



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAPACIDAD DE BIOACUMULACIÓN Y
RESISTENCIA A CADMIO Y
ZINC DE LAS RAÍCES PILOSAS DE *Arabidopsis halleri*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Raquel Sánchez Izquierdo

TUTOR:
Dr. JOSEPH DUBROVSKY

2008



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



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.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente al Dr. Joseph Dubrovsky por la oportunidad de trabajar con él. Por ser paciente a pesar de los errores y por todos los conocimientos que he adquirido.

A Paz por su amistad, toda la paciencia, las enseñanzas y la gran ayuda que me brindó durante todo el proyecto.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio Sveta, Selene, Alejandra, Katerina y a Yunuen, por su amistad y todas sus enseñanzas.

A Jazmín por hacer mi vida en el laboratorio más agradable y animarme en los momentos de desesperanza.

También agradezco a todos mis amigos de la facultad, Pilar, Nallely, Luisa Quetzalli, Jorge, Fernando, Rubén y Carlos. Por hacer mis cuatro años de licenciatura los más felices de mi vida.

A Dalila le doy gracias por ser mi amiga, estar conmigo en todo momento, por todos tus consejos, tu apoyo, pero sobre todo por demostrarme tu cariño en todo momento.

Pero sin duda, todos los éxitos se los debo a mi familia:

Le agradezco a mi abuelita Alicia y a mi tía Maricela, por todo su cariño y ayuda. A todos mis tíos (Juan, Carmela, Esther, Ofelia, Estela, Georgina, Ana y Lourdes), quienes a pesar de no verme, siempre me recuerdan y están dispuestos a ayudarme.

A mi hermana, Alicia le agradezco su cariño, apoyo incondicional y su muy agradable compañía.

A mis padres por todos los esfuerzos y sacrificios. Gracias a ustedes he alcanzado todos mis sueños.

A DGAPA por la beca otorgada.

Gracias a todos por su apoyo.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Sánchez Izquierdo Raquel 56 80 47 04 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 300301966</p>
<p>2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor Dr Joseph Dubrovsky</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dra Svetlana Shishkova</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 M. en C. Selene Napsupcialy Mendivil</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 M. en C. Manuel Hernández Quiroz</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 Biól Kassandra Patricia Ojeda Hinds</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Título Subtitulo Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito Capacidad de bioacumulación y resistencia a cadmio y zinc de las raíces pilosas de <i>A. halleri</i> 65p 2008</p>

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
1.2. INTRODUCCIÓN	5
1.2.1. Contaminación del agua y suelo en México	5
1.2.2. Sistemas alternativos de remoción de contaminantes: Biorremediación	7
1.2.3 Fitorremediación	9
1.2.4. Metales pesados, sus efectos en la salud y los ecosistemas	11
1.2.5. Usos y efectos del cadmio y el zinc	12
1.2.6. Plantas hiperacumuladoras de metales.....	14
1.2.7. Mecanismos de tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas.....	16
1.2.8. <i>Arabidopsis halleri</i>	17
1.2.9. Inducción de raíces pilosas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	18
1.2.10. Raíces pilosas como modelo en el estudio de la tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas.....	19
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVO GENERAL	22
6. OBJETIVOS PARTICULARES	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1. Material biológico.....	23
7.2. Esterilización de las semillas	23
7.3. Condiciones de crecimiento.....	24
7.4. Inducción de raíces pilosas	24
7.5 Confirmación del genotipo transformado	25

7.6 Cultivo de raíces pilosas	26
7.7 Exposición a cadmio y zinc	27
7.8 Análisis de supervivencia del meristemo apical	27
7.9 Velocidad relativa de crecimiento	28
7.10 Recopilación de los parámetros celulares	29
7.11 Método de aclaración de las raíces	30
7.12 Longitud de las células maduras del córtex	31
7.13 Densidad de primordios y raíces (P y R)	32
7.14 Evaluación de bioacumulación de cadmio y zinc	32
7.15 Exposición a Cd y Zn.....	32
7.16 Digestión del material vegetal	33
7.17 Determinación de Cd y Zn total en los cultivos de raíces pilosas	33
7.18 Análisis estadístico.....	34
8. RESULTADOS	34
8.1 Transformación de <i>A. halleri</i> con <i>A. rhizogenes</i>	34
8.2 Confirmación del evento de transformación.....	35
8.3 Cultivos de raíces pilosas.....	36
8.4 Análisis de supervivencia del meristemo apical	37
8.5 Velocidad relativa de crecimiento	39
8.6 Densidad de primordios y raíces laterales	41
8.7 Longitud de las células maduras del córtex	42
8.8 Acumulación de cadmio y zinc en las raíces pilosas	43
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES.....	58

11. APÉNDICE.....	59
12. REFERENCIAS.....	61

1. RESUMEN

Actualmente la contaminación ambiental es un gran problema que afrontan todos los países del mundo. En México el 25 % de los suelos y más del 70 % del agua están contaminados (INE 2002 y CNA; 2007). Hoy en día gran parte de esta contaminación es causada por metales pesados, debido al incremento acelerado de la industria minera y la agricultura, y aunque algunos metales son esenciales para los seres vivos, en altas concentraciones son altamente tóxicos. Dos de los metales más abundantes por su uso antropogénico son el cadmio y el zinc. Hoy en día existen tecnologías que intentan recuperar los sistemas contaminados basadas en métodos físico-químicos, sin embargo, la mayoría resultan ser muy costosos o poco eficientes (Pilon-Smits, 2005). Y para el caso específico de México no hay empresas que ofrezcan eliminar metales pesados del suelo (Velasco y Volke, 2002).

Ante esta problemática, se han propuesto tecnologías alternativas, una de ellas es la fitorremediación, basada en el empleo de plantas para la remoción, degradación, reducción o inmovilización de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos (Perr *et al.*, 2006; Nuñez *et al.*, 2004).

Por ahora se conocen poco más de 400 especies de plantas capaces de acumular grandes cantidades de uno o varios metales en sus tejidos aéreos, a estas especies se les conocen como plantas hiperacumuladoras de metales. *Arabidopsis halleri* es parte de este selecto es capaz de acumular cadmio y zinc en sus tejidos de manera extraordinaria ($\geq 1\%$ y 0.1% de la materia seca, respectivamente) (Bert *et al.*, 2000; Bert *et al.*, 2002; Bert *et al.* 2003). Sin embargo, esta especie herbácea tiene poca biomasa y un sistema radical poco extenso. Como alternativa, en este trabajo se propone la inducción de raíces pilosas con *Agrobacterium rhizogenes* con el objetivo de incrementar la biomasa de esta planta.

La infección por *A. rhizogenes* provoca en las plantas, una producción masiva de raíces con numerosos pelos radicales a esta enfermedad se le conoce como raíces pilosas, estas raíces son ampliamente usadas en la producción de metabolitos secundarios con fines biotecnológicos.

Existen numerosos trabajos acerca de la capacidad de bioacumulación de *A. halleri* (Lasat *et al.*, 1998; Küpper *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2000; Cosio *et al.* 2004; Zhao *et al.*, 2006). En el presente trabajo se establecieron cultivos de raíces pilosas y se probó su tolerancia a cadmio y zinc, así como su capacidad de bioacumulación de estos metales.

Se encontró que las raíces pilosas de *A. halleri* son capaces de tolerar y acumular grandes cantidades de cadmio y zinc, independientemente de la parte aérea. Los resultados muestran que las raíces pilosas pueden acumular mayor cantidad de cadmio con respecto al zinc.

Con base en los resultados se propone el uso de las raíces pilosas de *Arabidopsis halleri* como potenciales filtros biológicos, de agua contaminada con cadmio y zinc.

1.2 INTRODUCCIÓN

Hoy en día uno de los problemas más graves que afrontan todos los países del mundo es la contaminación del suelo, del agua y de la atmósfera. Aunque se han creado varias alternativas, basadas en métodos físicoquímicos, para rescatar los ecosistemas contaminados éstas resultan ser poco eficientes o demasiado costosas. Por lo tanto, se han buscado nuevas estrategias para enfrentar el problema, la biorremediación es una de las más prometedoras. Dentro de esta estrategia se encuentra la fitorremediación, tecnología que hace uso de las plantas para disminuir e incluso eliminar la contaminación de los ecosistemas, sin embargo, aún se sabe muy poco de los principios básicos de esta tecnología.

Este trabajo trata de contribuir al entendimiento de la capacidad de las plantas de acumular en sus tejidos altas concentraciones de metales.

1.2.1 Contaminación del agua y suelo en México

La contaminación, en términos generales, se define como el suministro de impurezas al ambiente y con esto se produce un deterioro en la atmósfera, el agua y el suelo a través de diversos químicos tóxicos y materiales de desecho. El deterioro varía dependiendo del tipo y de la concentración del contaminante (Demian, 1999).

En México existen graves problemas de contaminación por compuestos orgánicos e inorgánicos, tanto de suelos como de agua, debidos principalmente al desarrollo acelerado de la industria minera y petroquímica.

En el año 2006, el 19 % de las aguas superficiales estaban contaminadas, el 54% poco contaminada, el 20 % es aceptable y sólo el 10% es de calidad excelente (CNA;

2007). Del total de agua contaminada (descargas urbanas e industriales) sólo el 36% recibe algún tipo de tratamiento. A la mayor parte de esta agua se le da un tratamiento secundario mediante lodos activados y lagunas de estabilización, procesos que tienen entre 80 y 90% de eficiencia para la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), que no elimina los metales pesados del agua. Sin embargo, en el año 2004 el país solo contaba con 1 593 plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, las cuales procesaban cerca de 27.4 m³/s (10.6% del volumen generado). Por lo tanto, la mayoría del líquido se vierte a ríos, lagos o mares sin ningún tratamiento previo. El volumen de aguas residuales que anualmente regresan a las corrientes con contaminantes es de 20 Km³. De estas aguas residuales la industria genera 31 % con contenidos de metales pesados, ácidos, grasas y aceites (CNA, 2007).

Por otro lado, la superficie de suelo degradado por causas de contaminación en 1999 fue de 25,967 km². Entre los contaminantes que se consideran prioritarios en México debido a su alta toxicidad y a su persistencia en el ambiente, se encuentran los siguientes: dioxinas, furanos, hexaclorobenceno, bifenilos policlorados (BPCs), plaguicidas organoclorados, mercurio, plomo, cromo, cadmio, compuestos tóxicos atmosféricos e hidrocarburos poliaromáticos (HAPs). Los residuos peligrosos más comunes son los jales mineros, las escorias de fundición y aquellos provenientes de fuentes energéticas fósiles (INE 2002).

Como se mencionó anteriormente se han creado diversas estrategias para afrontar este problema. En México aproximadamente el 88 % de los suelos contaminados son sometidos a tratamientos de remediación *in situ*. Las empresas dedicadas a remediar suelos, usan métodos biológicos, siendo los más comunes el 1) el composteo (proceso en el que los residuos orgánicos son convertidos por

microorganismos en materia orgánica estable, se emplea ampliamente en el tratamiento de residuos agrícolas) y 2) la biolabranza (al suelo contaminado se le añade nutrientes y suelo limpio, se remueve constantemente para favorecer su aireación). Sin embargo, ninguna empresa ofrece servicios para la remediación de suelos contaminados con metales (Velasco y Volke, 2002), lo que resulta ser muy peligroso, pues además estos metales pueden ser lixiviados o transportados hasta cuerpos de agua (superficiales o subterráneos) y contaminarlos.

Actualmente, gran parte de la contaminación del suelo, del agua y del aire es provocada por el uso de metales pesados, problema que se incrementa de manera abrumadora con el desarrollo industrial y minero. Por lo tanto, se han buscado algunas alternativas para poder recuperar los ecosistemas contaminados, y así evitar daños a la salud humana. Algunas de estas alternativas son los métodos físico-químicos, como el lavado o incineración de suelos, la vitrificación, la separación física o la creación de barreras físicas, entre otros, (Mulligan *et al.*, 2001) y la precipitación, hidrólisis o reacciones de óxido-reducción para la remoción de contaminantes de aguas residuales (Nuñez *et al.*, 2004). Sin embargo estas estrategias llegan a ser muy costosas o insuficientes (Pilon-Smits, 2005).

Con base en la información anterior se entiende la necesidad de implementar con urgencia una tecnología que pueda recuperar los sitios contaminados. Como ya se mencionó anteriormente el uso de organismos vivos con este propósito, parece ser la mejor opción por el momento.

1.2.2 Sistemas alternativos de remoción de contaminantes:

Biorremediación

La biorremediación es una serie de procesos que consisten en el uso de organismos vivos (bacterias, algas, hongos, plantas o asociaciones simbióticas de plantas y hongos como las micorrizas) para remover, degradar o transformar sustancias orgánicas o inorgánicas de un sistema contaminado (suelo/sedimento o agua) (Demian, 1999; Velasco y Volke, 2003). Los microorganismos (bacterias, algas y hongos) generalmente se benefician al catalizar reacciones químicas que les permiten transformar su fuente de energía, es decir, estos organismos usan a los contaminantes como fuente de energía que luego transforman en energía química (ATP) (Demia 1999; Sims *et al.*, 1993).

Con esta tecnología es posible remover residuos tóxicos de forma natural y eficiente. Es importante mencionar que el método que se utilice debe ser optimizado con el fin de reducir o incluso eliminar el contaminante en un corto tiempo y bajo costo. Se pueden usar organismos propios del sitio o ajenos a este, de manera *in situ* o *ex situ*, estas condiciones dependen del proceso que se elija.

Existen varios procesos de biorremediación (Velasco y Volke. 2003)., entre los más comunes se encuentran:

- Bioestimulación: en este proceso se adiciona oxígeno o nutrientes o ambos al suelo contaminado, para estimular la actividad de microorganismos capaces de degradar los contaminantes.
- Biolabranza: el suelo contaminado se mezcla con nutrientes y suelo limpio y se remueve constantemente para favorecer la aireación.

- Bioaumentación: En este proceso se adicionan microorganismos vivos capaces de degradar contaminantes.
- Biorreactores: esta tecnología esta totalmente controlada y permite hacer uso de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación.
- **Fitorremediación:** En este caso se usan especies vegetales capaces de remover, transferir, estabilizar concentrar o destruir contaminantes orgánicos o inorgánicos. Ofrece ventajas adicionales, como la posibilidad de recuperar contaminantes como los metales pesados.

