



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



**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**Efecto del ácido indol acético y ácido naftalenacético en  
la fitoextracción de cadmio por *Typha latifolia***

**T E S I S**

**PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA:**

**BQ. Stephanie Rosales Loredo**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Alejandro Hernández Morales**

**CO-DIRECTORA:**

**Dra. Candy Carranza Álvarez**

**ASESOR:**

**Dr. José Roberto Macías Pérez**

**Cd. Valles S.L.P.**

**Marzo, 2024**



**Efecto del ácido indol acético y ácido naftalenacético en la fitoextracción de cadmio por *Typha latifolia*** © 2024 by Rosales Loredo Stephanie is licensed under CC BY-NC-ND 4.0

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



**Efecto del ácido indol acético y ácido naftalenacético en la fitoextracción  
de cadmio por *Typha latifolia***

Presenta:

**BQ. Stephanie Rosales Loredo**

**COMITÉ TUTELAR**

**Director:** Dr. Alejandro Hernández Morales

**Co-directora:** Dra. Candy Carranza Álvarez

**Asesor:** Dr. José Roberto Macías Pérez

**SINODALES**

**Presidenta:** Dra. Candy Carranza Álvarez

**Secretario:** Dr. Alejandro Hernández Morales

**Vocal:** Dr. José Roberto Macías Pérez

**Suplente:** Dra. Brenda Alvarado Sánchez

**Ciudad Valles, S.L.P.**

**Marzo, 2024**

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: 805117

## 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, codirección de la Dra. Candy Carranza Álvarez y asesoría del Dr. José Roberto Macías Pérez. Recibió apoyo financiero del 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 a mi familia, quienes me apoyaron en la manera en que ellos veían conveniente, siendo comprensivos y pacientes. Además de ello, esta tesis es dedicada a todas aquellas personas que me han acompañado en esta etapa de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT)**, por la beca otorgada (No. de apoyo 805117) que me permitió llevar a cabo mis estudios en la maestría.

A la **Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca** de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por la disposición de sus instalaciones; así como a los docentes de la Maestría en Ciencias Bioquímicas por sus enseñanzas durante mi tiempo en el posgrado y contribución durante mi formación como alumno, estando siempre en la mejor disposición.

A los laboratorios de **Biología (FEPZH-UASLP)**, **Microbiología (FEPZH-UASLP)** e **Investigación Biomédica**, por permitirme desarrollar la parte experimental de mi proyecto dentro de sus instalaciones y brindarme todos los recursos necesarios para ello. Así como a todos aquellos amigos y compañeros que estuvieron presentes durante este camino; a la **Dra. Gisela Adelina Rolón Cárdenas**, al **MC. Jesús Rubio Santiago**, **Joana Guadalupe Martínez Martínez** y **Georgina Cabrera Cruz**, por brindarme su apoyo técnico, su ayuda en la resolución de dudas, por compartir su experiencia, consejos y sugerencias para llevar a cabo este proyecto.

A mi comité de tesis conformado por el **Dr. Alejandro Hernández Morales**, la **Dra. Candy Carranza Álvarez** y el **Dr. José Roberto Macias Pérez**, por brindarme todo su apoyo durante mi estancia en la maestría, por su paciencia, consejos, enseñanzas y sobre todo por su tiempo.

## ÍNDICE GENERAL

CRÉDITOS INSTITUCIONALES .....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.5 OBJETIVOS .....	3
1.5.1 General.....	3
1.5.2 Específicos .....	3
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Contaminación por metales pesados.....	4
2.2 Cadmio (Cd).....	5
2.3 Fitorremediación.....	7
2.4 Mecanismos de fitorremediación.....	8
2.5 El género de <i>Typha</i> spp.....	10
2.6 <i>Typha</i> spp. y su papel en la fitorremediación .....	11
2.7 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).....	14
2.8 PGPR asociadas a <i>Typha latifolia</i> y su papel en la fitoextracción de metales pesados .....	15
2.9 Auxinas .....	16
CAPÍTULO III .....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 Esterilización de material vegetal .....	19
3.2 Preparación de medio de cultivo MS 0.2X con glucosa .....	19
3.3 Germinación <i>in vitro</i> del material vegetal .....	19
3.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. latifolia</i> .....	20
3.5 Preparación y ensamble del sistema hidropónico .....	20
3.6 Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. latifolia</i> en sistemas de hidroponía .....	20

