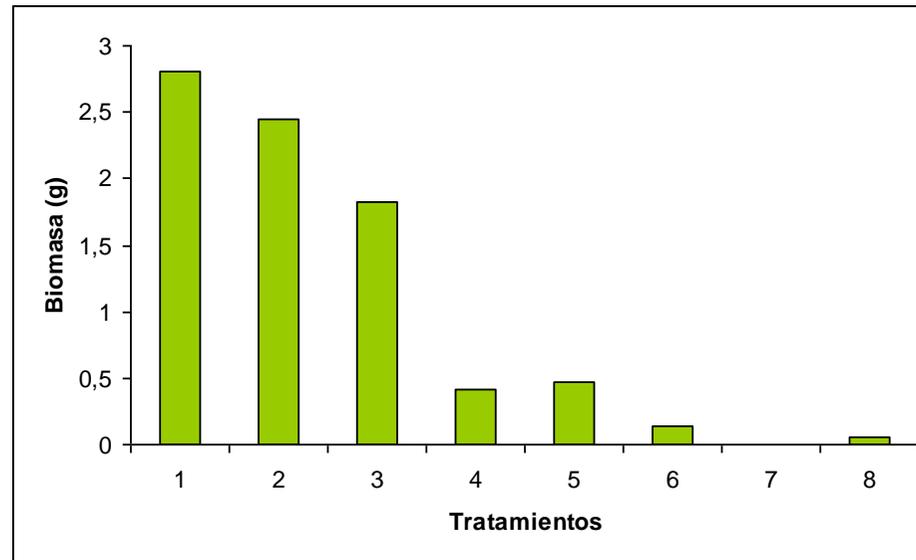
Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8
Número de brotes	472	179	85	125	15	9	0	2
Media / Desviación Estándar	94.40 ± 118.32	35.80 ± 23.78	17 ± 17.88	25 ± 25.33	3 ± 6.70	1.8 ± 4.02	0 ± 0	0.40 ± 0.89
Promedio del Desarrollo de los brotes	3	3	2	2	0 ⁵	1	0	0 ⁶

Figura 10. Sistema de selección *in vitro* de *Nicotiana glauca*. Número de brotes.

Donde: 0= nulo; 1 = muy bajo; 2 = bajo; 3=alto; 4= muy alto.

⁵ El número de brotes en este tratamiento se obtuvo solamente de un explante en todas las repeticiones, y el desarrollo de los brotes fue bajo (2).

⁶ El número de brotes en este tratamiento se obtuvo solamente de un explante en todas las repeticiones, y el desarrollo de los brotes fue muy bajo (1).



Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentración de Cadmio [μM]	25	50	100	150	175	200	300	400
Biomasa (g)	2.80	2.45	1.83	0.41	0.47	0.14	0	0.05
Media / Desviación Estándar	0.55 \pm 0.55	0.49 \pm 0.62	0.36 \pm 0.60	0.82 \pm 0.05	0.09 \pm 0.20	0.02 \pm 0.06	0 \pm 0	0.096 \pm 0.02

Figura 11. Sistema de selección *in vitro* de *Nicotiana glauca*. Biomasa.