1.2.3 Fitorremediación

Ya que los métodos convencionales usados para recuperar ecosistemas contaminados resultan ser muy costosos y en algunos casos insuficientes, se ha recurrido a una nueva tecnología, la fitorremediación, que se basa en la capacidad de algunas plantas de remover, reducir, degradar, mineralizar, estabilizar o inmovilizar agentes contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo, de sedimentos o de sistemas acuáticos. Dentro de esta tecnología hay varios procesos (Pletsch *et al.*, 1999; Nuñez *et al.*, 2004; Eapen y D' Souza, 2005; (Perr *et al.*, 2006):

- Fitoextracción: proceso en el cual se usan plantas para acumular contaminantes del suelo en sus tejidos.
- Fitodegradación: se basa en el uso de plantas que puedan destoxificar contaminantes orgánicos.

- Rizofiltración: consiste en que las raíces de las plantas con alta tasa de crecimiento y área superficial absorban, concentren o precipiten metales provenientes de efluentes contaminados.
- Fitovolatilización: los contaminantes, como el mercurio y el selenio, son transportados de la raíz a las partes aéreas y ahí son volatilizados en formas menos tóxicas o menos peligrosas.
- Fitoestabilización: es el uso de plantas que puedan estabilizar, lignificar o humificar (formación de un complejo entre una sustancia orgánica o mineral con un ácido húmico) los elementos contaminantes en el suelo.
- Fitoestimulación: en este caso las plantas liberan sustancias que estimulan el crecimiento de los microorganismos de la rizósfera capaces de degradar los contaminantes presentes en el suelo.

La elección de cualquiera de estas tecnologías depende de la concentración y características de los contaminantes, así como de las propiedades de las plantas (Pilon-Smits, 2005). Sin embargo, en cualquiera de sus variantes, la fitorremediación es menos costosa, ambientalmente no destructiva y en algunos casos ofrece la posibilidad de recuperar el metal (Clemens *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005).

Aunque la fitorremediación parece ser una estrategia prometedora en la remediación de suelos y agua, hay que tener en cuenta que también tiene algunas desventajas que pueden ser una limitante para alcanzar el éxito en el proceso de remediación en campo (Clemens *et al.*, 2002), por ejemplo:

- i) La mayoría de las plantas presentan crecimiento lento o su producción de biomasa es baja.
- ii) En algunos casos no desarrollan un sistema radical profundo.
- iii) No son tolerantes a altas concentraciones de contaminantes.

iv) Su capacidad para acumular grandes cantidades de contaminantes es baja La poca biomasa de algunas plantas hiperacumuladoras es una de las grandes limitantes para que los proyectos de fitorremediación en campo sean totalmente exitosos, por lo que es necesario plantear alternativas biotecnológicas que nos permitan incrementar la biomasa de estas plantas.

1.2.4 Metales pesados, sus efectos en la salud y los ecosistemas

La característica principal que define a un metal pesado es que debe tener una densidad mayor a 6 g/cm^3 (Alloway, 1995), sin embargo, existen muchas otras definiciones basadas en el peso atómico, una de ellas dice que el término de metales pesados es usado para denotar a aquellos metales con gran masa atómica, especialmente los metales de transición que no son asimilables por los seres vivos, como el mercurio, el cadmio o el plomo. Otra definición para los metales pesados se basa en sus propiedades químicas, ésta los clasifica como cualquier metal que reacciona fácilmente con dithizona ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$). Existen otras definiciones en términos del número atómico, otras que solo se basan en la toxicidad del metal y otras no tienen una base química (Duffus, 2002). Estos elementos son muy comunes en la naturaleza, 53 de los noventa elementos que ocurren de forma natural en el ambiente son metales pesados (Benavides, *et al.*, 2005), pueden presentarse en varios estados de oxidación, un buen ejemplo es el cromo que lo podemos encontrar en la naturaleza en estado trivalente (elemento esencial) o en estado hexavalente (muy tóxico). Algunos de ellos como el zinc, el cobre, el cobalto o el níquel son micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, en altas concentraciones pueden causar daños a los organismos que están en contacto con ellos, por ejemplo, en humanos pueden causar enfermedades desde dermatitis hasta cáncer. En plantas se ha observado un aumento en la peroxidación de los lípidos, daño

al DNA, y la oxidación de grupos sulfhidrilo de proteínas (Taiz y Zeiger 1998). Además, los iones de los metales pesados se unen con facilidad a enzimas provocando una disminución en su actividad, pueden también causar daño oxidativo a los tejidos de las plantas o disminución en el contenido de clorofila de la hoja (Gallego *et al.*, 1996; Duruibe *et al.*, 2007).

Ejemplos de metales pesados tóxicos son el plomo, mercurio, cromo, cobre, cadmio, zinc y níquel, estos son considerados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos como los metales más peligrosos en la lista de contaminantes prioritarios. En los últimos años se ha incrementado considerablemente el uso de cobre, cadmio y zinc (Mulligan *et al.* 2001); por lo que es necesario encontrar alternativas eficientes para eliminar estos contaminantes de los ecosistemas.

1.2.5 Usos y efectos del cadmio y el zinc

Dos de los metales más comunes en la naturaleza son el zinc y el cadmio. El zinc es un micronutriente esencial para las plantas (Taiz y Zeiger, 1998), es el segundo metal de transición más abundante, se encuentra de forma natural en sus tejidos en concentraciones de entre 15 y 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de biomasa seca. Sin embargo, cantidades más altas son tóxicas para la mayoría de las plantas, causando inhibición del crecimiento de la raíz, clorosis (Krämer, 2005), reducción del crecimiento del tallo y de las hojas, entre otras cosas. Estos síntomas pueden ser causados por que la planta pierde su capacidad de producir suficientes cantidades de auxina (hormona presente de forma natural en las plantas que regula procesos como el tropismo la elongación celular, la diferenciación vascular, la división celular y la ramificación lateral (Taiz y Zeiger, 1998). Para los humanos el zinc también es un elemento importante, es cofactor de más de 300 enzimas. Sin embargo la ingestión en exceso de este metal, puede causar entre otros trastornos:

anemia, decremento en los niveles de colesterol, induce la deficiencia de cobre (promueve la síntesis intestinal de metalotionina de cobre), inmunotoxicidad, efectos gastrointestinales, resequedad e irritación de la garganta, dolor de cabeza, fiebre y resfriados (EPA, 2005).

La fuente antropógena de zinc es de 20 a 1 con respecto a la fuente natural o geogénea, ya que se emplea en el galvanizado de acero y en la metalurgia de metales preciosos, para separar la plata del plomo. Es resultado de la combustión del petróleo y del desperdicio de fertilizantes fosfátados; solo con la industria minera se emitieron 10 000 toneladas de Zn por año durante los últimos 200 años (Broadley *et al.*, 2007). Se considera que un suelo está contaminado con zinc cuando se excede la concentración de 150 ppm (Mulligan *et al.*, 2001).

Un aspecto de suma importancia en la fitorremediación es la disponibilidad del metal para las plantas y depende de las características del suelo. Por ejemplo, el contenido de la materia orgánica, el tamaño de las partículas del suelo o el pH, siendo este último el factor físico-químico más importante; en valores de pH ácidos el zinc es más biodisponible debido a la solubilidad de coloides minerales y orgánicos (Mulligan *et al.*, 2001).

El cadmio es un metal pesado no esencial para las plantas (Taiz y Zeiger, 1998). La concentración de este metal en suelos no contaminados, debe ser menor a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Mulligan *et al.*, 2001), pero actualmente se puede encontrar en altas concentraciones debido a su producción en estaciones termoeléctricas, en la industria metalúrgica, en la fabricación de pigmentos, en pilas de cadmio-níquel, en fertilizantes fosfátados y como estabilizador de plásticos como el PVC (Hansen y Lassen 2003). Sin embargo, la fuente más importante de descarga de cadmio al medio ambiente es la quema de combustible

fósil, en la incineración de basura y cal fundir rocas para extraer zinc o plomo (Benavides *et al.*, 2005). Además, este metal es relativamente soluble en agua por lo que se encuentra en forma biodisponible, especialmente en valores de pH bajos entre 4.5 a 5.5 (Hansen y Lassen 2003 y Mulligan *et al.*, 2001).

Se sabe que el cadmio puede causar varias enfermedades en humanos, en exposiciones cortas dermatitis, y con la exposición crónica, daño renal y posiblemente cáncer de pulmón (Yang *et al.*, 2005, Hansen y Lassen, 2003). Las principales formas de intoxicación en humanos con este metal son: el consumo de alimentos y agua contaminados con cadmio, así como el fumar tabaco.

En plantas, se ha visto que el cadmio afecta la apertura de estomas y la transpiración, inhibe a la enzima Fe III reductasa, con lo que se alteran los procesos de fotosíntesis. También causa alteraciones en la membrana plasmática inducidas por la peroxidación de los lípidos, puede además reducir la actividad de enzimas involucradas en la fijación de CO₂, etc. (Benavides *et al.*, 2003). La absorción de cadmio por las raíces parece estar en competencia por las mismas proteínas transmembranales para nutrientes como potasio, calcio, magnesio, hierro entre otros (Benavides *et al.*, 2005).

Debido a los diversos efectos nocivos de metales pesados en exceso como el cadmio y el zinc en la salud humana y en general de los seres vivos, se hace necesario el uso de nuevas tecnologías, por ejemplo, aquellas basadas en especies vegetales con el propósito de remediar ambientes contaminados de manera eficiente y económica. En este trabajo se usaron plantas de la especie *Arabidopsis halleri* ya que anteriormente se demostró que es una de las especies capaces de acumular grandes cantidades de cadmio y zinc en el brote y en la raíz (Bert *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000).

1.2.6 Plantas hiperacumuladoras de metales

Existen especies vegetales que pueden tolerar concentraciones altas de metales pesados, pero existen algunas que además tienen la capacidad de acumular metales en sus tejidos en elevadas concentraciones sin presentar efectos de toxicidad, por lo que son llamadas plantas hiperacumuladoras. Entonces, una planta es considerada hiperacumuladora de metales, si creciendo en su hábitat natural tiene una elevada concentración de metales en sus tejidos aéreos, (Reevs y Baker, 2000). La concentración que pueden acumular varía dependiendo del metal. En la Tabla 1 se enlistan algunas de las 400 especies vegetales hiperacumuladoras que se conocen, así como la concentración mínima del metal que deben acumular para ser consideradas hiperacumuladoras.

Tabla. 1. Especies vegetales hiperacumuladoras de metales, los metales que acumulan y la cantidad mínima de metal en sus tejidos aéreos para ser considerada especie hiperacumuladora (Prassad y Freitas, 2003; Barceló y Poschenrieder, 2003).

Especie	Metal que acumula	Cantidad mínima que define a la planta como hiperacumuladora, $\mu\text{g/g}$ (Peso seco)
<i>Thlaspi goesingense</i>	Níquel	≥ 1000
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	Plomo	≥ 1000
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Níquel, zinc	≥ 1000 ; 10,000
<i>Berkheya codii</i>	Níquel	≥ 1000
<i>Alyssum pterocarpum</i>	Níquel, zinc y magnesio	≥ 1000 ; 10,000
<i>Alyssum bertholini</i>	Níquel	≥ 1000
<i>Arabidopsis halleri</i>	Cadmio y zinc	≥ 100 ; 10,000

--	--

1.2.7 Mecanismos de tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas

Las plantas hiperacumuladoras de metales tienen varios mecanismos para lograr el almacenamiento de metales en sus tejidos, estos mecanismos van desde la movilización y captura del metal a partir del suelo, la compartimentalización y secuestro dentro de las raíces, la transferencia al xilema, la translocación del metal de las raíces a la parte aérea, hasta el almacenamiento en estructuras especializadas como las vacuolas (Clemens *et al.*, 2002; Broadley *et al.*, 2007). Se explica brevemente en que consiste cada uno de estos mecanismos:

- **Movilización y captura del metal:** se cree que la acidificación de la rizósfera y la liberación de carboxilatos ayudan a aumentar la biodisponibilidad de metales. Los microorganismos presentes en la rizósfera y las asociaciones simbióticas (micorrizas), también contribuyen a incrementar la disponibilidad de los metales para las plantas y por tanto aumentar su acumulación (Clemens *et al.*, 2002).
- **Secuestro del metal en las raíces:** una vez que el metal está disponible, es adsorbido por la pared de las células de la raíz, después es transportado al interior de la misma (Clemens *et al.*, 2002).
- **Translocación del metal:** una vez en las células de la raíz. Los metales se unen a compuestos como la histidina, la nicotiamina o los citratos. Después son transportados por proteínas transportadoras de membrana al xilema. Pero cuando

los metales se unen a las fitoquelatinas, predominantemente quedan almacenados en los tejidos de la raíz (Clemens *et al.*, 2002).

- Secuestro y almacenamiento en las células de la hoja: el almacenamiento del exceso de metales se da en la vacuola de las hojas, sin embargo, la distribución de los metales en la planta varía según la especie y el estadio en que se encuentre (en pleno crecimiento, floración, generación de frutos) (Clemens *et al.*, 2002).

Todos estos procesos están regulados por varios mecanismos a nivel fisiológico y bioquímico. Zhao y colaboradores en el año 2000, estudiaron la capacidad de *A. halleri* para tolerar y acumular zinc y encontraron que el zinc puede unirse a ácidos carboxílicos como el ácido cítrico y málico, disminuyendo así el carácter tóxico del metal, también se ha demostrado que *A. halleri*, es capaz de acumular cadmio a través de la vía de transporte del zinc, aunque la capacidad de destoxificar cadmio se ve disminuida (Zhao *et al.*, 2006).

También se ha demostrado que la proteína, conocida como MTP3 (METAL TOLERANCE PROTEIN 3) interviene en el secuestro sub-celular de zinc y contribuye a la tolerancia básica de *A. thaliana* a este metal y que se expresa en cantidades mayores en células epidérmicas y del córtex de la raíz, lo que sugiere que esta proteína protege a la planta por la exclusión del zinc de los brotes (Arrivault *et al.*, 2006). Además plantas de *Arabidopsis* que sobre expresan una proteína llamada ZAT (ZINC TRANSPORTER de *A. thaliana*), también llamada MTP1 (METAL TOLERANCE PROTEIN 1), pueden tolerar concentraciones altas de zinc y acumularlo en sus tejidos (Clemens *et al.*, 2002).

