

Uso del cadmio como metal tóxico indicador en una empresa minera cooperante. Parte 2. Desarrollo de callos de *Phragmites australis* y el efecto del cadmio sobre ellos

Use of cadmium as a toxicity indicator metal in a cooperating mining company. Part 2. Development of cell culture from Phragmites australis and the effect of cadmium on them

Daniela Fuerte-Martínez*¹, Teresa de Jesús Olivera-Flores²,
María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química, Conjunto E, Edificio E-3 Alimentos y Química Ambiental, Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México. Tels.: +55 5622 5300 al 04, Fax +55 5622 5300. Correo-e (e-mail):
d_daniela_@hotmail.com

²Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Edificio E-1 Bioquímica y Farmacia, Laboratorio 116, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México

*Autora a quien debe dirigirse la correspondencia

Recibido: Mayo 10, 2022

Aceptado: Junio 30, 2022

Resumen

Para resaltar la presencia de los metales pesados como elementos potencialmente tóxicos (EPT) existentes en el agua de proceso de una industria minera cooperante se planteó el uso del cadmio como un indicador ambiental de la toxicidad especialmente para plantas hidrófitas que estén en contacto con el agua corriente de proceso para depurar. Para evaluar el efecto tóxico del cadmio en plantas acuáticas se usó el carrizo (*Phragmites australis*) en un ensayo *in vitro*, exponiendo células de callo de esta especie a diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 mg/L, las encontradas en los fluentes de una mina cooperante). Se implementó un protocolo con una serie de metodologías para la inducción, desarrollo y evaluación del crecimiento de callo. Se logró el establecimiento de cultivos celulares de callo de *Phragmites australis* con los que se realizó la evaluación del efecto tóxico, encontrándose que el cadmio no afectó el crecimiento del callo dado que no se abatió a las diferentes concentraciones en estudio.

Palabras clave: Flotación selectiva de minerales, cadmio disuelto en agua, tejido vegetal no diferenciado, callos, *Phragmites australis*

Abstract

To highlight the presence of heavy metals as potentially toxic elements (PTEs) existing in the process water of a cooperating mining industry, the use of cadmium was proposed as an environmental indicator of toxicity, especially for hydrophytic plants that are in contact with a water process stream for cleaning it. In order to evaluate the toxic effect of cadmium on a reed (*Phragmites australis*), it was proposed to carry out an *in vitro* test exposing callus cells of the plant species under study to different concentrations of cadmium (0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 mg/L found in the effluents of the cooperating mine). A protocol was implemented with a series of methodologies for the installation of reactors, tissue cutting, disinfection of ex-plants and composition of culture media to be tested simultaneously for the optimal and successive choice of the most favorable conditions for induction, development and assessment of callus growth. The establishment of cell cultures of *Phragmites australis* callus was achieved, with which the evaluation of the toxic effect was carried out. Findings indicate that cadmium did not affect the growth of the callus since it did not collapse at the different concentrations under study.

Keywords: Selective flotation of minerals, dissolved cadmium in water, undifferentiated cell mass plant tissue, callus, *Phragmites australis*

Introducción

La actividad minera en México es uno de los principales contribuyentes del sector en el mundo, ocupando el primer lugar en la producción de plata a nivel mundial y siendo uno de los 10 principales productores de 16 diferentes minerales. Sin embargo, la minería representa un fuerte impacto ambiental debido a la liberación de metales pesados los cuales son considerados elementos potencialmente tóxicos (Cárdenas, 2013; Ruiz-López, 2009).

En estudios previos realizados en los Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAYQA) se resaltó la presencia de elementos potencialmente tóxicos en el agua de proceso de una industria minera cooperante del Estado de México y la problemática generada por la acumulación de dichos elementos al reutilizar el agua de proceso en la operación unitaria de flotación para extraer y concentrar metales, que afecta la flotación selectiva de los minerales de interés (Ruiz-López, 2009). Para el estudio del impacto de los elementos tóxicos en las aguas reutilizadas, se ha utilizado como herramienta al componente vegetal de los humedales artificiales, que de forma controlada, se emplean plantas acuáticas para la eliminación de contaminantes presentes en aguas residuales mediante procesos físicos, biológicos y químicos. Considerando la problemática ambiental de la mina cooperante, se ha propuesto la instalación de humedales artificiales como sistema de remediación de la contaminación en el agua excedente de su proceso de concentración de los minerales la cual es enviada a un cuerpo receptor pre-construido conocido como presa de jales (Ruiz-López, 2009). Sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales interactúan los elementos potencialmente tóxicos y las plantas del humedal, así como el efecto tóxico que dichos elementos pueden provocar en las plantas.

Con el objetivo de evaluar el posible efecto de los elementos potencialmente tóxicos contenidos en el agua de la mina sobre las plantas hidrofíticas que se establecerían en el humedal artificial, se propuso un ensayo en el que se eligió al cadmio como metal indicador potencialmente tóxico y a la planta hidrofítica conocida coloquialmente como carrizo, *Phragmites australis*, como material biológico.

