



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZONA HUASTECA



**“Establecimiento de las condiciones para el análisis de expresión
diferencial de la interacción *Typha latifolia*-*Pseudomonas
rhodesiae*”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

BQ. Joana Guadalupe Martínez Martínez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alejandro Hernández Morales

CO-DIRECTORA:

Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez

ASESORA:

Dra. Candy Carranza Álvarez

Cd. Valles, S.L.P., México

Enero 2024



Establecimiento de las condiciones para el análisis de expresión diferencial de la interacción *Typha latifolia*-*Pseudomonas rhodesiae* © 2024 by Martínez Martínez Joana Guadalupe. Está permitido: copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, siempre y cuando se respete el deber de atribución, dando el crédito correspondiente al autor. No está permitido hacer uso comercial y no se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra. Esta licencia no limita o restringe los derechos morales o patrimoniales del autor.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZONA HUASTECA



Establecimiento de las condiciones para el análisis de expresión diferencial de la interacción *Typha latifolia*-*Pseudomonas rhodesiae*

PRESENTA

BQ. Joana Guadalupe Martínez Martínez

COMITÉ TUTELAR

Director: Dr. Alejandro Hernández Morales

Co-directora: Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu-Gómez

Asesora: Dra. Candy Carranza Álvarez

SINODALES

Presidenta: Dra. Candy Carranza Álvarez

Secretario: Dr. Alejandro Hernández Morales

Vocal: Dr. José Roberto Macías Pérez

Suplente: Dra. Gabriela Pérez Flores

El programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (Programa Nacional de Posgrados de Calidad) del CONAHCYT, registro 006289, en el nivel en formación.

Número de registro de la beca otorgada por CONAHCYT: 805038

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca bajo la dirección del Dr. Alejandro Hernández Morales y codirección con la Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez y estuvo financiado por el Programa Presupuestario F003 (Fondo Sectorial de Investigación para la Educación) CB2017-2018, A1-S-40454 otorgado a Alejandro Hernández-Morales.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a mis padres, por brindarme su apoyo en esta etapa de mi carrera, por estar conmigo en los momentos complicados y hacerme ver que todo estaría bien, por ser mi motivación e inspiración para ser mejor cada día, pero sobre todo por su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por la beca otorgada (No. de apoyo: 805038) que me permitió desarrollar mis estudios de maestría.

A mis amigos por presionarme y preguntarme a cada rato ¿cuándo terminas?, pero sobre todo por alegrarme aquellos días de trabajo abrumador y acompañarme en mis momentos de ocio, por motivarme y animarme constantemente a continuar con este proyecto.

A mi director de tesis, el Dr. Alejandro Hernández Morales por su disposición para brindarme su apoyo y enseñanzas en el tiempo que estuve en el laboratorio, por sus consejos a nivel profesional y personal, el tiempo de calidad brindado, por ser una persona que siempre da sin esperar nada a cambio e inspirarme a ser mejor.

A la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca y la Facultad de Ciencias Químicas por las instalaciones y las facilidades brindadas para realizar la parte experimental de mi trabajo de tesis.

Al laboratorio de Biotecnología por brindarme el espacio y las herramientas que hicieron posible la realización de este proyecto, a la Dra. Gisela Rolón y el M. C. Jesús Rubio, por el apoyo técnico brindado, su ayuda para resolver dudas y por compartir experiencias, sugerencias y consejos durante este camino. Así como a mis compañeros de posgrado y los chicos de servicio que formaron parte del laboratorio.

A la vida misma, por permitirme recorrer este camino y llenarme de experiencias y lecciones día con día para mi propio crecimiento. A todas esas personas que llenan mi vida de amor y luz, especialmente mis padres, que hacen que cada paso de este viaje llamado vida valga la pena.

ABSTRACT

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) inoculation has been shown to increase heavy metal accumulation and then phytoremediation efficiency. *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 is considered a PGPR due to the production of siderophores, indoleacetic acid, ACC-deaminase, and phosphate solubilization. *Typha latifolia* is one of the plants most used in phytoremediation due to its ability to tolerate and remove heavy metals. Most studies have focused on the Cd removal capacities in artificial wetlands, *in situ* and *in vitro*. However, the molecular mechanisms involved in response to Cd stress or in its interaction with PGPR during phytoremediation processes remain unknown. Genomic studies allow the implicit mechanisms to be explained and these can be used to achieve greater phytoremediation. Therefore, the aim of this work was to standardize the conditions of *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140 interaction to perform RNAseq analysis. Initially, germination tests were carried out to determine germination rate, the root length, and fresh and dry weight of shoots. Besides, *T. latifolia in vitro* cultures were established in hydroponic systems and the seedlings were exposed to *P. rhodesiae* GRC140, 40 mg/L Cd, or both for 10 days. Phenotypic analysis, pH of the hydroponic medium, total glutathione, electrolyte leakage percentage, and Cd quantitation by EAA were determined. Total RNA of treated plants was isolated and the expression of metallothionein, phytochelatin synthase, CL7951, CL354, CL3870 and Unigene11164 genes were determined by RT-qPCR. The results showed that *P. rhodesiae* GRC140 induces the early development of *T. latifolia* and improves the germination percentage in seeds exposed to Cd. In addition, bacterium promotes plant growth in 15-day-old seedlings. Under hydroponic conditions, *P. rhodesiae* GRC140 promotes root hair development in *T. latifolia*. Electrolyte leakage and GSH content were increased in the root tissue of seedlings exposed to Cd, while *P. rhodesiae* GRC140 decreased GSH content to basal levels. *P. rhodesiae* GRC140 improved the Cd content in shoots and roots, the BCF and the BAC of *T. latifolia* exposed to Cd. Metallothionein, CL7951, CL354, CL3870 and Unigene11164 were downregulated in *T. latifolia* exposed to Cd, while *P. rhodesiae* GRC140 upregulated CL3870 gene, after 10 days of interaction. The results of this work are the basis to carry out functional genomics analyzes of the *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140 interaction and try to develop efficient strategies in the phytoextraction of Cd by *T. latifolia*.

Keywords: Phytoremediation; cadmium; hydroponic; *Typha latifolia*; PGPR.

RESUMEN

Se ha demostrado que la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) en plantas acumuladoras de metales pesados incrementa la eficiencia de la fitorremediación. *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 es considerada una PGPR debido a la producción de sideróforos, ácido indolacético, ACC-desaminasa y solubilización de fosfatos. Por su parte, *Typha latifolia* es una de las plantas más utilizadas en fitorremediación por su capacidad para tolerar y remover metales pesados, pero la mayoría de los estudios se han enfocado en las capacidades de remoción de Cd en humedales artificiales, *in situ* e *in vitro*, por lo que se desconocen los mecanismos moleculares en respuesta al estrés por Cd. Los estudios genómicos permiten explicar los mecanismos implícitos y pueden aprovecharse para lograr una mayor fitorremediación. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estandarizar las condiciones de la interacción de *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140 para el análisis de RNAseq. Inicialmente, se realizó un ensayo de germinación en el que se determinó la tasa de germinación y se evaluó la longitud y el peso fresco y seco de brotes y raíces. Posteriormente, se estableció el cultivo *in vitro* de *T. latifolia* en sistemas de hidroponía y se siguió un diseño experimental donde las plántulas estuvieron expuestas 10 días a distintos tratamientos con *P. rhodesiae* GRC140 y 40 mg/L Cd. Al finalizar la exposición, se realizó un análisis fenotípico, se estudió el comportamiento del pH en el medio hidropónico, se determinó el contenido de glutatión total, el porcentaje de fuga de electrolitos, se cuantificaron los niveles de Cd mediante EAA, se aisló el ARN total vegetal y se determinó la expresión de los genes de metalotioneína, fitoquelatina sintasa, CL7951, CL354, CL3870 y Unigene11164 por RT-qPCR. Los resultados mostraron que *P. rhodesiae* GRC140 induce el desarrollo temprano de *T. latifolia* y mejora el porcentaje de germinación en semillas expuestas a Cd, además, promueve el crecimiento vegetal en plántulas de 15 días de crecimiento. En condiciones hidropónicas, *P. rhodesiae* GRC140 promueve el desarrollo de pelos radiculares en *T. latifolia*. Se incrementó la fuga de electrolitos y el contenido de GSH en el tejido radicular de plántulas expuestas a Cd, mientras que *P. rhodesiae* GRC140 minimizó el contenido de GSH hasta niveles basales. *P. rhodesiae* GRC140 mejoró el contenido de Cd en brotes y raíces de *T. latifolia*, el BCF y el BAC. Los genes de metalotioneína, CL7951, CL354, CL3870 y Unigene11164 se encontraron reprimidos en *T. latifolia* expuesta a Cd, mientras que *P. rhodesiae* GRC140 indujo la expresión del gen CL3870, después de 10 días de

interacción. Los resultados de este trabajo son la base para realizar análisis de expresión y genómica funcional de la interacción de *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140 y tratar de desarrollar estrategias eficientes en la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*.

Palabras clave: Fitorremediación; cadmio; hidroponía; *Typha latifolia*; PGPR.

ÍNDICE

CRÉDITOS INSTITUCIONALES	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABSTRACT	IV
RESUMEN	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos.....	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Fitorremediación.....	3
2.2 El cadmio en el medio ambiente.....	5
2.3 Mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en la fitorremediación de Cd.....	8
2.3.1 Absorción y transportadores.....	9
2.3.2 Translocación.....	11
2.3.3 Desintoxicación de Cd.....	11
2.3.4 Secuestro vacuolar.....	13
2.3.5 Mecanismos de la fitorremediación a través de PGPR.....	14
2.4 El género <i>Typha</i>	14
2.5 Aplicación de <i>Typha</i> spp.....	15
2.6 PGPR asociadas a la rizosfera de <i>Typha</i> spp.	17
2.7 Estudios de genómica funcional en <i>Typha</i>	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Esterilización superficial del material vegetal	20
3.2 Ensayo de germinación de semillas de <i>T. latifolia</i>	20
3.3 Establecimiento del cultivo hidropónico de <i>T. latifolia</i>	21
3.4 Cultivo y crecimiento de <i>P. rhodesiae</i> GRC140	22

3.5	Establecimiento de los ensayos.....	22
3.6	Análisis fenotípico y bioquímico	23
3.6.1	Peso fresco.....	23
3.6.2	Peso seco.....	23
3.6.3	Determinación del contenido de glutatión.....	23
3.6.4	Fuga de electrolitos.....	23
3.7	Determinación de pH.....	24
3.8	Cuantificación de Cd (II).....	24
3.8.1	Digestión ácida de muestras vegetales a temperatura ambiente.....	25
3.8.2	Digestión ácida de muestras vegetales en caliente.....	26
3.8.3	Preparación de muestras líquidas.....	26
3.8.4	Elaboración de curva de calibración de Cd y análisis por EAA.....	26
3.9	Extracción de ARN total y determinación de los niveles relativos de expresión genética.....	26
3.9.1	Extracción de ARN total.....	26
3.9.2	RT-qPCR.....	27
3.10	Análisis estadístico.....	28
4.	RESULTADOS	29
4.1	Ensayo de germinación de semillas de <i>T. latifolia</i>	29
4.2	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en plantas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd.....	32
4.2.1	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el fenotipo de <i>T. latifolia</i>	32
4.2.2	Comportamiento del pH en el medio hidropónico.....	34
4.2.3	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el contenido de glutatión de <i>T. latifolia</i>	35
4.2.4	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la fuga de electrolitos de <i>T. latifolia</i>	36
4.3	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la fitoextracción de Cd por <i>T. latifolia</i>	37
4.4	Análisis de la expresión de genes involucrados en la tolerancia a Cd durante la interacción <i>T. latifolia</i> - <i>P. rhodesiae</i> GRC140.....	39
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
5.1	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la germinación de <i>T. latifolia</i>	42
5.2	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en plantas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd.....	43
5.2.1	Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el fenotipo de <i>T. latifolia</i>	43

5.2.2 Comportamiento del pH en el medio hidropónico.....	46
5.2.3 Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el contenido de glutatión de <i>T. latifolia</i>	47
5.2.4 Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la fuga de electrolitos de <i>T. latifolia</i>	48
5.3 Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la fitoextracción de Cd por <i>T. latifolia</i>	49
5.4 Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la expresión de genes involucrados en la tolerancia a Cd por <i>T. latifolia</i>	52
CONCLUSIONES.....	58
PERSPECTIVAS.....	60
REFERENCIAS	61
ANEXOS	94
Anexo 1. Preparación de medio de cultivo MS 0.2X con glucosa	94
Anexo 2. Sistema de hidroponía.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de fitorremediación.....	5
Figura 2. Mecanismos involucrados en la fitorremediación de Cd.....	9
Figura 3. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la germinación de semillas de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd.....	29
Figura 4. Tasa de germinación de semillas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd al finalizar los 15 días de exposición.....	30
Figura 5. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el crecimiento de <i>T. latifolia</i>	31
Figura 6. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el crecimiento de <i>T. latifolia</i> . Después de 15 días de crecimiento se evaluó la longitud (A-B), el peso fresco (C) y el peso seco (D) de brotes y raíces.....	32
Figura 7. Plántulas de <i>T. latifolia</i> con 30 días de crecimiento en sistemas de hidroponía con medio MS 0.2X expuestas a 40 ppm de Cd.....	33
Figura 8. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el fenotipo de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd. Evaluación del (A) peso fresco y (B) peso seco de brotes y raíces a los 10 días de ser expuestas a los tratamientos.....	34
Figura 9. Comportamiento del pH en el medio hidropónico.....	35
Figura 10. Contenido de Glutación total en el tejido radicular de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd.....	36
Figura 11. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en la fuga de electrolitos del tejido radicular de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd.....	37
Figura 12. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en el contenido de Cd por <i>T. latifolia</i>	38
Figura 13. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 sobre el porcentaje de remoción (A), factor de bioconcentración (B), coeficiente de bioacumulación (C) y factor de translocación (D)	39
Figura 14. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 sobre los niveles relativos de expresión genética de (A) Metalotioneína, (B) Fitoquelatina sintasa, (C) CL7951, (D) CL354, (E) CL3870 y (F) Unigene11164 en raíces de <i>T. latifolia</i> utilizando actina como control interno.....	41
Figura 15. Modelo propuesto de los mecanismos implicados en la germinación de <i>T. latifolia</i> en presencia de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 y Cd.....	56
Figura 16. Modelo propuesto de los mecanismos implicados de la interacción <i>P. rhodesiae</i> GRC140- <i>T. latifolia</i> bajo estrés por Cd en condiciones de hidroponía.....	57

Figura 17. Sistema hidropónico ensamblado..... 95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental del ensayo de germinación de semillas de *T. latifolia*..... 21

Tabla 2. Diseño experimental..... 22

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por metales pesados ha incrementado a nivel mundial debido a la rápida industrialización, las prácticas agrícolas modernas y otras actividades antropogénicas que generan cantidades significativas de metales pesados. Esto se ha convertido en un problema grave que amenaza la biodiversidad de los ecosistemas, altera el funcionamiento de los microorganismos del suelo y compromete la seguridad alimentaria y la salud humana (Hu et al., 2021; Manoj et al., 2020; Wieczorek et al., 2018).

El cadmio (Cd) es un metal persistente y uno de los más tóxicos, aún a bajas concentraciones, tiene efectos nocivos en el crecimiento y el desarrollo de las plantas y representa un gran peligro para los organismos vivos (Chen et al., 2019). Por lo tanto, la búsqueda de estrategias para remediar el suelo contaminado con este metal pesado se ha convertido en una necesidad urgente. Entre las estrategias existentes, la remediación que emplea recursos biológicos es un enfoque prometedor que tiene ventajas sobre las técnicas fisicoquímicas convencionales (Manoj et al., 2020).

La fitorremediación es considerada una herramienta rentable, ecológica y segura para eliminar el Cd de sitios contaminados, mediante el uso de plantas que transportan y acumulan el metal dentro las vacuolas de las células radiculares y tejido aéreo (Raza et al., 2020). Entre estas plantas, *Typha latifolia* ha sido utilizada ampliamente en fitorremediación debido a la alta capacidad de tolerar metales pesados, entre ellos el Cd (Bonanno & Cirelli, 2017).

Se ha demostrado que la capacidad de fitorremediación está ligada con las poblaciones bacterianas asociadas a las raíces de las plantas. Por lo que, la eficiencia de la fitorremediación se puede mejorar mediante la incorporación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) como un enfoque combinado (Raza et al., 2020). Las PGPR incrementan la tolerancia y absorción de metales, mediante la síntesis de ácidos orgánicos, sideróforos y hormonas que modulan la fisiología vegetal y favorecen la adaptación a los metales pesados (Manoj et al., 2020; Raza et al., 2020). La comprensión de los eventos durante la interacción entre las PGPR y las plantas permitirá establecer estrategias más eficientes de fitorremediación.

En nuestro grupo de trabajo se ha establecido el modelo de interacción de *Pseudomonas rhodesiae* con *T. latifolia*. Se ha demostrado que *P. rhodesiae* es una PGPR que estimula el desarrollo radicular de *Cucumis sativus* y *Arabidopsis thaliana* en ausencia y presencia de Cd. Por otra parte, *P. rhodesiae* incrementa la translocación de Cd en plántulas de *T. latifolia* en un sistema de hidroponía. Sin embargo, hasta ahora, se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de *T. latifolia* con *P. rhodesiae*. Por lo que, el análisis de expresión de genes en respuesta al estrés por Cd permitirá generar conocimiento para comprender los mecanismos moleculares responsables de la tolerancia y fitoextracción de Cd en *T. latifolia*. Además, la determinación de los niveles de expresión de los genes involucrados en el proceso de fitoextracción de Cd durante la interacción *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140 proporcionará una idea más clara de la comunicación establecida en esta interacción, lo cual será útil para desarrollar estrategias eficientes en la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar las condiciones de la interacción de *T. latifolia* con *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 para el análisis de expresión mediante RNAseq.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la germinación de *T. latifolia* en cultivos *in vitro*.
- Evaluar la fitotoxicidad de Cd²⁺ en plantas de *T. latifolia* mediante la determinación de parámetros de crecimiento, el contenido de glutatión y fuga de electrolitos.
- Determinar la eficiencia de fitorremediación de la interacción de *T. latifolia* con *Pseudomonas rhodesiae* cuantificando la acumulación de Cd en brotes y raíces.
- Determinar los niveles de expresión de genes involucrados en la tolerancia a Cd durante la interacción *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fitorremediación

Cierto número de iones de metales pesados son solubles en agua en condiciones fisiológicas y se encuentran biodisponibles para las plantas y otros organismos vivos, siendo un peligro potencial para la vida. Muchos metales, como el hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni), cobalto (Co) y molibdeno (Mo), son esenciales para la célula debido a que participan en la protección celular, la regulación génica y la transducción de señales. Sin embargo, son tóxicos cuando se encuentran en exceso. Por otro lado el Cd, mercurio (Hg), plata (Ag), plomo (Pb) y cromo (Cr) no son esenciales biológicamente y muestran toxicidad, incluso en bajas concentraciones (DalCorso et al., 2019).

En este sentido, la búsqueda de estrategias para remediar sitios contaminados con metales pesados se ha convertido en una necesidad urgente. Entre ellas se encuentra la fitorremediación, definida como una tecnología emergente que utiliza la capacidad de algunas plantas ya sea silvestres o modificadas genéticamente para remediar el suelo, el aire y el agua de diversos contaminantes o transformarlos en derivados menos tóxicos. La fitorremediación es considerada una estrategia económica, eficiente y sencilla con respecto a otras técnicas de remediación (Bartucca et al., 2022; Sabreena et al., 2022).

La fitorremediación puede llevarse a cabo mediante distintos mecanismos (Figura 1), como la fitoextracción, la rizofiltración, la rizodegradación, la fitoestabilización, la fitodegradación y la fitovolatilización (Bartucca et al., 2022; DalCorso et al., 2019; Delgado-González et al., 2021; Sabreena et al., 2022).

La fitoextracción aprovecha la capacidad de las plantas para absorber metales pesados y almacenarlos en los tejidos aéreos como los brotes, hojas y tallos (DalCorso et al., 2019; Sabreena et al., 2022). Este proceso involucra el transporte de los metales pesados a través de la membrana plasmática de las células de la raíz, la carga del xilema, la translocación, el secuestro y la desintoxicación a nivel celular en toda la planta (Delgado-González et al., 2021). Las plantas empleadas en fitoextracción se caracterizan por una alta eficiencia de absorción y translocación de los metales hacia los brotes, alta acumulación y tolerancia de metales, brotes abundantes de rápido crecimiento y un sistema radicular profundo. La

eficiencia de la fitoextracción está expresada mediante el uso de parámetros, como el factor de bioconcentración (BCF) y el factor de translocación (TF) (DalCorso et al., 2019; Sabreena et al., 2022).

La rizofiltración ocurre cuando las raíces absorben, retienen y concentran contaminantes metálicos dentro del tejido radicular, limitando el movimiento de dichos contaminantes (Sabreena et al., 2022). Después de su absorción y movilización, el contaminante se almacena en las vacuolas y el apoplasto, o puede ser quelado por fitoquelatinas y metalotioneínas y unirse de manera covalente a la pared celular (Delgado-González et al., 2021). En este proceso, las plantas y la comunidad microbiana tienen una asociación simbiótica importante, siendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* spp., y *Rhodococcus* spp. las bacterias más comúnmente relacionadas con procesos de rizofiltración (Sabreena et al., 2022).

La rizodegradación se refiere a la biodegradación de los contaminantes orgánicos por bacterias y hongos rizosféricos que secretan enzimas específicas que degradan o transforman los contaminantes en formas menos tóxicas (Bartucca et al., 2022; Sabreena et al., 2022).

Al igual que la rizodegradación, la fitodegradación es aplicable a los contaminantes orgánicos. La planta secuestra los contaminantes orgánicos y se descomponen a través de varios procesos metabólicos, o degradados por la acción de enzimas involucradas en el metabolismo de la planta, como la deshalogenasa, la peroxidasa, la glutatión S-transferasa, la nitroreductasa, la nitrilasa y la fosfatasa (Bartucca et al., 2022; Sabreena et al., 2022).

La fitoestabilización se lleva a cabo en la rizosfera para estabilizar o inmovilizar los contaminantes (Delgado-González et al., 2021). Se basa principalmente en el uso de plantas que pueden absorber y acumular iones metálicos en y sobre las raíces, así como precipitarlos en la zona de la rizosfera debido a la unión de compuestos orgánicos y cambios en el estado oxidativo de los metales (Bartucca et al., 2022; DalCorso et al., 2019), sin embargo, únicamente se restringe el movimiento de los iones metálicos, por lo que no es duradero ya que los contaminantes siguen persistiendo en el suelo (Sabreena et al., 2022).

La fitovolatilización consiste en la capacidad de ciertas plantas para transformar los contaminantes en compuestos volátiles, y su posterior liberación a la atmósfera a través de la

transpiración por los estomas (Delgado-González et al., 2021; Sabreena et al., 2022). Normalmente se aplica para eliminar algunos metales, metaloides y compuestos orgánicos volátiles (COV) (Bartucca et al., 2022), no obstante, este enfoque no descontamina el medio ambiente por completo, ya que, al facilitar la transferencia de los contaminantes, pueden contaminar la atmósfera (Sabreena et al., 2022).

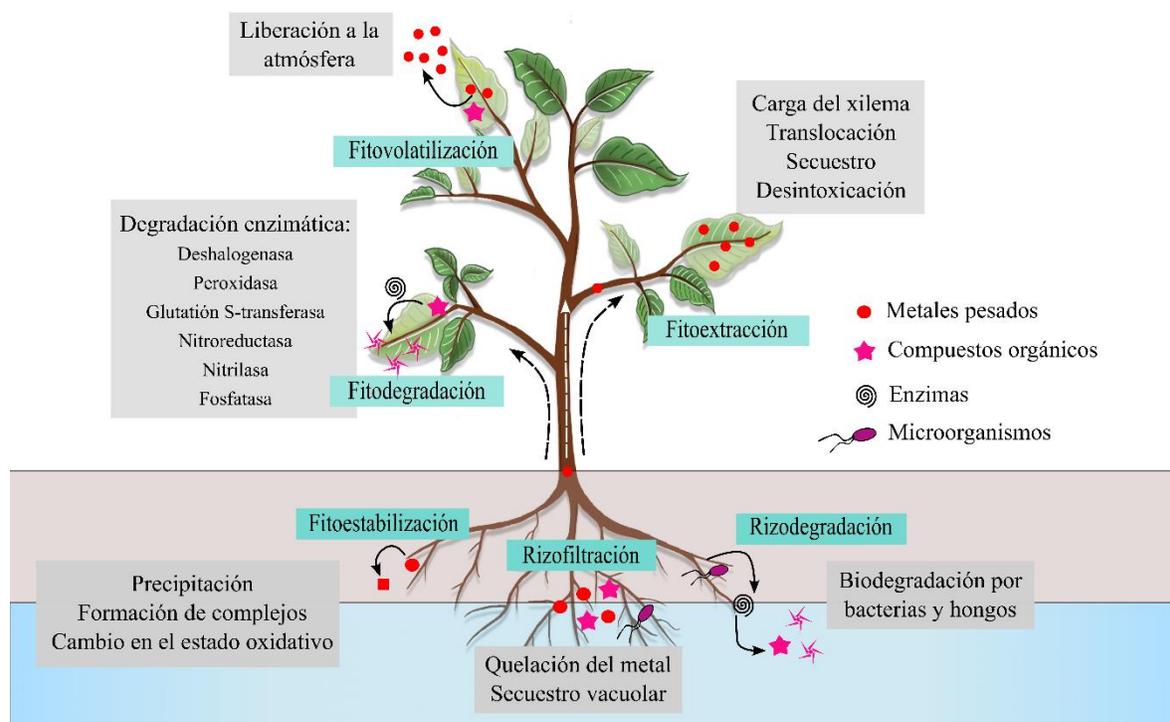


Figura 1. Mecanismos de fitorremediación. Figura modificada de Martínez-Martínez et al. (2023).

Últimamente, se han desarrollado y aplicado nuevos enfoques para eficientizar el proceso de fitorremediación. Por ejemplo, la fitorremediación asistida por bacterias. Además, se ha empleado la ingeniería genética para mejorar el rendimiento de las plantas en la fitorremediación al sobreexpresar genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de glutatión (GSH), fitoquelatinas (PC) y metalotioneínas (MT) (Bartucca et al., 2022).

2.2 El cadmio en el medio ambiente

La contaminación con metales pesados se ha convertido en un problema grave desde el punto de vista ambiental y de la salud pública, debido a que estos contaminantes no pueden degradarse naturalmente por ser elementos inorgánicos, por lo que tienden a persistir en el

agua y el suelo de nuestro planeta (Wieczorek et al., 2018). Los metales pesados se han derivado de un gran número de fuentes antropogénicas, dentro de las que destacan la rápida industrialización, las tecnologías modernas, la galvanoplastia, la minería, la producción de energía y combustibles, el uso de fertilizantes fosfatados, el reciclaje de desechos electrónicos, los lodos residuales y algunas pinturas industriales (Al-Naemi & Das, 2020; Genchi et al., 2020). Éstas han sido las razones del aumento de las concentraciones de metales pesados en el medio ambiente, afectando los ecosistemas y los seres vivos.

El cadmio es un contaminante que se ha convertido en una amenaza potencial para una amplia gama de organismos vivos. Es tóxico para los seres humanos, incluso en concentraciones más bajas a las reportadas como tóxicas para las plantas. El Cd tiene una mayor movilidad y biodisponibilidad que otros metales y sus efectos en los humanos son acumulativos (McLaughlin & Singh, 1999). Se ha reportado que al estar presente en los suelos, el Cd se transfiere a los cultivos, acumulándose en diversos órganos de la planta, y de éstos, a la cadena alimentaria, convirtiéndose en un riesgo potencial para la salud de los organismos que los consumen (Cajuste et al., 2001; Pérez Olvera et al., 2008).