1.2.8 *Arabidopsis halleri*

Arabidopsis halleri, también conocida como *Cardaminopsis halleri*, pertenece a la familia Brassicaceae. Es una planta herbácea montañosa perenne de 20 a 65 cm. de altura, que se propaga vegetativamente por estolones y es polinizada por un amplio grupo de insectos. Florece únicamente en verano de junio a agosto. Esta especie crece preferentemente en suelos arenosos y oligotróficos y se le puede encontrar en el centro y este de Europa hasta el norte de Rusia, en Japón y al norte de Taiwán. Es una especie diploide ($2n=16$) (www.efloras.org, 2007). Además se sabe que las poblaciones de esta especie son capaces de tolerar y acumular altas concentraciones de cadmio y zinc ($\geq 1\%$ y 0.1% de la materia seca, respectivamente) (Bert *et al.*, 2000, Bert *et al.*, 2002 Bert *et al.*, 2003).

En este estudio se eligió trabajar con *A. halleri* porque es una buena hiperacumuladora de cadmio y zinc, dos de los metales más comunes en los sitios contaminados. Existen varios trabajos importantes sobre su capacidad de acumulación de estos metales, en comparación con otras especies tiene una amplia distribución geográfica y tiene cercanía filogenética importante con *A. thaliana*, cuyo genoma está totalmente secuenciado. Aunque *A. halleri* es una buena hiperacumuladora de cadmio y zinc, su biomasa es muy reducida. Una estrategia para solucionar este problema es incrementar su biomasa a través de la inducción de raíces pilosas con *Agrobacterium rhizogenes*.

1.2.9 Inducción de raíces pilosas por *Agrobacterium rhizogenes*

La transformación de plantas, en su mayoría dicotiledóneas, por la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* es un fenómeno que se presenta de manera natural. Esta bacteria infecta y transforma plantas que han sufrido algún daño mecánico (Pletsch *et al.* 1999, Tzfira y Citovsky, 2002) y provoca una producción masiva de raíces con numerosos pelos radicales, conocidas como raíces pilosas (“hairy root”) (Shanks y Morgan, 1999; Nilsson *et al.*, 1997). *A. rhizogenes* es una bacteria fitopatógena, Gram-negativa que vive en el suelo, se caracteriza por poseer un plásmido llamado Ri (“root inducing”) de aproximadamente 200 Kb donde se encuentra la región de virulencia (*vir*) y el llamado DNA de transferencia (T-DNA). Esta región tiene los genes responsables de la formación de raíces pilosas y de la producción de derivados de azúcares y proteínas llamados opinas. Cuando el T-DNA se incorpora al genoma de la planta, las células comienzan a sintetizar opinas, aminoácidos bacterianos, que son excretadas al ambiente para ser usadas por la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno (Madigan *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2004). Para que la infección tenga lugar, la planta debe sufrir algún tipo de herida con lo que libera fenoles y azúcares que son reconocidos por la bacteria, y así se adhiere a la célula huésped. Una vez en la célula vegetal, proteínas codificadas por la región *vir* se activan y permiten la síntesis de una cadena simple llamada cadena T a partir del T-DNA, formándose un complejo de proteínas Vir, que actúan como puente que permite la transferencia de la cadena T desde el citoplasma de la bacteria al de la célula vegetal. Una vez aquí, se forma un complejo T maduro que es transportado del citoplasma al núcleo con ayuda de proteínas de la célula vegetal. La integración del complejo T está mediado tanto por proteínas Vir como por factores de la célula huésped (Tzfira y Citovsky, 2002; Zupan y Zambryski, 1995). Hoy en día este proceso que se da de forma natural es aprovechado con fines biotecnológicos muy variados, por ejemplo, la obtención de metabolitos secundarios.

1.2.10 Raíces pilosas como modelo de estudio de la tolerancia a metales y su bioacumulación en plantas

Las raíces pilosas tienen varias características que las hacen muy útiles en biotecnología vegetal. Presentan crecimiento rápido, estabilidad genética y bioquímica, crecen en medios de cultivo libres de hormonas y pueden ser propagadas fácilmente, por lo que son ampliamente usadas para la obtención de metabolitos secundarios, y también en la producción de anticuerpos monoclonales y para regenerar plantas transgénicas (Shanks y Morgan, 1999). Recientemente han sido propuestas como modelos de investigación y desarrollo de métodos de fitorremediación como: la fitotransformación, la fitoestimulación, la rizofiltración y la fitoextracción, debido a que las raíces también acumulan metales (Pletsch *et al.*, 1999). Ya que se ha demostrado que *Arabidopsis halleri* (Bert *et al.*, 2000 y Zhao, *et al.*, 2000) es una planta tolerante e hiperacumuladora de cadmio y zinc y la inducción de raíces pilosas incrementa considerablemente la biomasa (Lugo-Rodríguez, 2007), una característica necesaria en procesos de fitorremediación. En este trabajo se usa la raíz transformada de *A. halleri* con *A. rhizogenes* para probar su potencial de tejido acumulador de zinc y cadmio.

2. ANTECEDENTES

Existen numerosos trabajos a nivel genético, molecular, fisiológico, bioquímico, e incluso a nivel de campo, acerca de la capacidad de *Arabidopsis halleri* de acumular cadmio y zinc en sus tejidos (Bert *et al.*, 2000; Bert *et al.*, 2002; Krämer, 2005; Sarret, *et al.*, 2002; Zhao, *et al.*, 2000 Zhao, *et al.*, 2006; McGrath *et al.*, 2006). Sin embargo,

actualmente no hay trabajos que evalúen la capacidad de acumulación de metales de las raíces de forma individual y tampoco hay literatura que hable de la inducción de raíces pilosas (hairy roots) con *A. rhizogenes* y su comportamiento en presencia de metales. En este trabajo se hace la transformación de *A. halleri* para inducir raíces pilosas con el propósito de aumentar la biomasa de las raíces.

Actualmente existen muchos trabajos donde se han establecido cultivos de raíces pilosas de especies vegetales con el objetivo de producir metabolitos con interés comercial como antimicóticos, perfumes, tranquilizantes etc. (Shanks y Morgan, 1999), pero son pocos los reportes de cultivos de raíces pilosas de especies vegetales con fines de fitorremediación. Por ejemplo, Agostini y colaboradores en 2003 establecieron exitosamente cultivos de raíces pilosas de *Brassica napus* y probaron su capacidad de remover el 2,4-diclorofenol en solución, compuesto orgánico altamente tóxico. Ellos encontraron que en una hora se obtenía la máxima eficiencia de remoción. Nedelkoska y Doran en 2000, establecieron cultivos de raíces pilosas y analizaron la capacidad de *Thlaspi caerulescens* de acumular cadmio. Ellos reportaron que ésta especie es capaz de acumular altas concentraciones de cadmio creciendo en el medio de cultivo y observaron que la absorción se daba en los primeros 30 min. Posteriormente en 2001, en este grupo determinaron la capacidad de cultivos de raíces pilosas de tres especies del género *Alyssum* para acumular níquel en sus tejidos y encontraron que las especies son capaces de tolerar y acumular níquel, en altas concentraciones independientemente de la parte aérea, siendo *Alyssum bertolonii* la más eficiente.

Dada la poca información que se tiene acerca de los cultivos de las raíces pilosas de especies hiperacumuladoras y su potencial de acumulación de metales pesados así como su resistencia a altas concentraciones de metales, es necesario estudiar y conocer

más acerca de los cultivos de las raíces pilosas de especies hiperacumuladoras de metales.

3. JUSTIFICACIÓN

Plantas de *A.halleri* pueden acumular grandes cantidades de cadmio y zinc. Sin embargo su biomasa es poca, así como la extensión de sus raíces. Es por eso que en este trabajo se recurre a la transformación genética de la planta con *Agrobacterium rhizogenes*, para obtener raíces pilosas como una alternativa para incrementar la biomasa de la raíz (Eapen y D'Souza, 2005) y probar que los cultivos de raíces pilosas de esta especie pueden tolerar y acumular cadmio y zinc independientemente del resto de la planta.

Los cultivos de raíces pilosas son una buena alternativa como modelo de fitorremediación pues la mayoría de las especies hiperacumuladoras que se conocen hasta el momento entre ellas *A. halleri* no pertenecen a la flora actual de México, por lo que no pueden ser cultivadas en campo abierto.

El establecimiento de cultivos de raíces pilosas como filtros biológicos parece ser una buena alternativa tecnológica con fines de fitorremediación, sin embargo es necesario tener más información acerca de su comportamiento en presencia de altas concentraciones de metales.

4. HIPÓTESIS

El cultivo de las raíces pilosas de *Arabidopsis halleri* mantienen la capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de Cd y Zn así como la capacidad de acumularlos en cantidades significativas.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la supervivencia y el crecimiento de las raíces pilosas de *Arabidopsis halleri* en presencia de sales de cadmio y zinc de manera individual, así como determinar su tolerancia a estos metales y tasa de bioacumulación.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir raíces pilosas con *Agrobacterium rhizogenes* en *A. halleri* y propagarlas en cultivo *in vitro*.
- Analizar el crecimiento de las raíces pilosas de *A. halleri* en medio de cultivo con altas concentraciones de cadmio y zinc y sin la adición de estos metales.
- Establecer cuáles son las concentraciones máximas de cadmio y zinc en el medio de cultivo que permiten el crecimiento de las raíces pilosas de *A. halleri*.
- Determinar el coeficiente de bioacumulación de metales de los cultivos de raíces pilosas de *A. halleri*

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se usaron semillas de *Arabidopsis halleri* del ecotipo *Arabidopsis halleri* spp. *halleri* (donada por Pierre Saumitou-Laprade, Universidad de Lille, Francia). Para la inducción de raíces pilosas se usó la cepa de tipo silvestre A4 de *Agrobacterium rhizogenes*.

7.2 Esterilización de las semillas

Las semillas del ecotipo de *A. halleri* se esterilizaron durante 10 minutos en una solución preparada con cloro comercial (hipoclorito de sodio 6 %) al 20 %, suplementado con 0.08 % de tritón X-100. Posteriormente se lavaron 4 veces con agua destilada estéril durante 10 minutos y se almacenaron en cajas de Petri con agua estéril a 4° C durante 2 días.

7.3 Condiciones de crecimiento

Las semillas esterilizadas se sembraron en cajas de Petri con medio sólido MS (Murashige & Skoog, medio basal modificado, pH ajustado 5.7) al 0.2 X con 1 % sacarosa y 0.8 % de agar. Las plantas se cultivaron en cajas orientadas verticalmente a 22° C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de 15 días, las plántulas se trasplantaron a frascos con el mismo medio de cultivo, para obtener plantas más grandes y usar explantes de hoja y pecíolo para la transformación con *A. rhizogenes*.

7.4 Inducción de raíces pilosas

La bacteria *Agrobacterium rhizogenes* se inoculó en medio YM líquido pH 7 (Apéndice I), con 50 µg/ml de rifampicina, el cultivo se mantuvo por 48 hrs en agitación orbital a 120 rpm. Se midió la densidad del cultivo bacteriano, con ayuda de un espectrofotómetro y se registró la absorbancia a 600 nm, siendo el intervalo óptimo para la transformación 0.5-0.8 D.O. (1×10^5 a 1×10^8 células por ml), ya que se ha visto que en esta densidad se obtienen mejores resultados en la transformación de las plantas por la bacteria (Chávez *et al.*, 2003). Cuando la densidad del cultivo bacteriano se encontraba en el intervalo óptimo (48 hrs. de cultivo), se comenzó la transformación de las plantas.

La transformación de *A. halleri* consistió en cortar explantes (hojas y peciolo) de las plantas completas y hacer en ellas pequeñas incisiones. Los explantes con heridas se incubaron en 20 ml del cultivo bacteriano durante 40 min. Transcurrido este tiempo los explantes fueron retirados del cultivo bacteriano y sin hacer lavados se colocaron en cajas de Petri con medio MS 1X y 1% de sacarosa, en condiciones de oscuridad a 22° C, durante 2 días, con el objetivo de mantener el co-cultivo. Al término de este tiempo los explantes se lavaron con una solución de agua destilada y cefotaxima 50 µg/ml y se traspasaron a cajas de Petri con medio MS 1X con 3% de sacarosa, 0.8 % de agar y cefotaxima (400 µg/ml). Después de dos semanas aproximadamente, las raíces que emergieron de los explantes se cortaron y se traspasaron a cajas de Petri con MS 1X con 3% de sacarosa, 0.8 % de agar y cefotaxima (400 µg/ml). Fue necesario cambiar el cultivo de raíces a una caja con medio nuevo al menos en tres ocasiones antes de confirmar la transformación a través del análisis de PCR, esto con el objetivo de asegurar la eliminación total de la bacteria y así evitar falsos positivos.

7.5 Confirmación del genotipo transformado

Para asegurar la naturaleza transformada de la raíz pilosa de *A. halleri* se recurrió al análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y así se verificó que el T-DNA de la bacteria se integró al genoma de la planta. Para poder llevar a cabo este análisis se extrajo DNA genómico de las raíces siguiendo el protocolo de extracción con CTAB 2x (Apéndice II) (Lukowitz, *et. al.* 2000). El tejido de raíces necesario para la extracción se obtuvo en condiciones de esterilidad para permitir que el cultivo continuara creciendo y en caso de estar transformada empezar su propagación en medio de cultivo líquido.

En este caso se usaron los oligonucleótidos *rol B1* y *rol B2* (5'-ACTATAGCAAACCCCTCCTGC-3 y 5'-TTCAGGTTTACTGCAGCAGGC-3') para amplificar un fragmento de 652 pb del gen *rolB* de *A. rhizogenes* (Bonhomme *et al.* 2000) La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µl de reacción: MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.2 mM, oligo *rol B1* 50 pM, oligo *rol B2* 50 pM, amortiguador 1x, ADN polimerasa (Taq pol) 1 U/µl, H₂O mili Q 18 µl, y 1µl de DNA genómico. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador (Techne Genius ®) durante 30 ciclos, por 1.30 minutos a una temperatura de 94°C para desnaturalizar el DNA, a 63° C por 1.30 minutos para alinear el DNA y a 72° C por 2 minutos para la amplificación del fragmento *rolB*. Los productos de la amplificación se observaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.4%. El gel se preparó usando amortiguador TBE 1X (Apéndice III) que también se usó en la cámara de electroforesis. Se usó un marcador molecular de 1 Kb(Invitrogen™). El gel se corrió a 58 mili Amper durante 50 minutos y se tiñó con bromuro de etidio. Los resultados se observaron con ayuda de un transluminador UV.