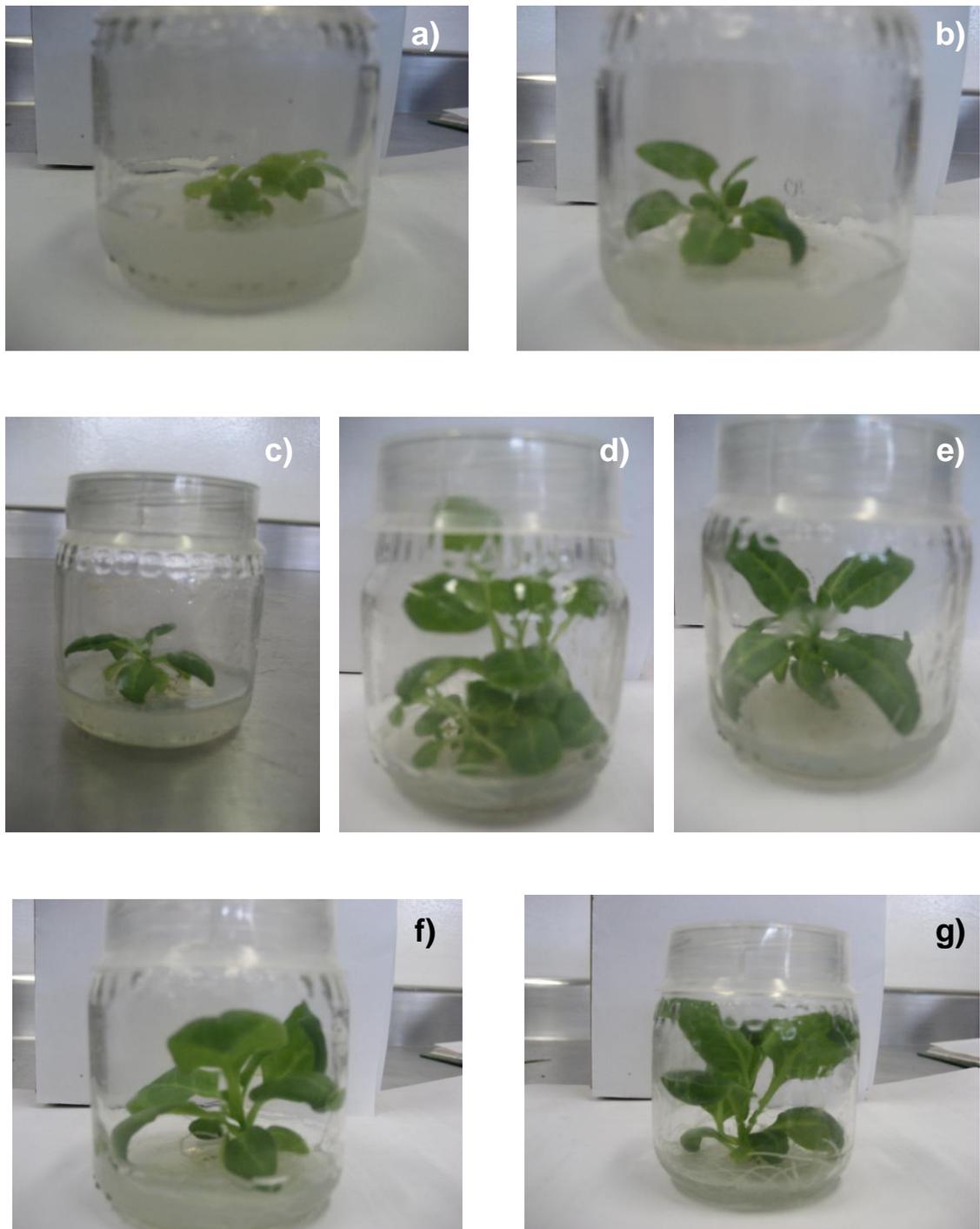


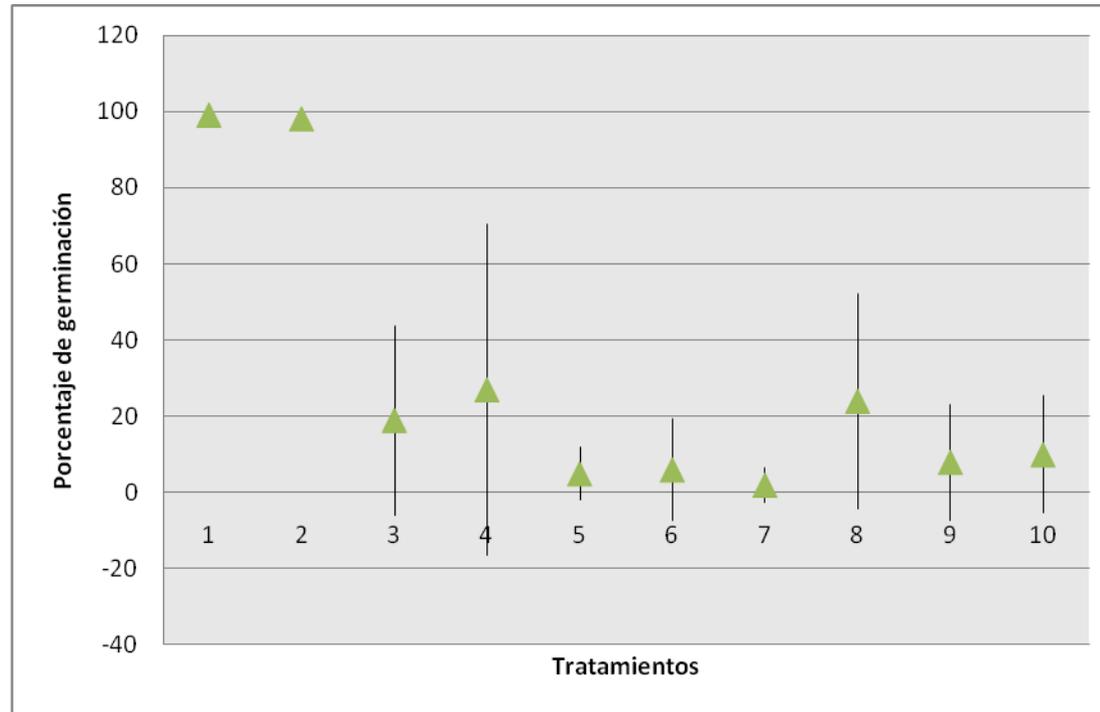
Figura 12. Selección de brotes de *Nicotiana glauca* tolerantes a cadmio. Plantas seleccionadas a 25 y 50 μM de CdCl_2 . a) brote a 50 μM de CdCl_2 evaluado a los 15 días de ser transplantado; b y c) brotes a 25 y 50 μM de CdCl_2 evaluados a los 30 días de ser transplantados respectivamente; d) brotes a 25 y 50 μM de CdCl_2 a los 45 días de ser transplantados; f) y g) brotes a 25 y 50 μM de CdCl_2 a los 60 días de ser transplantados