En este sentido, el Cd tiene un impacto negativo en la salud humana después de una exposición a largo y corto plazo (Al-Naemi & Das, 2020). Dado que su vida media es de alrededor de 25 a 30 años (Genchi et al., 2020), puede permanecer en el organismo humano durante toda la vida, acumulándose principalmente en el hígado, riñones y los testículos (Zhao et al., 2017). El que el hígado y los riñones sean extremadamente sensibles a este metal pesado puede deberse a la capacidad de dichos tejidos para sintetizar metalotioneínas (MT) (Genchi et al., 2020).

Además, el Cd se ha catalogado como un carcinógeno del Grupo I por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Bakulski et al., 2020) y se ha relacionado con cáncer de mama, pulmón, próstata, nasofaringe, páncreas y riñón (Genchi et al., 2020). En los seres humanos, la exposición a Cd puede traer consigo diversos efectos adversos, como disfunción renal y hepática, edema pulmonar, osteomalacia, daño testicular, y daño a las glándulas suprarrenales y al sistema hematopoyético (Bakulski et al., 2020; Genchi et al., 2020; Zhao et al., 2017). Incluso, la exposición a concentraciones bajas de Cd puede resultar en daños en el hígado, los riñones, el sistema óseo y cardiovascular, la vista y

el oído, asimismo, afecta la reproducción humana masculina y femenina, el embarazo y el desarrollo fetal (Genchi et al., 2020).

Se ha demostrado que la presencia de este elemento pesado en el suelo tiene un efecto negativo sobre los ecosistemas terrestres y acuáticos, debido a su toxicidad y estabilidad, ya que no es biodegradable (Yang & Shen, 2020). Su concentración en el suelo engloba aquella derivada del material geológico, así como de las fuentes externas y depende del equilibrio entre la absorción, la lixiviación y la absorción por las plantas que, a su vez, se ven afectados por las propiedades del suelo (pH, el estado redox, contenido de materia orgánica, arcilla, óxidos hidratados y carbonatos libres) (Alloway & Steinnes, 1999).

Por otro lado, cuando el Cd se encuentra en el suelo puede ingresar a las plantas mediante transportadores de elementos esenciales como el calcio (Ca), manganeso (Mn), hierro y zinc y alterar su desarrollo y crecimiento (Huybrechts et al., 2019). Diversos estudios realizados en especies vegetales han demostrado que el Cd induce efectos tóxicos en las plantas que pueden conducir incluso a la muerte (Zhu et al., 2021).

Los efectos perjudiciales del Cd sobre las plantas impactan en todas las etapas de su desarrollo, inhibiendo la germinación de las semillas, el crecimiento vegetal y el crecimiento reproductivo, alterando la fotosíntesis, la respiración, el contenido de agua y la absorción de los nutrientes. Dicha fitotoxicidad podría atribuirse a la capacidad del metal para unirse a los grupos tiol, histidilo y carboxilo de las proteínas, interfiriendo con su función (Huybrechts et al., 2019; Zhu et al., 2021).

En México, el Cd es uno de los contaminantes prioritarios debido a su toxicidad y persistencia en el medio ambiente, como resultado de las actividades mineras desde siglos pasados y el aumento de la intensa actividad de otras industrias, el inadecuado manejo, almacenamiento o transporte de las sustancias, y la falta de control sobre la gestión de residuos (Prieto-Méndez et al., 2018).

Para evitar los efectos nocivos del Cd y otros metales pesados, se han desarrollado métodos fisicoquímicos para reducir sus concentraciones en el medio ambiente, reduciendo así el impacto sobre la salud humana y los ecosistemas. A pesar de ser efectivos, la mayoría de los métodos fisicoquímicos son costosos, ineficientes y no amigables con el medio

ambiente (Fan et al., 2020; Martin & Ruby, 2004; Zhang et al., 2016). Por lo que se han desarrollado alternativas amigables con el medio ambiente como la fitorremediación, que utiliza especies vegetales para eliminar Cd y otros metales pesados del suelo y del agua y acumularlos en sus tejidos (Marrero-Coto et al., 2012). Algunos estudios han demostrado la capacidad de *Paspalum fasciculatum* (Salas-Moreno & Marrugo-Negrete, 2020), *Helianthus annuus* (Alaboudi et al., 2018) y *Panicum virgatum* (Guo et al., 2019) para eliminar Cd de suelos contaminados. De igual manera, las plantas del género *Typha* incluyen especies de importancia en la fitorremediación.

2.3 Mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en la fitorremediación de Cd

Los metales pesados son una de las principales causas de la reducción de los agroecosistemas cultivables saludables y amenazan la seguridad alimentaria y la salud humana, por lo que las preocupaciones sobre estos contaminantes han ido en aumento en todo el mundo.

La fitorremediación es una estrategia que utiliza plantas específicas que pueden absorber contaminantes metálicos como el Cd, a través de sus raíces para eliminar o reducir su biodisponibilidad. Estas plantas han desarrollado un conjunto de estrategias efectivas para responder al Cd en el medio ambiente (Figura 2). En los últimos años, se han realizado muchas investigaciones sobre los mecanismos fisiológicos y moleculares de la acumulación y desintoxicación de Cd en las plantas, con especial énfasis en la búsqueda e identificación de los genes responsables de la absorción, translocación, secuestro y tolerancia de Cd en los tejidos vegetales (Luo & Zhang, 2021).

Los genomas vegetales cuentan con una gran cantidad de genes con patrones de expresión específicos en respuesta a la absorción y el transporte de metales pesados (Manoj et al., 2020). El ingreso de los metales pesados en las raíces depende de factores como los exudados, el pH, la materia orgánica y el consorcio microbiano. El contacto de los metales pesados con la raíz de la planta induce factores de transcripción (TF) que regulan la expresión de genes involucrados en la tolerancia al estrés por metales (Rai et al., 2020).

Dada la similitud estructural de los metales pesados con nutrientes esenciales, normalmente, los metales pesados se trasladan a la raíz a través de la vía de transporte de nutrientes con la ayuda de proteínas y transportadores de membrana (Manoj et al., 2020). La

comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el transporte podría aportar conocimiento para mejorar la remediación de sitios contaminados con metales pesados.

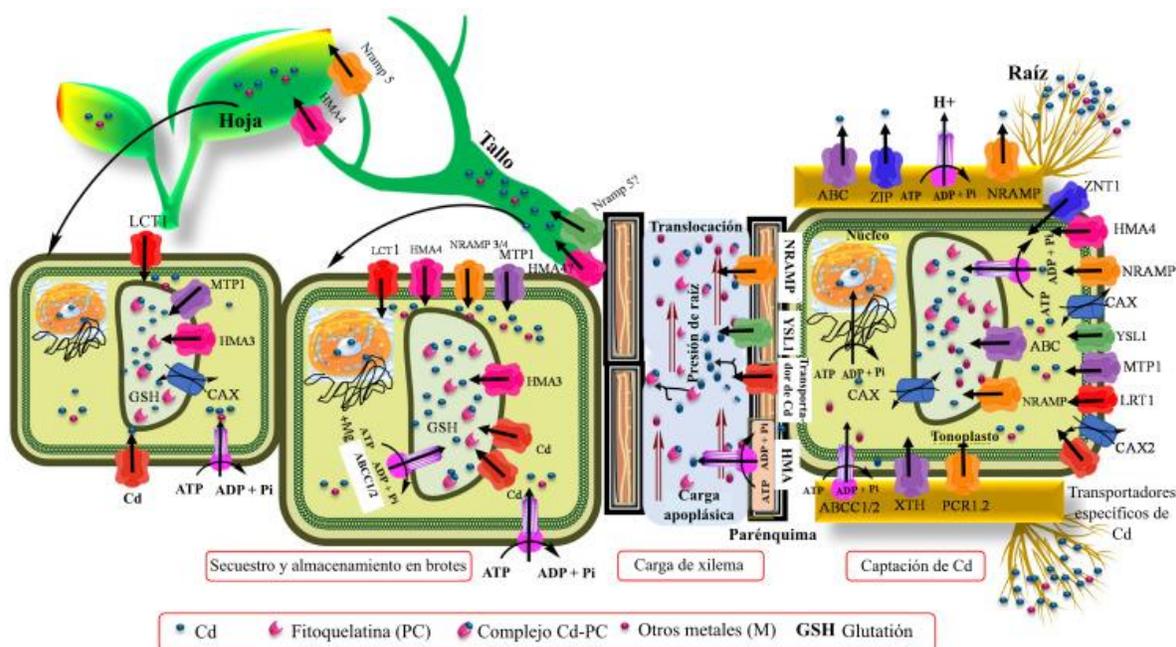


Figura 2. Mecanismos involucrados en la fitorremediación de Cd. Tomado de Raza et al. (2020).

2.3.1 Absorción y transportadores

La biodisponibilidad y absorción de los metales por parte de las plantas está influenciada por diversos factores como el tipo de metal, el pH, el potencial redox, el contenido de agua, la materia orgánica, entre otros (Yang et al., 2005).

Una vez biodisponible la mayoría de los iones metálicos entran a las células vegetales a través de un proceso dependiente de la energía mediante transportadores o canales específicos de iones metálicos (Jabeen et al., 2009). En el caso del Cd es captado por las vías apoplástica y simplástica, la primera es un proceso de difusión pasiva, mientras que la segunda es un proceso de transporte de membrana plasmática de transporte activo dependiente de energía que requiere concentraciones y gradientes de potencial electroquímico (Luo & Zhang, 2021).

Hasta la fecha se han identificado diversos transportadores de Cd, los cuales se han agrupado en familias en función de su similitud de secuencia. Estas familias de transportadores, que median la captación del Cd, incluyen proteínas reguladas por zinc y por

hierro (ZIP: proteínas similares a ZRT e IRT), facilitadores de la difusión de cationes (CDF), ATPasa de metales pesados (HMA) y proteínas de macrófagos asociados a la resistencia natural (NRAMP) (Luo & Zhang, 2021; Yang et al., 2005).

Los transportadores de la familia ZIP se encuentran principalmente en la membrana plasmática de las raíces de las plantas y están involucradas en la absorción y el transporte de muchos cationes desde la raíz al brote, entre ellos el Zn y Cd (Luo & Zhang, 2021; Sytar et al., 2021).

Las proteínas de la familia CDF pueden llamarse de manera más apropiada como transportadores de “salida de cationes”, ya que las proteínas parecen funcionar normalmente en la salida de cationes fuera del compartimento citoplásmico, a través de la membrana plasmática hacia el exterior de la célula, o a través de las endomembranas hacia los compartimentos intracelulares (Yang et al., 2005).

Las ATPasas de metales pesados están involucradas en el transporte de metales esenciales y potencialmente tóxicos como el Zn, Cu, Pb y Cd. Utilizan el ATP para bombear metales a través de las membranas celulares. Además, pueden encontrarse en diversas membranas intracelulares y son responsables de la compartimentación de metales pesados, como el secuestro vacuolar (Yang et al., 2005). En *A. thaliana*, AtHMA4 es una P-1B-ATPasa presente en la membrana plasmática que transporta Zn y Cd. La sobreexpresión de AtHMA4 mejora el crecimiento de la raíz en presencia de concentraciones tóxicas de Zn, Cd y Co, y aumenta la acumulación de Zn y Cd en los brotes (Verret et al., 2004).

Asimismo, la familia NRAMP desempeña un papel importante en la fitorremediación de metales pesados (Rai et al., 2020). Los NRAMPs están implicados en la absorción y transporte de Cd y otros iones metálicos divalentes (Luo & Zhang, 2021). Belouchi et al. (1997) identificaron tres homólogos *Nramp* en el arroz, encontrando que el gen *OsNramp1* se expresa principalmente en las raíces, *OsNramp2* en las hojas y *OsNramp3* en ambos tejidos vegetales. Este patrón de expresión sugiere que están regulados de forma diferente, que cumplen funciones distintas en diferentes tejidos, o que transportan iones metálicos diferentes pero relacionados en distintas partes de la planta. Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de *SaNramp6* de *Sedum alfredii* confiere una mayor tolerancia al Cd en *A. thaliana* (Chen et al., 2017).

2.3.2 Translocación

Después de la absorción, los iones metálicos pueden almacenarse en la raíz o transportarse a través del xilema hacia los brotes (Jabeen et al., 2009). Los transportadores de membrana desempeñan un papel fundamental en el traslado de los metales a otros compartimentos intercelulares/intracelulares y su posterior transporte a las partes aéreas de las plantas (Rai et al., 2020).

Las plantas hiperacumuladoras de metales pesados translocan los iones metálicos a través del pasaje simplástico radial y la carga del xilema, mientras que las no hiperacumuladoras concentran los iones metálicos en las vacuolas de la raíz o en el citoplasma formando complejos con ligandos (Sytar et al., 2021).

Las ATPasas de metales pesados (HMA) están implicadas en la homeostasis y tolerancia a los metales. Son responsables de transportar Cd desde la raíz hasta la parte aérea de la planta. Hidrolizan ATP y expulsan el Cd del citoplasma al apoplasto a lo largo de un gradiente electroquímico. HMA4 se ha visto involucrado en la traslocación del Cd (Luo & Zhang, 2021; Sytar et al., 2021).

En plantas de arroz, CAL1 y CAL2, proteínas similares a las defensinas, quelan el Cd citoplasmático para formar complejos y excretarlos a la savia del xilema a través del transporte a larga distancia, regulando su acumulación en el brote (Luo et al., 2018, 2020).

2.3.3 Desintoxicación de Cd

Cuando las plantas están expuestas a altos niveles de contaminación por metales, el estrés activa una serie de mecanismos fisiológicos y moleculares para que se adapten al ambiente estresante. Dentro de los mecanismos involucrados en la desintoxicación de metales se incluyen la unión a la pared celular de la planta, la formación de complejos intracelulares con ligandos peptídicos como las fitoquelatinas (PC) y metalotioneínas (MT), así como el secuestro de estos complejos en las vacuolas celulares (Luo & Zhang, 2021; Ma et al., 2016; Yang et al., 2005).

La pared celular se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y pectina. La captación de los contaminantes metálicos inicia en las células de la raíz, donde los sitios electronegativos de los componentes de la pared celular permiten que los cationes sean

adsorbidos en la pared. Los metales pesados se unen principalmente a la pectina de las paredes celulares. En este sentido, la pared celular incrementa la tolerancia al Cd de la planta al evitar que entre a las células de la raíz (Luo & Zhang, 2021; Tan et al., 2019; Zhang et al., 2018).

Los metales pesados existen como quelatos mediante las PC, el glutatión (GSH), las MT, etc. dentro del citosol, y son transportados posteriormente a las vacuolas (Rai et al., 2020).

El mecanismo principal de la desintoxicación de Cd que siguen las PC es la quelación por parte de estos péptidos para formar un complejo, que será transportado a las vacuolas por los transportadores ABC (Luo & Zhang, 2021).

Las PC son inducidas rápidamente en tejidos expuestos a una diversidad de metales pesados, como Cd, Hg y Pb (Yang et al., 2005). La biosíntesis de PC puede estar regulada por la biosíntesis de GSH. En plantas transgénicas de *Brassica juncea* la sobreexpresión de enzimas de las rutas biosintéticas de GSH incrementa la biosíntesis de PC y la tolerancia a Cd (Li et al., 2005).

Además, la regulación de la fitoquelatina sintasa (PCS) puede ser el mecanismo más importante en la ruta biosintética de la PC (Yang et al., 2005). Un estudio reciente, identificó en *Morus notabilis* dos genes de PCS implicados en la desintoxicación de metales pesados, *MnPCS1* y *MnPCS2*. La sobreexpresión de estos genes aumentó la fitorremediación de Zn y Cd en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco (Fan et al., 2018).

Por otra parte, las MT también funcionan como ligandos para formar complejos con los metales. Están involucradas en el equilibrio y tolerancia a Zn, Cu y Cd (Luo & Zhang, 2021). Peng et al. (2017) identificaron el gen *SpMTL* que codifica una proteína similar a la MT y que actúa como quelante de Cd citoplásmico. Los autores sugirieron que los niveles elevados de transcripción y la variación natural en las secuencias de proteínas de *SpMTL* contribuyen a la hiperacumulación e hipertolerancia de Cd en el hiperacumulador *Sedum plumbizincicola*.

Otro estudio, realizado en alfalfa transgénica (*Medicago sativa*) mostró que la sobreexpresión del gen ATP sulfurilasa, clonado y transferido desde *Arabidopsis*, aumentó su tolerancia al estrés por Cd para mejorar la fitorremediación (Kumar et al., 2019).

El secuestro de los metales pesados dentro de los compartimentos celulares se considera un mecanismo de desintoxicación para proteger los compuestos vitales que participan en la maquinaria metabólica (Rai et al., 2020).

2.3.4 Secuestro vacuolar

Dentro de los compartimentos celulares, el secuestro vacuolar de contaminantes metálicos, como el Cd, es considerado un mecanismo principal para la fitorremediación. La vacuola funciona como almacén de una gran cantidad de transportadores de proteínas para la tolerancia al estrés y/o la fitorremediación tras la exposición a los contaminantes ambientales (Tan et al., 2019; Zhang et al., 2018).

La vacuola es un orgánulo de almacenamiento de muchos iones. Se ha reportado que los complejos PC-metal son transportados a la vacuola y estabilizados allí formando un complejo con sulfuros o ácidos orgánicos (Jabeen et al., 2009).

Los transportadores que pueden transportar Cd libre y complejos PC-Cd a la vacuola incluyen transportadores de casete de unión a ATP (ABCC), NRAMP, H⁺/intercambiadores de cationes (CAX) y ATPasas de metales pesados (HMA) (Luo & Zhang, 2021). Entre estos, tres transportadores de membrana vacuolar ABCC (*AtABCC1*, *AtABCC2* y *AtABCC3*) tienen un papel importante en el secuestro del complejo PC-Cd (Brunetti et al., 2015; Park et al., 2012). Los transportadores de tonoplastos NRAMP (*AtNRAMP3* y *AtNRAMP4*), desempeñan un papel clave en la salida de Cd libre de la vacuola al citosol (Lanquar et al., 2005). Entre los CAX, *AtCAX2* y *AtCAX4* son transportadores localizados en tonoplastos, que además de ser específicos de Ca pueden transportar Cd, mediante el uso del gradiente de protones para controlar el almacenamiento de Ca y Cd en la vacuola (Korenkov et al., 2009). En cuanto a los HMA, *AtHMA3* es responsable del almacenamiento vacuolar de Cd (Morel et al., 2009).

2.3.5 Mecanismos de la fitorremediación a través de PGPR

Los microorganismos pueden mejorar los procesos de fitorremediación incrementando la biomasa vegetal, aumentando o disminuyendo la disponibilidad de los metales presentes en el ambiente, y facilitando su traslocación y bioacumulación (Ma et al., 2016).

Debido a que la mayoría de los metales pesados pueden ser transportados en forma de quelatos, los microorganismos pueden secretar una variedad de ligandos orgánicos que pueden cambiar las formas de entrada y de distribución en las plantas (Ma et al., 2016). Ma et al. (2013) informaron que la aplicación de la bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPB) *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b movilizó de manera efectiva el Cd y Zn del suelo y aumentó significativamente su acumulación en los brotes de *Sedum plumbizincicola*.

La inoculación de rizobacterias confiere la tolerancia y la absorción de metales regulando la expresión de genes transportadores de metales y quelantes de metales. La inoculación con PGPR alteran significativamente los parámetros anteriores, incrementando la acumulación de metales pesados (Manoj et al., 2020).

Las inoculaciones de PGPR influyen significativamente en el patrón de expresión de varios genes transportadores de metales. Por ejemplo, la inoculación de compuestos volátiles que produce una cepa de *B. amyloliquefaciens* SAY09 altera el patrón de expresión de los genes *FIT1*, *IRT1*, y *FRO2*, lo que conduce a una mayor acumulación de Cd y Fe en *Arabidopsis* (Zhou et al., 2017).

Chen et al. (2017) demostraron que la inoculación de la cepa endofítica *P. fluorescens* Sasm05 mejora el crecimiento y la acumulación de Cd en *S. alfredii* al inducir la expresión relativa de la familia de genes transportadores de metales SaHMA (*SaHMA2*, *SaHMA3* y *SaHMA4*), SaNRAMP (*SaNRAMP1*, *SaNRAMP3* y *SaNRAMP6*) y SaZIP (*SaZIP2*, *SaZIP3*, *SaZIP4* y *SaZIP11*). Otro estudio encontró una mayor acumulación de Cd con la cepa bacteriana endofítica SaMR12 inoculada en *S. alfredii* a través de la regulación positiva de la expresión de las principales familias de genes transportadores de metales (Pan et al., 2017).

2.4 El género *Typha*

Typha, comúnmente conocida como espadaña, es un género de macrófitas monocotiledóneas, emergentes y enraizadas. Este género tiene una distribución cosmopolita e incluye de 10 a

13 especies distribuidas en comunidades acuáticas de todo el mundo, a excepción de la Antártida (Sesin et al., 2021; Zhou et al., 2018). Crece en una variedad de hábitats acuáticos y semiacuáticos, incluidos humedales, lagos, ríos, márgenes de estanques, estuarios costeros, zanjas, ciénegas, pantanos, entre otros. Debido a su tolerancia por las condiciones climáticas diversas y los cambios ambientales, puede encontrarse desde zonas tropicales a templadas, y desde climas húmedos a secos, incluso puede adaptarse a condiciones salinas, ácidas, inundaciones y ambientes con altas concentraciones de metales (Baldwin & Cannon, 2007; Grace & Harrison, 1986; Sesin et al., 2021)

La estructura de *Typha* se caracteriza por ser una hierba perenne, erecta y rizomatosa, productora de flores en un tallo delgado de hasta 3 metros de altura. Las flores son diminutas y agrupadas en espigas que forman una inflorescencia cilíndrica, mientras que los rizomas laterales rastreros, o tallos subterráneos, alcanzan los 70 cm de largo y 3 cm de diámetro, en cambio, las hojas se caracterizan por ser de un color verde, planas, lineales y largas (Baldwin & Cannon, 2007).

Las tres especies de *Typha* más ampliamente distribuidas son *Typha angustifolia* L., *Typha domingensis* y *Typha latifolia* L., cada uno de estos, más sus híbridos específicos, en las últimas décadas se han vuelto cada vez más dominantes en múltiples regiones geográficas (Ciotir & Freeland, 2016) y debido a su rápido crecimiento, gran producción de biomasa y alta tolerancia a sitios contaminados con metales, se han empleado ampliamente y con éxito en varios enfoques de fitorremediación (Bonanno & Cirelli, 2017).

2.5 Aplicación de *Typha* spp.

Typha es un género ecológicamente relevante para una diversidad de ecosistemas. Dentro de los servicios ecosistémicos que ofrece, mejora la calidad del agua, reduce la eutrofización, aumenta la disponibilidad de oxígeno en la rizosfera beneficiando el desarrollo de otras plantas, apoya la biodiversidad proporcionando alimento y cobertura silvestre, incluso se ha convertido en una macrófita adecuada para la restauración de sitios contaminados (Sesin et al., 2021). Las macrófitas se han utilizado con éxito como bioindicadores, especialmente para el monitoreo biológico de ecosistemas acuáticos (Azizi et al., 2020).

Dadas sus capacidades de fitorremediación, *Typha* ha sido ampliamente utilizada en humedales para la remoción de iones, debido a su estructura interna aireada, formada por

tejidos con espacios abiertos que le permiten una mejor absorción de los contaminantes, a una óptima evapotranspiración y el transporte de oxígeno de la atmósfera a las hojas y desde las hojas hasta las raíces y el rizoma, además de su gran tolerancia a agentes tóxicos (Petry et al., 2020). En este sentido, se ha aprovechado el inmenso potencial de *Typha* en la fitorremediación de metales pesados de aguas residuales, a través de mecanismos como la absorción y la acumulación (Zaranyika & Nyati, 2017).

Por su parte, *T. latifolia* puede desarrollarse bajo diversas condiciones climáticas y tiene una amplia adaptabilidad, tolerancia y capacidad de absorber, acumular y eliminar metales pesados como el cadmio, cobre, cromo, zinc, plomo, arsénico (As), níquel, manganeso (Mn) y hierro del ambiente (Azizi et al., 2020; Kumari & Tripathi, 2015; Ponce-Hernández et al., 2020), además de desintoxicar contaminantes orgánicos como los pesticidas, plaguicidas o herbicidas (Papadopoulos & Zalidis, 2019).

T. latifolia y *T. angustifolia* se han utilizado como precursores de carbones activados para la remoción de metales pesados (Ponce-Hernández et al., 2020).

La paludicultura (siembra de cultivos perennes en turberas agrícolas húmedas o rehumedecidas) con *T. latifolia* mejora de manera efectiva la calidad del agua y reduce las emisiones de gases de efecto invernadero, como el metano (CH₄), en turberas rehumedecidas (Vroom et al., 2018).

De manera similar, estudios han encontrado que *T. angustifolia* es una acumuladora de metales pesados como Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Zn y Pb principalmente en sus raíces, por lo que es una planta muy apropiada para su uso en fitorremediación (Duman et al., 2015; Lim, 2016; Yadav et al., 2020).

Además, se ha demostrado que las plantas acumuladoras de metales pesados establecen interacciones con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), que contribuyen a su crecimiento y adaptación a las condiciones de la rizosfera.

2.6 PGPR asociadas a la rizosfera de *Typha* spp.

La rizosfera es un entorno importante para las raíces de las plantas y la supervivencia microbiana. Las bacterias beneficiosas que viven en la rizosfera son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Rehman et al., 2018).

Las PGPR son poblaciones bacterianas con la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas e incrementar el crecimiento vegetal en suelos con nutrientes limitados o en condiciones de estrés (Brito-Campo et al., 2022). De manera general las PGPR realizan diversas actividades como la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, síntesis de ácido indolacético (AIA) y actividad ACC-desaminasa (Manoj et al., 2020).

Dentro del tejido vegetal, las bacterias endófitas pueden ejercer un efecto beneficioso sobre la planta huésped de manera más eficiente (Franchi & Fusini, 2021), por lo que, en los últimos años, el estudio de las poblaciones microbianas asociadas a las raíces de *Typha* sp. ha incrementado.

Ghosh et al. (2014) aislaron y caracterizaron *Paenibacillus cookii* JGR8, una bacteria promotora de crecimiento vegetal que promueve el crecimiento de *T. angustifolia* mediante actividades bioquímicas como la producción de sideróforos, AIA y solubilización de fosfatos.

Rolón-Cárdenas et al. (2021) aislaron cuatro cepas bacterianas a partir de las raíces de *T. latifolia* cultivada en un ambiente contaminado con Cd. GRC065, GRC066, GRC093 y GRC140 fueron identificadas como *Pseudomonas rhodesiae* y poseían rasgos PGPR, como producción de sideróforos, ácido indolacético, ácido fenil acético, solubilización de fosfatos y actividad ACC-desaminasa. La inoculación de *P. rhodesiae* en *A. thaliana* mejoró el crecimiento de las plántulas en presencia y ausencia de Cd, sugiriendo que es una bacteria promotora de crecimiento vegetal. Además, se ha demostrado que GRC140 mejora el crecimiento de *Cucumis sativus* L. expuesta a Cd (Rolón-Cárdenas, 2020) y mejora la eliminación de Cd por parte de *T. latifolia* en sistemas hidropónicos (Rolón-Cárdenas et al., 2022).