3.7 Efecto de las auxinas en <i>T. latifolia</i> .....	20
3.7.1 Curva dosis-respuesta de auxinas en <i>T. latifolia</i> .....	20
3.7.2 Germinación <i>in vitro</i> de <i>T. latifolia</i> suplementado con auxinas .....	21
3.7.2.1 Preparación de agar agua.....	21
3.7.2.2 Efecto de las auxinas en la germinación de <i>T. latifolia</i> .....	21
3.8 Efecto de las auxinas en la captación de Cd por <i>T. latifolia</i> .....	22
3.9 Análisis fenotípico .....	23
3.9.1 Peso fresco.....	23
3.9.2 Peso seco .....	23
3.9.3 Contenido de clorofila.....	23
3.9.4 Contenido de glutatión (GSH).....	24
3.9.5 Actividad catalasa .....	25
3.9.6 Fuga de electrolitos .....	25
3.9.7 Cuantificación de Cd (II).....	26
3.9.7.1 Digestión acida de raíces .....	26
3.9.7.2 Digestión acida de tejido aéreo.....	26
3.9.7.3 Preparación de muestras líquidas .....	26
3.10 Determinación de cambios estructurales producidos en raíces.....	27
3.10.1 Preparación de las muestras .....	27
3.10.2 Cortes histológicos .....	28
3.11 Análisis estadístico.....	28
CAPÍTULO IV .....	29
RESULTADOS .....	29
4.1 Viabilidad de las semillas de <i>T. latifolia</i> .....	29
4.2 Efecto de las auxinas en <i>T. latifolia</i> .....	30
4.2.1 Germinación de <i>T. latifolia</i> suplementada con Ácido Indol Acético <i>in vitro</i> .....	30
4.2.2 Germinación de <i>T. latifolia</i> suplementada con Ácido 1-naphtalenacético <i>in vitro</i> .....	31
4.3 Curva dosis-respuesta de auxinas en <i>T. latifolia</i> .....	33
4.3.1 Curva dosis-respuesta de AIA en <i>T. latifolia</i> .....	34
4.3.1.1 El AIA no modifica los pesos fresco y seco de <i>T. latifolia</i> .....	35
4.3.1.2 El AIA incrementa la formación de pelos radicales en <i>T. latifolia</i> .....	36
4.3.1.3 El AIA incrementa el diámetro de pelos radicales de <i>T. latifolia</i> .....	37

4.3.2 Curva dosis-respuesta de ANA en <i>T. latifolia</i> .....	39
4.3.2.1 El ANA no influye en los pesos fresco y seco de <i>T. latifolia</i> .....	40
4.3.2.2 El ANA incrementa la formación de pelos radiculares en <i>T. latifolia</i> .....	41
4.3.2.3 Efecto del ANA en el incremento del diámetro de pelos radiculares de <i>T. latifolia</i> .....	42
4.4 Cambios en el pH del medio hidropónico y la absorción de auxinas .....	44
4.5 Ácido indol acético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) en la captación de Cd por <i>T. latifolia</i> .....	45
4.5.1 Efecto de las auxinas sobre el fenotipo de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd .....	45
4.5.2 Efecto de las auxinas sobre la biomasa de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd .....	49
4.5.3 Efecto de las auxinas sobre el pH de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd .....	50
4.5.4 El ANA y AIA incrementan la fitoextracción de Cd por <i>T. latifolia</i> .....	50
4.5.5 Efectos las auxinas frente a la toxicidad del Cd en <i>T. latifolia</i> .....	52
4.5.5.1 Actividad fotosintética de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd.....	52
4.5.5.2 Fuga de electrolitos.....	53
4.5.5.3 Mecanismos enzimáticos y no enzimático de reparación.....	54
CAPÍTULO V.....	56
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	56
5.1 Efecto de las auxinas en <i>T. latifolia</i> .....	56
5.2 Ácido indol acético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) en la captación de Cd por <i>T. latifolia</i> .....	60
CAPÍTULO VI .....	70
CONCLUSIONES .....	70
PERSPECTIVAS.....	71
BIBLIOGRAFÍA .....	72
ANEXOS .....	98
Anexo 1. _Soluciones buffer.....	98
Anexo 2. _Preparación de auxinas.....	98
Anexo 3. _Buffer de fosfatos (KPE).....	99
Anexo 4. _Preparación de formalina neutra .....	99
Anexo 5. _Silanizado de portaobjetos .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de fitorremediación.....	9
<b>Figura 2.</b> <i>Typha latifolia</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Vía de biosíntesis y conjugación del ácido indol acético (AIA).....	18
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de <i>T. latifolia</i> .....	29
<b>Figura 5.</b> Crecimiento y desarrollo vegetal de <i>Typha latifolia</i> después de 15 días de germinación <i>in vitro</i> suplementada con ácido indol acético.....	30
<b>Figura 6.</b> <i>Typha latifolia</i> posterior a 15 días de germinación <i>in vitro</i> suplementada con ácido indol acético.....	31
<b>Figura 7.</b> Crecimiento y desarrollo vegetal de <i>Typha latifolia</i> tras 15 días de germinación <i>in vitro</i> suplementada con ácido 1-naftalenacético.....	32
<b>Figura 8.</b> <i>Typha latifolia</i> posterior a 15 días de germinación <i>in vitro</i> suplementada con ácido 1-naftalenacético.....	33
<b>Figura 9.</b> Vista lateral y superior de brotes de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuestas a ácido indol acético.....	34
<b>Figura 10.</b> Efecto del ácido indol acético sobre <i>Typha latifolia</i> .....	35
<b>Figura 11.</b> Sistema radicular de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a ácido indol acético.....	36
<b>Figura 12.</b> Raíz de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a ácido indol acético.....	37
<b>Figura 13.</b> Estructura radical de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a ácido indol acético.....	38
<b>Figura 14.</b> Vista lateral y superior de brotes de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético.....	39
<b>Figura 15.</b> Efecto del ácido 1-naftalenacético sobre <i>Typha latifolia</i> .....	40
<b>Figura 16.</b> Sistema radicular de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético.....	41
<b>Figura 17.</b> Raíz de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético.....	42
<b>Figura 18.</b> Estructura radical de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético.....	43
<b>Figura 19.</b> pH inicial y final de medio MS + auxinas de <i>Typha latifolia</i> .....	44