Elementos potencialmente tóxicos, EPT

El término Elemento Potencialmente Tóxico (EPT) se define como cualquier elemento químico que pueda tener consecuencias nocivas a los seres vivos al exponerse a éstos. Los EPT incluyen elementos de importancia ambiental y/o toxicológica de carácter metálico, no metales y metaloides. Los de mayor importancia ambiental son el As, Be, Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, Se, Tl, V y Zn, siendo metales en su mayoría (Volke-Sepúlveda et al., 2005).

En materia de contaminación ambiental a los metales que en estado puro presentan una densidad mayor a 5.0 g/cm^3 y son tóxicos se les define también como "metales pesados", este término es utilizado con frecuencia para referirse a los EPT metálicos, sin embargo; debido a inconsistencias y confusiones en su descripción y uso, este término no está formalmente reconocido por la *IUPAC* (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Duffus, 2002).

El carácter tóxico de los EPT se debe a la capacidad que tienen para reaccionar e interferir con una serie de sistemas enzimáticos en los seres vivos. Los cationes metálicos divalentes (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+}) son estructuralmente muy similares entre sí, tienen diámetros iónicos entre 138 y 160 pm y una doble carga positiva. De esta manera, por su semejanza estructural, ciertos cationes metálicos divalentes pueden desplazar a otros con funciones fisiológicas importantes en las células. Por ejemplo, los iones Hg^{2+} , Cd^{2+} y Ag^+ forman complejos inespecíficos al interior de las células, que interfieren con el adecuado metabolismo celular (Csuros y Csuros, 2002).

El cadmio es un elemento químico metálico considerado un EPT. Es común hallarle en minas asociado con metales como el zinc, el plomo y el cobre, y nunca en estado puro. El cadmio produce efectos

tóxicos en los organismos vivos, aún en concentraciones muy bajas y no es degradable en la naturaleza, por lo que una vez liberado al ambiente permanecerá en circulación. Esta propiedad, sumada a su poder bioacumulativo, lo convierte en uno de los EPT de mayor importancia en materia de contaminación ambiental, así como un elemento de referencia para estudios de investigación de toxicidad (Hernández-Baranda et al., 2019).

Modelo biológico: *Phragmites australis*

Es una planta perenne, con un rizoma rastrero con capacidad para crecer sobre la superficie buscando agua (Figura 1). Puede alcanzar los 4 m de altura y 3 cm de diámetro, presentando una gran inflorescencia al final del tallo. Tiene una distribución cosmopolita y subcosmopolita. Habita generalmente en suelos húmedos y orillas de cursos de agua y lagunas. En ríos se encuentran fundamentalmente en los tramos más bajos, en los que la velocidad del curso de agua les permite enraizar. Soporta niveles moderados de salinidad en el agua y en el suelo, necesitando suelos encharcados hasta profundidades de 50 cm, por lo que es posible encontrarlo en las proximidades de marismas y zonas más salobres (Colaboradores de Wikipedia, 2022; Conabio, 2009).



Figura 1. *Phragmites australis* (cortesía de Oswaldo Téllez-Valdés, CONABIO, 2009)

Cultivo de callos

El cultivo de callos es la inducción y mantenimiento de una masa amorfa (Figura 2) de células vegetales no diferenciadas obtenida a partir del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados de una planta madre que, al someterse a un cambio en los niveles de auxinas y citocinas, logran una desdiferenciación celular (Ayala-Vázquez, 2008). Los tejidos de callo por lo general son heterogéneos en su composición celular; es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares, la diversidad celular depende de varios factores como el origen del tejido, la edad y la composición de los medios (Pérez-Molphe-Balch et al., 1999). Se ha observado que, tanto los callos establecidos a partir de diferentes órganos de una misma planta como los callos procedentes de un mismo explante,

llegan a diferir en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos; características que también pueden concentrarse mediante reguladores añadidos a los medios de cultivo y manipulación física.



Figura 2. Callo inducido a partir de tejidos vegetales de *Phragmites australis* (fotografía de la autora)

Materiales y métodos

Área de estudio

El material biológico *Phragmites australis* fue obtenido del humedal artificial localizado dentro de las instalaciones del Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur (CCH-Sur) de la UNAM (Palacios-Vargas et al., 2009). Se extrajeron 8 plantas de carrizo (*Phragmites australis*) para establecer cultivos en reactores a escala de laboratorio a partir de plantas sanas (Figuras 3a,b).

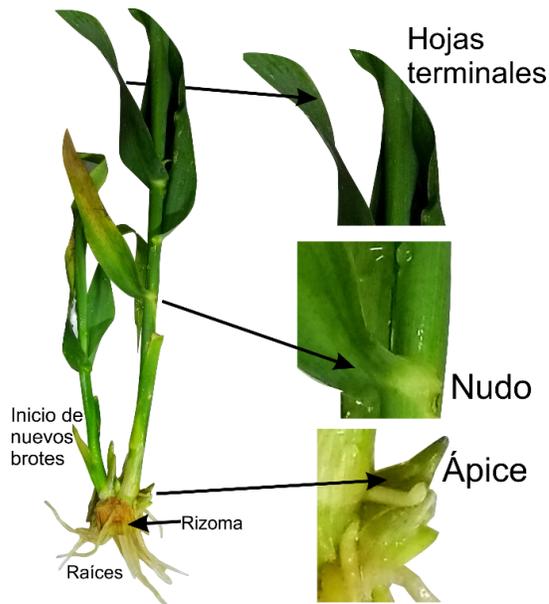


Figura 3a. Partes de la planta *Phragmites australis* de las cuales se extrajeron los explantes (Fotografías de la autora)