7.6 Cultivo de raíces pilosas

Los cultivos de raíces que sí estaban transformadas se subcultivaron en cajas de Petri con medio sólido MS 1X suplementado con 3 % de sacarosa, 0.8 % de agar y cefotaxima (400 µg/ml).

Posteriormente, una parte del cultivo en medio sólido se traspasó a matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio líquido MS 1X con 3 % de sacarosa y cefotaxima (400µg/ml), para evitar que la bacteria proliferara de nuevo y así evitar una posible contaminación. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad y en agitación orbital (100 rpm) a 21° C.

7.7 Exposición a cadmio y zinc

Los cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* fueron expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (CdCl_2) y sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (250, 500, 1000 y 2000 µM), que son hasta 489 (2000 µM) veces (Cd) y 64 (2000 µM) veces más de zinc con respecto al límite máximo permitido en México para el deshecho de estos metales (0.75 mg/ml para cadmio y 9 mg/ml para zinc) establecidas en la NOM-002-ECOL-1996.

7.8 Análisis de supervivencia del meristemo apical

Con el objetivo de determinar la concentración máxima de metales donde el cultivo de raíces pilosas presenta la mayor supervivencia, se seleccionaron para cada

replica 50 raíces de un subcultivo de raíces pilosas de siete días de crecimiento (tres replicas) en medio MS 1X con 3% de sacarosa sin reguladores de crecimiento en oscuridad, suplementado con 250, 500, 1000 y 2000 μM de sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y cloruro de cadmio CdCl_2 , (Bert *et. al.*, 2002 y Zhao *et. al.*, 2000), incubado a 21°C y en agitación orbital a 100 rpm.

Las raíces seleccionadas se mantuvieron durante 20 min. en una solución de CFDA (6-carboxifluoreceína diacetato) 5 $\mu\text{g/ml}$ (Goodall y Jonson, 1982). Después se lavaron con agua destilada para retirar los excesos del fluorocromo posteriormente, se montaron en portaobjetos con un poco de agua y se observaron en el microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de 488 nm, usando el objetivo 20x. Fueron analizados los meristemas apicales de las raíces laterales.

Se eligió este fluorocromo porque entra libremente en las células, y solo en aquellas que están vivas se da una conversión enzimática donde las esterasas intracelulares hidrolizan el CFDA provocando la conversión a un fluoróforo hidrofílico (Duane *et al.*, 1986). Entonces, las células que están muertas no presentan fluorescencia pues no hay producción de estas esterasas que hidrolizan el CFDA.

7.9 Velocidad relativa de crecimiento

Para estimar la velocidad relativa de crecimiento (VRC) de cultivos de raíces pilosas se usó la siguiente ecuación descrita en Chiariello y colaboradores (1989):

$$\text{VRC} = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

Donde:

W_2 = Peso final del cultivo.

W_1 = Peso inicial del cultivo.

t_1 = Tiempo inicial.

t_2 = Tiempo final.

Para poder obtener los datos de peso seco al inicio del cultivo (W_1) se pesaron 0.5 g ($\pm 10\%$) de tejido fresco (5 réplicas). Se secaron durante 7 días a 62° C, y se registró el peso seco para cada replica, el promedio de estos datos fue considerado como W_1 para todos los experimentos de VRC. Para pesar las raíces al inicio del cultivo se retiró el exceso de medio, colocando cada cultivo entre dos círculos de papel filtro estéril durante 30 segundos. Los fragmentos se pesaron en cajas de Petri, conservando las condiciones de esterilidad (Lugo-Rodríguez, 2007).

Los fragmentos (0.5 g $\pm 10\%$) obtenidos de un cultivo de raíces pilosas de 28 días de crecimiento se subcultivaron en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio líquido MS 1x con 3% de sacarosa y sin reguladores de crecimiento (3 réplicas para cada concentración), en las mismas concentraciones establecidas para el análisis de supervivencia, es decir, 250, 500 1000 y 2000 μM para zinc y cadmio por separado y el cultivo control, sin exceso de metales.

Los cultivos se mantuvieron durante 21 días creciendo en oscuridad a 21°C y en agitación orbital a 100 rpm y al término de éste tiempo se secaron durante 7 días a 62° C y se registró el peso seco en gramos (W_2).

7.10 Recopilación de los parámetros celulares

Como parámetros para determinar si existían diferencias en el crecimiento de la raíz de cultivos creciendo en diferentes concentraciones de cadmio, zinc y entre aquellos cultivos que crecieron sin exceso de metales, se determinó la densidad de raíces laterales y el tamaño de células maduras del córtex, con base en el método descrito por Dubrovsky *et al.* (2006). Se analizaron cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* que crecieron en medio MS 1X con 3% de sacarosa, suplementados con cadmio y zinc y el control sin exceso de metales, y se incubaron en oscuridad a 21°C en agitación orbital a 100 rpm, durante 14 días ya que es en este tiempo donde se registra un crecimiento exponencial del cultivo (Lugo-Rodríguez, 2007). Este análisis nos ayudó a entender como la formación de órganos laterales afecta la producción de biomasa y que procesos de crecimiento de las raíces pilosas están afectados bajo el tratamiento con metales.

7.11 Método de aclaración de las raíces

Para poder analizar la densidad de primordios y raíces laterales y la longitud de las células maduras del córtex, se seleccionaron 50 raíces de los cultivos de raíces pilosas; se eligieron las siguientes concentraciones para este análisis: sin exceso de sales de metales, 500 y 1000 μM . No se pudo seleccionar raíces que crecieron en la concentración más alta verificada (2000 μM), debido a que eran demasiado cortas para poder separarlas.

Las raíces seleccionadas debían de tener las siguientes características: raíces con meristemo vigoroso, es decir aquellas que no presentan pelos cerca de la punta y con

raíces laterales menores a 5mm. Estas raíces se colocaron en cajas con medio MS 1x y 1% de sacarosa durante 24 h, las cajas permanecieron en un cuarto de crecimiento en oscuridad a una temperatura de 25°C, en posición vertical (Lugo-Rodríguez, 2007). Sólo aquellas raíces que crecieron durante este tiempo fueron fijadas con una solución de paraformaldehído 2% en PIPES 0.025 M (Apéndice IV), durante 24 h. Después de tres lavados (15 min. cada uno) con PIPES 0.1M las raíces se aclararon usando el método descrito por Malamy y Benfey (1997). Este método consiste en mantener las raíces en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.24 N en metanol al 20 % (Apéndice V) durante 60 min. a 62° C. Pasado el tiempo se retiró esta solución y se añadió una solución básica de hidróxido de sodio (NaOH) al 7% en etanol al 60% (Apéndice VI). Las raíces se incubaron en esta solución durante 20 min. a temperatura ambiente. Finalmente se retiró esta solución y se rehidrataron con etanol al 40%, la solución se cambió por etanol al 20% y después al 10% y sin retirar se añade glicerol al 50 %. Las raíces pueden permanecer de 1 a 4 días en cada solución de rehidratación. Una vez terminado el tratamiento las raíces fueron montadas en portaobjetos con glicerol al 50% y analizadas por microscopía de contraste diferencial de interferencias (Nomarski), usando el objetivo de 40x, en un microscopio óptico invertido (Zeiss).

7.12 Longitud de las células maduras del córtex

Para determinar si el crecimiento de las raíces pilosas está influenciado por la elongación de las células de la raíz y si ésta elongación se ve afectada por la presencia de altas concentraciones de cadmio y zinc se midieron las células del córtex completamente elongadas. Se analizaron 10 raíces y para cada una se midió la longitud en micrómetros (μM) de 10 células del córtex, en la zona de diferenciación de la raíz (zona de la raíz cubierta de pelos radicales). La medición se realizó a partir de la quinta

célula inmediatamente después de observar las ornamentaciones características del protoxilema diferenciado.

7.13 Densidad de primordios y raíces

Otro parámetro que nos ayuda a entender el crecimiento de la raíz es la densidad de primordios (P) y raíces laterales (R). El análisis consistió en seleccionar raíces pilosas de aprox. 2 cm de longitud, es importante mencionar que no se eligió la raíz primaria puesto que sería muy difícil identificarla en el cultivo, dado el número excesivo de raíces y su consecuente aglomeración. . La densidad de P y R, se estimó como el número de primordios y raíces laterales presentes en la raíz entre la longitud a partir del primer primordio más cercano a la punta de ésta (Dubrovsky *et al.*, 2006).

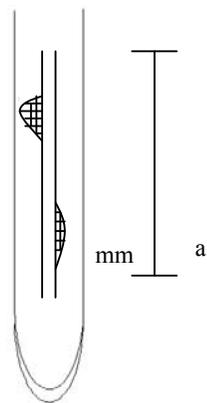


Fig. 1. Esquema que representa la forma en que fueron colectados los datos de densidad de p y r. (a) longitud de la raíz a partir del primer primordio más cercano a la punta de la raíz.

7.14 Evaluación de bioacumulación de cadmio y zinc

7.15 Exposición a Cd y Zn

Para determinar la cantidad de zinc y cadmio acumulado en los tejidos de raíces pilosas, se pesaron 0.5 g (peso fresco) de raíces pilosas de *A. halleri*, para ser cultivados en medio líquido MS 1x con 3% de sacarosa sin reguladores de crecimiento y suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de cadmio (CdCl_2) y sulfato de zinc (SO_4Zn), 250, 500, 1000 y 2000 μM y un cultivo control, sin exceso de metales. El cultivo se mantuvo por 21 días en condiciones de oscuridad y agitación 100 rpm a 21° C. Al término del cultivo las raíces se lavaron con una solución de CaCl_2 por 20 min., con el fin de eliminar los metales que quedaron adheridos a la superficie de la raíz (Papoyan *et al.*, 2007) y, se secaron durante 7 días a 62 °C. Se midió el volumen de medio de cultivo y se conservó para su posterior análisis. Pasado el tiempo de secado de las raíces, se registró el peso seco de todos los cultivos en una balanza analítica (Sartorius).

7.16 Digestión del material vegetal

Las raíces secas y pesadas se colocaron en vasos de precipitados de 100 ml y se agregó 10 ml de la mezcla de ácido nítrico (HNO_3) y ácido perclórico (HClO_4) en una relación 5:1 v/v. Se llevó a cabo una digestión abierta en parrillas de calentamiento a una temperatura de 80-120 °C hasta alcanzar la sequedad de las muestras. Posteriormente el material se resuspendió con ácido nítrico al 5% (Papoyan *et al.*, 2007)

y se llevó a un volumen final de 50 ml en un matraz volumétrico y se conservaron en frascos de polipropileno de 50 ml

7.17 Determinación de Cd y Zn total en los cultivos de raíces pilosas

Las concentraciones de cadmio y zinc total tanto de los cultivos de raíces como del medio donde crecieron, fueron determinadas con un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer instruments® modelo MHS-10), por la técnica de flama. El espectrómetro se calibró con un estándar certificado de zinc y cadmio. Los resultados se usaron para determinar el coeficiente de bioacumulación de las raíces pilosas usando la siguiente ecuación:

$$\text{Coeficiente de bioacumulación} = \frac{\text{Cantidad del metal en el tejido}}{\text{Cantidad del metal en el medio al inicio del cultivo}}$$

7.18 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente con la prueba de ANOVA. En el caso de haber diferencias significativas se hizo la prueba de Tukey. Se usó el programa STATISTICA.

8. RESULTADOS

8.1 Transformación de *A. halleri* con *A. rhizogenes*

Con el objetivo de incrementar la biomasa de las raíces de *A. halleri*, se hizo la transformación de las plantas con *A. rhizogenes*. La transformación se obtuvo de manera exitosa. Como se muestra en la **Fig. 2**, después de tres semanas de cultivo, las hojas permanecen verdes y turgentes. Las raíces emergen de las incisiones hechas tanto de la lámina como del pecíolo de las hojas. Fenotípicamente se observó que las raíces presentaban un número excesivo de pelos radicales, característica principal de las raíces pilosas.

Las raíces que emergieron de las hojas se cortaron a los 3 ó 4 días después de haber emergido o hasta que alcanzaron un tamaño considerable para que continuaran su crecimiento en medio sólido. Aunque estas raíces presentaban el fenotipo de raíces pilosas, posteriormente se confirmó la inserción del T-DNA de la bacteria al genoma de la planta por el análisis de PCR.

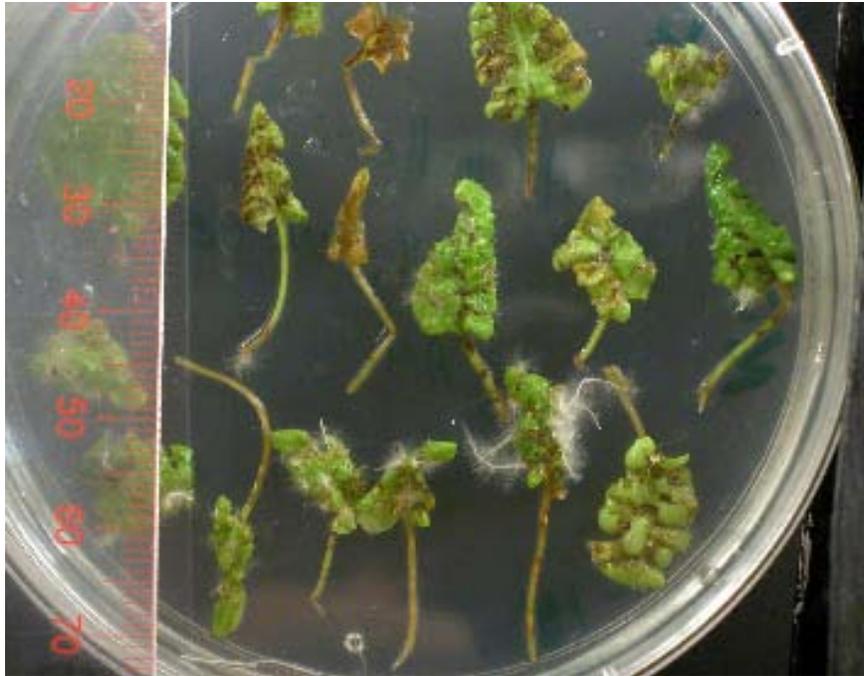


Fig. 2. Raíces emergiendo de explantes (hoja y peciolo) de *A. halleri* después de haber sido expuestas a la bacteria (*A. rhizogenes*) y traspasadas a cajas de Petri con medio MS 1x con 3% de sacarosa, agar 0.8 % y cefotaxima (400 μ g/ml).