<b>Figura 20.</b> Vista lateral y superior de brotes de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd.....	46
<b>Figura 21.</b> Sistema radicular de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd..	46
<b>Figura 22.</b> Raíz de <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd. ....	47
<b>Figura 23.</b> Estructura radical <i>Typha latifolia</i> de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd. ....	48
<b>Figura 24.</b> Efecto de las auxinas sobre <i>Typha latifolia</i> en presencia de Cd. ....	49
<b>Figura 25.</b> Efecto de las auxinas (ANA y AIA) en la acumulación de Cd por <i>T. latifolia</i> ..	51
<b>Figura 26.</b> Efecto de las auxinas (ANA y AIA) sobre el <b>A)</b> porcentaje de remoción, <b>B)</b> factor de translocación, <b>C)</b> factor de bioconcentración, y <b>D)</b> coeficiente de bioacumulación .....	52
<b>Figura 27.</b> Efecto de las auxinas (ANA y AIA) en la fotosíntesis de <i>T. latifolia</i> .....	53
<b>Figura 28.</b> Fuga de electrolitos del tejido radicular de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd.....	54
<b>Figura 29.</b> <b>A)</b> actividad catalasa; <b>B)</b> glutatión de <i>T. latifolia</i> expuesta a Cd.....	55
<b>Figura 30.</b> Modelo propuesto de los mecanismos implicados en el transporte de auxinas a las células del tejido radical de <i>T. latifolia</i> . ....	68
<b>Figura 31.</b> Modelo propuesto de los mecanismos implicados en la interacción auxinas- <i>T. latifolia</i> en ausencia y presencia de Cd en sistema hidropónico. ....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies de <i>Typha</i> empleadas en la fitorremediación de metales pesados.....	13
<b>Tabla 2.</b> Especies de <i>Typha</i> empleadas en el proceso de fitorremediación de compuestos orgánicos.....	14
<b>Tabla 3.</b> Diseño experimental para evaluar el efecto de las auxinas en las plantas de <i>T. latifolia</i> .....	21
<b>Tabla 4.</b> Diseño experimental para evaluar el efecto de las auxinas en la germinación de <i>T. latifolia</i> .....	22
<b>Tabla 5.</b> Diseño experimental para evaluar el efecto de las auxinas en la captación de Cd, por plántulas de <i>T. latifolia</i> .....	22
<b>Tabla 6.</b> Infiltración en parafina. ....	28
<b>Tabla 7.</b> pH inicial y final de medio MS + Cd, con y sin suplementación de auxinas de <i>Typha latifolia</i> .....	50
<b>Tabla 8.</b> Preparación de diluciones de las auxinas (AIA y ANA). ....	98
<b>Tabla 9.</b> PBS 10X, reactivos y concentraciones (250 ml) .....	99
<b>Tabla 10.</b> Tren de solventes .....	100