Figura 3b. Reactor de PVC para el crecimiento de las plantas acuáticas

La metodología se llevó a cabo en cinco etapas (Figura 4):

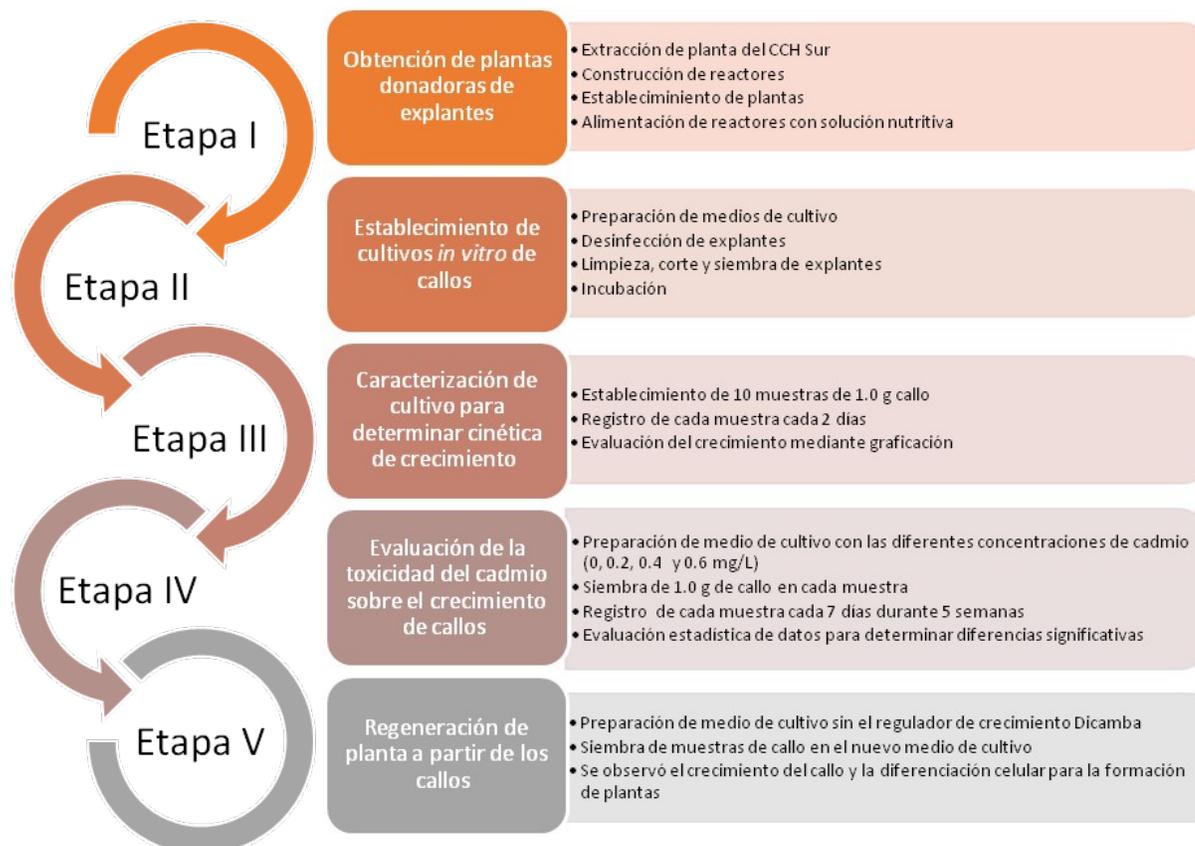


Figura 4. Metodología general

Cada reactor se construyó cortando 38 cm de largo de tubo de cloruro de polivinilo, *PVC* en inglés, de 20 cm (8 pulgadas) de diámetro y empalmándolo con su respectiva base, sellando cada una de las uniones. A cada reactor se le añadió tezontle (roca volcánica muy porosa) de tamaño homogéneo (1 cm de diámetro equivalente) como soporte para la planta, previamente lavada con el fin de disminuir la carga microbiana y materia orgánica. Cada planta se instaló 15 cm por encima de la base de la base del reactor y se cubrió con 15 cm más de tezontle. Semanalmente se alimentó cada reactor con solución nutritiva (Tabla 1) para promover su crecimiento, drenando la solución anterior con el fin de disminuir en lo mayor posible la carga microbiana.