Por otra parte, se han aislado bacterias del género *Pseudomonas* a partir de las raíces de *T. latifolia* expuestas a naproxeno y diclofenaco. En general, las bacterias presentaron

propiedades de PGPR de producción de AIA, ACC desaminasa, solubilización de fosfato y producción de sideróforos, estas actividades podrían tener beneficios en la planta hospedante y contribuir en la eliminación de los compuestos farmacológicos (Zapata-Morales et al., 2020).

Tiwari et al. (2012) aislaron bacterias de la rizosfera de *T. latifolia* cultivada en un sitio de cenizas volantes. El consorcio conformado por las cepas bacterianas *Paenibacillus macerans* NBRFT5, *Bacillus endophyticus* NBRFT4 y *Bacillus pumilus* NBRFT9, mejoró la acumulación de Fe, Ni y Zn en *Brassica juncea*. Estas bacterias producen sideróforos y ácidos orgánicos.

En *Typha domingensis*, la inoculación de dos cepas bacterianas endófitas, *Microbacterium arborescens* TYSI04 y *Bacillus pumilus* PIRI30, mejoraron el crecimiento vegetal, la degradación de efluentes textiles y disminuyeron sus efectos tóxicos y genotoxicidad (Kumar et al., 2018; Shehzadi et al., 2014).

Otro estudio, evaluó la capacidad PGPR de *Bacillus mycoides* (CSB25) aislado de la rizosfera de *T. domingensis* y encontró rasgos PGPR como la producción de AIA, solubilización de fosfato y fijación de nitrógeno (Brito-Campo et al., 2022). Además, se encontró que *Pseudomonas gessardii* aislada de la rizosfera de *T. domingensis* promueve el crecimiento y mejora la absorción de Fe, Mn, Ni, Pb y Cr por las raíces de las macrófitas *Brachia mutica*, *T. domingensis*, *Phragmites australis* y *Leptochala fusca* en un humedal artificial para tratar el agua de río contaminado (Shahid et al., 2020).

2.7 Estudios de genómica funcional en *Typha*

Los estudios transcripcionales sobre el género *Typha* en respuesta al estrés por metales pesados son escasos. El primer estudio realizado por Xu et al. (2015) determinó el transcriptoma de plantas de *T. angustifolia* expuestas y no expuestas a 250 μ M de Cd (en forma de CdCl₂). En el estudio se obtuvieron 57,608,230 lecturas a partir de las bibliotecas de cDNA, cuyo posterior análisis indicó que 102,473 unigenes se expresan diferencialmente en presencia de Cd.

Adicionalmente, se secuenciaron dos bibliotecas de RNAs pequeños, de plantas expuestas y no expuestas a 250 μ M de Cd. Se identificaron 114 secuencias correspondientes

a miARN conservados, 41 secuencias para ser anotadas como miARN nuevos en ambas bibliotecas. El análisis *in silico* mostró 764 genes blanco para 89 miARN conservados y 21 miARN nuevos. Los análisis de abundancia de lecturas y la validación mediante RT-PCR indicó que 4 miARN conservados y 6 miARN nuevos se expresan diferencialmente, sugiriendo que los miARN podrían desempeñar un papel en la respuesta al estrés por Cd en *T. angustifolia*.

En lo que respecta a los genes regulados por los miRNA se desconoce la función en *T. angustifolia*, por lo que es necesario profundizar en el estudio y anotación de los genes expresados diferencialmente en respuesta a Cd. Finalmente, dadas las limitaciones del estudio mencionado, no fue posible identificar y/o anotar genes de *T. angustifolia* involucrados en la tolerancia al Cd.

En otro estudio realizado por Xu et al. (2020) se identificaron 3275 genes expresados diferencialmente en raíces de *T. orientalis* expuestas a Pb. La mayoría de los genes diferenciales están relacionados con procesos redox, transporte de metales, proteína quinasa/fosforilación y factores de transcripción en respuesta al estrés por Pb. Se encontró que el Pb induce ocho genes que codifican para transportadores ABC y de otros genes que codifican transportadores de cobre, la ATPasa transportadora de fosfolípidos y la proteína asociada a metales pesados.

A partir del análisis de expresión diferencial se seleccionó el gen *ToLRI* para transformar plantas de *A. thaliana* sensibles a Pb. Los análisis de sobreexpresión muestran que *A. thaliana* incrementa su resistencia al Pb, lo cual indica que el gen *ToLRI* está involucrado en la tolerancia al Pb (Xu et al., 2020). Hasta ahora, el gen *ToLRI* es el único gen identificado en el género *Typha* spp. en respuesta a Pb. Por lo tanto, es necesario profundizar en el estudio de los genes de *Typha* spp. involucrados en la tolerancia y/o fitoextracción de metales pesados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Esterilización superficial del material vegetal

Las semillas de *T. latifolia* se colocaron en un tubo cónico de 50 ml y se lavaron con 30 ml de agua destilada agitando vigorosamente durante 1 minuto. Las semillas fueron transferidas a un microtubo estéril de 1.5 ml, eliminando por succión los restos de agua. Enseguida, se adicionaron 1000 µl de una solución de hipoclorito de sodio al 50 % + Tritón X-100 0.02 %, se resuspendieron e incubaron a temperatura ambiente con agitación rotatoria durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se removió la solución de asepsia por aspiración. Finalmente, se realizaron 6 lavados con 1000 µl de agua destilada estéril, mezclando por inversión y removiendo el agua (Remy & Duque, 2016).

3.2 Ensayo de germinación de semillas de *T. latifolia*

Para el ensayo de germinación (Garcia-Lemos et al., 2020; Mahdi et al., 2020) se utilizó como inoculante bacteriano *P. rhodesiae* GRC140. La bacteria se cultivó en 50 ml de caldo LB a 28 °C durante 24 h. Se tomaron alícuotas de 10 ml en tubos cónico y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min para obtener el sedimento bacteriano. Las células bacterianas se lavaron con 10 ml de agua destilada estéril, se centrifugaron nuevamente y se descartó el sobrenadante. El paquete celular contenido en cada uno de los tubos se resuspendió en 5 ml de agua destilada estéril y se transfirió a un matraz limpio y estéril. Posteriormente, la suspensión bacteriana fue ajustada a una $DO_{600nm}=1.0$. Para garantizar la viabilidad de las células, se realizaron diluciones seriadas con solución salina 0.85 %, se sembraron 10 µl de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} en agar LB 1/5. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 h.

Enseguida, se transfirieron alrededor de 100 semillas, esterilizadas superficialmente, a tubos cónicos que contenían 10 ml de la suspensión bacteriana ($DO_{600nm}=1.0$) y se incubaron bajo agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Como control negativo, se usaron semillas tratadas con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se secaron al aire. 20 semillas se transfirieron a frascos de vidrio que contenían 20 ml de agar agua al 1.5 % en presencia de GRC140 y de 40 ppm de Cd (ya que a esta concentración se ha demostrado que la planta muestra signos bioquímicos de estrés (Rolón-Cárdenas et al., 2022)), según fuera el tratamiento (Tabla 1). Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento y se incubaron a 28 °C bajo luz fluorescente con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. La tasa de

germinación se determinó a las 24 h, 48 h y 72 h después de la incubación. Al cumplir 15 días, se midieron varios parámetros de crecimiento que incluyeron la longitud de brotes y raíces y el peso fresco y seco. La tasa de germinación se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de germinación (\%)} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

Tabla 1. Diseño experimental del ensayo de germinación de semillas de *T. latifolia*

Tratamiento	Concentración de Cd	<i>P. rhodesiae</i> GRC140	Réplicas biológicas	Determinación
Control	0 ppm	0 UFC ml ⁻¹	3	Tasa de germinación (%) Longitud de brotes y raíces Peso fresco Peso seco
+GRC140	0 ppm	10 ⁷ UFC ml ⁻¹	3	
+Cd	40 ppm	0 UFC ml ⁻¹	3	
+Cd +GRC140	40 ppm	10 ⁷ UFC ml ⁻¹	3	

3.3 Establecimiento del cultivo hidropónico de *T. latifolia*

De manera inicial, una vez realizada la asepsia de las semillas siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.1, se germinaron en 500 µl de medio líquido MS 0.2X enriquecido con glucosa (Anexo 1) durante 5 días. Posteriormente, se distribuyeron en frascos de vidrio con 20 ml de agar MS 0.2X enriquecido con glucosa (Anexo 1) y se incubaron a 28 °C bajo luz fluorescente con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, durante 15 días.

Después de los 5 días de germinación, tres semillas de *T. latifolia* se transfirieron a sistemas de hidroponía (Alatorre-Cobos et al., 2014) (Anexo 2) que contenían 150 ml de medio líquido MS 0.2X con glucosa. Los sistemas fueron incubados a 28 °C bajo luz fluorescente con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad durante 4 semanas.

Transcurrido el tiempo, las plántulas se sometieron a una fase de 6 días de aclimatación, en la que se realizó un cambio de medio hidropónico utilizando MS 0.2X sin glucosa. El medio hidropónico se inoculó con una suspensión de *P. rhodesiae* GRC140, tal como se describe en la sección 3.4.

3.4 Cultivo y crecimiento de *P. rhodesiae* GRC140

Se preparó un preinóculo de *P. rhodesiae* GRC140 crecido en 50 ml de caldo de cultivo LB a 28 °C durante 24 h. Posteriormente, se midió la DO₆₀₀ inicial del preinóculo, se hicieron alícuotas de 10 ml en tubos cónicos, se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos para separar el paquete celular y se descartó el sobrenadante. A continuación, se realizaron dos lavados; cada uno consistió en adicionar 5 ml de MgSO₄ 0.01 M a cada uno de los tubos cónicos, centrifugarlos durante 15 minutos y descartar el sobrenadante. El paquete celular contenido en cada uno de los tubos se resuspendió con 5 ml de MgSO₄ 0.01 M y se transfirió a un matraz limpio y estéril. Después, se midió la absorbancia, alcanzando una DO₆₀₀ final de 0.986. Para garantizar la viabilidad de las células, se realizaron diluciones seriadas con solución salina 0.85 %, se sembraron 10 µl de las diluciones 10⁻⁶ y 10⁻⁷ en agar LB 1/5. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 h.

3.5 Establecimiento de los ensayos

Siguiendo el diseño experimental presentado en la Tabla 2, se utilizaron plántulas de *T. latifolia* de 1 mes de edad, se probó la concentración de 40 ppm de Cd y una suspensión bacteriana de *P. rhodesiae* GRC140 (DO₆₀₀=0.986), la cual fue adicionada posterior a la transferencia de las plántulas. Las plántulas fueron expuestas durante 10 días a los tratamientos.

Tabla 2. Diseño experimental.

Especie	Tratamiento	Concentración de Cd	<i>P. rhodesiae</i> GRC140	Tiempo de exposición	Réplicas biológicas	Determinación
<i>T. latifolia</i>	Control	0 ppm	0 UFC ml ⁻¹	10 días	3	Peso fresco Peso seco Glutación Fuga de electrolitos pH Contenido de Cd Expresión génica
	GRC140	0 ppm	10 ⁷ UFC ml ⁻¹	10 días	3	
	Cd	40 ppm	0 UFC ml ⁻¹	10 días	3	
	Cd + GRC140	40 ppm	10 ⁷ UFC ml ⁻¹	10 días	3	

3.6 Análisis fenotípico y bioquímico

3.6.1 *Peso fresco*

Los sistemas se desmontaron y se recuperaron las plántulas, posteriormente se cortaron de modo que las raíces estuvieran separadas del tejido aéreo. Se determinó el peso de ambos órganos (raíz y brotes) a través de su pesaje en balanza analítica.

3.6.2 *Peso seco*

Las muestras de material vegetal evaluadas para determinación de peso fresco fueron sometidas a un proceso de secado, el cual consistió en secar las muestras a 28 °C las primeras 24 h, y posteriormente a 60 °C las siguientes 24 h en una estufa (FELISA). Terminando el proceso de secado, el tejido (raíz y tejido aéreo) se pesó nuevamente.

3.6.3 *Determinación del contenido de glutatión*

Se llevó a cabo la determinación de glutatión total (GSH) en raíces siguiendo el método descrito previamente por Rahman et al. (2006). Para ello, se trituraron 250 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido y una vez pulverizado, se transfirieron a un microtubo de 1.5 ml con 500 µl de buffer de fosfato de potasio 0.1 M con EDTA 5 mM (KPE), pH 7.5. La muestra fue homogenizada en vórtex y centrifugada a 12 000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se tomó una alícuota de 150 µl para mezclarla con 150 µl de tampón de extracción (Triton X-100 al 0.1 % y ácido sulfosalicílico al 0.6 % en KPE). La muestra se centrifugó nuevamente y, enseguida, se tomó una alícuota de 100 µl. Ésta fue tratada con 700 µl de buffer KPE, 60 µl DTNB 1.68 mM, 60 µl de Glutatión reductasa (50 U/ml) y 60 µl de NADPH 0.9 mM.

Finalmente, las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 412 nm. El contenido de glutatión total se calculó de acuerdo con una curva estándar de GSH (Sigma-Aldrich, EE. UU.).

3.6.4 *Fuga de electrolitos*

La fuga de electrolitos (EL) se midió de acuerdo con el método descrito por Umnajkitikorn et al. (2021). Se sumergieron 100 mg de tejido radicular en 10 ml de agua desionizada a 20 °C durante 1 h y se midió la conductividad eléctrica inicial (EC_i) de las muestras con un medidor de conductividad. Después, las muestras fueron incubadas a 20 °C durante 24 h, y

se midió la conductividad eléctrica final (EC_f). Luego las muestras se calentaron a 120 °C en una autoclave durante 15 min, se enfriaron y se midió la conductividad eléctrica total (EC_t).

La fuga de electrolitos (EL) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% EL = \left(\frac{EC_f - EC_i}{EC_t - EC_i} \right) \times 100$$

3.7 Determinación de pH

Se tomaron muestras de medio hidropónico al inicio y al final de los tratamientos y se determinó el pH.

3.8 Cuantificación de Cd (II)

Después de la exposición al Cd, las plantas se lavaron con EDTA 0.1 M durante 15 minutos para eliminar el metal adsorbido y se cortaron a fin de separar la raíz y el tejido aéreo, posteriormente los tejidos vegetales se secaron a 70 °C durante 24 h. El contenido de Cd en los tejidos de las plántulas se determinó mediante digestión ácida de acuerdo con la metodología desarrollada por Carranza-Álvarez et al. (2008). También se cuantificó el Cd en los medios hidropónicos expuestos al metal. Con los datos obtenidos, se calculó el contenido de Cd en brotes y raíces, el porcentaje de remoción de Cd, y otros factores como bioconcentración, translocación y bioacumulación del metal, siguiendo las fórmulas correspondientes (Ren et al., 2020):

$$BCF = [Cd]_{raíz} / [Cd]_{medio}$$

Donde:

BCF= Factor de bioconcentración.

$[Cd]_{raíz}$ = Concentración de Cd en las raíces de la planta en mg/Kg.

$[Cd]_{medio}$ = Concentración de Cd en el medio de cultivo en mg/L.

$$TF = [Cd]_{aéreo} / [Cd]_{raíz}$$

Donde:

TF= Factor de translocación.

$[Cd]_{\text{aéreo}}$ = Concentración de Cd en las hojas de la planta en mg/Kg.

$[Cd]_{\text{raíz}}$ = Concentración de Cd en las raíces de la planta en mg/Kg.

$$BAC = [Cd]_{\text{aéreo}} / [Cd]_{\text{medio}}$$

Donde:

BAC = Coeficiente de bioacumulación.

$[Cd]_{\text{aéreo}}$ = Concentración de Cd en las hojas de la planta en mg/Kg.

$[Cd]_{\text{medio}}$ = Concentración de Cd en el medio de cultivo en mg/L.

Todo el material utilizado en las siguientes determinaciones fue previamente remojado durante 48 h en una dilución de HNO₃ grado reactivo al 5 %, enjuagado con agua desionizada y secado.

3.8.1 Digestión ácida de muestras vegetales a temperatura ambiente

Las raíces se secaron en una estufa a 70 °C durante 24-48 h y posteriormente se determinó el peso seco total de las muestras en una balanza analítica. Las muestras se trituraron en un mortero con pistilo y se resguardaron en bolsas de papel hasta su procesamiento.

Se pesaron 25 mg de la muestra pulverizada y se colocó en un recipiente de polipropileno o HDPE de 30 ml. Se adicionaron 100 µl de HNO₃ (Grado trazas) por cada 2 mg de muestra, es decir, 1.25 ml de HNO₃ en total, y se cerraron los recipientes y se dejó en reposo durante 5 días a temperatura ambiente en oscuridad.

Al sexto día, se adicionó 1 ml de H₂O₂ al 30 % (Grado reactivo) para completar la oxidación de la muestra orgánica y se dejó durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se aforó a 12.5 ml con agua desionizada, obteniéndose una muestra acidificada al 10 % HNO₃ (v/v).

Se preparó un blanco de reactivos, el cual contenía todos los reactivos usados en los mismos volúmenes y concentraciones en el procesamiento de la muestra. Este blanco siguió los mismos pasos de digestión y preparación de la muestra. Finalmente, las muestras se analizaron por EAA.

3.8.2 Digestión ácida de muestras vegetales en caliente

Las muestras secas de tejido aéreo fueron trituradas en un mortero con pistilo y resguardadas en bolsas de papel hasta su procesamiento.

Se pesaron 100 mg de muestra triturada y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se adicionaron 10 ml de agua regia (HCl: HNO₃ en relación 3:1 v/v) al recipiente. Se calentó a 270 °C en una placa de calentamiento y se evaporó hasta sequedad, se retiró el recipiente de la placa y se dejó enfriar. Posteriormente, se adicionaron 3 ml de HNO₃ (Grado trazas) para redissolver el residuo, se calentó la mezcla nuevamente y se evaporó hasta que quedaran 500 µl de mezcla en el matraz. Se retiró el recipiente de la placa y se dejó enfriar.

Enseguida, se adicionaron 500 µl de HNO₃ (Grado trazas) y 2 ml de agua desionizada para redissolver el residuo. La muestra se filtró y aforó a 25 ml utilizando agua desionizada. Finalmente, las muestras se guardaron en tubos cónicos de 50 ml y se analizaron por EAA.

3.8.3 Preparación de muestras líquidas

Las muestras líquidas se diluyeron a 4 ppm y se acidificaron al 5 % con HNO₃ (Grado trazas). Posteriormente, se analizaron por EAA.

3.8.4 Elaboración de curva de calibración de Cd y análisis por EAA

Todas las muestras fueron analizadas por EAA con llama de aire y acetileno (iCE 3000 series de Thermo Scientific™) a una longitud de onda de 228.8 nm y utilizando una lámpara de cátodo hueco para Cd (No. de catálogo: 942339030481, Thermo Scientific™). La concentración de Cd de las muestras se calculó de acuerdo con una curva de calibración de seis puntos, utilizando estándares de 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 y 7.5 mg/L de Cd, a partir de una solución stock grado absorción atómica certificada (Cadmium AA standard certified, Lote: 4307B38, Ricca Chemical Company). El equipo de EAA fue calibrado y, para validar la calibración, se tomó como ajuste aceptable un valor de $R^2 \geq 0.995$.

3.9 Extracción de ARN total y determinación de los niveles relativos de expresión genética

3.9.1 Extracción de ARN total

Después de los tratamientos con GRC140 y Cd durante 10 días, se recolectaron las raíces de las plántulas y se aisló el ARN total utilizando el kit Quick-RNA™ Plant Miniprep de Zymo

Research siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Para este experimento se utilizaron tres réplicas biológicas de cada tratamiento. La concentración del ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop OneC (Thermo Scientific).

Para la extracción del ARN, todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente y centrifugando a 13 000 x g durante 30 segundos, a menos que se especifique lo contrario.

Todo el tejido radicular fue pulverizado en nitrógeno líquido y transferido a un tubo ZR BashingBead Lysis y se adicionaron 1100 µl de RNA Lysis Buffer. Las muestras se agitaron en vórtex y se incubaron a 65-70 °C durante 30 minutos, utilizando un baño de agua. Posteriormente, se centrifugaron a 16 000 g durante 5 minutos para sedimentar los residuos y se transfirió el sobrenadante a una columna Zymo-Spin IICG en un tubo colector y se centrifugó. Al flujo continuo, se agregó un volumen igual de etanol (95-100 %) y se mezcló bien. La mezcla fue transferida a una columna Zymo-Spin IICR en un tubo colector y se centrifugó, descartando el flujo continuo. Enseguida, se añadieron 400 µl de RNA Prep Buffer a la columna y se centrifugó, descartando el flujo continuo. Después, se adicionaron 700 µl de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó nuevamente descartando el flujo continuo. Se añadieron 400 µl de RNA Wash Buffer y se centrifugó la columna durante 1 minuto para garantizar la eliminación completa del buffer de lavado. Luego, se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml libre de nucleasas, se añadieron 20 µl de agua libre de DNasa/RNasa directamente a la matriz de la columna y se centrifugó.

Por otro lado, se colocó un filtro Zymo-Spin III-HRC en un nuevo tubo colector, se añadieron 600 µl de Prep Solution y se centrifugó a 8000 x g durante 3 minutos. Finalmente, el ARN eluido previamente, fue transferido al filtro preparado en un tubo eppendorf de 1.5 ml libre de RNasa y se centrifugó a 16 000 x g durante 3 minutos.

3.9.2 RT-qPCR

Después de la extracción de ARN, se seleccionó completamente al azar una muestra de cada tratamiento para la síntesis de ADNc y para realizar tres réplicas técnicas de qRT-PCR.

El ADNc se sintetizó con 0.1 ng de ARN total con el kit de reactivos RevertAid First Strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Todos los componentes del kit y las muestras de ARN se mantuvieron en hielo durante el procedimiento. La síntesis de ADNc se llevó a cabo en un termociclador incubando los tubos de PCR durante 60 minutos a 42 °C. La reacción terminó calentando a 70 °C durante 5 minutos. El ADNc fue cuantificado en un NanoDrop y ajustado para tener un volumen de 50 µl a 100 ng/µl.

Las reacciones cuantitativas de PCR en tiempo real (RT-qPCR) se llevaron a cabo utilizando el Fast SYBR™ Green Master Mix en un sistema de PCR en tiempo real rápido usando 7500 fast (Applied Biosystems de Thermo Scientific). Se utilizaron los cebadores para los genes de metalotioneína, fitoquelatina sintasa, CL7951, CL354, CL3870 y Unigene11164. La RT-qPCR se realizó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C durante 20 s, luego se establecieron 40 ciclos a 95 °C durante 3 s e hibridación/extensión a 60 °C durante 30 s. El análisis de la curva de fusión confirmó la especificidad de la amplificación. Se utilizó actina como control interno. La expresión relativa de los genes se normalizó comparándola con la expresión de actina y se analizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos de este estudio se realizaron por triplicado y se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de media \pm desviación estándar mediante la prueba de Tukey. Las diferencias en $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software Inc., Boston, Massachusetts, EE. UU., 2007) y RStudio versión 2021.09.2+382 (Posit Software, PCB, 2022).

4. RESULTADOS

4.1 Ensayo de germinación de semillas de *T. latifolia*

Para determinar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la germinación de *T. latifolia*, se inoculó una suspensión bacteriana de 9.3×10^8 UFC ml^{-1} en semillas desinfectadas, las cuales fueron transferidas a frascos que contenían 20 ml de agar agua. La tasa de germinación se monitoreó durante 72 h y 15 días después de la interacción *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140 en ausencia y presencia de Cd. Se evaluaron parámetros de crecimiento vegetal, comparando con plantas control sin inocular.

En la Figura 3 se muestran los resultados del efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la germinación de *T. latifolia* expuesta a Cd en relación con el tiempo.

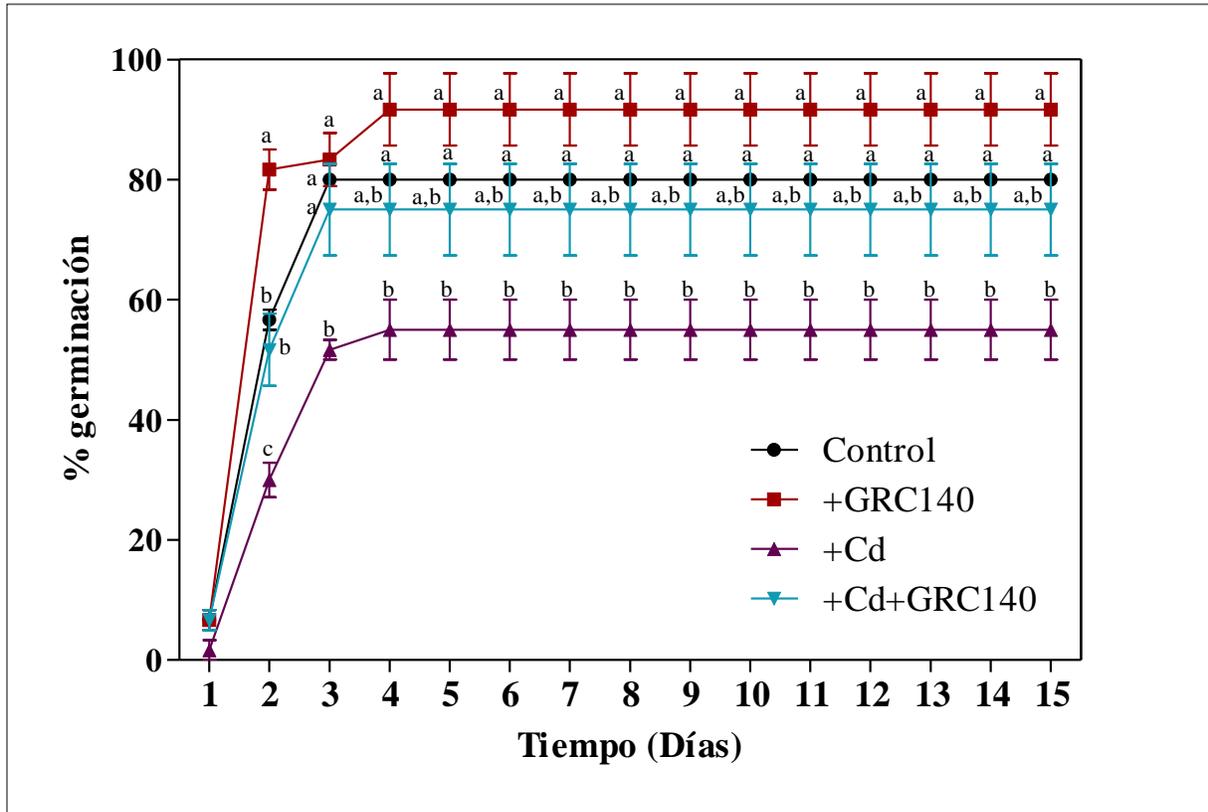


Figura 3. Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la germinación de semillas de *T. latifolia* expuesta a Cd. La tasa de germinación fue monitoreada cada 24 h durante 15 días. Las medias \pm SD ($n = 3$) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en $P < 0.05$ (prueba Post hoc de Tukey).

Los resultados indican que al segundo día de tratamiento la inoculación de *P. rhodesiae* GRC140 incrementa significativamente ($P < 0.0001$) la tasa de germinación (81 %) de semillas de *T. latifolia* en comparación con el control no inoculado (56 %), indicando que la bacteria influye positivamente en el desarrollo temprano de la planta.

Por otra parte, se observó que la presencia de Cd disminuye la tasa de germinación (30 %) en comparación con las semillas control no expuestas. Sin embargo, la inoculación de la bacteria incrementa la germinación de las semillas expuestas a Cd hasta en un 56 %, indicando que *P. rhodesiae* GRC140 ejerce efecto protector en las semillas de *T. latifolia* expuestas a Cd. Al día 3, la tasa de germinación de los grupos +GRC140 (83 %) y +Cd+GRC140 (75 %) fueron estadísticamente igual al control (80 %), mientras que el grupo con Cd fue estadísticamente diferente a este (51 %) ($P = 0.0042$), indicando nuevamente que la inoculación de *P. rhodesiae* GRC140 mejora la tasa de germinación de semillas de *T. latifolia* expuestas a Cd.