8.2 Confirmación del evento de transformación

Con el propósito de asegurar que el T-DNA de *A. rhizogenes* estuviera presente en los tejidos de *A. halleri*, se hizo el análisis de PCR. Es importante decir que este análisis se hizo para todas las raíces provenientes de diferentes explantes después de haber sido subcultivadas en al menos 4 ocasiones, para así evitar el crecimiento de la bacteria, con lo cual garantizamos que no hubo falsos positivos. En este caso se usó un control positivo correspondiente a DNA de un vector binario A4/pESC4, de 652 pb, como control negativo se usó DNA de raíces que no sufrieron el evento de transformación. Como se ve en la **figura 3**, las bandas del DNA de las raíces transformadas corresponden a la banda del control positivo, lo que nos indica que el T-DNA de la bacteria está presente en las raíces. Con lo cual aseguramos que se trata de cultivos de

raíces pilosas. Con estos resultados, se puede decir que el protocolo usado para la transformación de plantas de *A. halleri*, es eficiente y no hay necesidad de probar otras formas de transformación ni el uso de inductores como la acetosiringona (compuesto fenólico liberado por la planta como respuesta a una herida, que induce la activación de los genes *vir*).

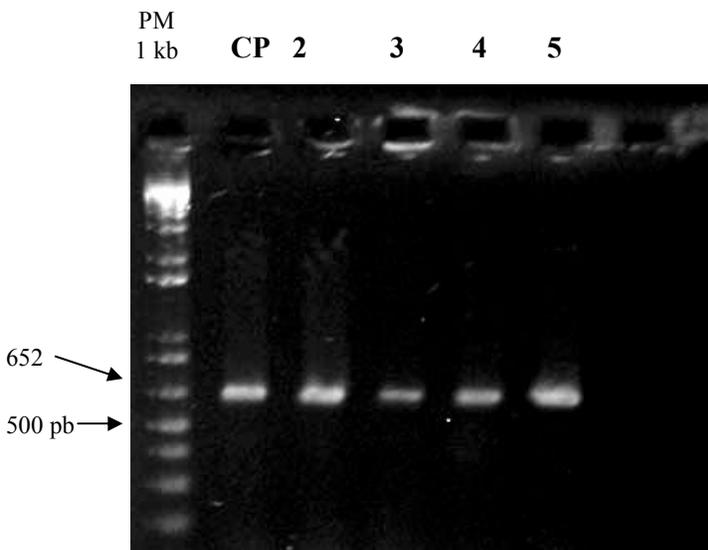


Fig. 3. Confirmación de la transformación de los tejidos de raíces pilosas de *A. halleri* a través del análisis de PCR. (CP) control positivo corresponde a DNA de la bacteria, carril 1-5 muestras de DNA de raíces transformadas.

8.3 Cultivos de raíces pilosas

Para poder iniciar todos los experimentos planeados fue necesario propagar las raíces en medio líquido. Una vez que se confirmó la integración del T-DNA de la bacteria en las raíces se comenzó su propagación en medio sólido y aproximadamente después de un mes se contaba con el tejido suficiente para comenzar a propagar en medio líquido. El crecimiento de las raíces pilosas fue más rápido cuando se encontraban en medio sólido que en medio líquido.

Se observó que los cultivos de raíces pilosas detenían su crecimiento al momento de comenzar su propagación en medio líquido, sin embargo, 14 días después las raíces crecían de manera favorable.

8.4 Análisis de supervivencia del meristemo apical

Con el análisis de supervivencia del meristemo apical de la raíz, utilizando CFDA (6-carboxifluoreceina diacetato) se conoció la concentración máxima de sales de cadmio y zinc que toleran los cultivos de raíces pilosas de *A. halleri*.

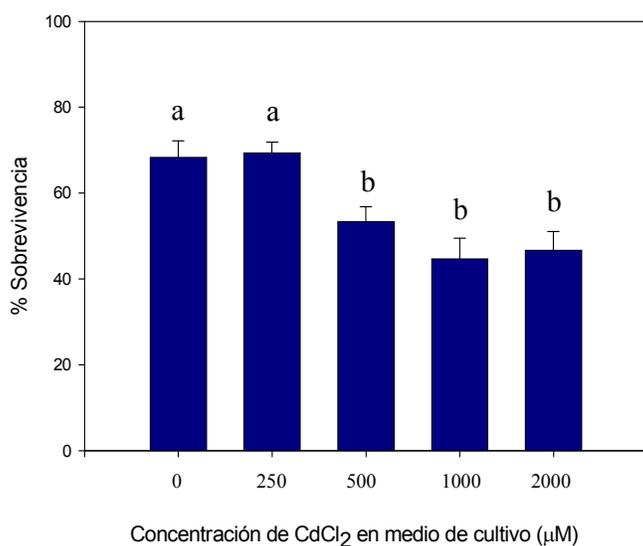


Fig. 4. Supervivencia del meristemo apical de la raíz de cultivos de raíces pilosas de $n= 6$ cultivos independientes, 50 raíces por réplica, Después de 7 días de crecimiento en el medio con CdCl₂. Letras diferentes indican diferencias significativas, $P < 0.05$ Media \pm E.E.

El porcentaje de supervivencia de las raíces sin exceso de metales es cercana a 70 % y se observó un decremento en la supervivencia del meristemo apical de las raíces pilosas al aumentar la concentración de CdCl₂ (**Fig.4**). Hay diferencias significativas con respecto al control (0 µM, $P < 0.05$), cuando la concentración es 500 µM o mayor (53 % de supervivencia), pero cuando la concentración de CdCl₂ aumenta (1000 y 2000 µM) no hay diferencias en la supervivencia de los cultivos que crecieron en estas concentraciones de cadmio.

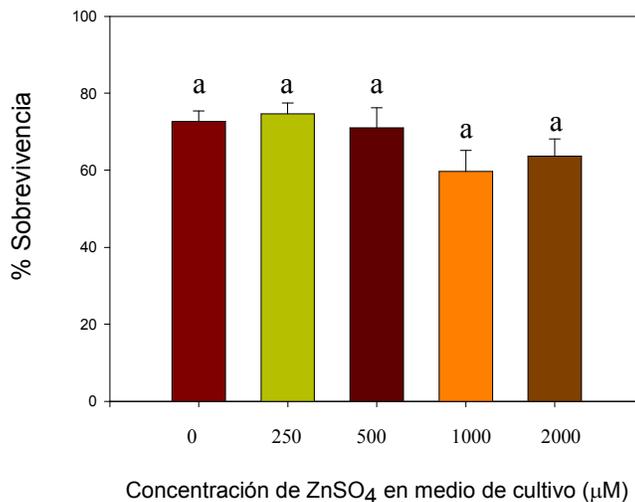


Fig. 5. Supervivencia del meristemo apical de la raíz de cultivos de raíces pilosas ($n= 6$ cultivos independientes, 50 raíces por replica), después de 7 días de crecimiento en medio con ZnSO₄. Media \pm E.E. $P > 0.05$.

Estos resultados sugieren que el efecto tóxico del cadmio para las raíces de *A. halleri*, comienza en la concentración de 500 µM. Sin embargo, parece que en concentraciones de 1000 y 2000 µM las raíces son capaces de tolerar el metal, sin presentar más efectos tóxicos. Es necesario probar con concentraciones más altas para saber cual de estas tiene un efecto que impida completamente la supervivencia de los cultivos de raíces pilosas. Los resultados del porcentaje de supervivencia de los cultivos de raíces pilosas que crecieron en presencia de sulfato zinc, se presentan en la **Fig.5**. En este experimento la supervivencia del control también se mantiene, cercana al 70 %. Se observa el mayor porcentaje de supervivencia en los cultivos que crecieron en la concentración de 250 µM (75 %). Sin embargo, no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los cultivos que crecieron en las diferentes concentraciones (0, 250, 500, 1000 y 2000 µM).

8.5 Velocidad relativa de crecimiento

Para determinar la concentración de cadmio y zinc más alta, donde los cultivos de raíces continúan su crecimiento se recurrió al análisis de velocidad relativa de crecimiento (VRC). De forma cualitativa se observó que los cultivos que fueron expuestos a las concentraciones más altas de cadmio y zinc (1000 y 2000 μM), su crecimiento disminuyó considerablemente y adquirieron un color café oscuro, sobre todo más fuertemente en aquellos cultivos que crecieron en presencia de cadmio.

Para los cultivos de raíces pilosas que crecieron sin exceso de metales se registró un porcentaje de velocidad relativa de crecimiento (VRC) cercana a 8% (**Fig. 6 y 7**). Este porcentaje disminuyó al aumentar la concentración de zinc. Cuando los cultivos crecieron en medio de cultivo suplementado con cadmio se observó macroscópicamente una disminución considerable en el crecimiento de estos al ir incrementando la concentración del metal. Además, las raíces presentaron un color café que se intensificó en los cultivos que estuvieron expuestos a la concentración más alta (2000 μM). Después de 21 días de tratamiento con cadmio el crecimiento se mantuvo en la concentración de 250 μM igual, con respecto al control (9 %). Sin embargo, la velocidad relativa de crecimiento disminuyó al aumentar la concentración de cadmio a partir de la concentración de 500 μM (7 %) (**Fig.7**). Hubo una reducción significativa ($P \leq 0.05$) en el crecimiento cuando las raíces permanecieron en la concentración de 1000 μM (1%). Sin duda el efecto más notorio de la toxicidad del cadmio sobre el cultivo de raíces pilosas, se presentó cuando el medio tenía una concentración de 2000 μM , donde incluso se detiene por completo el crecimiento. A partir de estos resultados se sugiere que la concentración más alta donde los cultivos continúan su crecimiento es 1000 μM , aunque este crecimiento sea más lento.

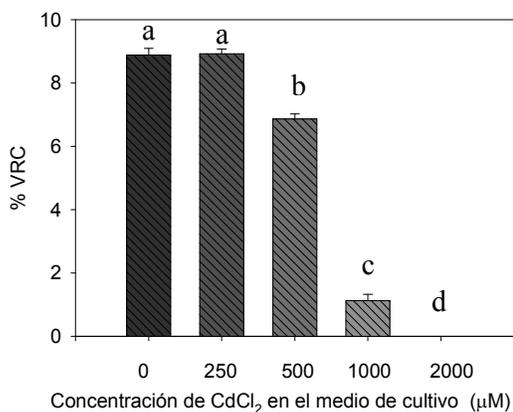


Fig. 6. VRC de cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* ($n= 6$ cultivos independientes), durante 21 días de crecimiento en CdCl₂. Las letras indican diferencias significativas entre las diferentes concentraciones $P < 0.05$. Media \pm E.E.

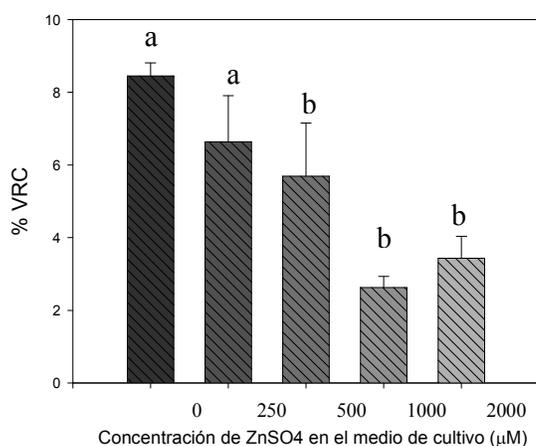


Fig. 7. Velocidad relativa de crecimiento (VRC) de cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* ($n= 6$ cultivos independientes), después de 21 días de crecimiento en medio con ZnSO₄. Letras diferentes indica diferencias significativas con respecto al control. $P < 0.05$. Media \pm E.E.

Sin embargo, cuando las raíces pilosas crecen en medio con zinc, solo se observan diferencias significativas con respecto al control en los cultivos que crecieron en concentración de 1000 μ M, (3 %) y 2000 μ M (3%), a pesar de ser el porcentaje más bajo, las raíces continúan creciendo. Los resultados indican que la concentración más alta de zinc (2000 μ M), no es suficientemente tóxica para detener por completo el

crecimiento de los cultivos de raíces pilosas, por lo tanto es necesario hacer más pruebas con concentraciones más altas para así determinar cual de estas limita el crecimiento.

8.6 Densidad de primordios y raíces laterales

Para saber en que forma se ve afectado el crecimiento de las raíces expuestas a los metales, se realizó el análisis de densidad de primordios. Se encontró que la densidad de primordios y raíces aumenta al incrementar la concentración tanto de cadmio como de zinc en el medio de cultivo (Fig. 8). Sin embargo, se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al control, cuando las raíces estuvieron expuestas a la concentración más alta (1000 μM) tanto de zinc como de cadmio. La densidad más alta de primordios y raíces laterales fue de 1.9 ± 0.12 (1000 μM de Zn), es decir dos primordios y raíces laterales por milímetro de raíz.

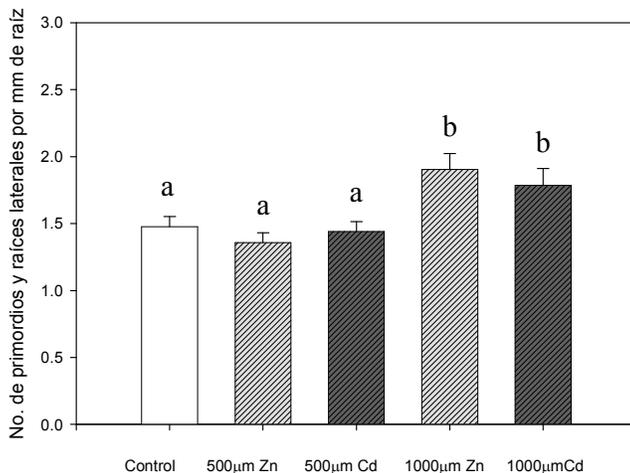


Fig. 8. Densidad de primordios y raíces laterales de raíces pilosas de *A. halleri* ($n= 10$ raíces, 3 cultivos independientes), después de 14 días de crecimiento en medio con CdCl_2 y en medio con ZnSO_4 . Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). Media \pm E.E.