Selección de individuos tolerantes a cadmio

En un experimento preliminar para determinar resistencia de las semillas de *N. glauca* a cadmio en la población de la reserva del Pedregal de San Ángel. Se encontró que las semillas son capaces de germinar en todas las concentraciones probadas de CdCl₂ (**Figura 13**). Se debe destacar que el intervalo manejado de concentración de dicho contaminante fue muy amplio y cubre todas las concentraciones probadas anteriormente en estudios similares (de 25 a 400 µM de CdCl₂). Las semillas lograron germinar incluso en la concentración más alta manejada en este estudio (400 µM) que rebasan con mucho los mejores resultados reportados en la literatura para otras especies (Santandrea *et al.*, 2000; Gisbert *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2000; Lodeiro *et al.*, 2005; Lugon-Moulin *et al.*, 2006).

A partir de 100 µM de CdCl₂, se observaron diferentes síntomas de estrés en las plantas, principalmente la reducción de tamaño de las raíces y la disminución del tamaño de la planta. Las plantas pudieron completar su desarrollo solamente hasta 50µM de CdCl₂, concentración que podría ser muy adecuada para seleccionar individuos con alta tolerancia a cadmio.

Las semillas germinadas a una concentración de 25 y 50 µM de CdCl₂, fueron transplantadas *in vitro* a medio sin contaminante y a los 20 días se observaron plantas con una mayor área foliar y redes de raíces vigorosas (Figura 13). Sería conveniente iniciar el proceso de mejoramiento *in vitro* utilizando como explantes hojas de plantas previamente seleccionadas por este procedimiento.



Tratamiento	1	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración de CdCl_2	0 μM	25 μM	50 μM	100 μM	150 μM	175 μM	200 μM	300 μM	400 μM
Media / Desviación Estándar	98±2.738	19±24.849	27±43.531	5±7.071	6±13.416	2±4.472	24±28.151	8±15.247	10±15.411

Figura 13. Selección de individuos de *Nicotiana glauca* tolerantes a cadmio.

Sería muy interesante realizar estos experimentos con semillas provenientes de los dos sitios contaminados seleccionados. A pesar de esto, las semillas provenientes de la Reserva del Pedregal de San Ángel, sitio sin contaminación aparente, germinaron en presencia de cadmio, lo cual nos indica la potencialidad de la especie para tolerar altas concentraciones de metales pesados.

La selección de individuos tolerantes en la etapa de germinación puede ser un mecanismo valioso para obtener variedades vegetales de estas especies con capacidades homogéneas de respuesta ante metales pesados.