En la Figura 4, se observa la tasa de germinación al finalizar los 15 días de exposición a los distintos tratamientos, donde el grupo de Cd (55 %) fue significativamente menor respecto al control (80 %) ($P = 0.0091$), evidenciando el efecto negativo del Cd en la germinación de las semillas de *T. latifolia*.

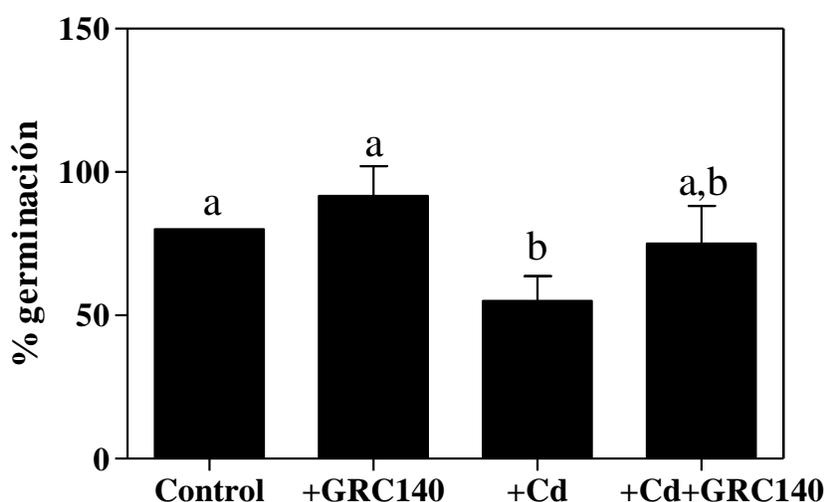


Figura 4. Tasa de germinación de semillas de *T. latifolia* expuestas a Cd al finalizar los 15 días de exposición. Las medias \pm SD ($n = 3$) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en $P < 0.05$ (prueba Post hoc de Tukey).

En cuanto a los parámetros de crecimiento vegetal, en las Figura 5 y 6, se muestran los resultados de la longitud, peso fresco y peso seco de brotes y raíces después de 15 días de la interacción planta-bacteria. Con respecto a la longitud, se encontró una mayor longitud del brote en presencia de GRC140 (1.9 cm) con respecto al control (1.2 cm) ($P=0.0003$), y en el caso de las raíces, también se obtuvo una mayor longitud en presencia de la bacteria (1.0 cm) en comparación con el control no inoculado (0.4 cm) ($P=0.0018$) (Figura 6A-B).

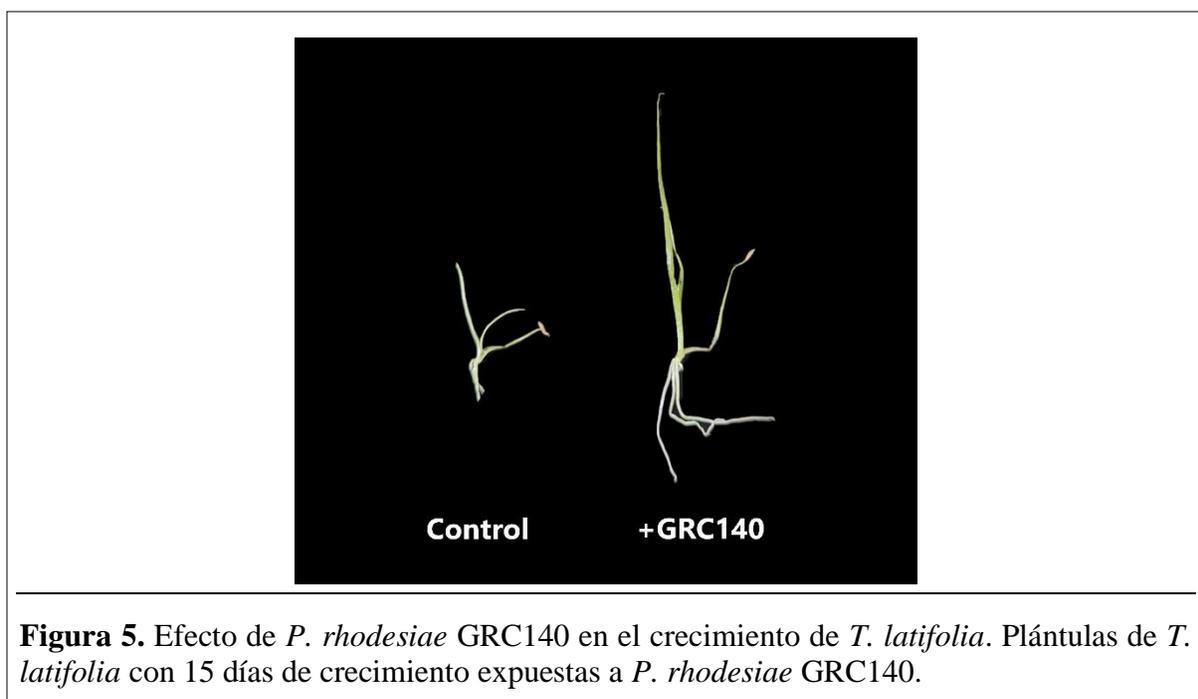


Figura 5. Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en el crecimiento de *T. latifolia*. Plántulas de *T. latifolia* con 15 días de crecimiento expuestas a *P. rhodesiae* GRC140.

Por otra parte, la inoculación de las semillas con GRC140 aumentó significativamente la biomasa de las plántulas (Figura 6C-D). Se observó un incremento significativo en el peso fresco ($P=0.0003$) y peso seco ($P=0.0111$) de las plántulas inoculadas con el aislado bacteriano, obteniéndose 2.31 mg/planta y 0.12 mg/planta, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que, al término de los 15 días de la interacción planta-bacteria, *P. rhodesiae* GRC140 promueve el crecimiento vegetal de *T. latifolia*.

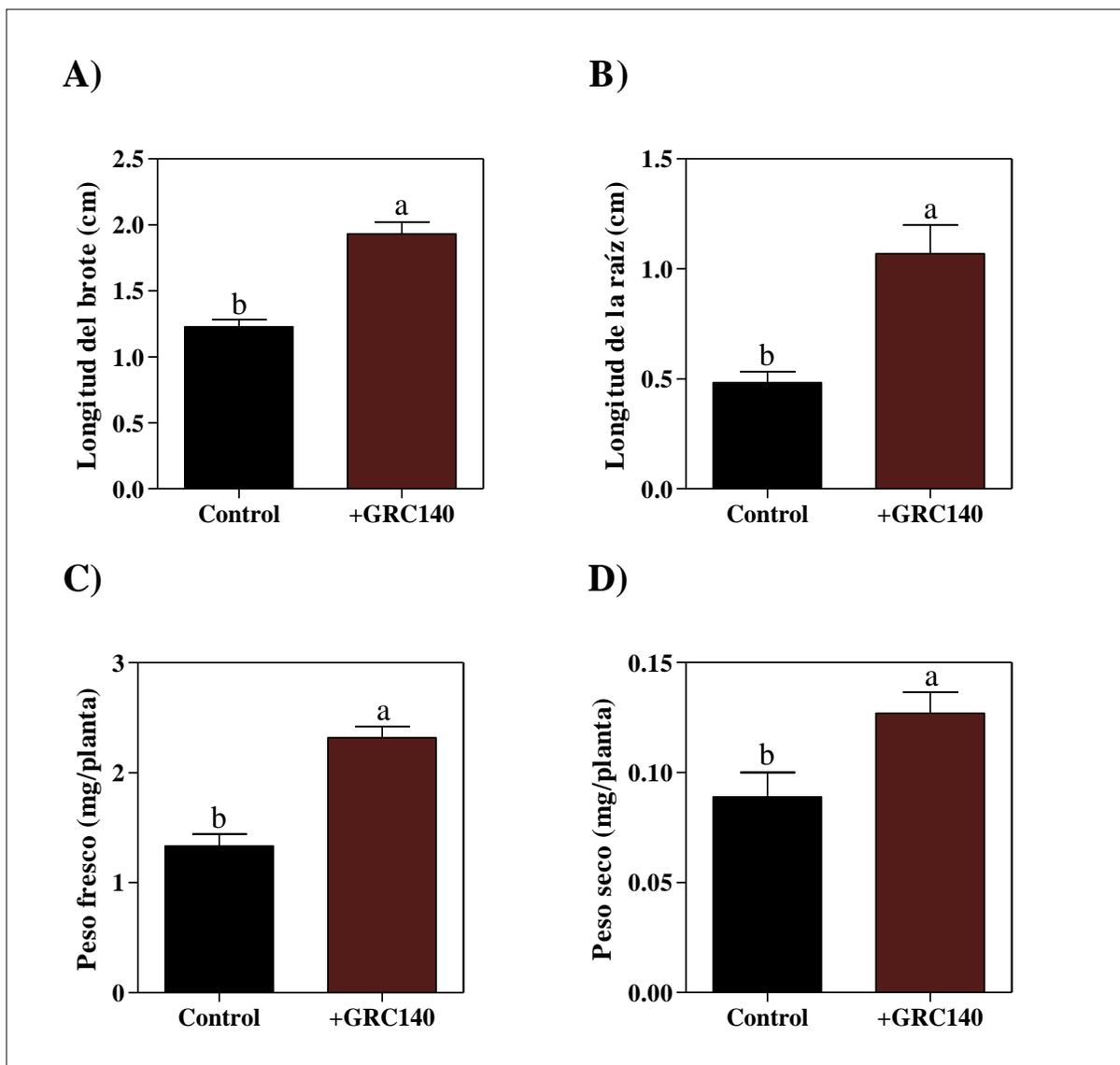


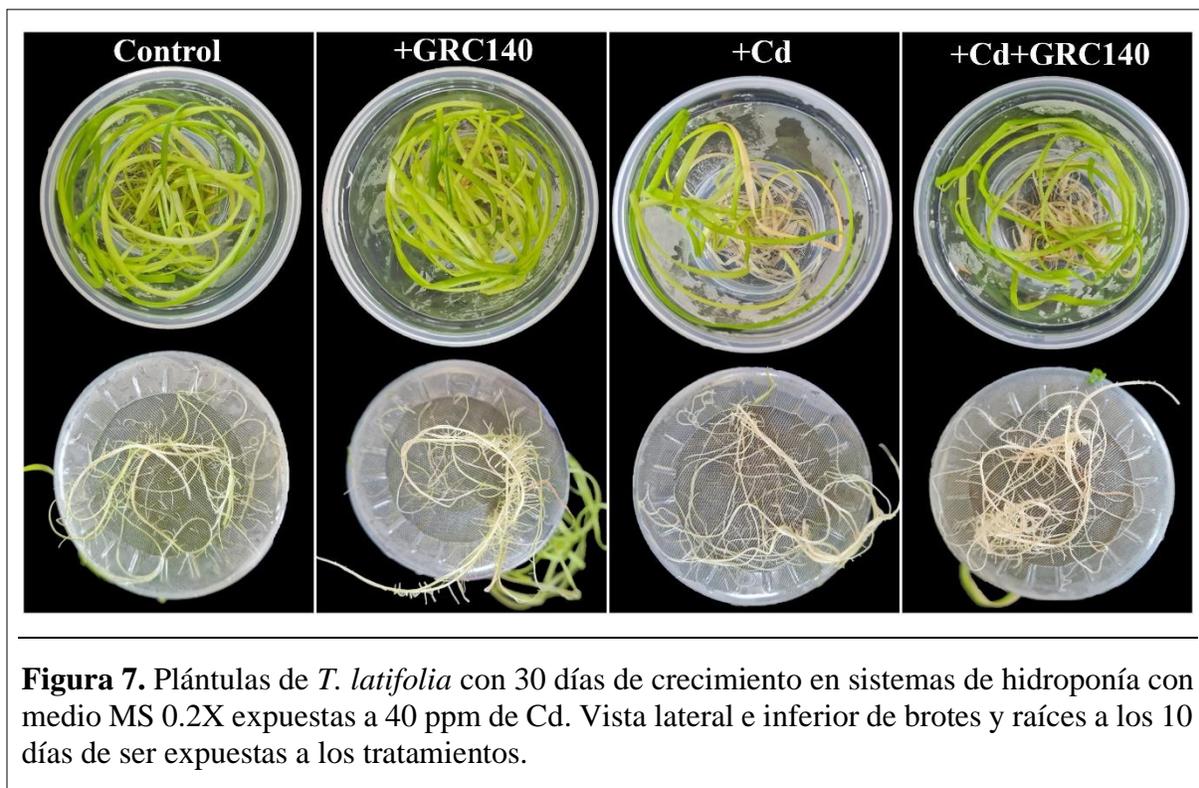
Figura 6. Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en el crecimiento de *T. latifolia*. Después de 15 días de crecimiento se evaluó la longitud (A-B), el peso fresco (C) y el peso seco (D) de brotes y raíces. Las medias \pm SD (n = 3) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en $P < 0.05$ según la prueba *t* de Student.

4.2 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd

4.2.1 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en el fenotipo de *T. latifolia*

Para evaluar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en plantas de *T. latifolia* expuestas Cd, se siguió el diseño experimental mostrado en la Figura 7. Las plántulas, crecidas durante 30 días en hidroponía, fueron inoculadas con una suspensión bacteriana de 7.417×10^4 UFC ml^{-1} de *P. rhodesiae* GRC140 y expuestas a 40 mg/L de Cd. La interacción de las plántulas con la

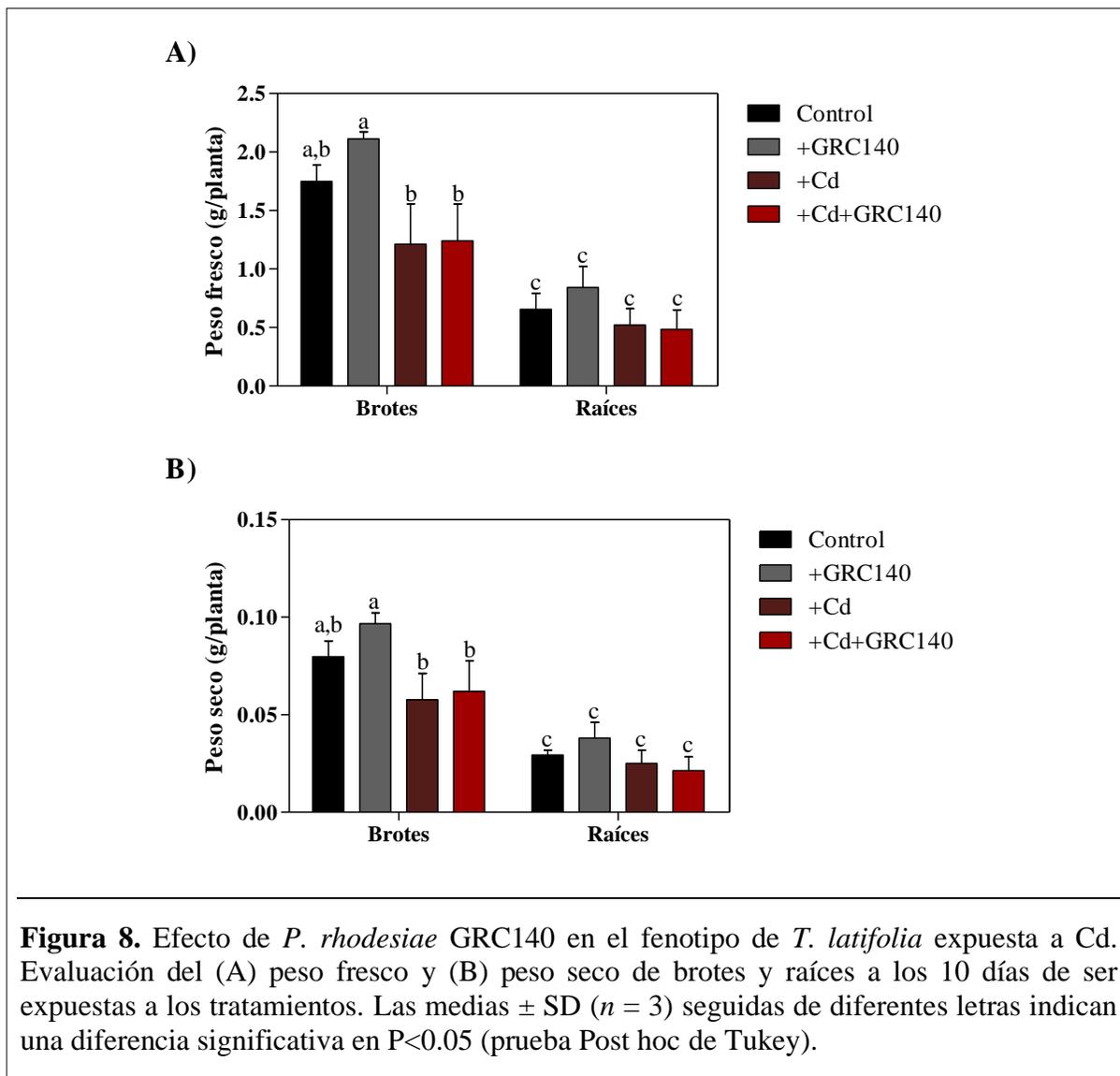
bacteria se llevó a cabo durante 10 días. Al finalizar se evaluó el efecto de la bacteria en el crecimiento y tolerancia de *T. latifolia* a Cd.



Los resultados obtenidos muestran que, al término del periodo de exposición, las plántulas en presencia de *P. rhodesiae* GRC140 crecieron de forma adecuada y no se observaron efectos negativos en el sistema brotes, sin embargo, aquellas que fueron expuestas a Cd, presentaron marchitamiento. En lo que respecta al sistema radicular, no se observan diferencias en las raíces expuestas a Cd con respecto al control. Los resultados indican que el Cd afecta el fenotipo de las plantas a nivel de brotes. Por otra parte, se observó un mayor desarrollo de pelos radiculares en las plantas inoculadas con la bacteria, mientras que en las plantas no inoculadas el desarrollo de pelos radiculares es escaso (Figura 7). Los resultados muestran que *P. rhodesiae* GRC140 induce la formación de pelos radiculares tanto en plantas expuestas como las no expuestas a Cd, lo cual puede atribuirse a las auxinas (ácido indol acético y ácido fenil acético) sintetizadas por la bacteria (Rolón-Cárdenas et al., 2021).

En la Figura 8 se muestran los resultados de peso fresco y peso seco de brotes y raíces después de los 10 días de exposición con el metal. Con respecto al peso fresco (Figura 8A),

en los brotes se encontró un decremento significativo en la biomasa de las plantas expuestas a Cd ($P=0.0057$), ya sea en presencia o ausencia de *P. rhodesiae* GRC140. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el caso del tejido radicular. Por otro lado, los resultados de peso seco (Figura 8B) presentaron la misma tendencia, observando un decremento significativo para el caso de los brotes de las plantas expuestas al metal ($P=0.0111$).



4.2.2 Comportamiento del pH en el medio hidropónico

La Figura 9 representa la variación de pH en el sistema hidropónico durante 46 días. En el día 0, el medio de cultivo tenía un pH de 5.7, sin embargo, conforme las plantas de *T. latifolia* fueron creciendo en los sistemas de hidroponía durante 30 días, el pH descendió hasta 3.6;

lo cual sugiere que la planta exuda compuestos que acidifican el medio de cultivo. Una vez transcurridos los 30 días, las plantas entraron en una fase de aclimatación de 10 días, donde aquellas que estaban destinadas al tratamiento bacteriano se inocularon con una suspensión de *P. rhodesiae* GRC140 en $MgSO_4$ y, al resto de los sistemas, se agregó una solución de $MgSO_4$ 0.01 M para una concentración final de 1 % con respecto al medio hidropónico.

Al día 36, el medio hidropónico de los sistemas inoculados con la bacteria incrementó su pH a 4.5, mientras que las plantas control mantuvieron un pH de 4.0; en este punto, las plántulas post-aclimatación fueron sometidas a un cambio de medio hidropónico, utilizando MS 0.2X en presencia de 40 ppm de Cd y en ausencia de glucosa, según fuera el tratamiento, durante 10 días. Al término del día 46, el pH de los sistemas inoculados con GRC140 (5.6) fue estadísticamente igual al control (5.3), mientras que, en presencia de Cd, el pH descendió hasta 3.0 ($P < 0.0001$), lo cual sugiere que el estrés por Cd induce la segregación de ácidos por medio de las raíces.

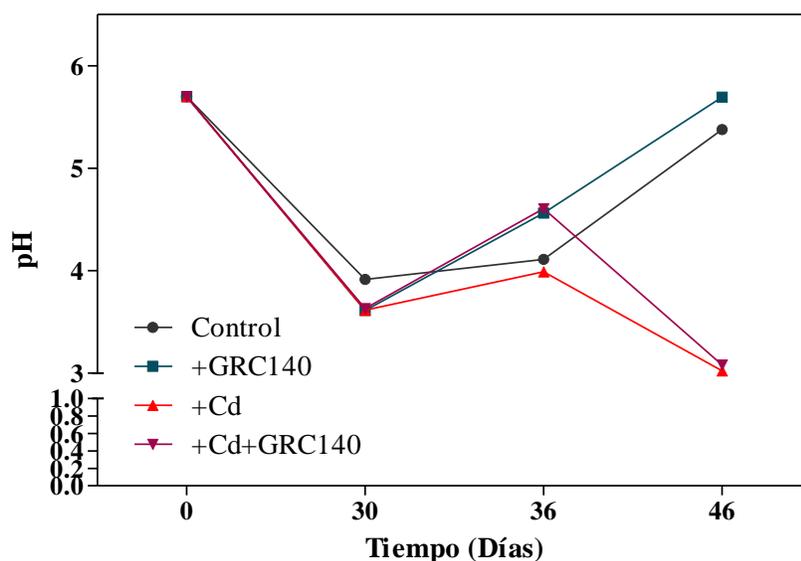


Figura 9. Comportamiento del pH en el medio hidropónico.

4.2.3 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en el contenido de glutatión de *T. latifolia*

Para determinar si *P. rhodesiae* GRC140 ejerce un efecto protector en plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd, se evaluó el contenido de glutatión total (GSH), donde se encontraron

diferencias estadísticamente significativas en los niveles de GSH del tejido radicular con una $P < 0.0001$ (Figura 10).

En plantas expuestas a Cd, se observaron mayores niveles de GSH (995.8 nmol GSH/g PF) en comparación con el resto de los grupos, siendo 7 veces mayor que el observado en el tejido radicular del grupo control (132.867 nmol GSH/g PF). Por otro lado, las plantas que fueron inoculadas con GRC140 y expuestas a Cd mostraron niveles de GSH estadísticamente iguales al control (229.133 nmol GSH/g PF), sugiriendo que la bacteria disminuye el estrés oxidativo causado por el Cd.

Los resultados indican que los niveles de GSH aumentaron en el tejido radicular de plantas expuestas a Cd, sin embargo, al incorporar la bacteria el GSH disminuye a niveles basales, lo cual sugiere que, *P. rhodesiae* GRC140 podría minimizar el estrés metálico en *T. latifolia*.

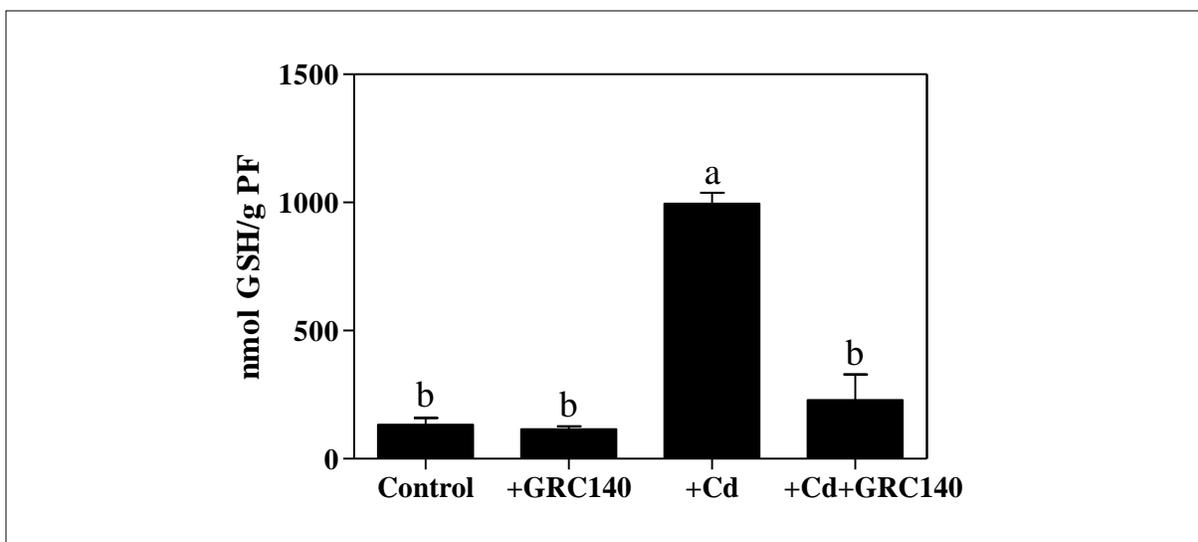
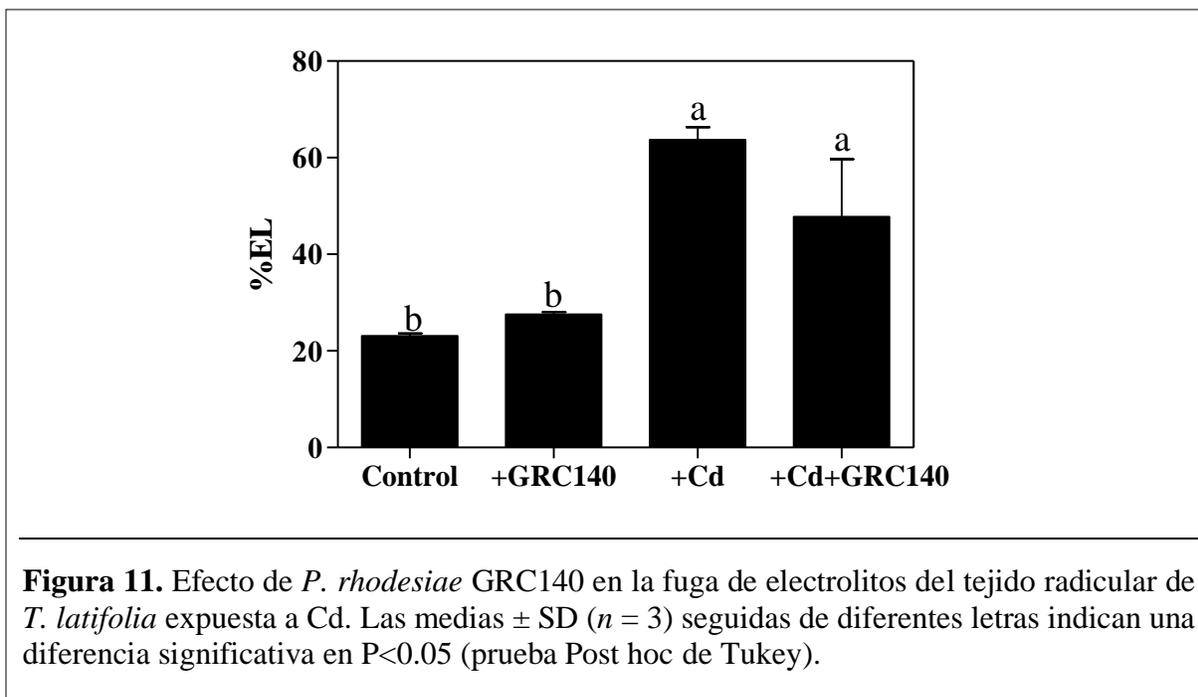


Figura 10. Contenido de Glutación total en el tejido radicular de *T. latifolia* expuesta a Cd. Las medias \pm SD ($n = 3$) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en $P < 0.05$ (prueba Post hoc de Tukey).