Tabla 1. Preparación de la solución nutritiva

Reactivos	Concentración (mg/L)	Reactivos	Concentración (mg/L)
NH ₄ H ₂ PO ₄	23.62	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.050
MgSO ₄ ·7H ₂ O	98.79	H ₃ BO ₃	0.19
KCl	223.09	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.12
NaNO ₃	252.09	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ H ₂ O	1.52
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.10	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.61
CaCl ₂	115.61		

Para establecer los medios *in vitro* e inducir el desarrollo del callo se extrajeron explantes de 3 diferentes tejidos de la planta: Las hojas terminales, los nudos y los ápices. Se sometieron a desinfección (Tabla 2) y posteriormente se colocaron en los medios de cultivo (Tabla 3). Se incubaron a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. De los cultivos con los cuales se logró

la inducción de callo se renovó el medio de cultivo cada 6 semanas y simultáneamente se les retiraba, en condiciones de esterilidad, el tejido deteriorado u oxidado, manteniendo solamente el callo fresco y el tejido vegetal que no hubiese perecido.

Tabla 2. Método de desinfección

Método	Componente	Concentración	Acción	Tiempo	Condición de espacio
D1	Jabón líquido y agua corriente	10 mL/L	Sumergir y agitar	15 minutos	Aséptica
	Alcohol	70%	Sumergir y agitar	1 minuto	Estéril Realizar campana de flujo laminar
	Hipoclorito de sodio	10%	Sumergir y agitar	20 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Benomil	2 g/L	Sumergir y agitar	15 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Agrimicin-500	2 g/L	Sumergir y agitar	15 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Antioxidante (Ácidos ascórbico y cítrico)	100 g/L c/u	Sumergir y	15 minutos	
	Antibiótico y antimicótico, mg/L	Cefotaxime 250 Terbinafina 250	Agitar		
D2	Jabón líquido y agua corriente	10 mL/L	Sumergir y agitar	15 minutos	
	Alcohol	70%	Sumergir y agitar	1 minuto	Realizar campana de flujo laminar
	Hipoclorito de sodio	20%	Sumergir y agitar	20 minutos	
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto cada uno	
	Benomil	2 g/L	Sumergir y agitar		
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Agrimicin-500	2 g/L	Sumergir y agitar		
	Agua desionizada estéril	100%	Enjuagar 3 veces	1 minuto c/u	
	Antioxidante (Ácidos ascórbico y cítrico)	100 g/L c/u	Sumergir	15 minutos	
	Antibiótico y antimicótico, mg/L	Cefotaxime 250 Terbinafina 250	y agitar		

Ver Glosario: Benomilo, agrimicina-500, cefotaxime 250, terbinafina 250

Tabla 3. Composición del medio de cultivo

Compuesto	Nombre y concentración de cada medio de cultivo
Sales inorgánicas	B5 ² 100%
Vitaminas MS modificadas	100%
Aminoácido	Glicina 2 mg/L
Fuente de energía	Sacarosa 30 g/L
Fitohormona para inducción de callo (auxina)	<i>Dicamba</i> 5.0 mg/L
Auxina	ANA 1.0 mg/L
Citocina	BA 0.5 mg
pH	5.7
Gelificante	Gelzan 3.0 g/L
Antibiótico	Cefotaxime 1.0 mL/L
Antimicótico	Nistatina 50.0 mg/L

Donde MS: Medio de sales y vitaminas diseñado por Murashige y Skoog (1962); B5: Sales para la preparación de medio de Gamborg et al. (1968); *Dicamba*: Herbicida selectivo con actividad de auxina en bajas concentraciones; ANA: Ácido naftalenacético; BA: Bencil amino purina; Gelzan o goma gelana: Polisacárido soluble en agua que permite la gelificación de medios de cultivo; Nistatina: Antimicótico de actividad fungistática

Colección de muestra

Se caracterizó la cinética de crecimiento del callo previo al ensayo de toxicidad con la finalidad determinar el inicio del período de mayor crecimiento. Se hizo una mezcla de callo de los diferentes cultivos con el fin de homogeneizar el tejido. Se sembró 1.0 g de callo de la mezcla en 10 medio de cultivo y se incubaron a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Se registró la masa del callo, como indicador de crecimiento, cada 2 días, tres veces a la semana, durante 3 semanas consecutivas. Se tuvo un total de 10 mediciones para cada una de las 10 repeticiones. Se calculó el promedio de masa de cada día y se graficó para visualizar la cinética de crecimiento y reconocer las fases *lag*, exponencial y estacionaria. No se hicieron cálculos de las rapideces de reproducción celular. Se determinó que día 10 era el inicio de la fase exponencial, siendo referencia para la preparación de los cultivos de callo con cadmio para el ensayo de toxicidad.

Análisis de las muestras

Se preparó medio de cultivo al que se le añadieron diferentes volúmenes de una solución de cadmio con una concentración de 10.0 mg/L preparada a partir de la solución patrón trazable de material de referencia estándar del Instituto Estadounidense de Normas y Tecnología para Cd(NO₃)₂ en HNO₃ 0.5 mol/L (1000 mg/L Cd Certipur®) para obtener 5 repeticiones de medios de cultivo a cada una de las cuatro concentraciones de 0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L Cd.

De cultivos frescos, se tomaron las muestras para el ensayo en el día 9 a partir del día de siembra. Se colocó 1.0 g de callo en cada uno de los frascos con medio de cultivo, se sometieron a condiciones ambientales controladas en un cuarto de incubación a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Fuerte-Martínez et al., 2019). El cadmio se cuantifica por absorción atómica (Bernal-González, 2022). Se midieron y registraron las masas de callo de cada 7 días, durante 5 semanas consecutivas. Se tuvo un total de 6 mediciones (considerando el día 0) para cada una de las 5 repeticiones de las concentraciones de cadmio (tres y un blanco).