7. Conclusiones

- *Nicotiana glauca* Graham presenta una amplia distribución en el país y se adapta a una amplia gama de condiciones ecológicas.
- Las condiciones óptimas de germinación de *N. glauca* fueron condiciones de luz y temperatura de 25°C.
- El tratamiento de desinfección utilizado para la germinación de las semillas de *N. glauca* fue exitoso pues no se presentó contaminación.
- El porcentaje de sobrevivencia de las semillas provenientes de la Ex planta de Cromatos de México fue 98% y para las de la zona chinampera de Xochimilco fue 99%.
- Se generó un protocolo muy eficiente para la reproducción *in vitro* de esta especie.
- El mejor tratamiento para la inducción de brotes de *N. glauca* fue 2 mgL⁻¹ de BAP. Presentó la mejor relación entre el número de brotes por explante (56 brotes), por tratamiento (836 brotes) y la biomasa de los explantes individuales
- Los brotes generaron raíces vigorosas en medio MS con la mitad de los macronutrientes y sin reguladores de crecimiento.

- Las plantas fueron aclimatizadas en condiciones de invernadero y se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 98%.
- La capacidad de acumulación de cadmio por *N. glauca* se encuentra dentro de los rangos promedio obtenidos por plantas que se consideran hiperacumuladoras de cadmio.
- Se generó un sistema de selección de líneas de mejoramiento de *N. glauca*. La mejor respuesta para la germinación y la generación de brotes en presencia de CdCl_2 se obtuvo a los 25 y 50 μM de este contaminante. Se seleccionaron individuos a esta concentración y se aclimatizaron.
- *N. glauca* tiene una gran capacidad de acumulación de cadmio y puede ser una excelente candidata para realizar estudios de fitorremediación en campo.

Anexo 1.

Medio de cultivo Murashig -Skoog (1962).

Stock	Compuesto	g/20 L
Macronutrientes Stock 1 20 L x 400 mL	(NH ₄)NO ₃	33
	KNO ₃	38
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7.4
	KH ₂ PO ₄	3.5
Cloruro de Calcio Stock 2 20 L x 200 mL	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	8.8
Micronutrientes Stock 3 20 L x 200 mL	MnSO ₄ · H ₂ O	0.033802
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.172
	H ₃ BO ₃	0.124
	KI	0.0166
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.005
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.0005
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.0005
Stock 4 20 L x 200 mL	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.556
	Na ₂ EDTA	0.746
Vitaminas Stock 5 20 L x 200 mL	Tiamina	0.002
	Ac. Nicotínico	0.01
	Piridoxina	0.01
Stock 6 20 L x 200 mL	Myo-Inositol	2.0
Stock 7 20 L x 200 mL	Glicina	0.04

Abreviaturas

ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
IBA	Ácido indolbutírico
2,4-D	Ácido 2, 4 diclorofenoxiacético
K	Kinetina ó 6-furfurilaminopurina
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
CdCl ₂	Cloruro de cadmio

Referencias

1. Aoshima, K., T. Katoh y M. Kasuya. 2006. Renal effects of environmental exposure to cadmium in middle-aged population of Jinzu River basin in Toyama, Japan: 2000-2002 study. *Nippon Eiseigaku Zasshi*, 61(1): 69-80.
2. Baker, A.J.M y R.R. Brooks. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements –a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81–126.
3. Balba, M. T., N. Al-Awadhi y R. Al-Daher. 1998. Bioremediation of Oil-Contaminated Soil: Microbial Methods for Feasibility Assessment and Field Evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32(2):155-164.
4. Balbás, P. 2002. De la Biología Molecular a la Biotecnología. Trillas, México. 324 pp.
5. Barazani, O., P. Sathiyamoorthy., U. Manandhar., R. Vulkan y Golan-Goldhirsh. 2004. A Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site. *Chemosphere*, 54: 867-872.
6. Bhamra, R. K. y M. Costa. 1992. Trace elements: aluminum, arsenic, cadmium, mercury, and nikel. 575-613 pp. En: Lippmann, M. (Ed).

Environmental toxicants. Human exposures and their health effects.
VNB, New York. 1124 pp.

7. Berleth, T y S. Chatfield. 2002. Embryogenesis: Pattern formation from a single cell. *Arabidopsis Book*, 7(1): 1-22.
8. Bhattacharya, A., P. Sharma y P. S. Ahuja. 2003. Mutants for biochemical and molecular insights into embryogenesis in plants. *Indian Journal of Biotechnology*, 2(1): 38-47.
9. Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88: 1707-1719.
10. Coenen, C y T. L. Lomax. 1997. Auxin-Cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science*, 2(9): 351-355.
11. Compton, M. E. y J. M. Koch. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM) (trademark) on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2): 259-261.
12. Debergh, P. C y P. E. Read. 1991. Micropropagation. 1-13 pp. En: Debergh, P. C y R. H. Zimmerman (Eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publication, The Netherlands. 465 pp.