8.7 Longitud de las células maduras del córtex

Con el objetivo de saber como las diferentes concentraciones de cadmio y zinc afectaban el crecimiento de las raíces pilosas se midió la longitud máxima alcanzada por las células del córtex.

Como se muestra en la **Fig. 9.**, la longitud de las células corticales de raíces control (sin exceso de metales) fue de 58.0 μm y la longitud disminuyó al aumentar la concentración de ambos metales. Se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control, cuando las raíces crecieron en medio suplementado con 1000 μM de cadmio (38.5 μm), es decir, la longitud de las células disminuyó hasta 67%, pero no hay diferencias en la longitud entre aquellas raíces que crecieron en medio con 1000 μM de zinc y 1000 μM de cadmio.

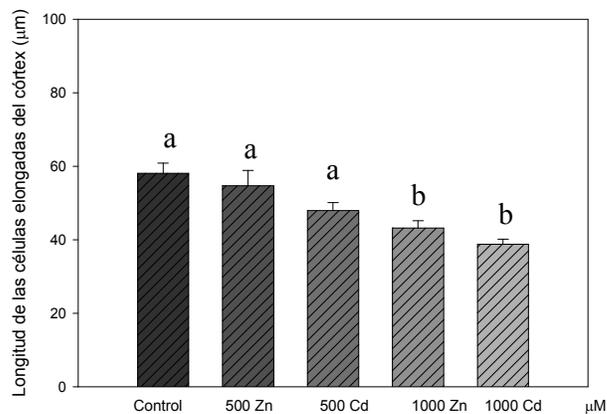


Fig. 9. Longitud de las células corticales completamente elongadas de raíces pilosas de *A. halleri* ($n = 30$ raíces), después de 14 días de crecimiento en medio con CdCl_2 y ZnSO_4 . Las letras indican diferencias significativas entre las concentraciones y los metales ($P < 0.05$). Media \pm E.E.

8.8 Acumulación de cadmio y zinc en los las raíces pilosas

La cantidad de cadmio y zinc que acumularon las raíces pilosas se determinó en mg kg^{-1} de peso seco. En la **Fig.10** se observa que la concentración de cadmio en los tejidos se incrementa al aumentar la concentración de este metal en el medio y parece que no hay saturación en la acumulación. La cantidad de cadmio en el tejido es muy alta, hasta $22863.4 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso seco (**Tabla 2**) cuando los tejidos crecen en medio con $2000 \mu\text{M}$ de cadmio, superando hasta en 229 veces la concentración mínima establecida ($> 100 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso seco) que debe acumular una planta para ser considerada hiperacumuladora de cadmio. Existen diferencias significativas entre todas las concentraciones en las que las raíces fueron expuestas. Interesantemente la concentración de cadmio en las raíces es extraordinariamente alta (22863 mg kg^{-1} de peso seco) cuando las raíces crecen en medio con $2000\mu\text{M}$ de cadmio.

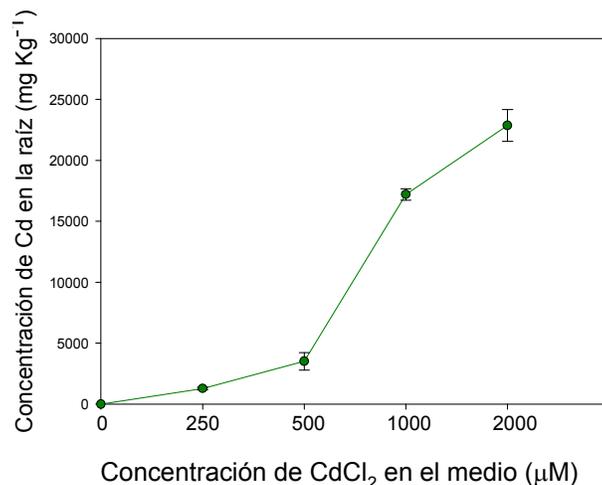


Fig. 10. Concentración de CdCl₂ ($n=6$ cultivos) en las raíces pilosas de *A. halleri*. Media E.E.

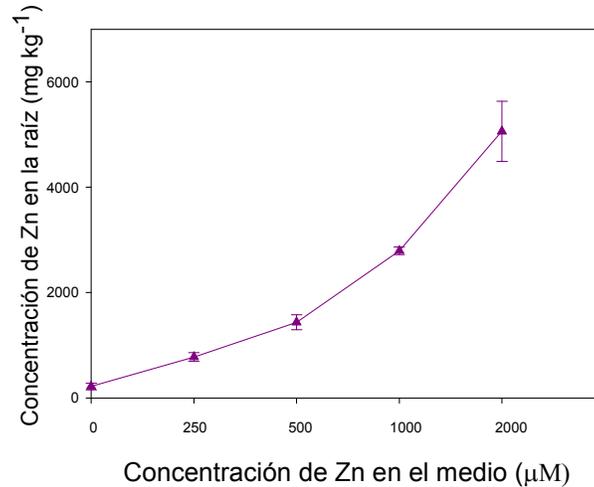


Fig. 11. Concentración de ZnSO₄ (n= 9 cultivos) en las raíces pilosas de *A. halleri*. Media E.E.

En la **figura 11**, podemos observar que la concentración de zinc en las raíces aumenta al incrementarse la concentración de este metal en el medio, tampoco se observa saturación en la acumulación. Sin embargo, la concentración de zinc más alta en los tejidos (5060 mg kg⁻¹), se encuentra 50% por debajo de la mínima establecida para plantas hiperacumuladoras de zinc (>10,000 mg kg⁻¹ de peso seco).

La cantidad de metales en los tejidos nos da información parcial sobre las propiedades de acumulación de una planta. El coeficiente de bioacumulación es un mejor indicador de esta capacidad, en plantas acumuladoras de metales el coeficiente es mayor a 1 (Zaho *et al.*, 2003), en este trabajo el coeficiente de acumulación se determinó como la cantidad de metal en la raíz, entre la cantidad inicial de metal en el medio de cultivo.

El coeficiente de bioacumulación de cadmio se muestra en la **figura 12** y la **tabla 2**. Se puede observar que el coeficiente es bastante alto (45.6) cuando la concentración de cadmio en el medio es baja (250 μM) y presenta un máximo de 153

(1000 μM). Sin embargo, cuando la concentración en el medio es 2000 μM , el coeficiente disminuye significativamente (102).

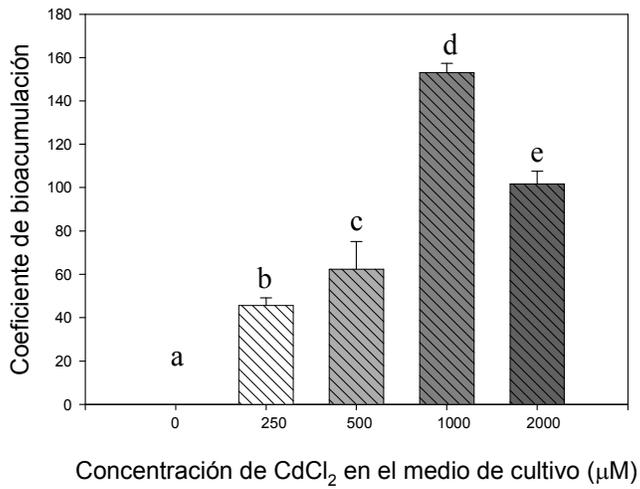


Fig. 12. Coeficiente de bioacumulación (cantidad de metal en la raíz/cantidad inicial de metal en el medio de cultivo), para CdCl₂ de raíces pilosas de *A. halleri*. (n=6 cultivos). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. P<0.05, Media \pm E.E.

Tabla 2. Concentración de cadmio y zinc en las raíces pilosas de *A. halleri* y en el medio de cultivo donde crecieron

	Tratamiento (μM)	Concentración inicial en el medio (mg L^{-1})	Concentración final en el medio (mg L^{-1})	Cantidad en las raíces pilosas (mg kg^{-1} peso seco)	Coefficiente de bioacumulación
Zn	0	8.6 *	1.5 ± 0.03	218.54 ± 63.2	25.4 ± 7.3
	250	16 (24.6**)	18.1 ± 0.79	777.66 ± 80.1	31.1 ± 3.2
	500	33 (41.6**)	37.2 ± 2.03	1436.19 ± 140.3	34.8 ± 3.4
	1000	65 (73.6**)	54.1 ± 11.43	2793.18 ± 73.4	37.7 ± 1
	2000	131 (139.6**)	113 ± 11.12	5060.92 ± 573.5	36.3 ± 4.1
Cd	0	0	ND	ND	-
	250	28	16.5 ± 0.465	1283.14 ± 99.9	45.6 ± 3.5
	500	56	25.5 ± 1.176	3508.6 ± 713.9	62.4 ± 12.7
	1000	112	97.5 ± 2.65	17208.1 ± 475.1	153.0 ± 4.2
	2000	224	216 ± 5.38	22863.4 ± 1303.1	101.7 ± 5.8

Los resultados representan la media \pm E.E, cultivos creciendo 21 días en medio con cadmio $n=6$; cultivos creciendo en medio con Zn $n=9$, excepto para 1000 μM $n=6$.

ND = no detectable.

* El medio de cultivo MS contiene 8.6 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

** Concentración inicial en cada tratamiento más la concentración de zinc presente en el medio MS

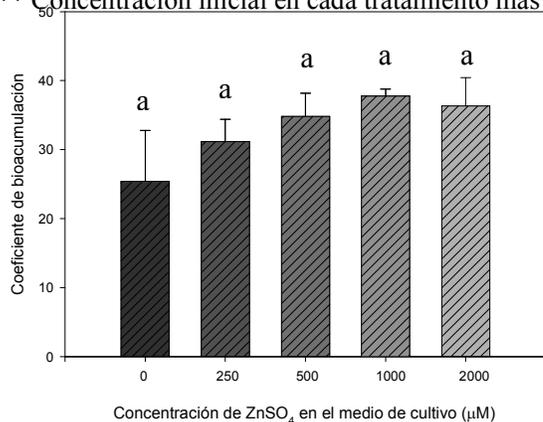


Fig. 12. Coeficiente de bioacumulación (cantidad de metal en la raíz/cantidad inicial de metal en el medio de cultivo), para CdCl_2 de raíces pilosas de *A. halleri*. ($n=6$ cultivos). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. $P < 0.05$, Media \pm E.E.

Las raíces pilosas de *A. halleri* presentan un coeficiente de bioacumulación para zinc de hasta 37.7 (500 μM), 58% por debajo del coeficiente de bioacumulación para cadmio en la misma concentración, pero en este caso, el coeficiente no aumenta con el incremento de zinc en el medio de cultivo, sino que se mantiene constante.

En la **tabla 2** se muestran los resultados de acumulación de cadmio y zinc en mg kg^{-1} de peso seco, el coeficiente de bioacumulación, y la concentración para ambos metales en el medio al final del cultivo.

En la **figura 13** se muestran los resultados de la dinámica de acumulación de cadmio, es evidente que la acumulación de cadmio en los tejidos de la raíz aumenta con el tiempo. La máxima acumulación se observa a 24 horas de exposición (3924.46 mg kg^{-1} de peso seco). Sin embargo, al comparar los resultados con los obtenidos en los experimentos a largo plazo (**Fig. 11; tabla 2**), se evidencia que la acumulación aumenta casi seis veces al los 21 días (22863.4 mg kg^{-1} de peso seco).

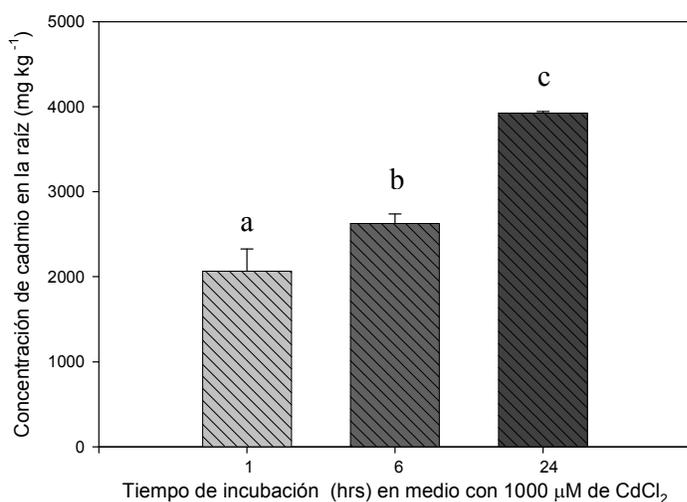


Fig. 13. Dinámica de acumulación de cadmio a corto plazo. Los cultivos de raíces pilosas fueron incubados en medio con 1000 μM de CdCl_2 ($n=3$ cultivos), durante 1,6 y 24 hrs. Letras diferentes denotan diferencias significativas $P<0.05$, Media \pm E.E.

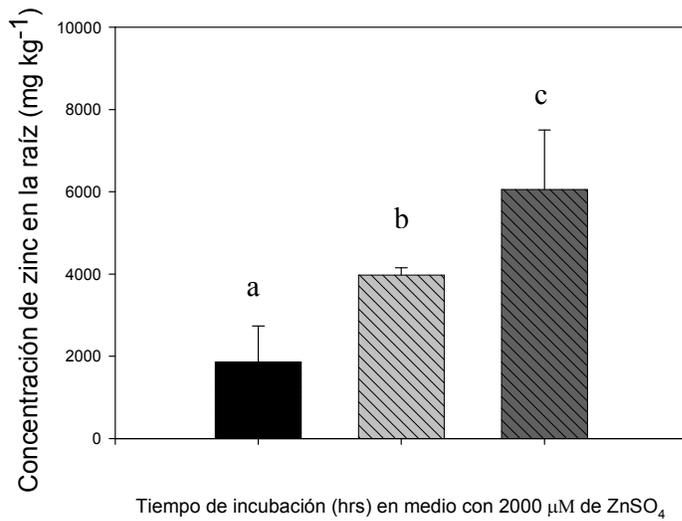


Fig. 14. Dinámica de acumulación de zinc a corto plazo. Los cultivos de raíces pilosas fueron incubados en medio con 2000 μM de ZnSO_4 ($n=3$ cultivos), durante 1, 6 y 24 hrs. Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. $P<0.05$, Media \pm E.E.