Análisis estadístico

Se evaluó el efecto de toxicidad realizando un análisis estadístico de tipo ANOVA para comparar simultáneamente si existían diferencias significativas en el crecimiento de los callos a las 4 diferentes concentraciones en estudio.

Resultados y discusión

Caracterización de cultivos para determinar cinética de crecimiento

Se realizó el registro de masa de callo para determinar el comportamiento de crecimiento del callo y determinar las fases de éste mediante la curva de crecimiento (Figuras 5a,b).

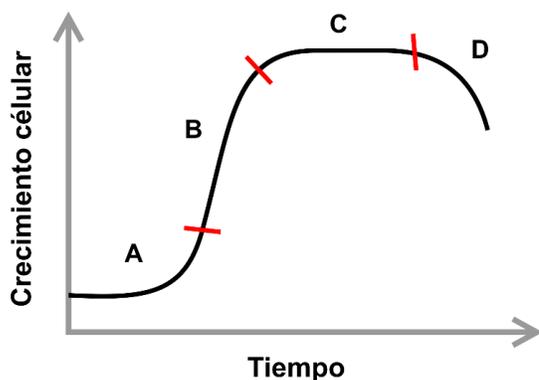


Figura 5a. Curva de crecimiento típica: A) Fase *lag*, B) Fase exponencial, C) Fase estacionaria, D) Fase de muerte (Imagen de la autora)

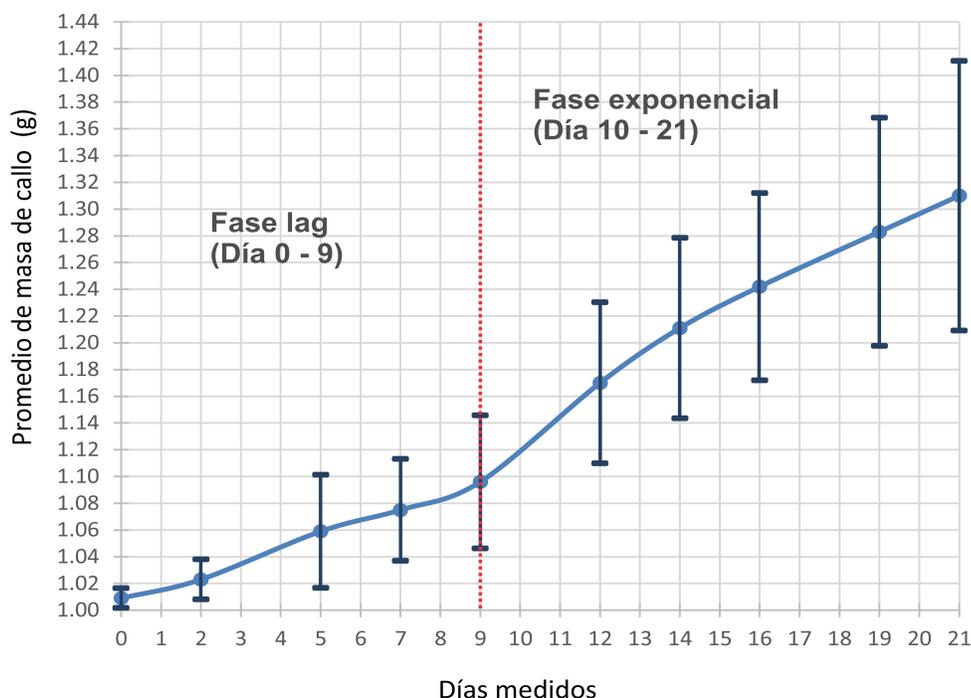


Figura 5b. Cinética de crecimiento de los callos

Se presenta la masa promedio por día de callo de *Phragmites australis* y se señalan las fases de desarrollo alcanzadas en el ensayo. En la gráfica se observa que la fase *lag* (a) duró a partir del inicio de la incubación hasta el día 9, y la fase exponencial (b) inició en el día 10 y no se determinó el día final de esa fase y el inicio de la fase estacionaria (C) debido a que en la gráfica se observa que el crecimiento continúa aún en la última muestra registrada. Para conocer el tiempo total que dura la fase exponencial se tendría que extender el tiempo de incubación y los registros de masa del callo para determinar la cinética de crecimiento completa.

Evaluación de la toxicidad del cadmio sobre el crecimiento de los callos

Se muestra el promedio de las repeticiones por semana para cada concentración considerada (Figura 6). Los resultados muestran que tuvo mayor crecimiento el callo expuesto a la concentración de $0 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$, seguido en orden de la concentración $0.6 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$, $0.4 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$ y finalmente $0.2 \text{ mgL}^{-1} \text{ Cd}$. En el análisis estadístico se encontró, sin embargo, que no hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento del callo expuesto a las diferentes concentraciones de cadmio en el medio.