4.2.4 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la fuga de electrolitos de *T. latifolia*

El efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la fuga de electrolitos en raíces de *T. latifolia* se presenta en la Figura 11. Los resultados indican que la inoculación con *P. rhodesiae* GRC140 no afecta el nivel de fuga de electrolitos en plántulas de *T. latifolia*, mientras que en las raíces

de las plántulas expuestas a Cd se incrementa significativamente la fuga de electrolitos en comparación con el control, alcanzando un 63 % de fuga ($P=0.0001$). Por otra parte, la inoculación de *P. rhodesiae* GRC140 disminuye la fuga de electrolitos (47 %). Sin embargo, no se restauran los valores basales como los cuantificados en el grupo control (23 %).



4.3 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*

Para determinar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la fitoextracción de Cd por *T. latifolia* y su eficiencia en la remoción del metal, se determinó el contenido de Cd en brotes y raíces de las plantas expuestas a Cd (Figura 12). Independientemente del tratamiento, el contenido de Cd fue similar en ambos tejidos, alcanzando hasta una concentración de 1600 $\mu\text{g/g}$ en presencia de la bacteria. Además, se encontró que GRC140 incrementó significativamente 1.5 veces la concentración de Cd en brotes ($P=0.0315$) y 1.2 veces en raíces ($P=0.0213$) de *T. latifolia*.

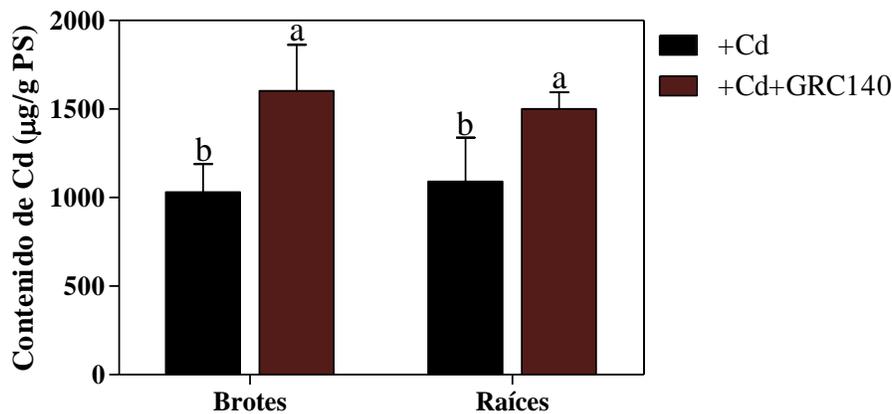


Figura 12. Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en el contenido de Cd por *T. latifolia*. Las medias \pm SD ($n = 3$) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en $P < 0.05$ (prueba Post hoc de Tukey).

Otros factores que permiten estimar el potencial de *T. latifolia* en el proceso de fitorremediación son el porcentaje de remoción, el factor de bioconcentración (BCF), el coeficiente de bioacumulación (BAC) y el factor de translocación (TF) (Figura 13).

Después de los diez días de exposición al metal, el nivel de Cd en la solución hidropónica disminuyó significativamente ($P=0.0132$). Sin embargo, los resultados muestran que la eficiencia de *T. latifolia* en la remoción de Cd (Figura 13A) incrementó en presencia de GRC140 (8.53 %) en comparación con el control de Cd (7.37 %), aunque no fue estadísticamente significativo. También se encontraron diferencias significativas ($P=0.0213$) en relación con la capacidad de captar el metal en el tejido radicular (BCF) (Figura 13B), viéndose mejorada en presencia de la bacteria (40.69) respecto al control (33.17). Además, la inoculación de *P. rhodesiae* GRC140 incrementó significativamente ($P=0.0315$) la capacidad de la planta para acumular Cd en el tejido aéreo (BAC) (Figura 13C), alcanzando un coeficiente de 43.42, en comparación con el tratamiento sin bacteria (27.94). Finalmente, la capacidad de *T. latifolia* para trasladar el metal a su tejido aéreo (FT) (Figura 13D) se incrementó en presencia de GRC140 (1.067) en comparación con el control (0.8514), pero no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

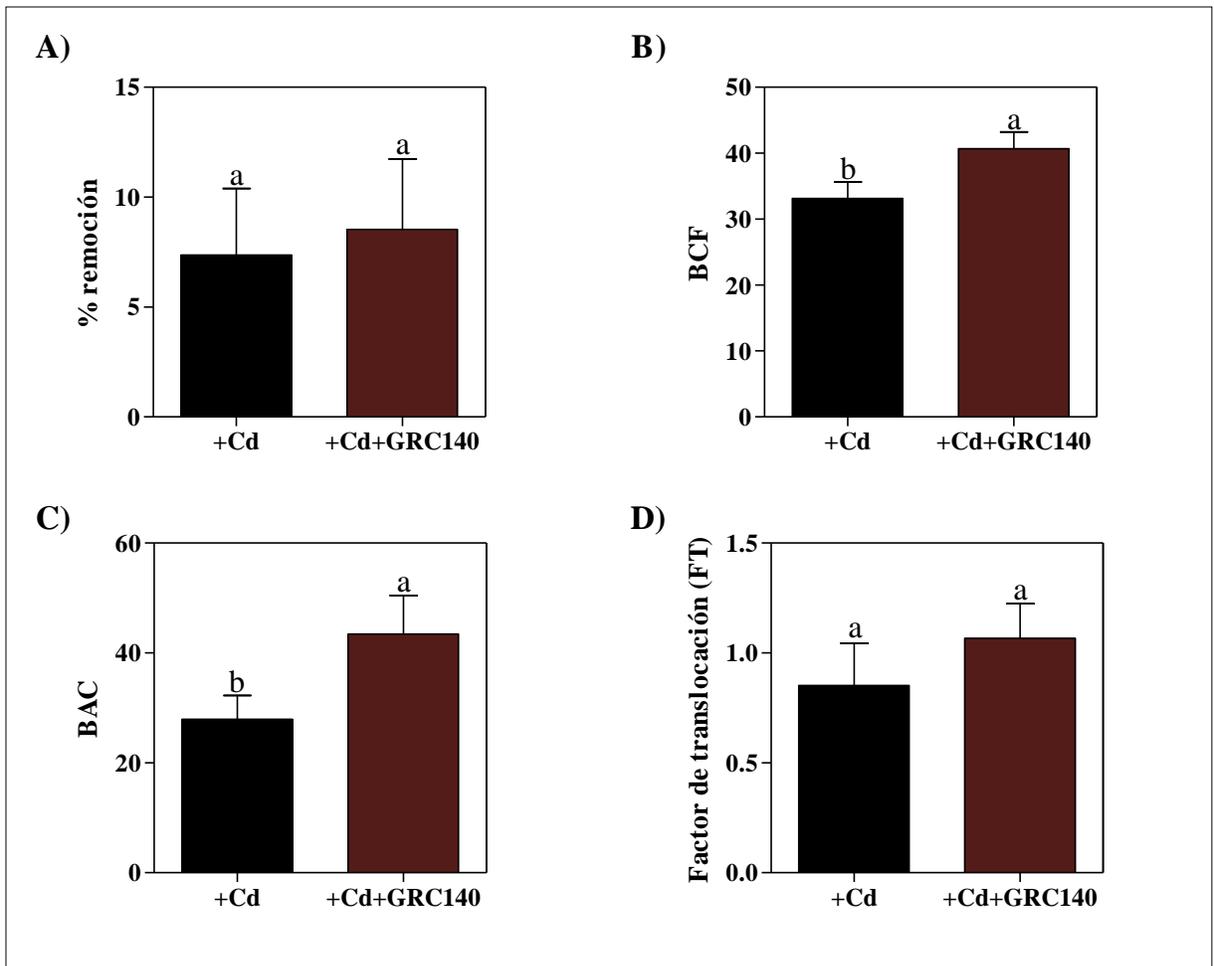


Figura 13. Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 sobre el porcentaje de remoción (A), factor de bioconcentración (B), coeficiente de bioacumulación (C) y factor de translocación (D). Las medias \pm SD ($n = 3$) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en $P < 0.05$ (prueba Post hoc de Tukey).

4.4 Análisis de la expresión de genes involucrados en la tolerancia a Cd durante la interacción *T. latifolia*-*P. rhodesiae* GRC140

Para analizar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la fitoextracción de Cd, se cuantificaron los niveles relativos de expresión de ortólogos previamente reportados en respuesta a Cd en *T. angustifolia*. Basándonos en un estudio transcriptómico de *T. angustifolia* expuestas a Cd, se seleccionaron 4 genes expresados diferencialmente en presencia de este metal CL7951, CL354, CL3870 y Unigene11164 (Xu et al., 2015), además de los genes que codifican para una metalotioneína y fitoquelatina sintasa.

Los resultados mostraron que, el Cd reprime la expresión de 5 genes evaluados en este estudio, 10 días después de la exposición (Figura 14).

En presencia de GRC140, Cd y GRC140-Cd, se reprime significativamente el gen de metalotioneína en un 50 %, 69 % y 65 % respectivamente ($P=0.0002$) (Figura 14A). En el caso de la fitoquelatina sintasa (Figura 14B), aunque se observó un decremento en el nivel de expresión de las plantas expuestas a Cd, este no fue significativo.

Adicionalmente, la presencia de GRC140 no afectó significativamente la expresión genética de CL7951 (Figura 14C), pero se encontró una disminución significativa en presencia de Cd, en un 88 % y 84 % en ausencia y presencia de la bacteria, respectivamente ($P=0.0006$). Se observó un comportamiento similar en el caso de CL354 (Figura 14D), ya que el Cd afectó el nivel de expresión hasta en un 43 % respecto al control ($P=0.0016$).

Por otra parte, la presencia de GRC140 induce la expresión relativa de CL3870 (Figura 14E) en un 46 %, mientras que la exposición a Cd lo reprime hasta en un 59 % ($P<0.0001$). Finalmente, la presencia de GRC140 no afectó significativamente la expresión génica de Unigene11164 (Figura 14F), pero se encontró una disminución significativa del 78 % en presencia de Cd, con una $P<0.0001$.

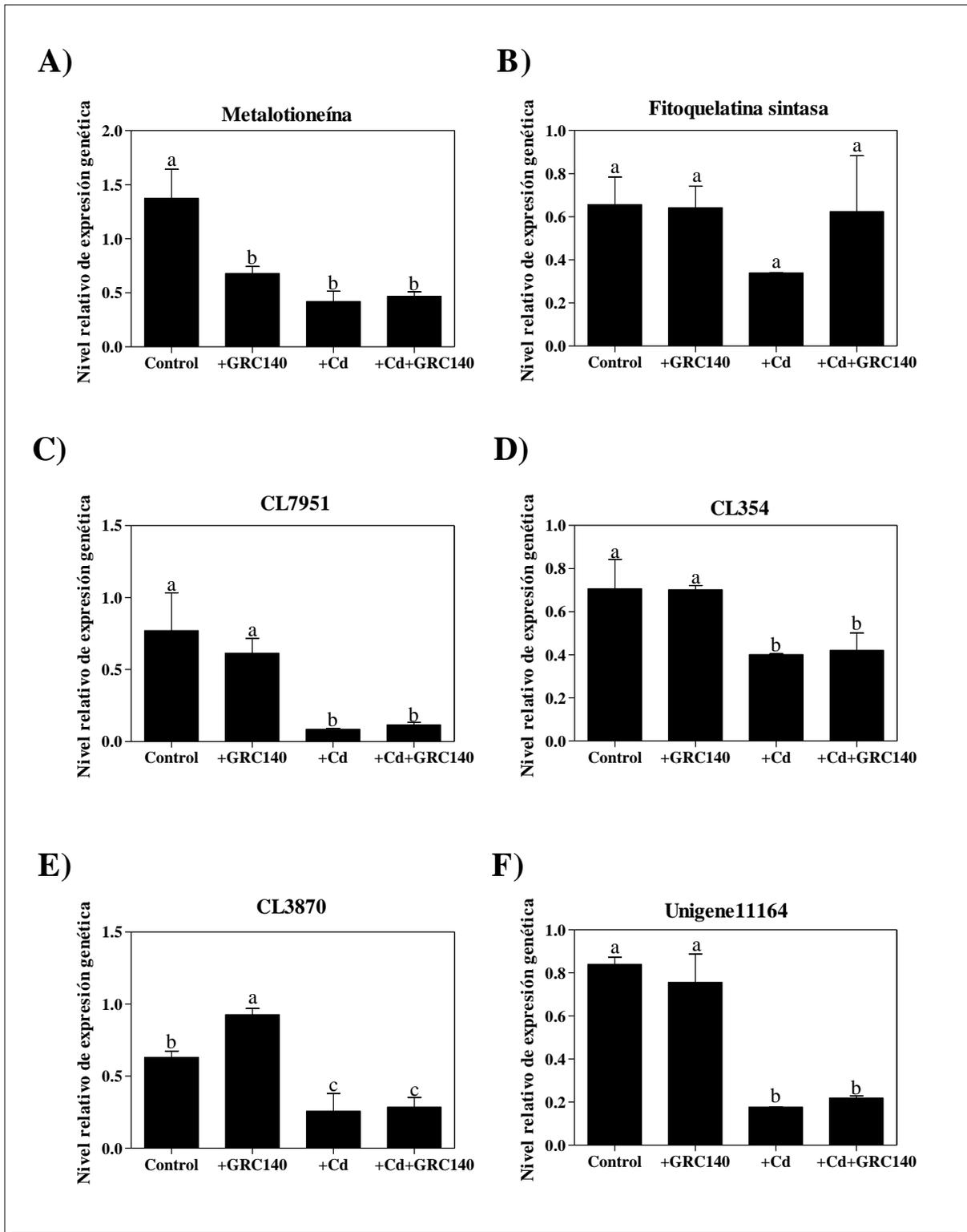


Figura 14. Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 sobre los niveles relativos de expresión génica de (A) Metalotioneína, (B) Fitoquelatina sintasa, (C) CL7951, (D) CL354, (E) CL3870 y (F) Unigene11164 en raíces de *T. latifolia* utilizando actina como control interno. Las medias \pm SD ($n = 3$) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en $P < 0.05$ (prueba Post hoc de Tukey).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la germinación de *T. latifolia*

En los últimos años, la aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) ha tomado gran relevancia, especialmente en la agricultura sostenible (Mir et al., 2022). El estudio de las interacciones entre plantas y PGPR ha incrementado debido al potencial para mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como para brindar protección contra el estrés biótico y abiótico (Garcia-Lemos et al., 2020; Mashabela et al., 2023).

Primeramente, se evaluó la capacidad de *P. rhodesiae* GRC140 para promover el crecimiento de su planta hospedera *T. latifolia*, realizando pruebas de germinación. Se demostró que el tratamiento bacteriano de las semillas de *T. latifolia* mejora la eficiencia de germinación (Figuras 3 y 4) y los parámetros de crecimiento (Figuras 5 y 6). Estos hallazgos coinciden con los estudios de Mahdi et al. (2020) quienes mostraron que la PGPR *Enterobacter asburiae* QF11 favorece el crecimiento temprano de las plantas de *Chenopodium quinoa Willd.*, particularmente en la tasa de germinación, la longitud total y los pesos fresco y seco. Por otro lado, la inoculación de *Pseudomonas moraviensis* J12 o *Bacillus cereus* J156 en semillas de trigo aumentaron notablemente la tasa de germinación y el crecimiento de las plántulas (Fahsi et al., 2021); mientras que *Bacillus megaterium* mejoró la germinación final, la longitud de brotes y raíces y el peso seco de la raíz en plántulas de soja (Miljaković et al., 2022).

Las PGPR regulan las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares en las plantas. GRC140 al ser una PGPR con la capacidad para sintetizar AIA (Rolón-Cárdenas et al., 2021), podría modular el equilibrio hormonal de las plantas. En este sentido, el impacto positivo de GRC140 observado en la germinación y crecimiento de *T. latifolia* puede atribuirse a la producción bacteriana de AIA.

Esta hormona es el primer contacto entre la bacteria y la semilla, de modo que el AIA penetra la cubierta de la semilla, promoviendo su germinación, regulando el crecimiento y desarrollo de la planta y afectando la biosíntesis de diversos metabolitos (Miljaković et al., 2022). El AIA se ha asociado con la estimulación del desarrollo y alargamiento de los

sistemas radicales (Fahsi et al., 2021). Asimismo, la germinación temprana observada en las semillas tratadas con GRC140 (Figura 3), puede estar relacionada con el AIA, ya que pudo haber estimulado la actividad de enzimas específicas (Qessaoui et al., 2019), como la α -amilasa, y de esta manera mejorar los niveles de azúcares solubles de la descomposición del almidón (Mir et al., 2022).

Adicionalmente, el estrés por Cd retrasó e inhibió la germinación de las semillas de *T. latifolia* (Figuras 3 y 4), lo que concuerda con estudios previos donde se ha informado que la toxicidad del Cd disminuye la germinación de semillas de *Capsicum annuum* L. (Liaquat et al., 2020), de maíz (Shahzad et al., 2021) y trigo (Maslennikova et al., 2022). Sin embargo, las PGPR pueden mejorar la tolerancia de las plantas a condiciones estresantes por metales pesados. La inoculación de semillas de plantas con especies de microorganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, etc., incrementa la capacidad de resistencia a metales pesados (Shahzad et al., 2021). En el presente estudio, transcurridas 48 h, las semillas inoculadas con GRC140 mostraron una germinación acelerada en comparación con las no inoculadas en las mismas condiciones de estrés (Figura 3). Si bien la inoculación de GRC140 en presencia de Cd aumentó el porcentaje de germinación (Figura 4), este aumento no fue significativo. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas donde se ha reportado que la inoculación de *Bacillus pumillus* aumentó el porcentaje de germinación de semillas de *Zea mays* L. (Shahzad et al., 2021), *Bacillus anthracis* PM21 mejoró significativamente la germinación de las semillas de *Sesbania sesban* (Ali et al., 2021) y *P. fluorescens* PGPR-7 aumentó la eficiencia de germinación de garbanzo (Syed et al., 2023) bajo distintas concentraciones de Cd.

El Cd tiene efectos negativos en las semillas, incluyendo un retraso y disminución en la germinación, anomalías generales y reducción del alargamiento de brotes y raíces (Kotoky et al., 2019). Está claro que la inoculación con *P. rhodesiae* GRC140 mejora la germinación o el crecimiento de las plantas y que la exposición a Cd afecta el crecimiento de *T. latifolia*.

5.2 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd

5.2.1 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en el fenotipo de *T. latifolia*

Para determinar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd, primeramente, se estableció el cultivo hidropónico. En hidroponía, las plantas se cultivan en

sistemas sin suelo en los que los nutrientes se proporcionan a través de una solución nutritiva a base de agua (Khan et al., 2020). En comparación con los sistemas de suelo, los sistemas hidropónicos producen rendimientos mayores y períodos de crecimiento más cortos, ya que los nutrientes están más disponibles para la planta y el crecimiento de las raíces es más rápido (Stegelmeier et al., 2022).

Los sistemas de hidroponía se han utilizado para estudiar los fenotipos de las plantas, la disponibilidad de nutrientes, las respuestas al estrés biótico o abiótico y la exposición a elementos tóxicos. Se han empleado sistemas hidropónicos para el crecimiento de *A. thaliana* (van Delden et al., 2020), *Latuca sativa* (Goddek & Vermeulen, 2018; Majid et al., 2021; Sapkota et al., 2019), *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L. (Kawasaki et al., 2018), entre muchas más, lo que indica la amplia aceptación del sistema de hidroponía para el establecimiento de cultivos.

El sistema hidropónico ofreció una accesibilidad mejorada y una separación menos invasiva del tejido radicular y de brotes, ya que con el uso de un medio líquido se evitó la manipulación física adicional, eliminando la posibilidad de causar daños mecánicos, pérdida de tejido y estrés, tal como menciona Kulkarni et al. (2018).

P. rhodesiae GRC140 es una bacteria aislada de las raíces de *T. latifolia*, considerada una PGPR debido a que solubiliza fosfatos, produce sideróforos, sintetiza AIA y PAA y tiene actividad ACC-desaminasa. Además, se ha visto que estimula el crecimiento de *C. sativus* L. expuesta a Cd (Rolón-Cárdenas, 2020) y el de *A. thaliana* Col-0 en ausencia y presencia de Cd (Rolón-Cárdenas et al., 2021). Esto concuerda con hallazgos de otros grupos de investigación, que han demostrado que cepas de *P. rhodesiae* promueven el crecimiento de *Solanum lycopersicum* (Romero et al., 2016), *C. aconitifolius*, *Phaseolus vulgaris*, *Bacopa monnieri* (John Jimtha & Radhakrishnan, 2018), *Phaseolus vulgaris* L. (Nath et al., 2022) y *Oryza officinalis* (Tian et al., 2023).

Algo que hay que destacar en este estudio es la observación de un mayor desarrollo de pelos radiculares en las plantas de *T. latifolia* inoculadas con GRC140 (Figura 7). El desarrollo de pelo radicular está fuertemente controlado por señales hormonales (Vissenberg et al., 2020). Las fitohormonas, especialmente las auxinas, desempeñan un papel esencial como moléculas señalizadoras en el crecimiento y desarrollo de pelo radicular (Li et al.,

2022). Las PGPR son capaces de modular la arquitectura de las raíces debido a su potencial para secretar AIA (Grover et al., 2021), una auxina que controla muchos procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Dahmani et al., 2020). Los resultados actuales concuerdan con hallazgos anteriores; la inoculación con *Bacillus amyloquefaciens* UCMB5113 (Asari et al., 2017) o *Paenibacillus lentimorbus* B-30488 (Dixit et al., 2022) aumentó la formación de pelos radiculares de *A. thaliana*, mientras que *Bacillus megaterium* RmBm31 aumentó la longitud de los pelos radiculares en plántulas de *A. thaliana* Col-0 (Dahmani et al., 2020). Algunas especies de *Pseudomonas* también alteran la arquitectura del sistema de raíces a través de la producción de AIA, como *Pseudomonas* PS01, que promovió la formación de raíces laterales y de pelos radiculares en *A. thaliana* (Chu et al., 2020). Sin embargo, las PGPR no necesariamente tienen que producir auxinas para ejercer un efecto sobre la arquitectura del sistema radicular, ya que el desarrollo de las raíces es un proceso complejo que involucra distintos componentes, reguladores clave como factores de transcripción y miARN, que pueden verse afectados por la inoculación de PGPR (Asari et al., 2017).

A pesar de que, *P. rhodesiae* posee rasgos PGPR que se han visto reflejados en el incremento del peso fresco total, la longitud de raíces y brotes y la formación de raíces laterales (John Jimtha & Radhakrishnan, 2018; Rolón-Cárdenas et al., 2021) y su potencial como promotora del crecimiento en otras plantas, GRC140 no tuvo un efecto significativo en los pesos fresco y seco de *T. latifolia* respecto al control (Figura 8). Soumya et al. (2020) encontró resultados similares en plantas de *Amaranthus tricolor* L. al ser tratadas con *P. rhodesiae*, ya que no hubo variaciones significativas en peso fresco y peso seco. Esto sugiere que *P. rhodesiae* GRC140 ejerce un efecto significativo en el desarrollo temprano de *T. latifolia* y no en plantas de 1 mes de edad cultivadas en sistemas de hidroponía; aunque se podría buscar un sistema alternativo que permita monitorear diariamente el crecimiento de *T. latifolia* durante la interacción con GRC140 para conocer si hay un efecto, y no únicamente al finalizar los 10 días de interacción.

Por otro lado, el Cd afectó notablemente el fenotipo de las plantas, presentando hojas cloróticas y un decremento significativo en la biomasa de los brotes de *T. latifolia* (Figuras 7 y 8). Estos resultados fueron similares a los de Shahzad et al. (2021), quienes reportaron

síntomas visuales de marchitamiento en el maíz (*Zea mays* L.) y una disminución en el peso fresco de las plantas al estar expuestas a 75 mg de Cd. Igualmente, Zhao et al. (2021), informaron que el Cd tuvo un impacto negativo sobre el crecimiento del sasafrás y disminuyó la biomasa de hojas, ramas y raíces. También, se ha informado que el Cd reduce los pesos fresco y seco de brotes y raíces de *Eruca sativa* L. (Yildirim et al., 2019) y *Oryza sativa* L. (Riaz et al., 2021). Estos efectos pueden ser atribuidos a la toxicidad inducida por el Cd. Se ha reportado que las plantas expuestas a metales tóxicos muestran síntomas como clorosis de las hojas y una disminución en el peso fresco y seco (El Rasafi et al., 2022; Jawad Hassan et al., 2020). Lo anterior resulta porque el Cd puede limitar o inhibir la fotosíntesis de las plantas, lo que debilita su capacidad fotosintética y, en consecuencia, reduce la biomasa (Zhao et al., 2021). Asimismo, en vista de la similitud del Cd con otros iones divalentes esenciales, éstos pueden ser reemplazados en plantas expuestas al Cd, afectando así procesos fisiológicos importantes y provocando daños morfológicos y estructurales (Emiliani et al., 2021).

5.2.2 Comportamiento del pH en el medio hidropónico

Las raíces de las plantas son capaces de inducir cambios de pH en la rizosfera, liberando iones protones (H^+) o hidroxilo (OH^-) para mantener un equilibrio iónico, dependiendo del estado nutricional de la planta (Neina, 2019).

En este estudio, todo el medio de cultivo hidropónico utilizado para el crecimiento de *T. latifolia* tenía un pH de 5.7, sin embargo, conforme las plantas de *T. latifolia* fueron creciendo en los sistemas durante 30 días, el pH descendió hasta 3.6 (Figura 9). Posteriormente, se realizó un cambio de medio para someter a las plantas a una fase de aclimatación con GRC140 durante 6 días, al término del periodo el pH descendió a 4.5 y a 4.0 en sistemas inoculados y no inoculados, respectivamente (Figura 9). En un estudio previo, Faget et al. (2013) encontró que el maíz (*Zea mays* L.) inicialmente acidificó la rizosfera pero la alcalinizó gradualmente con el tiempo. Estos descensos de pH en el medio hidropónico podrían estar relacionados con la influencia que ejerce la planta por absorber determinados nutrientes de manera selectiva, podría ser que las plantas absorbieran una mayor cantidad de cationes, lo que resulta en una liberación de H^+ , descendiendo el pH (Javed et al., 2021; Neina, 2019). Otros procesos que podrían contribuir en cierta proporción en la disminución

del pH es la exudación de las raíces y la respiración, como resultado de la acumulación de CO₂, lo que formaría ácido carbónico (Hinsinger et al., 2003).

Las plántulas post-aclimatación fueron sometidas a un cambio de medio hidropónico, en presencia y ausencia de 40 ppm de Cd, según fuera el tratamiento. Al término de la exposición, los sistemas inoculados con GRC140 mantuvieron un pH similar a la inicial de 5.7, mientras que, en presencia de Cd, el pH descendió hasta 3.0 (Figura 9). Lo anterior puede ser atribuido a un mecanismo para mejorar la disponibilidad del Cd en la solución (Hussain et al., 2021), un pH ácido aumenta la formación de iones libres de Cd²⁺, lo cual es deseable para una mejor absorción del metal por parte de la planta (Agarwal et al., 2023). A un pH bajo, existe una mayor capacidad intercambiable entre Cd²⁺ y H⁺ (Zhang et al., 2020). Se ha reportado que una disminución en el pH ha dado como resultado una mejor disposición y absorción de Cd²⁺ por plantas de *Panicum virgatum* L. (Reed et al., 2002) y *Oryza sativa* (Hu et al., 2016; Li et al., 2020).