Cuando hacemos la dinámica de acumulación para zinc a corto plazo (**Fig. 14**) observamos que la acumulación aumenta al incrementarse el tiempo de exposición al metal. Pero al comparar estos resultados con los obtenidos en los experimentos a largo plazo (**Fig. 10**) se observa que solo con 24 horas se alcanza la máxima acumulación de zinc (6053.10 mg kg^{-1} de peso seco).

9. DISCUSIÓN

La capacidad de algunas plantas de acumular metales pesados en sus tejidos ha sido muy estudiada, actualmente se conocen cerca de 400 especies hiperacumuladoras de metales y se ha propuesto que la mayor acumulación se da en los tejidos aéreos de estas plantas (Zhao *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2006; Lasat *et al.* 1998; Cosio *et al.* 2004; Küpper *et al.* 2000). Sin embargo, Nedelkoska y colaboradores (2000 y 2001) establecieron cultivos de raíces pilosas de *Thlaspi caerulescens*, especie hiperacumuladora de cadmio, y de varias especies de *Alyssum*, especies que acumulan níquel, demostrando que las raíces pilosas pueden tolerar altas concentraciones de metales y que son buenas hiperacumuladoras de cadmio y níquel respectivamente (aunque en menor grado, con respecto a raíces de plantas completas), independientemente de la parte aérea.

En este trabajo se establecen por primera vez cultivos de raíces pilosas de *A. halleri*, y se analizó la tolerancia de estas raíces a cadmio y zinc así como su capacidad de acumular estos metales en sus tejidos. Se determinó la tolerancia de las raíces como la concentración más alta de metal donde la supervivencia del meristemo de la raíz es la más alta y existe el continuo crecimiento de las raíces. La supervivencia de las raíces pilosas en condiciones control (sin exceso de metales) fue 71%. Se consideró que este porcentaje relativamente bajo se debe principalmente a dos factores: 1) se estimó sólo la supervivencia de los meristemos de las raíces, la parte más sensible a daño mecánico y 2) no se consideró la supervivencia de los primordios que se encuentra en la parte sub apical y que dan origen a nuevas raíces laterales. Por lo tanto se consideró que el método de análisis de supervivencia proporciona datos subestimados. Cuando las raíces fueron expuestas a diferentes concentraciones de zinc, la supervivencia del meristemo apical de las raíces pilosas de *A. halleri* se mantuvieron estables con respecto al control,

lo que sugirió que las raíces toleraron muy bien concentraciones hasta de 2000 μM de zinc. Estos resultados son confirmados con los de velocidad relativa de crecimiento, pues aunque el porcentaje de sobrevivencia disminuye hasta 12%, cuando las raíces crecen en 2000 μM de zinc, las raíces. Estos resultados sugieren que las raíces son capaces de tolerar concentraciones más altas de zinc, muy probablemente debido a que es un elemento esencial para las plantas (Taiz y Zeiger, 1998). Se consideró necesario exponer los cultivos de raíces pilosas a concentraciones más altas de zinc para así determinar la concentración máxima que pueden tolerar sin sufrir un efecto tóxico que evite la supervivencia de las raíces y su crecimiento.

No sucede lo mismo cuando las raíces pilosas son expuestas a altas concentraciones de cadmio (500, 1000 y 2000 μM), donde el porcentaje de supervivencia del meristemo apical de la raíz fue cercano a 50 %. Las raíces cultivadas en medio con 250 μM de cadmio no muestran diferencias significativas con respecto al control. Aunque 250 μM es la concentración más baja analizada en este trabajo, es importante mencionar que esta concentración está 61 veces por encima del límite máximo permitido (0.75 mg/L) de descarga de cadmio a aguas residuales que se vierten a aguas y bienes nacionales (NOM-002-ECOL-1966). Los cultivos de raíces pilosas en un medio con cadmio, la velocidad relativa de crecimiento disminuyó significativamente a partir de 500 μM , y aunque las raíces pilosas llegan a tolerar hasta 2000 μM de cadmio, en esta concentración su crecimiento se detuvo por completo. Este resultado era de esperarse dada la alta toxicidad del cadmio. Sin embargo, en 1000 μM los cultivos continuaron su crecimiento (1%), estos datos son consistentes con lo probado por Bert y colaboradores (2000), pues no observaron efectos tóxicos en plantas completas hasta en 2000 μM , ellos también observan que la tolerancia de *A. halleri* a cadmio es menor que la tolerancia a zinc. Esto es consistente con los resultados aquí

presentados. Interesantemente, ellos observan que cuando la parte aérea acumula en sus tejidos 1720 mg kg^{-1} de cadmio, la biomasa se reduce en un 50%. En contraste, se observó una disminución solo del 12.5% en la velocidad de crecimiento, cuando las raíces acumularon $3508.6 \text{ mg kg}^{-1}$ (peso seco) de cadmio y cuando estuvieron expuestas a $500 \mu\text{M}$ de este metal.

Los datos de los dos análisis sugieren que los cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* son capaces de tolerar altas concentraciones de cadmio y zinc, independientemente de la parte aérea de la planta.

La velocidad relativa de crecimiento de las raíces pilosas de *A. halleri* en condiciones control (sin exceso de metales) es 8.66%, este resultado es similar a lo reportado por otros autores para raíces pilosas de otras especies, que están en condiciones óptimas. Por ejemplo, Han *et al.* (2004) reportaron una velocidad relativa de crecimiento para cultivos de raíces pilosas de *Daucs. carota* de 6% a los 21 días de crecimiento. Rijhwani y Shanks (1998), reportaron un máximo de 19 %, para cultivos de *Cataranthus roseus*, también en 21 días de crecimiento. Weathers *et al.*, 1998, en biorreactores y 28 días de crecimiento observaron un máximo de 13.5 %, para raíces pilosas de *Artemisia annua* y Shaoxiong *et al.* (1996), observaron un 8.3 %, en las mejores condiciones de raíces pilosas de *Solanum aviculare* con 28 días de crecimiento.

La densidad de primordios y raíces laterales y la longitud de las células corticales, son parámetros que ayudan a entender en qué forma se ve afectado el crecimiento de las raíces pilosas al ser expuestas a altas concentraciones de metales.

Las raíces pilosas de *A. halleri* presentan una alta densidad de primordios y raíces laterales (1.47 por mm de raíz). Dubrovsky *et al.* (2006) reportaron una densidad para raíces de *A. thaliana*, mucho menor (0.6 por mm de raíz) y aunque se trata de diferentes especies, son muy cercanas, estos resultados nos hacen suponer que la

transformación de la planta con *A. rhizogenes*, es determinante en la generación de más primordios y raíces laterales. Para confirmar esta hipótesis, se considera necesario comparar la densidad de primordios y raíces laterales de raíces no transformadas con las raíces pilosas, tanto en condiciones control (sin exceso de metales), como con exceso de metales. En este trabajo también se observó que la densidad de primordios y raíces laterales en raíces pilosas aumenta significativamente cuando las raíces se incuban en medio con altas concentraciones de cadmio y zinc (1000 μM). Probablemente el aumento en la densidad es debido a que las raíces pilosas se encuentran bajo gran estrés. Las diferencias en la densidad de primordios y raíces laterales con respecto al control, se observaron cuando las raíces crecieron en presencia de 1000 μM de cadmio y zinc. Sin embargo, en esta concentración el tipo de metal, cadmio o zinc, no influye en la densidad de primordios y raíces, estos datos parecen ser contradictorios con los obtenidos en el análisis de velocidad relativa de crecimiento de las raíces pilosas, ya que este parámetro se vio afectado considerablemente cuando las raíces pilosas crecieron en medio con 1000 μM de cadmio (1%), pero cuando crecieron en medio con zinc con la misma concentración, la velocidad relativa de crecimiento fue de 3%. Se piensa que estos resultados se deben a una gran producción de primordios y raíces laterales, consecuencia del estrés al que están sometidas, sin embargo, el crecimiento de estos se ve detenido por el alto grado de toxicidad de las altas concentraciones de cadmio y zinc.

Los resultados de longitud de las células del córtex maduro confirman la hipótesis, pues la longitud se ve disminuida con el aumento de la concentración de cadmio y zinc en el medio de cultivo. Sin embargo, si se toma en cuenta que la longitud de las células del córtex disminuye cuando las raíces crecen en 1000 μM de zinc o cadmio, y se recurre al índice de iniciación (I) de raíces, que se refiere al número de iniciaciones en una longitud de raíz equivalente a 100 células del córtex ($I = 100 \cdot d^{-1}$),

donde d es la densidad de primordios y raíces laterales (por mm de raíz) y l es la longitud de las células en mm) (Dubrovsky, comunicación personal), entonces se observa que tanto el zinc como el cadmio muestran un efecto inhibitorio en la iniciación de las raíces, cuando estas crecen en 500 μ M de cadmio y zinc y 1000 μ M de cadmio. Sorpresivamente, cuando las raíces crecieron en 1000 μ M de zinc no hubo un efecto de este metal en la iniciación de las raíces (datos no mostrados) y, de esta forma podemos explicar por que hay una disminución en el crecimiento tan drástica de las raíces cuando estas crecen en 1000 μ M de cadmio.

En este trabajo también se comprueba que las raíces pilosas de *A. halleri* pueden acumular una gran cantidad de cadmio, este potencial de acumulación ya se ha visto en raíces pilosas de *Thlaspi caerulescens*. Nedelkoska y Doran 2000, encontraron que la mayor parte de cadmio en esta especie, era retenida en la pared celular, según los autores, es un mecanismo de defensa para evitar la toxicidad del cadmio. Estos datos son confirmados por Wójcik et al. (2005) ellos observaron que en periodos cortos de exposición, el cadmio se encontraba en los tejidos más externos de la raíz, y en periodos prolongados se encontraba en los tejidos más internos, por lo que proponen que la acumulación de cadmio en la pared celular es el primer mecanismo de defensa para el protoplasto, especialmente en bajas concentraciones y periodos cortos de exposición.

En cuanto a la capacidad de bioacumulación de las raíces pilosas de *A. halleri* se reporta un coeficiente máximo de bioacumulación de 153 para raíces incubadas en 1000 μ M de cadmio. Este valor es 69% mayor a lo reportado por Nedelkoska y Doran (2000) para raíces pilosas de *Thlaspi caerulescens* (106) y es 9 veces mayor a lo observado en la parte aérea de plantas completas creciendo en suelo de la misma especie (Zhao et al. 2003).

Cuando las raíces pilosas de *A. halleri* fueron incubadas con zinc el máximo coeficiente de bioacumulación fue 37.7. Este resultado es similar a lo reportado por Zhao y colaboradores (2003) para la parte aérea de plantas completas de *T. caerulescens* que crecieron en suelo (40), a diferencia de lo que se obtuvo en este trabajo, ellos observaron una disminución de la eficiencia de acumulación cuando la concentración de zinc en el suelo aumento. Se cree que el bajo coeficiente de bioacumulación para zinc y cadmio de esta especie es menor en suelo debido a la baja disponibilidad del metal.

Los resultados aquí presentados, demuestran que la acumulación de metales no es exclusiva de la parte aérea.

Es interesante notar que en nuestro análisis, la acumulación de cadmio no presenta saturación, sin embargo, sucede lo contrario con el coeficiente de biacumulación, pues el coeficiente máximo se presenta en 1000 μM y no en 2000 μM , estos datos sugieren que la acumulación de cadmio llega a saturación en concentraciones tan altas.

Sorpresivamente, cuando las raíces pilosas estuvieron expuestas a zinc acumularon una concentración 50% menor a la establecida para ser considerada una especie hiperacumuladora (10,000 mg kg^{-1} de peso seco), sin embargo se sabe que plantas completas de *A. halleri* son hipertolerantes a zinc, pues crecen saludablemente en 1000 μM de zinc en solución y en esta concentración acumulan 32 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco en la parte aérea y en raíz 26000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Zhao *et al.*, 2000). Lasat *et al.* (1998) demostraron que las vacuolas de la raíz de *Thlaspi caerulescens* acumulan menos Zn, porque lo hacen más disponible para el transporte en el xilema. Si pensamos que esto también sucede en plantas de *A. halleri*, podemos explicar porque las raíces pilosas de esta especie no acumulan cantidades tan grandes de Zn como la parte aérea. Aunque las raíces pilosas de *A. halleri* no acumulan grandes cantidades de zinc, comparadas con las

raíces de plantas completas si presentan un coeficiente de bioacumulación muy alto (37.7 en 500 μM), lo que nos indica que tiene un gran potencial de bioacumulación. Sin embargo, Dushenkov y colaboradores (1995), determinaron en raíces de *Brassica juncea*, un coeficiente de bioacumulación de 131 y 134 para Zn y Cd respectivamente. De acuerdo a estos datos las raíces pilosas de *A. halleri* no son tan eficientes en la bioacumulación de zinc.

Aunque los resultados presentados en este trabajo se refieren únicamente a las raíces pilosas de *A. halleri*, podemos compararlos con los resultados para raíces no transformadas de plantas completas. Se puede ver que los resultados de este trabajo no coinciden con lo reportado por Küpper *et al.* (2000), ellos observaron que las raíces de *A. halleri*, acumularon más zinc en la raíz que en la parte aérea, reportando una concentración de 57145 mg kg^{-1} de peso seco. Por otro lado, en este grupo también se observó que la concentración de Cd en las raíces fue más alta que en la parte aérea, en todos los tratamientos que analizaron, estos resultados apoyan los resultados de este trabajo. También observan precipitación de fosfato de cadmio y zinc en el apoplasto de la epidermis de la raíz, confirmando la idea de que las altas concentraciones de cadmio y zinc en las raíces de *A. halleri* son consecuencia de la precipitación de estos metales en forma de fosfatos, propuesta por Zhao *et al.* (2000).