13. Debnath, M., C. P. Malik y P. S. Bisen. 2006. Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(1): 33-49.
14. Dhaliwal, H. S., E. C. Yeung y T. A. Thorpe. 2004. TIBA inhibition of in vitro organogenesis in excised tobacco leaf explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40(2): 235-238.
15. Eapen, S y S. D'Souza. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, 23: 97-114.
16. Feher, A., T. P. Pasternak y D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3): 201-228.
17. Fitz, W. J. y W. W. Wenzel. 2002. Arsenic transformations in the soil rhizosphere plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, 99: 259-278.
18. Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) heyneh. *Plant Growth Regulation*, 43(1): 27-47.

19. Ganesh Kumasi, K., M. Ganesan y N. Jayabalan. 2008. Somatic organogénesis and plant regeneration in *Ricinus communis*. *Biologia Plantarum*, 52(1): 17-25.
20. Gisbert, C., R. Ros., A. De Haro., D. Walker., M. Bernal., R. Serrano y J. Navarro-Aviñó. 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303: 440-445.
21. Ikeda, M., M. Umehara y H. Kamada. 2006. Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23(2): 153-161.
22. Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2-3): 91-110.
23. Juscafresa, B. 1995. *Guía de la Flora Medicinal, Tóxica, Aromática y Condimenticia*. AEDOS, España. 375 pp.
24. Komamine, A., N. Murata y K. Nomura. 2005. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures - morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(1): 6-10.

25. Kovalchuk, O., V. Titov., B. Hohn y I. Kovalchuk. 2001. A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Natural Biotechnology*, 19(6): 568-572.
26. Krämer, U y A. N. Chardonens. 2001. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Applied Microbiology Biotechnology*, 55: 661–672.
27. Krämer, U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Plant Biotechnology*, 16(2): 133-141.
28. Krämer, U., I. J. Pickering., R. C. Prince., I. Raskin y D. E. Salt. 2000. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*, 122(4): 1342-1353.
29. Kumar, P., P. Lakshmanan y T. Trevor. 1998. A Review regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene in vitro cell. *Development Biology Plant*, 34: 94-103.
30. Lipavska, H y H. Konradova. 2004. Somatic embryogenesis in conifers: The role of Carbohydrate Metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(1): 23-30.

- 31.Lodeiro, P., B. Cordero., J.L. Barriada., R. Herrero y M.E. Sastre de Vicente. 2005. Biosorption of cadmium by biomasa of brown marine macroalgae. *Bioresource Technology*, 96: 1796-1803.
- 32.Lombi, E., F.J. Zhao., S.J. Dunham y S.P. McGrath. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytology*, 145: 11–20.
- 33.López, G. 2002. Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares. Mundi-Prensa, España. 719-720 pp.
- 34.Lugon-Moulin, N., F. Martin., M. R. Krauss., P. B. Ramey y L. Rossi. 2006. Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere*, 63: 1074-1086.
- 35.Malinowski, R y M. Filipecki. 2002. The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7(4): 1137-1151.
- 36.McGrath, S.P., F.J. Zhao y E. Lombi. 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant Soil*, 232: 207-214.
- 37.Mendoza-Cózatl, D., H. Loza-Tavera., A. Hernández Navarro y R. Moreno-Sánchez. 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism

- under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 653–671.
38. Moore, G.S. 2002. Living with the Earth. Concepts in environmental health science. Lewis Publishers, USA.
39. Murashige, T y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 15: 473- 497.
40. Namasivayam, P. 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(1): 1-8.
41. Nehnevajova, E., R. Herzig., K-H. Erismann y J-P. Schwitzguébel. 2007. In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell Reports*, 26: 429–437.
42. Nomura, K y A. Komamine. 1986. Somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *Development Growth & Differentiation*, 28(6): 511-517.
43. Ochoa-Alejo, N y R. Ramírez-Malagon. 2001. In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(6): 701-729.