5.2.3 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en el contenido de glutatión de *T. latifolia*

Es bien sabido que cuando las plantas están expuestas al estrés por Cd, una de las consecuencias inmediatas es la producción de una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede causar daño oxidativo en las células (Chen et al., 2019; Peco et al., 2020; Sahile et al., 2021). Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos para prevenir el daño de ROS, que constan de componentes enzimáticos y no enzimáticos (Ullah et al., 2019). El glutatión (GSH) es una molécula esencial que participa en la defensa antioxidante no enzimática y su nivel indica el estado redox general de la planta (Molina et al., 2020). Además, es un precursor de fitoquelatinas, que forman complejos con metales pesados y los transportan a vacuolas donde son secuestrados y fijados como elementos no tóxicos (Li et al., 2021).

Como se esperaba, la presencia de Cd en el medio hidropónico condujo a un incremento en los niveles de GSH en el tejido radicular de *T. latifolia* (Figura 10), lo que concuerda con Rolón-Cárdenas et al. (2022), quienes demostraron que el estrés por Cd induce la síntesis de GSH total en el tejido radicular de *T. latifolia* expuesta a 10, 20 y 40 mg/L de Cd. Se observaron resultados similares en plantas de trigo expuestas a 5 µM de Cd (Zhang et al., 2021), y en plantas de soja (*Glycine max* L.) después de 40 días de exposición a Cd

(Molina et al., 2020). Otro estudio reportó que el contenido de GSH de plantas de *Lonicera japónica* expuestas a 10, 30, 80, 150 y 200 ppm de Cd incrementó significativamente con el tiempo durante 70 días. Los niveles de GSH alcanzaron un máximo al día 70 en respuesta a los tratamientos de 80, 150 y 200 ppm de Cd, aumentando en un 69 %, 65 % y 99 %, respectivamente (Li et al., 2022).

Por otro lado, se ha descrito que las bacterias endófitas mejoran la defensa de las plantas, evitando la acumulación de ROS y aliviando el daño oxidativo (Ullah et al., 2019). En este sentido, la inoculación con *P. rhodesiae* GRC140 disminuyó los niveles de GSH hasta niveles basales en *T. latifolia* expuesta a Cd (Figura 10). Lo anterior concuerda con lo expuesto por Sahile et al. (2021), quienes informaron un mayor contenido de GSH en plantas de soja expuestas a 0.7, 1.4 y 2.1 mM de Cd, pero que la inoculación de la PGPR *Bacillus cereus* ALT1 disminuyó dichos niveles. Otro estudio encontró que bacterias endófitas *Serratia* sp. IU01 y *Enterobacter* sp. IU02, aisladas de *Solanum nigrum* L., disminuyeron los niveles de GSH en *Brassica juncea* expuesta a 5-25 mg/kg de Cd (Ullah et al., 2019).

Por lo que, nuestros resultados sugieren que *P. rhodesiae* GRC140 desempeña un efecto protector en plantas de *T. latifolia* contra el estrés oxidativo inducido por el Cd.

Las PGPR modulan el sistema de defensa antioxidante (Khanna et al., 2019), por lo que *P. rhodesiae* GRC140 podría minimizar el estrés por Cd no sólo a través de la actividad de glutatión, sino mediante el mejoramiento de las actividades de enzimas antioxidantes y de antioxidantes no enzimáticos, Sin embargo, se desconocen dichas actividades y la eficiencia de GRC140 sobre otros agentes antioxidantes.

5.2.4 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la fuga de electrolitos de *T. latifolia*

Tras la exposición al estrés por Cd, las ROS pueden oxidar los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que provoca un estrés oxidativo, causando daño celular, fuga de electrolitos y muerte celular (Sharma et al., 2022).

El funcionamiento adecuado de las células se logra mediante niveles óptimos de electrolitos y contenido de agua dentro de la célula (Ali et al., 2021), por lo que, la integridad de las membranas celulares durante el estrés por Cd se evaluó mediante el porcentaje de fuga de electrolitos. En el presente estudio, se encontró un aumento significativo en la fuga de

electrolitos de las raíces de *T. latifolia* expuestas a Cd (Figura 11). Se sabe que las ROS activan los canales iónicos de membrana que liberan iones de potasio (K^+) intracelulares, estimulando las enzimas hidrolíticas intracelulares que conducen a la muerte celular (Demidchik, 2018). Aunque los niveles de ROS no se determinaron en este estudio, la razón por la que la fuga de electrolitos se encontró elevada en el sistema radicular de *T. latifolia*, podría explicarse por la producción de ROS inducidas por el Cd, indicando estrés oxidativo. Lo anterior concuerda con Rolón-Cárdenas et al. (2022), quienes observaron un incremento en la fuga de electrolitos en raíces de *T. latifolia* expuestas a 20 y 40 mg/L de Cd. Otros estudios indicaron que el estrés por Cd incrementó la fuga de electrolitos en plantas de garbanzo (Ahmad et al., 2021), maíz (Shahzad et al., 2021) y trigo (Maslennikova et al., 2022, 2023).

Investigaciones previas describen que el empleo de PGPR puede mitigar el estrés oxidativo inducido por el Cd, por ejemplo, la inoculación con *Serratia* sp. IU01 y *Enterobacter* sp. IU02 redujo la fuga de electrolitos en *Brassica juncea* expuesta a 5-25 ppm de Cd (Ullah et al., 2019) mientras que, *B. subtilis* 10-4 mitigó el estrés en *Triticum aestivum* (Maslennikova et al., 2023). Otro estudio reveló que la aplicación de *Bacillus anthracis* PM21 redujo la fuga de electrolitos en plantas de *S. sesban* estresadas bajo a 100, 150 y 200 mg/L de Cd (Ali et al., 2021), asimismo, Raihan et al. (2022) encontraron niveles más bajos de fuga de electrolitos cuando plantas de *Brassica campestris* expuestas a Cd habían sido inoculadas con *Paraburkholderia fungorum* y *Delftia* sp. A pesar de no ser significativa, en este trabajo se observó una disminución de la fuga de electrolitos en las plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd que fueron inoculadas con GRC140 (Figura 11), lo que sugiere que podría fortalecer en menor medida la integridad de la membrana bajo estrés por Cd.

5.3 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*

Se ha informado que las PGPR contribuyen en gran medida a mejorar la fitorremediación (Zhu et al., 2023). En este trabajo, *P. rhodesiae* GRC140 mejoró significativamente el contenido de Cd en brotes y raíces de *T. latifolia* (Figura 12). Lo anterior sugiere, que la bacteria facilita la movilización del Cd del medio a las raíces y promueve la translocación al tejido aéreo de la planta. Estos resultados son similares a aquellos reportados en plantas de *T. latifolia* de 2 meses (Rolón-Cárdenas et al., 2022), ya que en condiciones hidropónicas

GRC140 incrementó el contenido de Cd en los brotes. De igual manera, la inoculación de las cepas *Burkholderia* SaMR10 y *Sphingomonas* SaMR12 promueve la acumulación de Cd en el brote y la raíz de *Brassica juncea* (Wang et al., 2019); la inoculación de *P. fluorescens* mejoró la concentración de Cd en el tejido aéreo y radicular de *S. alfredii* (Wu et al., 2020) y *Bacillus* sp. Kz5 y *Enterobacter* sp. Kz15 mejoraron significativamente las concentraciones de Cd en *Brassica juncea* en comparación con aquellas no inoculadas (Zhang et al., 2023). Wu et al. (2020) mencionan que el aumento en la concentración de Cd en las plantas después de ser inoculadas con PGPR puede estar relacionado con el aumento de la biomasa seca, debido al efecto promotor de la PGPR. Sin embargo, en este estudio no se encontró un incremento significativo en los resultados de la biomasa en el experimento hidropónico, por lo que, el efecto observado en el contenido de Cd podría explicarse por el desarrollo de una mayor cantidad de pelos radiculares en las raíces inoculadas con GRC140, permitiendo una mayor captación del metal o la regulación positiva de genes que codifican transportadores de metales hacia los brotes (Pan et al., 2017).

Adicionalmente, Abeer et al. (2022) han reportado que la inoculación de PGPR *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus subtilis* mejora la remoción de Cd por parte de *Helianthus annuus* L., en comparación con las plantas no inoculadas. En este estudio, a pesar de que después de los diez días de exposición al metal, el nivel de Cd en la solución hidropónica disminuyó significativamente, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de remoción por parte de *T. latifolia* en ausencia y presencia de GRC140, aunque este último haya aumentado (Figura 13A).

En relación con el factor de bioconcentración (BCF), este ayuda a estimar la exposición a contaminantes y la absorción de las plantas (Nino Savala et al., 2021). El BCF indica la capacidad de la planta para acumular el metal en las raíces respecto a la concentración del suelo (Medina Marcos & Montano Chávez, 2014). En este trabajo, la inoculación con *P. rhodesiae* GRC140 mejoró el BCF en *T. latifolia* (Figura 13B), lo que concuerda con hallazgos anteriores. La inoculación con *B. pumilus* mejoró el BCF de *Z. mays* (Hayat et al., 2020), mientras que, la cepa *Bacillus anthracis* PM21 indujo altos niveles de BCF en plantas de *Sesbania sesban* L. expuestas a 100 y 200 mg/kg de Cd, en comparación con aquellas plantas no inoculadas (Ali et al., 2021). Las plantas que tienen valores de BCF

mayores a 1, son adecuadas para la translocación de Cd del suelo a los tejidos aéreos (Hayat et al., 2020; Wang et al., 2018). Por lo tanto, *P. rhodesiae* GRC140 podría incrementar la movilización del Cd a los brotes de *T. latifolia*.

En lo que respecta al coeficiente de bioacumulación (BAC), es un indicador del comportamiento de acumulación de metales de las plantas (Matić et al., 2019). Es la proporción del metal contenido en la parte aérea de la planta en relación con el suelo (Espinoza Pincay & Vallejo Caicedo, 2019; Renu et al., 2022) y resulta útil para elegir la planta adecuada en la fitorremediación de los suelos contaminados (Bader et al., 2020). En este estudio, el BAC mejoró con la inoculación de GRC140 (Figura 13C). De manera similar, se ha encontrado un aumento del BAC en plantas de *Z. mays* y *Spinacia oleracea* L. expuestas a Cd inoculadas con *B. pumilus* y *Ochrobactrum intermedium* BB12, respectivamente (Hayat et al., 2020; Renu et al., 2022). Otro estudio previo, demostró que la inoculación de las rizobacterias *Enterobacter cloacae* RCB980, *Klebsiella pneumoniae* kpa, y *Klebsiella* sp. XT-2 mejora el BAC en plantas de *Pennisetum giganteum* expuestas a 25 mg/kg de Cd (Yankey et al., 2021).

Por otro lado, el factor de translocación (FT) mide la capacidad de la planta para trasladar el metal desde la raíz hasta los brotes (de Oliveira Mesquita et al., 2021). Los principales criterios que limitan la fitoextracción son la translocación de metales, la producción de biomasa y la acumulación de metales en los tejidos vegetales. Dado que la recolección de las raíces de plantas que acumulan metales durante la fitoextracción no es factible, es necesario tener en cuenta el movimiento de metales a los órganos aéreos, ya que la recolección de tejidos aéreos puede ser una solución rentable en este proceso (Konkolewska et al., 2020). En el presente estudio, no hubo diferencias significativas en el FT en presencia y ausencia de GRC140, aunque el FT osciló entre 0.8514 y 1.067 (Figura 13D). Sin embargo, en un estudio previo, se demostró que la inoculación de GRC140 en plantas de *T. latifolia* de 2 meses mejoró significativamente el FT de Cd en las plantas (Rolón-Cárdenas et al., 2022). Adicionalmente, se ha encontrado que la inoculación con *Lelliottia jeotgali* MR2 y *Sphingomonas* SaMR12 mejora la translocación de Cd (factor de translocación >1) en *Miscanthus floridulus* (Lab.) y *S. alfredii*, respectivamente (Liu et al., 2021; Pan et al., 2017). El FT es un índice importante para seleccionar plantas que puedan

ser utilizarlas en fitorremediación (Woraharn et al., 2021). Valores altos de FT (>1) sugieren que la planta puede absorber Cd del suelo y almacenarlo en el tejido aéreo de manera eficiente (Wang et al., 2018). Aunque GRC140 no mejoró el FT en este trabajo, probablemente como un mecanismo de tolerancia, *T. latifolia* por sí sola tiene una buena capacidad para transferir el Cd de las raíces a los brotes en las condiciones experimentales evaluadas.

El estudio actual sugiere que *P. rhodesiae* GRC140 está involucrada en la biodisponibilidad y movilización del Cd, debido a la acumulación en el tejido radicular y aéreo, y puede considerarse como una estrategia para remediar sitios contaminados con Cd.

Rolón-Cárdenas (2017) ha reportado que *P. rhodesiae* GRC140 puede adsorber Cd²⁺ en su superficie celular, consecuencia de las interacciones electrostáticas entre los iones metálicos y los grupos funcionales de la pared celular cargados negativamente. Además, la producción de pioverdina y la formación de biopelículas pueden estar implicados en su tolerancia a Cd. Sin embargo, se sugiere su uso en combinación con *T. latifolia* para incrementar la eficiencia en la remediación de Cd.

Aunque GRC140 muestra tolerancia a Zn, Ni y Co y se ha sugerido que presenta mecanismos de tolerancia a distintos metales pesados (Rolón-Cárdenas, 2017), en este estudio se utilizó el Cd por ser un contaminante tóxico presente en el suelo que puede ingresar a los tejidos de las plantas a través de los transportadores de nutrientes esenciales y una vez dentro de las células vegetales, puede entrar a la cadena alimentaria, amenazando la salud de todos los organismos vivos (Pérez Olvera et al., 2008; Vazquez et al., 2001). También, tiene una mayor movilidad y una biodisponibilidad que otros metales, encontrándose libre en un amplio rango de pH, incluso, es de los más tóxicos a bajas concentraciones. Las regulaciones estándares establecen límites permisibles por debajo de 1 ppm de Cd en suelos y agua potable. A diferencia de otros metales pesados, la distribución de los sitios contaminados con Cd y el tiempo de permanencia en la atmósfera son mayores (Ramírez, 2002).

5.4 Efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en la expresión de genes involucrados en la tolerancia a Cd por *T. latifolia*

La mayoría de los estudios de fitorremediación de Cd realizados con *T. latifolia*, se han enfocado en análisis fisiológicos o fisicoquímicos, donde han evaluado su capacidad de

remoción, sin embargo, hasta el momento se desconocen las respuestas adaptativas que ocurren a nivel molecular.

Está documentado que, bajo condiciones de estrés ambiental, las plantas exhiben respuestas moleculares que las ayudan a adaptarse a las condiciones ambientales. La respuesta molecular de las plantas al estrés por metales consiste en la síntesis de moléculas y proteínas de señalización, como transportadores y quelantes de metales (Jalmi et al., 2018). Se han identificado varios genes inducidos por estrés por metales utilizando diferentes enfoques ómicos en varias plantas (Tiwari & Lata, 2018). Sin embargo, los estudios genómicos del género *Typha* son limitados.

Actualmente, la RT-qPCR se ha convertido en un método eficaz para analizar patrones de expresión genética en estudios de biología vegetal (Sang et al., 2013). Las plantas tienen genes quelantes de metales y sus proteínas posteriores, incluidas las metalotioneínas (MT) y fitoquelatinas (PC), que son necesarias para que las células vegetales mantengan la homeostasis y el secuestro de los metales (Agarwal & Rani, 2022). En este sentido, en el presente estudio se analizó la expresión de los genes de metalotioneína y fitoquelatina sintasa, que se han visto involucrados en la tolerancia a Cd (Li et al., 2019; Riyazuddin et al., 2021; Venegas-Rioseco et al., 2021).

Las metalotioneínas, proteínas ricas en cisteína de bajo peso molecular (Duan et al., 2019), tienen una alta afinidad para unirse a iones metálicos mono y divalentes en el citoplasma y posteriormente secuestrarlos en la vacuola o sacarlos de las células (Wei et al., 2022) y además son conocidas por sus propiedades redox (Agarwal & Rani, 2022). Las células las utilizan para inmovilizar, secuestrar y desintoxicar iones metálicos, entre ellos el Cd (Hasan et al., 2017).

Algunos estudios han informado un incremento en el nivel de expresión de genes de MT, por ejemplo, Cheng et al. (2021) identificaron varios genes de MT en especies del género *Oryza*, donde la expresión de los genes *OsMT-1*, *OsMT-4*, *OsMT-5*, *OsMT-6*, *OsMT-7*, *OsMT-8* y *OsMT-9*, tuvo una tendencia de aumento pronunciado entre las 12 y 24 h después de haber sido expuestas a Cd, mientras que las primeras 12 horas mantuvieron niveles de expresión sin cambios aparentes, por otro lado, el nivel de expresión de *SaMT2* aumentó en raíces de *S. alfredii* expuestas a 100 μ M de Cd durante 8 días; incluso la

sobreexpresión de estos genes ha mejorado la tolerancia y acumulación de Cd en los brotes de plantas transgénicas de tabaco (Zhang et al., 2014). Sin embargo, en este estudio la exposición a Cd no indujo un aumento significativo en el nivel de expresión del gen de MT en las raíces de *T. latifolia* (Figura 14A). Se observaron resultados similares en raíces de *Sulla coronaria* expuestas a 30 días con Cd, ya que el nivel de expresión de *ScMT* disminuyó significativamente en los tratamientos con 100 y 200 μM de Cd, incluso en aquellos que habían sido inoculados previamente con un consorcio bacteriano (*Rhizobium sullae* y *Pseudomonas* sp.) (Chiboub et al., 2020); también, la expresión del gen *MT2* en raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) fue reprimido a las 3 y 24 h después de haber sido expuestas a Cd (Wei et al., 2022). Los genes de MT tienen diferentes patrones de expresión específicos de tejidos, generalmente los MT1 se expresan predominantemente en raíces, mientras que los MT2 en hojas (Zhang et al., 2014), y debido a que el gen de MT analizado en este estudio es de tipo 2, su expresión genética en las raíces podría verse influenciada por lo anterior. Asimismo, los genes MT pueden tener diferentes funciones específicas dependiendo de la especie vegetal, por lo que otros tipos de MT podrían estar desempeñando un papel clave en la desintoxicación de Cd en *T. latifolia*, tal como menciona Chiboub et al. (2020), o la tolerancia y acumulación de cadmio podría derivar de otros mecanismos.

De manera similar, las plantas sintetizan fitoquelatinas al inicio del estrés por metales porque desempeñan un papel clave en la mediación de la tolerancia de las plantas a los metales pesados (Hasan et al., 2017). Éstas son importantes quelantes del Cd y se sintetizan enzimáticamente por la fitoquelatina sintasa (PCS) (Chiboub et al., 2020; Hernández-Baranda et al., 2019). La exposición a metales pesados puede manifestarse a nivel molecular mediante alteraciones en la expresión de la PCS (Lancíková et al., 2020). Un estudio reciente reportó que la expresión de los genes *MnPCS1* y *MnPCS2* se indujo en la raíz de *Morus notabilis* transcurridas 24 h de ser expuestas a 30 y 100 μM de Cd (Fan et al., 2018). También se ha informado una regulación positiva del nivel de expresión de *PCS* en *S. alfredii* durante las primeras 72 h de ser expuesta a Cd (Sang et al., 2013), en raíces de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* x *A. hybridu* después de 14 días del tratamiento con Cd (Lancíková et al., 2020) y en *Oryza sativa* después de estar bajo estrés por 20 días (Jan et al., 2019). Además, la sobreexpresión de *PCS* ha incrementado la fitorremediación en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y tabaco (Fan et al., 2018; Guo et al., 2008). Sin embargo, plantas de

Sulla coronaria sometidas a 100 μM de Cd, plantas inoculadas con *Rhizobium sullae* y *Pseudomonas* sp. y tratadas con 100 μM de Cd y plantas inoculadas y tratadas con 200 μM de Cd registraron niveles de expresión de *ScPCS* más bajas respecto al control (Chiboub et al., 2020). Si bien los genes de PCS pueden estar implicados en la desintoxicación de Cd, en las condiciones utilizadas en este trabajo se observó un decremento del nivel de expresión en las raíces de *T. latifolia* expuestas a Cd (Figura 14B), aunque éste no fue significativo, por lo que podría tratarse de un gen de expresión temprana.

Por otra parte, un estudio previo realizó un estudio de genómica funcional en *T. angustifolia* en el cual se identificaron genes expresados diferencialmente en presencia de Cd (Xu et al., 2015). Basándonos en ese estudio, se seleccionaron los genes reprimidos CL7951 y CL354, y los genes inducidos CL3870 y Unigene11164, para cuantificar sus niveles de expresión en *T. latifolia* expuesta a Cd (Figura 14C-F). El tratamiento con GRC140 indujo la expresión del gen CL3870, mientras que los genes CL7951, CL354 y Unigene11164 se encontraron reprimidos en el tejido radicular de *T. latifolia* expuesta a Cd durante 10 días, por lo que podría tratarse de genes de expresión temprana, ya que Xu et al. (2015) realizaron el análisis en las primeras 24 h de exposición. Si bien, falta estudiar con mucho más detalle las respuestas adaptativas que ocurren a nivel molecular en *T. latifolia* en respuesta al estrés por Cd y durante su interacción con *P. rhodesiae* GRC140, el trabajo actual brinda información que podría ser útil y dar partida a toma de decisiones para investigaciones posteriores e intentar dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la tolerancia a Cd.

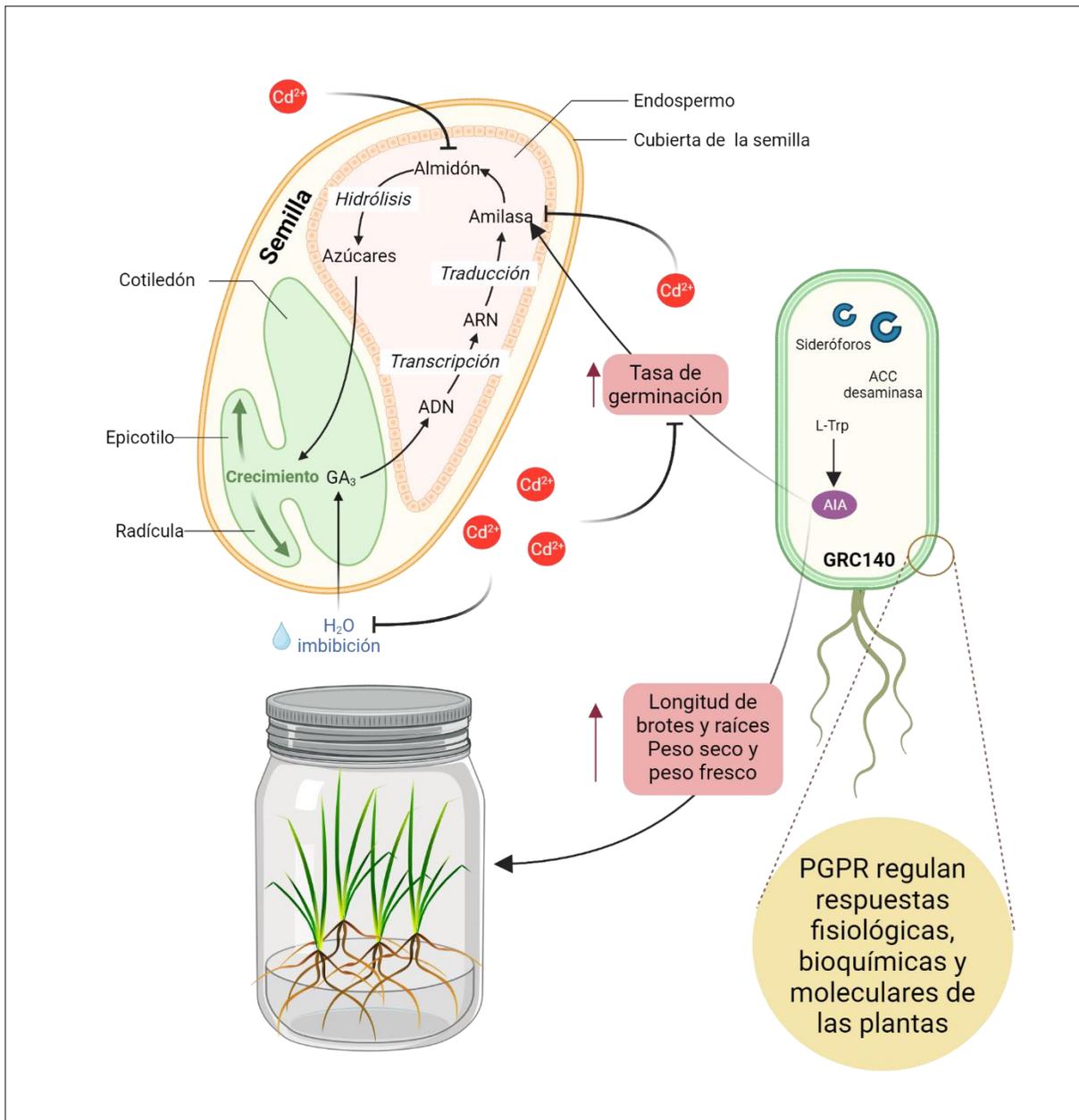


Figura 15. Modelo propuesto de los mecanismos implicados en la germinación de *T. latifolia* en presencia de *P. rhodesiae* GRC140 y Cd. El efecto positivo de *P. rhodesiae* GRC140 sobre la germinación y el crecimiento podría estar relacionado con la síntesis de AIA y la estimulación de la actividad de enzimas específicas como la α -amilasa. El Cd puede inhibir la germinación de las semillas a través de la alteración en la absorción de agua, el funcionamiento normal de enzimas y la movilización del almidón.

CONCLUSIONES

- Los primeros efectos positivos de *P. rhodesiae* GRC140 sobre *T. latifolia* se observaron durante la prueba de germinación realizada en agar agua: GRC140 indujo un desarrollo temprano de la planta (81 % de germinación), la exposición a Cd limitó el porcentaje de germinación (30 %) y el tratamiento bacteriano mejoró la tasa de germinación (51 %) de las semillas expuestas a Cd después de 48 h.
- El tratamiento de las semillas con *P. rhodesiae* GRC140 promovió el crecimiento vegetal de *T. latifolia*, mejorando la longitud de brotes y raíces, y la biomasa de las plántulas, después de 15 días de interacción.
- En condiciones hidropónicas, *P. rhodesiae* GRC140 promueve el desarrollo de pelos radiculares en *T. latifolia* después de 10 días de interacción, mientras que el Cd provoca marchitamiento del tejido aéreo.
- Se conoció el comportamiento del pH en el medio hidropónico, y existen fluctuaciones en el transcurso del desarrollo de *T. latifolia*, y durante la interacción con *P. rhodesiae* GRC140 y el Cd.
- El contenido de GSH se encontró elevado en el tejido radicular de *T. latifolia* expuesta a Cd (995.8 nmol GSH/g PF), mientras que el tratamiento con *P. rhodesiae* GRC140 en plantas expuestas a Cd minimizó el contenido de GSH hasta niveles basales (229.133 nmol GSH/g PF), como un mecanismo de tolerancia y disminuyendo el estrés causado por el metal.
- La exposición a Cd afectó la integridad de las membranas celulares de *T. latifolia*, ocasionando un incremento (63%) significativo en la fuga de electrolitos.
- La inoculación de *P. rhodesiae* GRC140 incrementó 1.5 veces el contenido de Cd en brotes y 1.2 veces en raíces de *T. latifolia* y mejoró el factor de bioconcentración (BCF) y el coeficiente de bioacumulación (BAC).
- La cuantificación de los niveles relativos de expresión mostró que los genes de metalotioneína, CL7951, CL354, CL3870 y Unigene11164 se encontraron

reprimidos en *T. latifolia* expuesta a Cd, mientras que *P. rhodesiae* GRC140 indujo la expresión del gen CL3870, después de 10 días de interacción.