Discusión final

La instalación de los reactores con plantas de carrizo fue óptima y se logró una adecuada adaptación de las plantas a su nuevo ecosistema, diferente en sustrato y clima. Las plantas crecieron lo suficiente para que se tomaran repetidas muestras sanas de tallos, hojas y nodos.

El cambio periódico del agua de riego favoreció la disminución de carga microbiana, debido a que esto previene la acumulación por el estancamiento. Posteriormente, se llevó a cabo la desinfección, la cual resultó ser un proceso laborioso debido a que las plantas provenían de un sustrato de tezontle expuesto al aire libre, por lo que a pesar del cambio de sustrato y la renovación constante de agua de riego para disminuir la carga microbiana, se requirió implementar un método de desinfección.

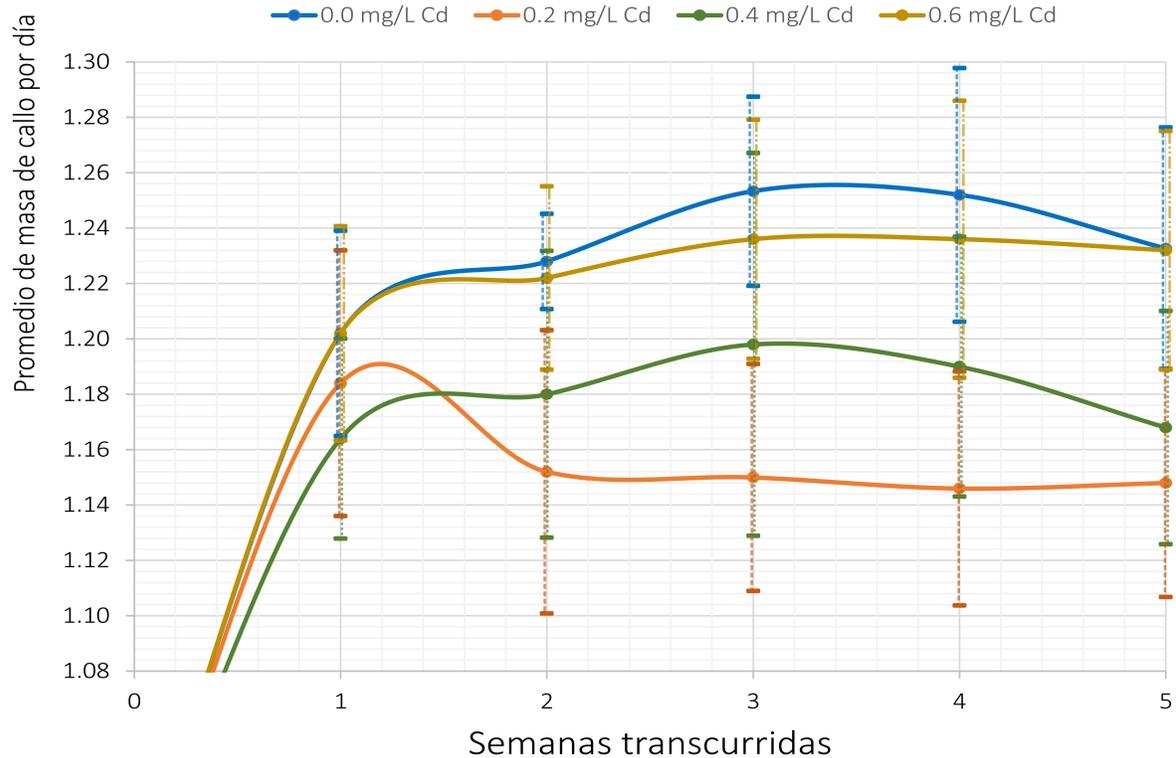


Figura 6. Crecimiento promedio (incluyendo desviaciones estándar) de callo para las tres concentraciones de cadmio estudiadas y el control

El crecimiento celular *in vitro* es un proceso controlado por las interacciones que se establecen entre los medios nutritivos suplementados con reguladores de crecimiento, así como las condiciones fisiológicas y bioquímicas endógenas de los explantes. En contraste con el desarrollo de una planta completa, la inducción de callo tiene requerimientos particulares, siendo el principal el regulador de crecimiento, que promueve la dediferenciación celular a partir de los explantes expuestos al medio de cultivo enriquecido (Ramos-Rodríguez, 2006).

Tanto en los explantes de nodos como de hojas superiores se consiguió inducir el callo ya que presentan un gran número de células meristemáticas, las cuales tienen la singularidad de dividirse aceleradamente, aunque adicionalmente se ha demostrado que la formación de callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal, ya sea hoja, tallo, raíz, nudo, pecíolo, cotiledones, etc. Es por esto que la respuesta celular a la formación callo depende de muchos factores, las condiciones fisiológicas y bioquímicas de los tejidos, la composición de los medios de los cultivos y las condiciones ambientales, entre otras (Álvarez, 1994).