La mayor acumulación de cadmio en las raíces en comparación con la parte aérea es un resultado recurrente. Bert *et al.* (2003) encontraron mayor cantidad de cadmio en los tejidos de la raíz que en la parte aérea y que la cantidad de zinc en la parte aérea es mayor que en la raíz, lo que indica que el zinc es translocado de la raíz a la parte aérea. Lombi *et al.* (2000) observaron que en plantas creciendo en suelo de *T. goesingense* y *T. caerulea*, la concentración de cadmio en la raíz (28051 mg kg^{-1})

también era más alta que en la parte aérea, en plantas creciendo en presencia de 500 μM de este metal.

Es posible que la acumulación de zinc se de principalmente en las vacuolas de tejidos de la parte aérea, y quizá, la menor acumulación de cadmio a la raíz, sea un mecanismo de protección para evitar que llegue a la parte aérea. Boominathan y Doran (2003), demostraron que el cadmio se adhiere a las paredes celulares para evitar la translocación a la parte aérea en plantas de *Thlaspi caerulescens*, muy probablemente este fenómeno también se presenta en las raíces pilosas de *A. halleri*.

Un factor muy importante en la acumulación de metales es el tiempo necesario de exposición para obtener el máximo de bioacumulación. Las raíces pilosas de *A. halleri* necesitan de al menos 21 días de crecimiento en medio con cadmio para poder acumular una gran cantidad de éste en sus tejidos, sin embargo, cuando las raíces pilosas crecieron en presencia de zinc, la acumulación de este metal en las raíces fue similar en las muestras incubadas durante 24 hrs y aquellas incubadas durante 21 días, es decir, que en 24 hrs de exposición se da el máximo de bioacumulación. Estos datos no corresponden a lo demostrado por Nedelkoska y colaboradores en 2000, pues observaron que en raíces pilosas de *Thlaspi caerulescens*, la saturación en la acumulación ocurre en tan solo 30 min. Sin embargo, hablando en términos prácticos, la máxima acumulación de zinc en 24 hrs, ventajoso, pues no sería necesario mantener el cultivo durante mucho tiempo y la remediación de aguas contaminadas con zinc sería más rápida.

En este trabajo se logro establecer exitosamente cultivos de raíces pilosas de *A. halleri* y se comprobó que pueden acumular hasta 22863 mg kg^{-1} (peso seco) de cadmio, sin embargo, el crecimiento y la supervivencia de los cultivos se ven muy afectadas. En

contraste, las raíces pilosas de esta especie sobreviven bien en las concentraciones más altas de zinc aquí analizadas y su crecimiento no se observa tan afectado en comparación con el cadmio. Desafortunadamente la cantidad de zinc que acumulan es relativamente poca, incluso esta por debajo del límite para ser considerada una especie hiperacumuladora. A pesar de este resultado se demuestra que las raíces pilosas pueden acumular zinc y cadmio independientemente de la parte aérea.

10. CONCLUSIONES

- **Las raíces pilosas de *A. halleri* pueden absorber altas concentraciones de cadmio y de zinc y logran desarrollarse.**
- **Las raíces pilosas de *A. halleri* toleran concentraciones más altas de zinc en comparación con el cadmio.**
- **Las raíces pilosas son capaces de hiperacumular cadmio y zinc en sus tejidos, independientemente de la parte aérea.**
- **Las raíces pilosas pueden ser usadas potencialmente como filtros biológicos, para la biorremediación de aguas contaminadas con cadmio y zinc.**

11. APÉNDICE

Apéndice I.- Preparación del medio YM pH 7

- Manitol 1%
- MgSO₄ · 7H₂O, 0.8 mM
- K₂HPO₄ · 3H₂O. 2.2 mM
- Extracto de levadura 0.04%
- NaCl 1.7 mM

Apéndice II. Protocolo para la elaboración de CTAB 2X

- Tris 100 mM HCl, pH 8.0
- EDTA, 20 mM
- NaCl, 1.4 M
- CTAB, 2%

Apéndice III.- Preparación del amortiguador TBE 10X

Protocolo para la preparación de 1l del amortiguador TBE 10X

- Pesar 108 g de Tris y 55gr de ácido bórico y disolver en 900 ml de agua
- Añadir 40 ml de EDTA, 0.5M
- Aforar a 1L con agua
- Ajustar el pH a 8.0

Apéndice IV.- Protocolo para la preparación de la solución de paraformaldehído al 10% y 0.1 M de PIPES

Protocolo para la preparación solución de fijador 2% de paraformaldehído con Pipes 25mM, se prepararon stocks de la siguiente manera:

1.- Para preparar 100 ml de PIPES 0.1 M:

- Se pesó 3.024 g de PIPES sólido y se llevó a un volumen 70 ml con agua destilada estéril para disolver.
- Se agitó mientras se ajustó el pH a 7.2 con KOH 5M.
- Cuando se alcanzó el pH de 7.2, se añadió agua destilada y se aforó al volumen requerido.

2.-Para preparar 100 ml paraformaldehído al 10%

- Se pesó 10g de paraformaldehído seco y se disolvió en la campana de extracción con agua destilada caliente.
- Se dejó agitar esta solución durante 5 minutos, y enseguida se añadieron gotas de NaOH (o KOH) para disolver.
- Para la eliminación de la capa de precipitado blanco, se filtró la solución y se aforó al volumen requerido.

Apéndice V.-Protocolo para la elaboración de soluciones para la aclaración de las raíces (Malamy y Benfey, 1997)

Solución ácida

- 1.- Para preparar 125 ml de solución de HCl 0.24 N en metanol al 20%:
 - Tomar 25 ml de metanol
 - Agregar 2.5 ml de HCl concentrado
 - Aforar con 97.5 ml de agua destilada

Solución básica

- 2.- Para preparar 10 ml de solución NaOH 7% en etanol al 60%:
 - Pesar 0.7 g de NaOH
 - Añadir 6 ml de etanol
 - Aforar a 10 ml con 4 ml de agua destilada

12. REFERENCIAS

- Agostini, E., Congligno, M., Milrad, S., Tigier, A., Giulietti, A. 2003. Phytoremediation of 2,4 dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**:139-144.
- Alloway, Dr, B.J. 1995. Heavy Metals in Soils, Springer. Londres. pp. 384.
- Arrivault, S., Sanger, T., Krämer, U. 2006. The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal.* **46**: 861-879.
- Barceló, J. y Poschenrieder, C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science.* **2**: 333-344.
- Benavides, P., Gallego, M., Tomaro, L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiology.* **17** (1):21-34.
- Bert, V., Macnair, R., De Laguerie, P., Laprade, S., Petit, D. 2000. Zinc tolerance and accumulation in metalicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). *New Phytology.* **146**: 225-233.
- Bert, V., Laprade S., De Laguerie P., Petit, D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytology.* **155**: 47-57.
- Bert, V., Meerts P, Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber W., Verbruggen, N. 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant soil.* **249**:9-18
- Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M., Dubreuil, A. 2000. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol* A, B, C genes only. *J. Biotechnology.* **81**: 157-158.
- Boominathan, R., Doran, P. 2003. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology.* **101**: 131-146.
- Broadley, M., White, P., Hammond, P., Zelko, I., Lux, A. 2007. Zinc in plants. *Transley Review.* **173**: 677-702.
- Chávez-Vela., Chávez, O., Pérez-Molphe, B. 2003. Transformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrociencia.* **37**: 629-639.
- Chi, M; Echeverría, S; Kay, J; Acerito, E; Rodríguez, Z. 2004. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como herramienta biotecnológica. *Ciencia.* 61-68.

Chiarello, N., Mooney, H., Williams, K. 1992. Growth, carbon allocation and cost of plants tissues. in *Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation*. Eds. Pearcy, R., Ehleringer, J., Mooney, H, Rundel, P. Ed. Chapman & Hall. Londres. pp. 457.

Clemens, S., Palmgrend, G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plants Science*. 7: 309-315.

CNA. Comision Nacional del Agua. Estadísticas del agua en México, Edición 2007. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx>

Cosio, C., Martinoia, E., Keller, C. 2004. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. *Plant Physiology*. 134:716-725.

Demian Cervantes, F. 1999. Estudios de ecotoxicidad, biorremediacion y fito-biorremediacion en suelos contaminados con hidrocarburos (diesel). UNAM. Facultad de Ciencias.

Duane, L., Pincel, D., Johnson, L., Pace, M. 1986. Assessments of Spermatozoal Function Using Dual Fluorescent Staining and Flow Cytometric Analyses. *Biology of Reproduction*. 34:127-138.

Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernández-Barrera, A., Shiskova, S. y Gónzales, I. 2006. Lateral Root Inicitation in *Arabidopsis*. Developmental Window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botanny*, 97: 903-915.

Duffus, J. 2002. "Heavy Metals"- A Meaningless Term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 74:793-807.

Duruibe, J., Ogwuegbu, M., Ekwurugwu, J.2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*. 2:112-118.

Dushenkov, V., Kumar, N., Motto, H., Raskin, I. 1995. Rhizofiltration: The use of Plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol*. 29:1239-12445.

Eapen, S. y D'Souza, S. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*. 23:97-114.

EPA. Environment Protection Agency. 2005 Toxicological review of zinc and compounds. Disponible en: <http://www.epa.gov/iriswebp/iris/toxreviews/0426-tr.pdf>

Gallego, M., Benavides, P., Tomarao, L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*. 121: 151-159.

Goodall, H. y Johnson, M. 1982. Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature*. 295: 524-526.

Han, B., Linden, J., Guajarathi, P., Wickramasinghe, R. S. 2004. Population balance approach to modeling hairy root growth. *Biotechnol. Prog.* 20: 872-879

Hansen, E.; Lassen, C. 2003. Cadmium review. Nordic Council of Ministers. **324**:1-24.
INE. Instituto Nacional de Ecología. Fuentes de contaminación en México. Disponible en: <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/372/fuentes.html>

Krämer, U. 2005. MTP1 mops up excess zinc in *Arabidopsis* cell. *Trends in Plant Science*. **10**: 313-315.

Küpper, H., Lombi, E., Zaho, F., McGrath, P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*. **212**:75-84.

Lasat, M., Baker, M. J., Kochian, V. 1998. altered Zn Compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*. **118**:875-883.

Lombi, E., Zhao, J., Dunham S. J., McGrath, S.P. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytology*. **145**: 11-20.

Lugo-Rodríguez, A. 2007. Estudio comparativo del crecimiento y la morfogénesis de las raíces de *A. thaliana* intactas y transformadas por *A. rhizogenes*. Tesis de Licenciatura. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. UDG. Guadalajara, Jalisco.

Lukowitz, W., Gillmor, C.S., Scheible, W.R. 2000. Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiology* **123**: 795-805.

Madigan, T., Martinko, M., Parker. 2001. Brook. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. España. pp 591-593.

Malamy, J and Benfy, P. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124: 33-44.

McGrath,S.P., Lombi, E. Gray, C. Caille, N, Dunham, S. Zhao, F. 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution* **141**: 115-125.

Mulligan, C. N. Yong, R. N., Gibbs B.F. 2001. Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*. **60**: 193-207.

Nedelkoska, V., Doran, M. 2000. Hyperaccumulation of Cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*. **67**: 607-615.

Nedelkoska, V. y Doran, M. 2001. Hyperaccumulation of nickel by hairy roots of *Alyssum* species: comparison with whole regenerated plants. *Biotechnol. Prog.* **17**: 752-759.

Nilsson, O., Touminen, H., Sundberg, B., Olsson, O. 1997. The *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cell competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen. *Physiologia Plantarum*. **100**:456-462.

Norma Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Normas Oficiales Mexicanas vigentes/NOM-ECOL-002.pdf>

Núñez, L., Meas, V., Ortega, B., Olguín J., 2004. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*. 69-82

Papoyan, A., Piñeros M., Kochian, V. L. 2007. Plant Cd^{2+} and Zn^{2+} status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. **175**: 51-58.

Perr, A., Baxter, R., Richards, L. Freeman, L., Murphy, S., 2006. Phytoremediation and hyperaccumulator plants in Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. Vol. **14** pág. 299-340.

Pilon-Smits, E. 2005, Phytoremediation. Annual Review. *Plan. Biology*. **56**:15:39.

Pletsch, M., Santos de Arujo, B., Charlwood, V. 1999. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnology Advances*. **17**: 679-687.

Prasad, V y Freitas, O. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. **6**.

Reeves, D, R., Baker, A. J. M. 2000. Metal-Accumulating Plants in Phytoremediation of toxic metals. Using Plants to Clean Up the Environment. Eds. Raskin, I. y Enley, B. Ed. John Wiley & Sons, Inc.

Rijhwani, K. S. y Shanks, V. J. 1998. Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Chatharantus roseus* hairy root culture. *Enzyme and Microbial technology*. **22**: 606-611.

Sarret, G.; Saumitou-Laprade, P.; Valérie Bert, Olivier Proux, Jean-Louis Hazemann, Agne's Traverse, Matthew A. Marcus, and Alain Manceau. 2002. Forms of Zinc Accumulated in the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*. **130**: 1815–1826.

Shanks, V. y Morgan, J. 1999. Plant 'hairy root' culture. *Current opinion in Biotechnology*. **10**:151-155.

Shaoxiong, Y., Kwok, H., Doran, M. P. 1996. Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme and Microbial technology*. **18**: 238-243.

Sims, M., Tricia, C., Worth, C. 1993. Biorremediation: Nature's Cleanup Tool. DIANE Publishing. USA. p. 29.

Taiz, L., Zeiger, E., 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA. pp. 792.

Tzfira, T. y Citovsky, V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *TRENDS in Cell Biology*. **12**: 121-129

Velasco, T. y Volke, V. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Ed. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)

Velasco, A y Volke, V. 2003. Composteo: alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*. 66: 41-53.

Weathers, P.J., Wyslouzil, B.E., Wobbe, K.K., Kim, Y.J., y Yigt, E. 1998. The biological response of hairy roots to O₂ levels in bioreactors. *Workshop bioreactor technology*. 286-289.

Wójcik, M., Vangronsveld, J., D'Haen, J., Tukiendorf, A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*. 5: 163-171.

Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, J. 2005. Molecular mechanism of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18: 339-353.

Zhao, J., Lombi, E., Bredon, T., McGrath, P. 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant, cell and Environment*. **23**:507-514.

Zhao, J., Lombi, E., McGrath, P. 2003. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant and soil*. **249**:37-43.

Zhao, F., Jiang, R., Dunham, J., McGrath, S. 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*. **172**: 646-654.

Zupan, R. y Zambryski, P., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*. **107**: 1041- 1047.