- Se estandarizaron las condiciones de la interacción de *T. latifolia* con *P. rhodesiae* GRC140 para el análisis de expresión mediante RNAseq.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la tolerancia a otros metales pesados en *T. latifolia* durante su interacción con *P. rhodesiae* GRC140 en condiciones hidropónicas.
- Monitorear diariamente el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en los parámetros de crecimiento de *T. latifolia*, para confirmar o descartar si la bacteria tiene efecto promotor de crecimiento en plantas de 1 mes de edad cultivadas en hidroponía.
- Evaluar la expresión genética relativa del gen de glutatión sintasa, para conocer su comportamiento en *T. latifolia* bajo estrés por Cd.
- Evaluar en qué medida *P. rhodesiae* GRC140 reduce el estrés oxidativo causado por el Cd en comparación con otros antioxidantes exógenos.
- Llevar a cabo el análisis de expresión diferencial mediante RNA-seq de dicha interacción y con los resultados, seleccionar genes de interés o expresados diferencialmente, diseñar oligonucleótidos específicos para dichos genes y mediante RT-PCR en tiempo real, conocer su expresión genética relativa en *T. latifolia*.

REFERENCIAS

- Abeed, A. H. A., Mahdy, R. E., Alshehri, D., Hammami, I., Eissa, M. A., Abdel Latef, A. A. H., & Mahmoud, G. A.-E. (2022). Induction of resilience strategies against biochemical deteriorations prompted by severe cadmium stress in sunflower plant when *Trichoderma* and bacterial inoculation were used as biofertilizers. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1004173>
- Agarwal, P., & Rani, R. (2022). Strategic management of contaminated water bodies: Omics, genome-editing and other recent advances in phytoremediation. *Environmental Technology & Innovation*, *27*, 102463. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102463>
- Agarwal, P., Vibhandik, R., Agrahari, R., Daverey, A., & Rani, R. (2023). Role of Root Exudates on the Soil Microbial Diversity and Biogeochemistry of Heavy Metals. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04465-2>
- Ahmad, P., Raja, V., Ashraf, M., Wijaya, L., Bajguz, A., & Alyemeni, M. N. (2021). Jasmonic acid (JA) and gibberellic acid (GA3) mitigated Cd-toxicity in chickpea plants through restricted cd uptake and oxidative stress management. *Scientific Reports*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98753-8>
- Alaboudi, K. A., Ahmed, B., & Brodie, G. (2018). Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Annals of Agricultural Sciences*, *63*(1), 123-127. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.05.007>
- Alatorre-Cobos, F., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Yong-Villalobos, L., Pérez-Torres, C.-A., Oropeza-Aburto, A., Méndez-Bravo, A., González-Morales, S.-I., Gutiérrez-Alanís, D., Chacón-López, A., Peña-Ocaña, B.-A., & Herrera-Estrella, L. (2014). An improved, low-cost, hydroponic system for growing *Arabidopsis* and

- other plant species under aseptic conditions. *BMC Plant Biology*, 14(1), 69.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-69>
- Ali, J., Ali, F., Ahmad, I., Rafique, M., Munis, M. F. H., Hassan, S. W., Sultan, T., Iftikhar, M., & Chaudhary, H. J. (2021). Mechanistic elucidation of germination potential and growth of *Sesbania sesban* seedlings with *Bacillus anthracis* PM21 under heavy metals stress: An in vitro study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111769. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111769>
- Ali, J., Wang, X., Rafique, M., Ahmad, I., Fiaz, S., Munis, M. F. H., & Chaudhary, H. J. (2021). Phytoremediation of Cadmium Contaminated Soil Using *Sesbania sesban* L. in Association with *Bacillus anthracis* PM21: A Biochemical Analysis. *Sustainability*, 13(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/su132413529>
- Alloway, B. J., & Steinnes, E. (1999). Anthropogenic Additions of Cadmium to Soils. En M. J. McLaughlin & B. R. Singh (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants* (pp. 97-123). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_5
- Al-Naemi, H. A., & Das, S. C. (2020). Cadmium-induced endothelial dysfunction mediated by asymmetric dimethylarginine. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(14), 16246-16253. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08116-5>
- Asari, S., Tarkowská, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D. V., Bejai, S., & Meijer, J. (2017). Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta*, 245(1), 15-30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>
- Azizi, A., Krika, A., & Krika, F. (2020). Heavy metal bioaccumulation and distribution in *Typha latifolia* and *Arundo donax*: Implication for phytoremediation. *Caspian*

- Journal of Environmental Sciences*, 18(1), 21-29.
<https://doi.org/10.22124/cjes.2020.3975>
- Bader, N., Faraj, M., Mohamed, A., Alshelmani, N., Elkailany, R., & Bobtana, F. (2020). Evaluation of the phytoremediation performance of Hammada scoparia and Halocnemum Strobilaceum for Cu, Fe, Zn and Cr accumulation from the industrial area in Benghazi, Libya. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, 3(2), 138-144.
<https://doi.org/10.26655/jmchemsci.2020.2.5>
- Bakulski, K. M., Seo, Y. A., Hickman, R. C., Brandt, D., Vadari, H. S., Hu, H., & Park, S. K. (2020). Heavy Metals Exposure and Alzheimer's Disease and Related Dementias. *Journal of Alzheimer's Disease*, 76(4), 1215-1242. <https://doi.org/10.3233/JAD-200282>
- Baldwin, B., & Cannon, A. (2007). *Typha review*. Utah State University.
- Bartucca, M. L., Cerri, M., Del Buono, D., & Forni, C. (2022). Use of Biostimulants as a New Approach for the Improvement of Phytoremediation Performance—A Review. *Plants*, 11(15), 1946. <https://doi.org/10.3390/plants11151946>
- Belouchi, A., Kwan, T., & Gros, P. (1997). Cloning and characterization of the OsNramp family from Oryza sativa, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, 33(6), 1085-1092.
<https://doi.org/10.1023/a:1005723304911>
- Bonanno, G., & Cirelli, G. L. (2017). Comparative analysis of element concentrations and translocation in three wetland congener plants: Typha domingensis, Typha latifolia and Typha angustifolia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 92-101.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.021>

- Brito-Campo, H. L., Ayala-Santamaría, M. F., Barros-Escalante, K. J., Cubillos-Hinojosa, J. G., Pantoja-Guerra, M. F., Valero, N. O., & Gómez-Gómez, L. (2022). PGPR activity of coal solubilizing bacteria. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia*, 39, e223932. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v39.n2.10](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v39.n2.10)
- Brunetti, P., Zanella, L., De Paolis, A., Di Litta, D., Cecchetti, V., Falasca, G., Barbieri, M., Altamura, M. M., Costantino, P., & Cardarelli, M. (2015). Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter AtABCC3 increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 66(13), 3815-3829. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv185>
- Cajuste, L., Alarcón, A. V., Grabach, C. D. S., González, G., & Bauer, M. (2001). Cadmio, Níquel y Plomo en agua residual, suelo y cultivos en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Agrociencia*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Cadmio%2C-N%3ADquel-y-Plomo-en-agua-residual%2C-suelo-y-en-Cajuste-Alarc%3Bn/9b3886f63296643dff36bd2cbf5dcf8c0fb47eb6>
- Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., Alfaro-De La Torre, M. C., & García-De La Cruz, R. F. (2008). Accumulation and Distribution of Heavy Metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an Artificial Lagoon in San Luis Potosí, México. *Water, Air, and Soil Pollution*, 188, 297-309. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9545-3>
- Chen, B., Luo, S., Wu, Y., Ye, J., Wang, Q., Xu, X., Pan, F., Khan, K. Y., Feng, Y., & Yang, X. (2017). The Effects of the Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the Plant Growth and Cadmium Uptake of *Sedum alfredii* Hance. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02538>

- Chen, H., Li, Y., Ma, X., Guo, L., He, Y., Ren, Z., Kuang, Z., Zhang, X., & Zhang, Z. (2019). Analysis of potential strategies for cadmium stress tolerance revealed by transcriptome analysis of upland cotton. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36228-z>
- Chen, S., Han, X., Fang, J., Lu, Z., Qiu, W., Liu, M., Sang, J., Jiang, J., & Zhuo, R. (2017). *Sedum alfredii* SaNramp6 Metal Transporter Contributes to Cadmium Accumulation in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 7, 13318. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13463-4>
- Cheng, M., Yuan, H., Wang, R., Zou, J., Liang, T., Yang, F., & Li, S. (2021). Genome-Wide Identification and Analysis of the Metallothionein Genes in *Oryza* Genus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijms22179651>
- Chiboub, M., Jebara, S. H., Abid, G., & Jebara, M. (2020). Co-inoculation Effects of *Rhizobium sultae* and *Pseudomonas* sp. On Growth, Antioxidant Status, and Expression Pattern of Genes Associated with Heavy Metal Tolerance and Accumulation of Cadmium in *Sulla coronaria*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1), 216-228. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09976-z>
- Chu, T. N., Bui, L. V., & Hoang, M. T. T. (2020). *Pseudomonas* PS01 Isolated from Maize Rhizosphere Alters Root System Architecture and Promotes Plant Growth. *Microorganisms*, 8(4), 471. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040471>
- Ciotir, C., & Freeland, J. (2016). Cryptic intercontinental dispersal, commercial retailers, and the genetic diversity of native and non-native cattails (*Typha* spp.) in North America. *Hydrobiologia*, 768(1), 137-150. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2538-0>

- Dahmani, M. A., Desrut, A., Moumen, B., Verdon, J., Mermouri, L., Kacem, M., Coutos-Thévenot, P., Kaid-Harche, M., Bergès, T., & Vriet, C. (2020). Unearthing the Plant Growth-Promoting Traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an Endophytic Bacterium Isolated From Root Nodules of *Retama monosperma*. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00124>
- DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G., & Furini, A. (2019). Heavy Metal Pollutions: State of the Art and Innovation in Phytoremediation. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14), 3412. <https://doi.org/10.3390/ijms20143412>
- de Oliveira Mesquita, F., Pedrosa, T. D., Batista, R. O., & de Andrade, E. M. (2021). Translocation factor of heavy metals by elephant grass grown with varying concentrations of landfill leachate. *Environmental Science and Pollution Research International*, *28*(32), 43831-43841. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13765-1>
- Delgado-González, C. R., Madariaga-Navarrete, A., Fernández-Cortés, J. M., Islas-Pelcastre, M., Oza, G., Iqbal, H. M. N., & Sharma, A. (2021). Advances and Applications of Water Phytoremediation: A Potential Biotechnological Approach for the Treatment of Heavy Metals from Contaminated Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(10), 5215. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105215>
- Demidchik, V. (2018). ROS-Activated Ion Channels in Plants: Biophysical Characteristics, Physiological Functions and Molecular Nature. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 1263. <https://doi.org/10.3390/ijms19041263>
- Dixit, R., Agrawal, L., Srivastava, S., & Chauhan, P. S. (2022). *Paenibacillus lentimorbus* Enhanced Abiotic Stress Tolerance Through Lateral Root Formation and Phytohormone Regulation. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*(6), 2198-2209. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10439-7>

- Duan, L., Yu, J., Xu, L., Tian, P., Hu, X., Song, X., & Pan, Y. (2019). Functional Characterization of a Type 4 Metallothionein Gene (CsMT4) in Cucumber. *Horticultural Plant Journal*, 5(3), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2019.04.002>
- Duman, F., Urey, E., & Koca, F. D. (2015). Temporal variation of heavy metal accumulation and translocation characteristics of narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia* L.). *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(22), 17886-17896. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4979-4>
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., Tack, F. M. G., Sebastian, A., Prasad, M. N. V., & Rinklebe, J. (2022). Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(5), 675-726. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435>
- Emiliani, J., Oyarce, W. G. L., Salvatierra, L. M., Novo, L. A. B., & Pérez, L. M. (2021). Evaluation of Cadmium Bioaccumulation-Related Physiological Effects in *Salvinia biloba*: An Insight towards Its Use as Pollutant Bioindicator in Water Reservoirs. *Plants*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/plants10122679>
- Espinoza Pincay, A. Y., & Vallejo Caicedo, R. P. (2019). *Absorción y bioacumulación de metales pesados de tres especies vegetales introducidas en la amazonia ecuatoriana en relaves mineros*. [bachelorThesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esoch.edu.ec/handle/123456789/10578>
- Faget, M., Blossfeld, S., Von Gillhausen, P., Schurr, U., & Temperton, V. (2013). Disentangling who is who during rhizosphere acidification in root interactions: Combining fluorescence with optode techniques. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00392>

- Fahsi, N., Mahdi, I., Mesfioui, A., Biskri, L., & Allaoui, A. (2021). Phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from jujube ziziphus lotus plant stimulate wheat germination rate and seedlings growth. *PeerJ*, 9, e11583. <https://doi.org/10.7717/peerj.11583>
- Fan, J., Cai, C., Chi, H., Reid, B. J., Coulon, F., Zhang, Y., & Hou, Y. (2020). Remediation of cadmium and lead polluted soil using thiol-modified biochar. *Journal of Hazardous Materials*, 388(122037). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122037>
- Fan, W., Guo, Q., Liu, C., Liu, X., Zhang, M., Long, D., Xiang, Z., & Zhao, A. (2018). Two mulberry phytochelatin synthase genes confer zinc/cadmium tolerance and accumulation in transgenic Arabidopsis and tobacco. *Gene*, 645, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.042>
- Franchi, E., & Fusini, D. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Assisted Phytoremediation of Inorganic and Organic Contaminants Including Amelioration of Perturbed Marginal Soils. En *Handbook of Assisted and Amendment: Enhanced Sustainable Remediation Technology* (pp. 477-500). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119670391.ch23>
- Garcia-Lemos, A. M., Großkinsky, D. K., Saleem Akhtar, S., Nicolaisen, M. H., Roitsch, T., Nybroe, O., & Veierskov, B. (2020). Identification of Root-Associated Bacteria That Influence Plant Physiology, Increase Seed Germination, or Promote Growth of the Christmas Tree Species *Abies nordmanniana*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 566613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.566613>
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The Effects of Cadmium Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3782. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>

- Ghosh, U. D., Saha, C., Maiti, M., Lahiri, S., Ghosh, S., Seal, A., & MitraGhosh, M. (2014). Root associated iron oxidizing bacteria increase phosphate nutrition and influence root to shoot partitioning of iron in tolerant plant *Typha angustifolia*. *Plant and Soil*, 381(1), 279-295. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2085-x>
- Goddek, S., & Vermeulen, T. (2018). Comparison of *Lactuca sativa* growth performance in conventional and RAS-based hydroponic systems. *Aquaculture International*, 26(6), 1377-1386. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0293-8>
- Grace, J. B., & Harrison, J. S. (1986). The biology of Canadian weeds. *Typha latifolia* L., *Typha angustifolia* L. and *Typha x glauca* Godr. *Canadian Journal of Plant Science*, 66(2), 361-379. <https://doi.org/10.4141/cjps86-051>
- Grover, M., Bodhankar, S., Sharma, A., Sharma, P., Singh, J., & Nain, L. (2021). PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2020.618230>
- Guo, J., Dai, X., Xu, W., & Ma, M. (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 72(7), 1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.018>
- Guo, Z., Gao, Y., Cao, X., Jiang, W., Liu, X., Liu, Q., Chen, Z., Zhou, W., Cui, J., & Wang, Q. (2019). Phytoremediation of Cd and Pb interactive polluted soils by switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *International Journal of Phytoremediation*, 21(14), 1486-1496. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1644285>

- Hasan, Md. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X.-Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z.-Y. (2017). Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress—A Review. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1492. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>
- Hayat, K., Menhas, S., Bundschuh, J., Zhou, P., Niazi, N. K., Amna, null, Hussain, A., Hayat, S., Ali, H., Wang, J., Khan, A. A., Ali, A., Munis, F. H., & Chaudhary, H. J. (2020). Plant growth promotion and enhanced uptake of Cd by combinatorial application of *Bacillus pumilus* and EDTA on *Zea mays* L. *International Journal of Phytoremediation*, 22(13), 1372-1384. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1780410>
- 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). <https://www.redalyc.org/journal/1932/193262826010/html/>
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., & Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248(1), 43-59. <https://doi.org/10.1023/A:1022371130939>
- Hu, X., Wang, J., Lv, Y., Liu, X., Zhong, J., Cui, X., Zhang, M., Ma, D., Yan, X., & Zhu, X. (2021). Effects of Heavy Metals/Metalloids and Soil Properties on Microbial Communities in Farmland in the Vicinity of a Metals Smelter. *Frontiers in Microbiology*, 12, 707786. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707786>
- Hu, Y., Cheng, H., & Tao, S. (2016). The Challenges and Solutions for Cadmium-contaminated Rice in China: A Critical Review. *Environment International*, 92-93, 515-532. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.042>

- Hussain, B., Ashraf, M. N., Shafeeq-ur-Rahman, Abbas, A., Li, J., & Farooq, M. (2021). Cadmium stress in paddy fields: Effects of soil conditions and remediation strategies. *Science of The Total Environment*, 754, 142188. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142188>
- Huybrechts, M., Cuypers, A., Deckers, J., Iven, V., Vandionant, S., Jozefczak, M., & Hendrix, S. (2019). Cadmium and Plant Development: An Agony from Seed to Seed. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3971. <https://doi.org/10.3390/ijms20163971>
- Jabeen, R., Ahmad, A., & Iqbal, M. (2009). Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms. *The Botanical Review*, 75(4), 339-364. <https://doi.org/10.1007/s12229-009-9036-x>
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., Sharma, D., & Sinha, A. K. (2018). Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 9, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>
- Jan, R., Khan, M. A., Asaf, S., Lubna, Lee, I.-J., & Kim, K. M. (2019). Metal Resistant Endophytic Bacteria Reduces Cadmium, Nickel Toxicity, and Enhances Expression of Metal Stress Related Genes with Improved Growth of *Oryza Sativa*, via Regulating Its Antioxidant Machinery and Endogenous Hormones. *Plants*, 8(10), 363. <https://doi.org/10.3390/plants8100363>
- Javed, M. T., Tanwir, K., Abbas, S., Saleem, M. H., Iqbal, R., & Chaudhary, H. J. (2021). Chromium retention potential of two contrasting *Solanum lycopersicum* Mill. Cultivars as deciphered by altered pH dynamics, growth, and organic acid exudation under Cr stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(22), 27542-27554. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12269-8>

- Jawad Hassan, M., Ali Raza, M., Ur Rehman, S., Ansar, M., Gitari, H., Khan, I., Wajid, M., Ahmed, M., Abbas Shah, G., Peng, Y., & Li, Z. (2020). Effect of Cadmium Toxicity on Growth, Oxidative Damage, Antioxidant Defense System and Cadmium Accumulation in Two Sorghum Cultivars. *Plants*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/plants9111575>
- John Jimtha, C., & Radhakrishnan, E. K. (2018). Multipotent Plant Probiotic Rhizobacteria from Western Ghats and Its Effect on Quantitative Enhancement of Medicinal Natural Product Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(2), 755-768. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0810-3>
- Kawasaki, A., Okada, S., Zhang, C., Delhaize, E., Mathesius, U., Richardson, A. E., Watt, M., Gilliam, M., & Ryan, P. R. (2018). A sterile hydroponic system for characterising root exudates from specific root types and whole-root systems of large crop plants. *Plant Methods*, 14(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0380-x>
- Khan, S., Purohit, A., & Vadsaria, N. (2020). Hydroponics: Current and future state of the art in farming. *Journal of Plant Nutrition*, 44(10), 1515-1538. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1860217>
- Khanna, K., Jamwal, V. L., Kohli, S. K., Gandhi, S. G., Ohri, P., Bhardwaj, R., Abd_Allah, E. F., Hashem, A., & Ahmad, P. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria induced Cd tolerance in *Lycopersicon esculentum* through altered antioxidative defense expression. *Chemosphere*, 217, 463-474. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.005>
- Konkolewska, A., Piechalak, A., Ciszewska, L., Antos-Krzemińska, N., Skrzypczak, T., Hanć, A., Sitko, K., Małkowski, E., Barańkiewicz, D., & Małecka, A. (2020).

- Combined use of companion planting and PGPR for the assisted phytoextraction of trace metals (Zn, Pb, Cd). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13809-13825. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07885-3>
- Korenkov, V., King, B., Hirschi, K., & Wagner, G. J. (2009). Root-selective expression of AtCAX4 and AtCAX2 results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnology Journal*, 7(3), 219-226. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00390.x>
- Kotoky, R., Nath, S., Kumar Maheshwari, D., & Pandey, P. (2019). Cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* S2I7 associated with the growth promotion of rice plant. *Environmental Sustainability*, 2(2), 135-144. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00055-3>
- Kulkarni, S., Abraham, P. S., Mohanty, N., Kadam, N. N., & Thakur, M. (2018). *Sustainable Raft Based Hydroponic System for Growing Spinach and Coriander*. 117-125. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53556-2_13
- Kumar, A. A., Sukumaran, D., & Vincent, S. G. T. (2018). Rhizoremediation of Azodyes by Constructed Wetland Technology using *Typha latifolia*. En V. Kumar, M. Kumar, & R. Prasad (Eds.), *Phytobiont and Ecosystem Restitution* (pp. 253-261). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_13
- Kumar, V., AlMomin, S., Al-Shatti, A., Al-Aqeel, H., Al-Salameen, F., Shajan, A. B., & Nair, S. M. (2019). Enhancement of heavy metal tolerance and accumulation efficiency by expressing *Arabidopsis* ATP sulfurylase gene in alfalfa. *International Journal of Phytoremediation*, 21(11), 1112-1121. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1606784>

- Kumari, M., & Tripathi, B. D. (2015). Efficiency of *Phragmites australis* and *Typha latifolia* for heavy metal removal from wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *112*, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.034>
- Lancíková, V., Tomka, M., Žiarovská, J., Gažo, J., & Hricová, A. (2020). Morphological Responses and Gene Expression of Grain Amaranth (*Amaranthus* spp.) Growing under Cd. *Plants*, *9*(5), 572. <https://doi.org/10.3390/plants9050572>
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H., & Thomine, S. (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO Journal*, *24*(23), 4041-4051. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600864>
- Li, C., Tang, Y., Gu, F., Wang, X., Yang, W., Han, Y., & Ruan, Y. (2022). Phytochemical analysis reveals an antioxidant defense response in *Lonicera japonica* to cadmium-induced oxidative stress. *Scientific Reports*, *12*, 6840. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10912-7>
- Li, G.-Z., Chen, S.-J., Li, N.-Y., Wang, Y.-Y., & Kang, G.-Z. (2021). Exogenous Glutathione Alleviates Cadmium Toxicity in Wheat by Influencing the Absorption and Translocation of Cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *107*(2), 320-326. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03283-8>
- Li, M., Stragliati, L., Bellini, E., Ricci, A., Saba, A., Sanità di Toppi, L., & Varotto, C. (2019). Evolution and functional differentiation of recently diverged phytochelatin synthase genes from *Arundo donax* L. *Journal of Experimental Botany*, *70*(19), 5391-5405. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz266>

- Li, M., Zhu, Y., Li, S., Zhang, W., Yin, C., & Lin, Y. (2022). Regulation of Phytohormones on the Growth and Development of Plant Root Hair. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 865302. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865302>
- Li, T.-Q., Yang, X.-E., Jin, X.-F., He, Z.-L., Stoffella, P.-J., & Hu, Q.-H. (2005). Root responses and metal accumulation in two contrasting ecotypes of *Sedum alfredii* Hance under lead and zinc toxic stress. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, *40*(5), 1081-1096. <https://doi.org/10.1081/ese-200056163>
- Li, X., Peng, P., Long, J., Dong, X., Jiang, K., & Hou, H. (2020). Plant-induced insoluble Cd mobilization and Cd redistribution among different rice cultivars. *Journal of Cleaner Production*, *256*, 120494. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120494>
- Liaquat, F., Munis, M. F. H., Arif, S., Haroon, U., Shengquan, C., & Qunlu, L. (2020). Cd-tolerant SY-2 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*: A potential PGPR, isolated from the Nanjing mining area in China. *3 Biotech*, *10*(12), 519. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02524-7>
- Lim, T. K. (2016). *Typha angustifolia*. En T. K. Lim (Ed.), *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 12 Modified Stems, Roots, Bulbs* (pp. 103-113). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5_4
- Liu, S., Liu, H., Chen, R., Ma, Y., Yang, B., Chen, Z., Liang, Y., Fang, J., & Xiao, Y. (2021). Role of Two Plant Growth-Promoting Bacteria in Remediating Cadmium-Contaminated Soil Combined with *Miscanthus floridulus* (Lab.). *Plants*, *10*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/plants10050912>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luo, J.-S., Huang, J., Zeng, D.-L., Peng, J.-S., Zhang, G.-B., Ma, H.-L., Guan, Y., Yi, H.-Y., Fu, Y.-L., Han, B., Lin, H.-X., Qian, Q., & Gong, J.-M. (2018). A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice. *Nature Communications*, 9(1), 645. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03088-0>
- Luo, J.-S., Xiao, Y., Yao, J., Wu, Z., Yang, Y., Ismail, A. M., & Zhang, Z. (2020). Overexpression of a Defensin-Like Gene CAL2 Enhances Cadmium Accumulation in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 217. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00217>
- Luo, J.-S., & Zhang, Z. (2021). Mechanisms of cadmium phytoremediation and detoxification in plants. *The Crop Journal*, 9(3), 521-529. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.02.001>
- Ma, Y., Oliveira, R. S., Freitas, H., & Zhang, C. (2016). Biochemical and Molecular Mechanisms of Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00918>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y., & Freitas, H. (2013). Phytoextraction of heavy metal polluted soils using *Sedum plumbizincicola* inoculated with metal mobilizing *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b. *Chemosphere*, 93(7), 1386-1392. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.077>
- Mahdi, I., Fahsi, N., Hafidi, M., Allaoui, A., & Biskri, L. (2020). Plant Growth Enhancement using Rhizospheric Halotolerant Phosphate Solubilizing Bacterium *Bacillus*

- licheniformis QA1 and Enterobacter asburiae QF11 Isolated from Chenopodium quinoa Willd. *Microorganisms*, 8(6), 948.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060948>
- Majid, M., Khan, J. N., Ahmad Shah, Q. M., Masoodi, K. Z., Afroza, B., & Parvaze, S. (2021). Evaluation of hydroponic systems for the cultivation of Lettuce (*Lactuca sativa* L., var. Longifolia) and comparison with protected soil-based cultivation. *Agricultural Water Management*, 245, 106572.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106572>
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 254, 109779.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>
- Marrero-Coto, J., Amores-Sánchez, I., & Coto-Pérez, O. (2012). Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(3), 52-61.
- Martin, T. A., & Ruby, M. V. (2004). Review of in situ remediation technologies for lead, zinc, and cadmium in soil. *Remediation Journal*, 14(3), 35-53.
<https://doi.org/10.1002/rem.20011>
- Martínez-Martínez, J. G., Rosales-Loredo, S., Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J. L., Carranza-Álvarez, C., Macías-Pérez, J. R., Rolón-Cárdenas, G. A., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2023). Bacterial Communities Associated with the Roots of *Typha* spp. And Its Relationship in Phytoremediation Processes. *Microorganisms*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061587>