Teniendo callo suficiente, se procedió a realizar la curva de crecimiento en la cual se precisaron la fase *lag* y parte de la fase exponencial sin hallar el final de esta ni el principio de la fase estacionaria, lo cual deriva de la tendencia creciente de la curva en la gráfica, ya que en ninguno de los puntos se aprecia una masa constante, indicativo de la fase estacionaria. Para discernir todas las fases de cinética de crecimiento se requiere continuar las mediciones periódicamente hasta que perezca el callo en el medio, no se realizó debido a que el objetivo de la cinética de crecimiento era el de hallar el tiempo de inicio de la fase exponencial, primordial para realizar el muestreo del callo para el establecimiento de los medios para el ensayo de toxicidad de cadmio.

En el ensayo para evaluar la toxicidad del cadmio en el callo de *Phragmites australis*, se designó como indicador de crecimiento la masa de callo de cada una de las muestras expuestas. Con los resultados obtenidos se realizó una gráfica para visualizar la cinética de crecimiento del callo a cada una de las concentraciones de cadmio. Se observa al comparar las curvas de crecimiento que el callo que más creció fue aquel que tenía una concentración de 0 mg/L Cd, seguido del callo a concentración de 0.6 mg/L Cd, luego a 0.4 mg/L y finalmente el callo que menos creció fue el de concentración 0.2 mg/L; sin embargo este orden de crecimiento no parece tener relación directa con respecto de la concentración de cadmio, por lo que se realizó un análisis estadístico en el cual se confrontaron los resultados de las 4 concentraciones simultáneamente para evaluar las diferencias entre ellas.

Los resultados obtenidos evidenciaron que no hubieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el crecimiento de callo a las 4 concentraciones de cadmio. Dado que no se manifestó una diferencia en el crecimiento del callo por efecto del cadmio, se infiere que este no causa un daño tóxico a las células de *Phragmites australis*, a pesar del carácter potencialmente tóxico del elemento. Siendo así, dicha resistencia del tejido vegetal indica la existencia de al menos algún mecanismo de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos, un hallazgo que deberá explorarse con más investigación experimental.

Se sabe que las plantas presentan una serie de mecanismos celulares que pueden estar participando en la tolerancia a elementos potencialmente tóxicos. Estos consisten en la formación de micorrizas, el secuestro del metal en la pared celular de la planta, la precipitación con exudados radicales, la reducción de la absorción del metal por la membrana plasmática, el secuestro de metales en vacuolas mediante transportadores específicos localizados en el tonoplasto y quelación de metales en el citosol por fitoquelatinas, metalotioneínas, histidina y prolina en forma libre (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). Sin embargo, la prevalencia de un mecanismo u otro en una planta no está del todo comprendido y, así mismo, se desconoce cuál o cuáles pudieran ser los mecanismos de tolerancia existentes en *Phragmites australis*, por lo que se considera necesario llevar a cabo estudios que involucren la aplicación de herramientas moleculares, con el fin de entender con claridad el modo de acción de los mecanismos de *Phragmites australis* (Figura 7).



Figura 7. Seguimiento fotográfico: a) Callos embriogénicos, b) Germinación de embriones, c) Plántulas de carrizo, d) Plantas completas ya crecidas y mantenidas en medio líquido (fotos de la primera autora)

Siendo que la tolerancia a EPT en los organismos vegetales puede entenderse como resultado de un proceso evolutivo dado por el desarrollo de una serie de mecanismos específicos que permiten

mantener la toma de elementos esenciales dentro de intervalos fisiológicos permisibles mientras prevalece la capacidad de inactivar metabólicamente los elementos que representan un riesgo para la integridad celular (Linhart y Grant, 1996), se reconoce que este tipo de conocimiento permite proponer soluciones a problemas de contaminación de agua y la posibilidad de recuperación de los diferentes ecosistemas impactados por metales y otros EPT, tales como las zonas mineras.

Conclusiones

La especie *Phragmites australis* se adaptó óptimamente en el sustrato de tezontle y nuevo clima al que fue sometido. La selección de las partes de las plantas de aspecto sano resultó adecuada para obtener los *explantes* y posteriormente someterlos a desinfección y promover el desarrollo de callo. Las concentraciones de 0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/L Cd en el medio, no mostraron diferencias significativas en el crecimiento del callo, por lo que se deduce que no tiene un efecto tóxico sobre las células de *Phragmites australis*.

Glosario de términos

Término	Significado
Agrimicina-500	Es un fungicida-bactericida, fungicida agrícola en polvo humectable formulado con sulfato de estreptomina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre, actúa con un efecto sinérgico, controlando más eficazmente las enfermedades bacterianas y fungosas (https://www.zoetis.mx/products/agricola/agrimycin-500.aspx);
Benomilo	Plaguicida que posee una actividad o aptitud acaricida; fungicida y nematocida, nombre IUPAC: 1-benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo CA: [1-[carbonil]-1H-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo, se trata de una sustancia aplicada en agroquímica como fungicida sistémico
Callo	Un callo de células (también denominado <i>callus</i> o <i>calli</i>), es una masa de células no diferenciadas. En las plantas las células del callo son aquellas que cubren una herida (Wikipedia, 2022)
Cefotaxime 250 Desdiferenciación	Es un antibiótico del grupo de las cefalosporinas de tercera generación Por primera vez, investigadores han inducido células diferenciadas para que reviertan el proceso y vuelvan a ser células troncales. Aunque se sabe que tal desdiferenciación ocurre en sistemas naturales, los científicos nunca antes habían imitado el proceso en el laboratorio (https://www.hhmi.org/news/se-inducen-c-lulas-desdiferenciarse-para-que-vuelvan-ser-c-lulas-troncales)
Explante	Biología: Fragmento de un tejido extraído de un ser vivo para cultivarlo en un medio artificial (diccionario de la lengua española: https://dle.rae.es/explante)
Terbinafina 250	Es un antimicótico que se usa para tratar infecciones micóticas del cuero cabelludo. Las tabletas de terbinafina se utilizan para tratar las infecciones micóticas de las uñas de los dedos de los pies y de los dedos de las manos, su acción consiste en detener el crecimiento de los hongos (https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a699061-es.html)