44. Parc, G., J. Rembur., P. Rech y D. Chiriqui. 2007. *In vitro* culture of tobacco callus on medium containing peptone and phytate leads to growth improvement and higher genetic stability. *Plant Cell Reports*, 26(2): 145-152.
45. Pasqua, G., F. Manes., B. Monacelli., L. Natale y S. Anselmi. 2002. Effects of the culture medium pH and ion uptake in *in vitro* vegetative organogenesis in thin cell layers of tobacco. *Plant Science*, 162: 947-955.
46. Pennazio, S. 2002. The culture of single plant cells: A historical view. *Rivista Di Biologia-Biology Forum*, 95(3): 455-472.
47. Pereira Bastos, M. E. y M. Nefussi. 1986. Aspectos toxicológicos de agentes químicos. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS/OM, Metepec, Edo. de México, México. 114 pp.
48. Phillips, G. C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants - recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40(4): 342-345.
49. Poornima, D. 2006. Micropropagation of *Nicotiana plumbaginifolia* viv. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 81(1): 123-125.

50. Puranik, P. R. y K. M. Paknikar. 1999. Biosorption of Lead, Cadmium, and Zinc by *Citrobacter* Strain MCMB-181: Characterization Studies. *Biotechnology Prog*, 15: 228-237.
51. Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera., R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3): 285-301.
52. Raskin, I., B. D. Ensley., I. Chet., D. E. Salt., M. Blaylock., N. P. Kumar y V. Dushenkov. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13(5): 468-474.
53. Rojas-Herrera, R., F. Quiroz-Figueroa., L. Sanchez-Teyer y V. M. Loyola-Vargas. 2002. Molecular analysis of somatic embryogenesis: An overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 8(2): 171-184.
54. Rojo, A. y J. Rodríguez. 2002. La flora del Pedregal de San Ángel. INE-SEMARNAT, México. 82 pp.
55. Rose, R. J. y K. E. Nolan. 2006. Invited review: Genetic regulation of somatic embryogenesis with particular reference to *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42(6): 473-481.

56. Rout, G. R., A. Mohapatra y S. M. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24(6): 531-560.
57. Rout, G. R., S. Samantaray y P. Das. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18(2): 91-120.
58. Santandrea, G., T. Pandolfini y A. Bennici. 2000. A physiological characterization of Mn-tolerant tobacco plants selected by in vitro culture. *Plant Science*, 150: 163–170.
59. Shingu, Y., T. Kudo., S. Ohsato., Y. Kimura., I. Yamaguchi y H. Hamamoto. 2005. Characterization of genes encoding metal tolerance proteins isolated from *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331: 675-680.
60. Singh, S., S. Eapen y S.F.D. Souza. 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62: 233–246.
61. Solt, M. I., F. Dawson y R. Christman. 1960. Biosynthesis of anabasine and of nicotine by excised. Root cultures of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology*, 35 (6): 887-894

62. Steward, F.C., M.O. Mapes y K. Mears. 1958. Growth and organised development of cultured cells: II. Organisation in cultured grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45: 705–7.
63. Sugiyama, M. 1999. Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology*. 2(1): 61-64.
64. Thorpe, T. A. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2): 169-180.
65. Umehara, M y H. Kamada. 2005. Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotechnology*, 22(4): 253-260.
66. Vitousek, P. M., H. A. Mooney., J. Lubchenco y J. M. Melillo. 1997. Human domination of earth`s ecosystems. *Science*, 277: 494-499.
67. Von, A. S., I. Sabala., P. Bozhkov., J. Dyachok y L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3): 233-249.
68. Yerushalmi, L., S. Rocheleau., R. Cimpoaia y M. Sarrazin. 2003. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil, *Bioremediation Journal*, 7: 37.

69. Zappi, M.E., B.A. Rogers., C.L. Teeter., D. Gunnison y R. Bajpai. 1996. Bioslurry Treatment of a soil Contaminated with Low Concentrations of Total Petroleum Hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 46: 1-12.
70. Zhang, S y P. G. Lemaux. 2004. Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. *Critical Reviews in Plant Science*, 23(4): 325-335.
71. Zhu Yong, L., E.A.H. Pilon-Smits., A. S. Tarun., S. U. Weber., L. Jouanin y N. Terry. 1999. Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing γ -Glutamylcysteine Synthetase1. *Plant Physiology*, 121: 1169–1177.
72. Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 81(3): 277-285.