- Mashabela, M. D., Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., Dubery, I. A., Terefe, T., & Mhlongo, M. I. (2023). Metabolomic evaluation of PGPR defence priming in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars infected with *Puccinia striiformis* f. Sp. *Triticici* (stripe rust). *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1103413. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1103413>
- Maslennikova, D., Koryakov, I., Yuldashev, R., Avtushenko, I., Yakupova, A., & Lastochkina, O. (2023). Endophytic Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus subtilis* Reduces the Toxic Effect of Cadmium on Wheat Plants. *Microorganisms*, *11*(7), 1653. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071653>
- Maslennikova, D., Nasyrova, K., Chubukova, O., Akimova, E., Baymiev, A., Blagova, D., Ibragimov, A., & Lastochkina, O. (2022). Effects of *Rhizobium leguminosarum* Thy2 on the Growth and Tolerance to Cadmium Stress of Wheat Plants. *Life*, *12*(10), 1675. <https://doi.org/10.3390/life12101675>
- Matić, N., Jena, V., Sinha, D., Ghosh, S., & Pandey, A. (2019). *Accumulation and Translocation of Heavy Metals in Coriandrum sativum*. *2*, 850-855.
- McLaughlin, M. J., & Singh, B. R. (1999). Cadmium in Soils and Plants. En M. J. McLaughlin & B. R. Singh (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants* (pp. 1-9). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_1
- Medina Marcos, K. D., & Montano Chávez, Y. N. (2014). Determinación del factor de Bioconcentración y Traslocación de metales pesados en el *Juncus arcticus* Willd. Y *Cortaderia rudiusscula* Stapf, de áreas contaminadas con el pasivo ambiental minero Alianza—Ancash 2013. *Repositorio Institucional Digital - UNASAM*. <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/1775>

- Miljaković, D., Marinković, J., Tamindžić, G., Đorđević, V., Tintor, B., Milošević, D., Ignjatov, M., & Nikolić, Z. (2022). Bio-Priming of Soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus megaterium*: Strategy to Improve Seed Germination and the Initial Seedling Growth. *Plants*, *11*(15), 1927. <https://doi.org/10.3390/plants11151927>
- Mir, M. I., Hameeda, B., Quadriya, H., Kumar, B. K., Ilyas, N., Kee Zuan, A. T., El Enshasy, H. A., Dailin, D. J., Kassem, H. S., Gafur, A., & Sayyed, R. Z. (2022). Multifarious Indigenous Diazotrophic Rhizobacteria of Rice (*Oryza sativa* L.) Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 781764. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.781764>
- Molina, A. S., Lugo, M. A., Pérez Chaca, M. V., Vargas-Gil, S., Zirulnik, F., Leporati, J., Ferrol, N., & Azcón-Aguilar, C. (2020). Effect of Arbuscular Mycorrhizal Colonization on Cadmium-Mediated Oxidative Stress in *Glycine max* (L.) Merr. *Plants*, *9*(1), 108. <https://doi.org/10.3390/plants9010108>
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., & Richaud, P. (2009). AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *149*(2), 894-904. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130294>
- Nath, R., Tamuly, D., Sharma, G. d, & Barooah, M. (2022). Effect of endophytic bacterial consortium isolated from tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) roots on growth and yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Ecology, Environment and Conservation*, *28*, S122-S133. <https://doi.org/10.53550/EEC.2022.v28i08s.020>
- Neina, D. (2019). The Role of Soil pH in Plant Nutrition and Soil Remediation. *Applied and Environmental Soil Science*, 2019, e5794869. <https://doi.org/10.1155/2019/5794869>

- Nino Savala, A. G., Franzaring, J., Zhong, Z., Li, H., & Fangmeier, A. (2021). Assessing bioavailable fraction and bioconcentration factors of Cd and Zn in young silage maize under different P fertilization and crop rotation. *Environmental Pollutants and Bioavailability*, 33(1), 377-387. <https://doi.org/10.1080/26395940.2021.1991846>
- Pan, F., Luo, S., Shen, J., Wang, Q., Ye, J., Meng, Q., Wu, Y., Chen, B., Cao, X., Yang, X., & Feng, Y. (2017). The effects of endophytic bacterium SaMR12 on *Sedum alfredii* Hance metal ion uptake and the expression of three transporter family genes after cadmium exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 9350-9360. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8565-9>
- Papadopoulos, N., & Zalidis, G. (2019). The Use of *Typha Latifolia* L. in Constructed Wetland Microcosms for the Remediation of Herbicide Terbutylazine. *Environmental Processes*, 6, 985-1003. <https://doi.org/10.1007/s40710-019-00398-3>
- Park, J., Song, W.-Y., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T. H., Schiller, M., Lee, T. G., Martinoia, E., & Lee, Y. (2012). The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 69(2), 278-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04789.x>
- Peco, J. D., Campos, J. A., Romero-Puertas, M. C., Olmedilla, A., Higuera, P., & Sandalio, L. M. (2020). Characterization of mechanisms involved in tolerance and accumulation of Cd in *Biscutella auriculata* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110784. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110784>
- Peng, J.-S., Ding, G., Meng, S., Yi, H.-Y., & Gong, J.-M. (2017). Enhanced metal tolerance correlates with heterotypic variation in SpMTL, a metallothionein-like protein from

- the hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Plant, Cell & Environment*, 40(8), 1368-1378. <https://doi.org/10.1111/pce.12929>
- Pérez Olvera, M. A., García Mateos, R., Vázquez Alarcón, A., Colinas León, T., Pérez Grajales, M., & Navarro Garza, H. (2008). Concentración de Pb, Cd, Ni y Zn en suelos contaminados y su transferencia a la pella de brócoli. *Terra Latinoamericana*, 26(3), 215-225.
- Petry, C. T., Costa, D. T., & Droste, A. (2020). Removal of ammoniacal nitrogen from municipal landfill leachate with floating *Typha domingensis* (Typhaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), Article 1. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.74749>
- Ponce-Hernández, A., Maldonado-Miranda, J., Medellín-Castillo, N., Alonso-Castro, A., & Carranza Alvarez, C. (2020). *Phytoremediation Technology: Sustainable Solution for Cleaning Up of Recalcitrant Pollutants from Disturbed Environs* (pp. 245-268). https://doi.org/10.1007/978-3-030-46075-4_11
- Prieto-Méndez, J., Acevedo-Sandoval, O. A., Prieto-García, F., & Trejo-González, N. (2018). Phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Biodiversity International Journal*, Volume 2(Issue 4). <https://doi.org/10.15406/bij.2018.02.00088>
- Qessaoui, R., Bouharroud, R., Furze, J. N., El Aalaoui, M., Akroud, H., Amarraque, A., Vaerenbergh, J. V., Tahzima, R., Mayad, E. H., & Chebli, B. (2019). Applications of New Rhizobacteria *Pseudomonas* Isolates in Agroecology via Fundamental Processes Complementing Plant Growth. *Scientific Reports*, 9, 12832. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>

- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Rai, P. K., Kim, K.-H., Lee, S. S., & Lee, J.-H. (2020). Molecular mechanisms in phytoremediation of environmental contaminants and prospects of engineered transgenic plants/microbes. *Science of The Total Environment*, 705, 135858. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135858>
- Raihan, Md. R. H., Rahman, M., Mahmud, N. U., Adak, M. K., Islam, T., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2022). Application of Rhizobacteria, Paraburkholderia fungorum and Delftia sp. Confer Cadmium Tolerance in Rapeseed (Brassica campestris) through Modulating Antioxidant Defense and Glyoxalase Systems. *Plants*, 11(20), 2738. <https://doi.org/10.3390/plants11202738>
- Ramírez, A. (2002). *Toxicología del cadmio conceptos actuales para evaluar exposicion ambiental u ocupacional con indicadores biológicos*. 63(1). https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v63_n1/toxicologia.htm
- Raza, A., Habib, M., Kakavand, S. N., Zahid, Z., Zahra, N., Sharif, R., & Hasanuzzaman, M. (2020). Phytoremediation of Cadmium: Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms. *Biology*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biology9070177>
- Reed, R., Sanderson, M., Allen, V., & Zartman, R. (2002). Cadmium application and pH effects on growth and cadmium accumulation in switchgrass. *Communications in Soil Science and Plant Analysis - COMMUN SOIL SCI PLANT ANAL*, 33, 1187-1203. <https://doi.org/10.1081/CSS-120003881>
- Rehman, F., Pervez, A., Khattak, B. N., & Ahmad, R. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria Impact on Typha latifolia and Phragmites australis Growth and

- Dissolved Oxygen. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 46(8), 1700353.
<https://doi.org/10.1002/clen.201700353>
- Remy, E., & Duque, P. (2016). Assessing Tolerance to Heavy-Metal Stress in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1398, 197-208.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3356-3_16
- Ren, M., Qin, Z., Li, X., Wang, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, Y., & Yang, S. (2020). Selenite antagonizes the phytotoxicity of Cd in the cattail *Typha angustifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 109959.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109959>
- Renu, S., Sarim, K. Mohd., Singh, D. P., Sahu, U., Bhoyar, M. S., Sahu, A., Kaur, B., Gupta, A., Mandal, A., Thakur, J. K., Manna, M. C., & Saxena, A. K. (2022). Deciphering Cadmium (Cd) Tolerance in Newly Isolated Bacterial Strain, *Ochrobactrum intermedium* BB12, and Its Role in Alleviation of Cd Stress in Spinach Plant (*Spinacia oleracea* L.). *Frontiers in Microbiology*, 12, 758144.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.758144>
- Riaz, M., Kamran, M., Fang, Y., Yang, G., Rizwan, M., Ali, S., Zhou, Y., Wang, Q., Deng, L., Wang, Y., & Wang, X. (2021). Boron supply alleviates cadmium toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by enhancing cadmium adsorption on cell wall and triggering antioxidant defense system in roots. *Chemosphere*, 266, 128938.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128938>
- Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W., & Gupta, R. (2021). A Comprehensive Review on the Heavy Metal Toxicity and Sequestration in Plants. *Biomolecules*, 12(1), 43. <https://doi.org/10.3390/biom12010043>

- Rolón-Cárdenas, G. (2020). Effect of *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 on *Cucumis sativus* L. seedlings with and without Cadmium. *Journal of Natural Resources and Life Sciences Education*. <https://doi.org/10.35429/JNAS.2020.21.7.14.20>
- Rolón-Cárdenas, G. A. (2017). *Caracterización bioquímica y molecular de bacterias endófitas de Typha latifolia tolerantes a Cd*. Maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Rolón-Cárdenas, G. A., Arvizu-Gómez, J. L., Pacheco-Aguilar, J. R., Vázquez-Martínez, J., & Hernández-Morales, A. (2021). Cadmium-tolerant endophytic *Pseudomonas rhodesiae* strains isolated from *Typha latifolia* modify the root architecture of *Arabidopsis thaliana* Col-0 in presence and absence of Cd. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(1), 349-361. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00408-9>
- Rolón-Cárdenas, G. A., Martínez-Martínez, J. G., Arvizu-Gómez, J. L., Soria-Guerra, R. E., Alfaro-De la Torre, M. C., Alatorre-Cobos, F., Rubio-Santiago, J., González-Balderas, R. de M., Carranza-Álvarez, C., Macías-Pérez, J. R., Aldaba-Muruato, L. R., & Hernández-Morales, A. (2022). Enhanced Cd-Accumulation in *Typha latifolia* by Interaction with *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 under Axenic Hydroponic Conditions. *Plants*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/plants11111447>
- Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in Microbiology*, 167(3), 222-233. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.11.001>
- Sabreena, Hassan, S., Bhat, S. A., Kumar, V., Ganai, B. A., & Ameen, F. (2022). Phytoremediation of Heavy Metals: An Indispensable Contrivance in Green

Remediation Technology. *Plants*, 11(9), Article 9.
<https://doi.org/10.3390/plants11091255>

Sahile, A. A., Khan, M. A., Hamayun, M., Imran, M., Kang, S.-M., & Lee, I.-J. (2021). Novel *Bacillus cereus* Strain, ALT1, Enhance Growth and Strengthens the Antioxidant System of Soybean under Cadmium Stress. *Agronomy*, 11(2), Article 2.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11020404>

Salas-Moreno, M., & Marrugo-Negrete, J. (2020). Phytoremediation potential of Cd and Pb-contaminated soils by *Paspalum fasciculatum* Willd. Ex Flügge. *International Journal of Phytoremediation*, 22(1), 87-97.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1644291>

Sang, J., Han, X., Liu, M., Qiao, G., Jiang, J., & Zhuo, R. (2013). Selection and Validation of Reference Genes for Real-Time Quantitative PCR in Hyperaccumulating Ecotype of *Sedum alfredii* under Different Heavy Metals Stresses. *PLOS ONE*, 8(12), e82927.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082927>

Sapkota, S., Sapkota, S., & Liu, Z. (2019). Effects of Nutrient Composition and Lettuce Cultivar on Crop Production in Hydroponic Culture. *Horticulturae*, 5(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae5040072>

Sesin, V., Davy, C. M., & Freeland, J. R. (2021). Review of *Typha* spp. (Cattails) as toxicity test species for the risk assessment of environmental contaminants on emergent macrophytes. *Environmental Pollution*, 284, 117105.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117105>

Shahid, M. J., Ali, S., Shabir, G., Siddique, M., Rizwan, M., Seleiman, M. F., & Afzal, M. (2020). Comparing the performance of four macrophytes in bacterial assisted floating treatment wetlands for the removal of trace metals (Fe, Mn, Ni, Pb, and Cr) from

polluted river water. *Chemosphere*, 243, 125353.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125353>

Shahzad, A., Qin, M., Elahie, M., Naeem, M., Bashir, T., Yasmin, H., Younas, M., Areeb, A., Irfan, M., Billah, M., Shakoor, A., & Zulfiqar, S. (2021). *Bacillus pumilus* induced tolerance of Maize (*Zea mays* L.) against Cadmium (Cd) stress. *Scientific Reports*, 11, 17196. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96786-7>

Sharma, P., Chouhan, R., Bakshi, P., Gandhi, S. G., Kaur, R., Sharma, A., & Bhardwaj, R. (2022). Amelioration of Chromium-Induced Oxidative Stress by Combined Treatment of Selected Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria and Earthworms via Modulating the Expression of Genes Related to Reactive Oxygen Species Metabolism in *Brassica juncea*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.802512>

Shehzadi, M., Afzal, M., Khan, M. U., Islam, E., Mobin, A., Anwar, S., & Khan, Q. M. (2014). Enhanced degradation of textile effluent in constructed wetland system using *Typha domingensis* and textile effluent-degrading endophytic bacteria. *Water Research*, 58, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.064>

Soumya, S., Sreejith, S., Shad, K. S., Anusha, P., Swathy, B., Renikrishna, R., Saranya, S., Jishma, P., Radhakrishnan, E. K., & Remakanthan, A. (2020). Combined Effect of *Pseudomonas* spp. Consortium and Fertilizer with Micronutrients on Enhanced yield of *Amaranthus tricolor* (L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(5), 1083-1092. <https://doi.org/10.1007/s40011-020-01179-x>

- Stegelmeier, A. A., Rose, D. M., Joris, B. R., & Glick, B. R. (2022). The Use of PGPB to Promote Plant Hydroponic Growth. *Plants*, *11*(20), 2783. <https://doi.org/10.3390/plants11202783>
- Syed, A., Elgorban, A. M., Bahkali, A. H., Eswaramoorthy, R., Iqbal, R. K., & Danish, S. (2023). Metal-tolerant and siderophore producing *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma* spp. Improved the growth, biochemical features and yield attributes of chickpea by lowering Cd uptake. *Scientific Reports*, *13*, 4471. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31330-3>
- Sytar, O., Ghosh, S., Malinska, H., Zivcak, M., & Brestic, M. (2021). Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator plants. *Physiologia Plantarum*, *173*(1), 148-166. <https://doi.org/10.1111/ppl.13285>
- Tan, X., Li, K., Wang, Z., Zhu, K., Tan, X., & Cao, J. (2019). A Review of Plant Vacuoles: Formation, Located Proteins, and Functions. *Plants*, *8*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/plants8090327>
- Tian, Q., Gong, Y., Liu, S., Ji, M., Tang, R., Kong, D., Xue, Z., Wang, L., Hu, F., Huang, L., & Qin, S. (2023). Endophytic bacterial communities in wild rice (*Oryza officinalis*) and their plant growth-promoting effects on perennial rice. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1184489. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1184489>
- Tiwari, S., & Lata, C. (2018). Heavy Metal Stress, Signaling, and Tolerance Due to Plant-Associated Microbes: An Overview. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00452>
- Tiwari, S., Singh, S. N., & Garg, S. K. (2012). Stimulated phytoextraction of metals from fly ash by microbial interventions. *Environmental Technology*, *33*(21), 2405-2413. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.670269>

- Ullah, I., Al-Johny, B. O., AL-Ghamdi, K. M. S., Al-Zahrani, H. A. A., Anwar, Y., Firoz, A., AL-Kenani, N., & Almatry, M. A. A. (2019). Endophytic bacteria isolated from *Solanum nigrum* L., alleviate cadmium (Cd) stress response by their antioxidant potentials, including SOD synthesis by *sodA* gene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *174*, 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.074>
- Umnajkitikorn, K., Fukudome, M., Uchiumi, T., & Teaumroong, N. (2021). Elevated Nitrogen Priming Induced Oxinitro-Responses and Water Deficit Tolerance in Rice. *Plants*, *10*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/plants10020381>
- van Delden, S. H., Nazarideljou, M. J., & Marcelis, L. F. M. (2020). Nutrient solutions for *Arabidopsis thaliana*: A study on nutrient solution composition in hydroponics systems. *Plant Methods*, *16*, 72. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00606-4>
- Vazquez, A., González, G., Cajuste, L., Bauer, M., & Siebe, C. (2001). Cadmio, Níquel y Plomo en agua residual, suelo y cultivos en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Agrociencia*, *35*, 267-274.
- Venegas-Rioseco, J., Ginocchio, R., & Ortiz-Calderón, C. (2021). Increase in Phytoextraction Potential by Genome Editing and Transformation: A Review. *Plants*, *11*(1), 86. <https://doi.org/10.3390/plants11010086>
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A., & Richaud, P. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters*, *576*(3), 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.023>
- Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., & Schoenaers, S. (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *71*(8), 2412-2427. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa048>

- Vroom, R. J. E., Xie, F., Geurts, J. J. M., Chojnowska, A., Smolders, A. J. P., Lamers, L. P. M., & Fritz, C. (2018). *Typha latifolia* paludiculture effectively improves water quality and reduces greenhouse gas emissions in rewetted peatlands. *Ecological Engineering*, *124*, 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.09.008>
- Wang, Q., Ma, L., Zhou, Q., Chen, B., Zhang, X., Wu, Y., Pan, F., Huang, L., Yang, X., & Feng, Y. (2019). Inoculation of plant growth promoting bacteria from hyperaccumulator facilitated non-host root development and provided promising agents for elevated phytoremediation efficiency. *Chemosphere*, *234*, 769-776. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.132>
- Wang, Y., Lv, N., Mao, X., Yan, Z., Wang, J., Tan, W., Li, X., Liu, H., Wang, L., & Xi, B. (2018). Cadmium tolerance and accumulation characteristics of wetland emergent plants under hydroponic conditions. *RSC Advances*, *8*(58), 33383-33390. <https://doi.org/10.1039/C8RA04015J>
- Wei, T., Sun, Y., Yashir, N., Li, X., Guo, J., Liu, X., Jia, H., Ren, X., & Hua, L. (2022). Inoculation with Rhizobacteria Enhanced Tolerance of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Plants in Response to Cadmium Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*(1), 445-460. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10315-4>
- Wieczorek, J., Baran, A., Urbański, K., Mazurek, R., & Klimowicz-Pawlas, A. (2018). Assessment of the pollution and ecological risk of lead and cadmium in soils. *Environmental Geochemistry and Health*, *40*(6), 2325-2342. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0100-5>
- Woraharn, S., Meeinkuirt, W., Phusantisampan, T., & Chayapan, P. (2021). Rhizofiltration of Cadmium and Zinc in Hydroponic Systems. *Water, Air, & Soil Pollution*, *232*(5), 204. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05156-6>

- Wu, Y., Ma, L., Liu, Q., Sikder, M. M., Vestergård, M., Zhou, K., Wang, Q., Yang, X., & Feng, Y. (2020). *Pseudomonas fluorescens* promote photosynthesis, carbon fixation and cadmium phytoremediation of hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Science of The Total Environment*, 726, 138554. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138554>
- Xu, X., Chen, Q., Mo, S., Qian, Y., Wu, X., Jin, Y., & Ding, H. (2020). Transcriptome -wide modulation combined with morpho-physiological analyses of *Typha orientalis* roots in response to lead challenge. *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121405. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121405>
- Xu, Y., Chu, L., Jin, Q., Wang, Y., Chen, X., Zhao, H., & Xue, Z. (2015). Transcriptome-Wide Identification of miRNAs and Their Targets from *Typha angustifolia* by RNA-Seq and Their Response to Cadmium Stress. *PLOS ONE*, 10(4), e0125462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125462>
- Yadav, A., Goyal, D., Prasad, M., Singh, T. B., Shrivastav, P., Ali, A., & Dantu, P. K. (2020). Bioremediation of Toxic Pollutants: Features, Strategies, and Applications. En M. Naeem, A. A. Ansari, & S. S. Gill (Eds.), *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management* (pp. 361-383). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_18
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., & Stoffella, P. J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 339-353. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.007>
- Yang, Y., & Shen, Q. (2020). Phytoremediation of cadmium-contaminated wetland soil with *Typha latifolia* L. and the underlying mechanisms involved in the heavy-metal uptake and removal. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 4905-4916. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07256-7>

- Yankey, R., Karanja, J. K., Okal, E., Omoor, I. N. A., Lin, H., Bodjremou, D. M., Li, J., Lin, D. M., Cao, X. M., & Lin, Z. X. (2021). A consortium of plant growth-promoting rhizobacteria strains synergistically assists Jujuncao (*Pennisetum giganteum*) to remediate cadmium contaminated soils. *Applied Ecology and Environmental Research*, *19*, 2425-2442. https://doi.org/10.15666/aeer/1903_24252442
- Yildirim, E., EkiNci, M., Turan, M., Agar, G., Örs, S., Dursun, A., Kul, R., & Balci, T. (2019). Impact of Cadmium and Lead Heavy Metal Stress on Plant Growth and Physiology of Rocket (*Eruca sativa* L.). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, *22*(6), 843-850. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.548626>
- Zapata-Morales, A. L., Alfaro-De la Torre, Ma. C., Hernández-Morales, A., & García-De la Cruz, R. F. (2020). Isolation of Cultivable Bacteria Associated with the Root of *Typha latifolia* in a Constructed Wetland for the Removal of Diclofenac or Naproxen. *Water, Air, & Soil Pollution*, *231*(423). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04781-x>
- Zaranyika, M. F., & Nyati, W. (2017). Uptake of heavy metals by *Typha capensis* from wetland sites polluted by effluent from mineral processing plants: Implications of metal–metal interactions. *3 Biotech*, *7*(5), 286. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0916-1>
- Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., & Jiang, L. (2020). Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. *Chemical Engineering Journal*, *398*, 125657. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125657>

- Zhang, J., Martinoia, E., & Lee, Y. (2018). Vacuolar Transporters for Cadmium and Arsenic in Plants and their Applications in Phytoremediation and Crop Development. *Plant & Cell Physiology*, 59(7), 1317-1325. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy006>
- Zhang, J., Zhang, M., Tian, S., Lu, L., Shohag, M. J. I., & Yang, X. (2014). Metallothionein 2 (SaMT2) from *Sedum alfredii* Hance Confers Increased Cd Tolerance and Accumulation in Yeast and Tobacco. *PLOS ONE*, 9(7), e102750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102750>
- Zhang, P., Jin, C., Sun, Z., Huang, G., & She, Z. (2016). Assessment of Acid Enhancement Schemes for Electrokinetic Remediation of Cd/Pb Contaminated Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(6), 217. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2879-y>
- Zhang, T., Xiao, J., Zhao, Y., Zhang, Y., Jie, Y., Shen, D., Yue, C., Huang, J., Hua, Y., & Zhou, T. (2021). Comparative physiological and transcriptomic analyses reveal ascorbate and glutathione coregulation of cadmium toxicity resistance in wheat genotypes. *BMC Plant Biology*, 21, 459. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03225-w>
- Zhang, Y., Wu, X., Tao, Y., Ke, T., Wu, W., Liao, K., Li, X., Zeng, Y., Chen, C., & Chen, L. (2023). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on oilseed rape *Brassica juncea* and phytoextraction of cadmium. *Journal of Soils and Sediments*, 23(9), 3472-3484. <https://doi.org/10.1007/s11368-023-03559-y>
- Zhao, H., Guan, J., Liang, Q., Zhang, X., Hu, H., & Zhang, J. (2021). Effects of cadmium stress on growth and physiological characteristics of *sassafras* seedlings. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89322-0>

- Zhao, L., Ru, Y., Liu, M., Tang, J., Zheng, J., Wu, B., Gu, Y., & Shi, H. (2017). Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development in vitro. *PLoS ONE*, *12*(11), e0186727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186727>
- Zhou, B., Tu, T., Kong, F., Wen, J., & Xu, X. (2018). Revised phylogeny and historical biogeography of the cosmopolitan aquatic plant genus *Typha* (Typhaceae). *Scientific Reports*, *8*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27279-3>
- Zhou, C., Zhu, L., Ma, Z., & Wang, J. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* SAY09 Increases Cadmium Resistance in Plants by Activation of Auxin-Mediated Signaling Pathways. *Genes*, *8*(7), 173. <https://doi.org/10.3390/genes8070173>
- Zhu, T., Li, L., Duan, Q., Liu, X., & Chen, M. (2021). Progress in our understanding of plant responses to the stress of heavy metal cadmium. *Plant Signaling & Behavior*, *16*(1), 1836884. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1836884>
- Zhu, Y., Wang, Y., He, X., Li, B., & Du, S. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria: A good companion for heavy metal phytoremediation. *Chemosphere*, *338*, 139475. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139475>

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio de cultivo MS 0.2X con glucosa

Para la germinación *in vitro* de semillas de *T. latifolia*, se preparó medio de cultivo MS 0.2X con glucosa, para ello se disolvieron 0.086 g de sales MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture), 0.7 ml de buffer MES (500 mM, pH 5.7), 1 g de dextrosa anhidra y 1.5 g de agar bacteriológico en 100 ml de agua destilada. El medio se llevó a ebullición y se distribuyeron 20 ml en frascos de vidrio con capacidad de 100 ml, por último, se esterilizaron en autoclave (15 minutos, 121°C).

Por otro lado, para el establecimiento del cultivo *in vitro* en sistemas de hidroponía, se prepararon 3 litros de medio líquido MS 0.2X con glucosa, pH 5.7, para ello se agregaron 2.58 g de sales MS, 21 ml de buffer MES y 30 g de dextrosa anhidra en 3 litros de agua destilada. Finalmente, se esterilizó en autoclave (15 minutos, 121°C).

Anexo 2. Sistema de hidroponía

El sistema de hidroponía (Figura 17) consistió en un recipiente de polietileno (PE) con capacidad de 1 L y un porta-semillas. El porta-semillas estuvo constituido por una malla HDPE de 11 cm de diámetro sostenida entre dos anillos de PE (anillo A: 3 cm de altura y anillo B: 2.5 cm de altura) y apoyado sobre un aro de PE de 2.2 cm de altura aproximadamente.

Cada sistema fue colocado dentro de una bolsa termoplástica y esterilizado en autoclave (15 minutos, 121°C).



Figura 17. Sistema hidropónico ensamblado. Se muestran los componentes del sistema con sus respectivas dimensiones, el porta-semillas ensamblado y el sistema de hidroponía armado.