Reconocimientos

Una parte de esta investigación fue presentada por la primera autora en la 16th INTERNATIONAL PHYTOLOGICAL CONFERENCE 2019 en Changsha, China, en forma de cartel. Para esta presentación se obtuvo un apoyo financiero parcial por parte de la Sociedad Internacional de

Fitotecnologías, cuyo presidente era el Dr. David Tsao. El Dr. Joel Burken, quien forma parte de la Sociedad, realizó el contacto con la primera autora y el pago de una beca, por lo que la primera autora quiere dar un reconocimiento a esta Sociedad y a sus integrantes. Asimismo, las autoras agradecen los valiosos comentarios a esta investigación de la Dra. Irma Bernal-Lugo, así como de la Dra. Marisela Bernal-González.



Referencias bibliográficas

- Álvarez, A. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Reguladores del crecimiento vegetal. Trillas. México. Pp. 48-66.
- Ayala-Vázquez, I. 2008. Células vegetales en biotransformaciones: Tamizado de la reacción de oxidación de eugenoles/ácidos hidroxicinámicos y dimerización oxidativa del eugenol con cultivos de nueve plantas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México, México.
- Bernal-González, M. 2022. Manual de operación de un espectrofotómetro de absorción atómica. UNAM, Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química, Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México.
- Cárdenas, J. 2013. La minería en México: Despojo a la Nación. Rev. Mexicana Derecho Constitucional. 28: 35-74.
- Colaboradores de Wikipedia. 2022. *Phragmites australis* [en línea] (2022, 24 de febrero). Wikipedia, La enciclopedia libre. Fecha de consulta: 23 de marzo de 2022. https://es.wikipedia.org/wiki/Phragmites_australis
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. CONABIO, Ciudad de México, México. Consulta: 07 de octubre de 2021. <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/archives/5023-Plantas/Plantas/OTV5088%20Phragmites%20australis.jpg.info>
- Csuros, M., Csuros, C. 2002. Environmental Sampling and Analysis for Metals. Lewis Publishers Ed. 372 pp. Boca Raton, Florida. EE.UU.
- Duffus, J.H. 2002. Heavy metals - A meaningless term? IUPAC Technical Report. Pure Appl. Chem. 74:793-807. DOI: 10.1351/pac200274050793
- Fuerte-Martínez, D., Olivera-Flores, T.d.J., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.d.C. 2019. Effect of cadmium on plant tissue: Mass of undifferentiated cells (callus, *Phragmites australis*). Presentado en 16th International Phytotechnologies Conference 2019. International Phytotechnology Society. Sept. 23-27, Changsha, China.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cellular Research. 50:151-158.
- González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. Bol. Soc. Bot. Méx. 82:53-61.

-
- Hernández-Baranda, Y., Rodríguez-Hernández, P., Peña-Icart, M., Meriño-Hernández, Y., Cartaya-Rubio, O. 2019. Toxicidad del cadmio en las plantas y estrategias para disminuir sus efectos. Estudio de caso: El tomate. *Cultivos Tropicales*. 40(3), e10. Ediciones Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISSN impreso: 0258-5936. ISSN digital: 1819-4087. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362019000300010#B8
- Linhart, Y.B., Grant, M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 27:237-277.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15:473-497.
- Palacios-Vargas, J.G., Mejía-Recamier, B.E., Cutz-Pool, L.Q. 2009. Microartrópodos edáficos. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. http://www.repsa.unam.mx/documentos/Palacios-Vargas_et_al_2009_Microartropodos.pdf
- Pérez-Molphe-Balch, E.M., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. Consulta: 26 de octubre de 2021. https://editorial.uaa.mx/catalogo/ccb_tejidos_vegetales_9686259627.html#:~:text=Se%20le%20llama%20Cultivo%20de condiciones%20artificiales%2C%20ax%C3%A9nicas%20y%20controladas.
- Ramos-Rodríguez, T.M. 2006. Regeneración de melón (*Cucumis melo* L.) bajo condiciones *in vitro* como modelo biológico. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Ruiz-López, V. 2009. Remoción de cadmio y zinc de aguas residuales de una industria minera mediante reactores biológicos que simulan un humedal artificial. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Ciudad de México, México. <http://132.248.9.195/ptd2009/septiembre/0648758/Index.html>
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J.A., de-la-Rosa-Pérez, D.A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: Muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. 144 pp. Ciudad de México, México.