## **ABREVIATURAS**

**PE:** Polietileno.

**HDPE:** Polietileno de alta densidad.

**AIA:** Ácido indol acético.

**ANA:** Ácido naftalenacético.

**AIB:** Ácido indol butírico.

**HCN:** Cianuro de hidrógeno.

**BPCV:** Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

**EPT:** Elementos potencialmente tóxicos.

**ACC:** Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

**PGPR:** Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

**EL:** Fuga de electrolitos

## RESUMEN

En los últimos años, se han realizado investigaciones centradas en la búsqueda de estrategias ecológicas para la eliminación de metales pesados. Se ha demostrado que las bacterias productoras de auxinas mejoran la fitoextracción de metales pesados en *T. latifolia*. Sin embargo, aún no se comprende completamente cómo actúan las auxinas en el sistema radical ni los cambios estructurales que inducen en el tejido bajo estrés por Cd, así como su influencia en la fitoextracción de este metal. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ácido indol acético y del ácido naftalenacético en el tejido radicular de *T. latifolia* expuesto al Cd y su contribución a la tolerancia y acumulación del metal. Inicialmente, las auxinas se aplicaron en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ppm durante el proceso de germinación de la especie vegetal, y posteriormente en plántulas de 1 mes de desarrollo en sistemas de hidroponía. Se evaluó el efecto de estas auxinas en el crecimiento y la tolerancia de *T. latifolia* bajo estrés por Cd, mediante análisis de fenotipo, clorofila, pérdida de electrolitos, glutatión reducido y actividad catalasa. Además, se determinó la fitoextracción de Cd cuantificando los niveles del metal mediante espectrofotometría de absorción atómica. Finalmente, se evaluaron los cambios estructurales inducidos por las auxinas en el tejido radicular de la planta modelo. Los resultados indicaron que el uso de ANA y AIA durante la germinación promueve el crecimiento y desarrollo general de la especie vegetal. En plántulas de 1 mes, el efecto beneficioso de las auxinas se reflejó en un aumento de la biomasa del tejido radicular. Se encontró que concentraciones de 0.5 ppm de ANA y 1 ppm de AIA mejoran la tolerancia de *T. latifolia* al estrés por Cd, facilitando su acumulación en el tejido radicular. Además, la histología reveló un aumento en el diámetro de los pelos radiculares después de la suplementación con auxinas, tanto en ausencia como en presencia de Cd, lo que sugiere una mayor síntesis de componentes celulares, como carbohidratos. Estos resultados contribuyen a comprender la interacción entre auxinas, planta y metal.

**Palabras claves:** *T. latifolia*; fitorremediación; cadmio; auxinas.

## ABSTRACT

Currently, research has focused on the search for ecological strategies for heavy metal removal. Auxin-producing bacteria have been shown to enhance heavy metal phytoextraction in *T. latifolia*. However, how auxins act on the root system and the structural changes they induce in the tissue under Cd stress, as well as their influence on Cd phytoextraction, are not yet fully understood. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of indole acetic acid and naphthaleneacetic acid on the root tissue of *T. latifolia* exposed to Cd and their contribution to the tolerance and accumulation of the metal. Initially, auxins were applied at concentrations of 0.1, 0.5 and 1 ppm during the germination process of the plant species, and subsequently in seedlings of 1 month of development in hydroponic systems. The effect of these auxins on the growth and tolerance of *T. latifolia* under Cd stress was evaluated by analysis of phenotype, chlorophyll, electrolyte loss, reduced glutathione and catalase activity. In addition, Cd phytoextraction was determined by quantifying metal levels using atomic absorption spectrophotometry. Finally, auxin-induced structural changes in the root tissue of the model plant were evaluated. The results indicated that the use of ANA and AIA during germination promotes the overall growth and development of the plant species. In 1-month-old seedlings, the beneficial effect of auxins was reflected in an increase in root tissue biomass. Concentrations of 0.5 ppm ANA and 1 ppm AIA were found to improve the tolerance of *T. latifolia* to Cd stress, facilitating its accumulation in root tissue. In addition, histology revealed an increase in the diameter of root hairs after auxin supplementation, both in the absence and presence of Cd, suggesting an increased synthesis of cellular components, such as carbohydrates. These results contribute to the understanding of the interaction between auxins, plant and metal.

**Key words:** *T. latifolia*; phytoremediation; cadmium; auxin.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por metales pesados ha aumentado (Neira-Moscoso et al., 2021) debido a que éstos son liberados hacia el ecosistema como consecuencia de las diversas actividades antropogénicas, generando así, una serie de amenazas para las plantas, animales e incluso para los seres humanos, debido a su persistencia, bioacumulación, propiedad no biodegradable y toxicidad a bajas concentraciones (Pabón Guerrero et al., 2022).

El cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico del que no existe evidencia que indique que es biológicamente esencial o benéfico para las plantas, animales y humanos (Cueva Cruz & Urquiza Rojas, 2020). El Cd provoca cáncer, enfermedad de itai-itai, infarto de miocardio, enfermedad arterial periférica, hipertensión y nefropatía diabética en el ser humano (Zafra Sánchez & Flores Tique, 2020). Mientras que, en las plantas retrasa el crecimiento, clorosis, enrojecimiento de las puntas de las raíces y conduce a su muerte (Huaraca-Fernández et al., 2020).

Para el cadmio no existe una degradación biológica o química en la naturaleza. Asimismo, los métodos fisicoquímicos para su eliminación son costosos y poco amigables con el medio ambiente. Por lo que, se han implementado técnicas como la fitorremediación para la remoción o inmovilización de este y otros metales pesados (Netro Soto, 2018). La fitorremediación es una técnica alternativa rentable, no invasiva, ecológica y sustentable, que remueve contaminantes localizados en suelos, aguas y sedimentos contaminados (Mendarte-Alquisira et al., 2021; Ramírez Revilla et al., 2018). La fitorremediación puede hacer uso de plantas y microorganismos asociados (hongos o bacterias) de manera simultánea, para remover, filtrar, biodegradar y/o transformar, además de estabilizar contaminantes, representando así una alternativa efectiva y de bajo costo para la remediación de los sistemas contaminados (Jiménez et al., 2020).

*Typha latifolia* es una macrófita fitorremediadora, empleada en la fitorremediación debido a su capacidad para tolerar elevadas concentraciones de contaminantes y la acumulación de metales pesados como: Pb, Cd, Cr, Mn y Fe. Además, estudios previos han demostrado que esta planta es capaz de extraer Cd y Pb, lo que la sugiere como una excelente alternativa para la remoción de estos metales en sitios contaminados. Se ha demostrado que *T. latifolia* establece relaciones simbióticas con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por

sus siglas en inglés), las cuales confieren tolerancia a los metales pesados y optimizan la fitoextracción (Salcedo Recalde, 2019).

En nuestro grupo de investigación se han aislado y caracterizado PGPR asociadas a las raíces de *T. latifolia*, entre estas se ha demostrado que *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, induce la germinación de semillas, confiere tolerancia a Cd y mejora su translocación a los tejidos aéreos. *P. rhodesiae* GCR140 solubiliza fosfatos, produce sideróforos, ácido indol acético (AIA), ácido fenil acético (AFA) y tiene actividad ACC-desaminasa, que en conjunto contribuyen a la adaptación de la planta a las condiciones de estrés causado por Cd (Martínez-Martínez, 2024; Rolón-Cárdenas *et al* 2015).

En los últimos años, la atención se ha centrado en las auxinas (AIA y AFA) bacterianas, incluso se han hecho esfuerzos por caracterizar PGPR productoras de auxinas debido a que las bacterias pertenecientes a este grupo ejercen los mejores efectos en las plantas utilizadas en fitorremediación.

Dado que hasta el momento se ha observado el efecto global de *P. rhodesiae* GCR140 en la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*, se desconoce la contribución particular de las auxinas en la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*, así como los efectos de las auxinas en la arquitectura y en la morfología de las células radiculares de *T. latifolia*. Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de AIA y Ácido Naftalenacético (ANA, auxina sintética) en la fitoextracción de Cd por *Typha latifolia*, así como los cambios en la arquitectura radicular y la morfología de las células de las raíces de *T. latifolia*.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 General

Evaluar el efecto del ácido indol acético y del ácido naftalenacético en el tejido radicular de *T. latifolia*, tanto en presencia como en ausencia de Cd, y determinar su influencia en el proceso de fitoextracción de este metal.

### 1.5.2 Específicos

- Determinar el efecto del ácido indol acético y ácido naftalenacético en la germinación de semillas, en el sistema radicular y brotes de *T. latifolia* en condiciones *in vitro*.
- Analizar la contribución del ácido indol acético y el ácido naftalenacético en el balance redox y en fitoextracción de Cd en *T. latifolia* cultivada en sistemas de hidroponía.
- Establecer el efecto del ácido indol acético y el ácido naftalenacético en el tejido radicular de plantas de *T. latifolia* expuestas y no expuestas a Cd en sistemas de hidroponía.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Contaminación por metales pesados

Los metales pesados son elementos químicos con una densidad relativamente alta, los cuales pueden llegar a ser tóxicos incluso a bajas concentraciones. Se encuentran de manera natural en el suelo en forma de minerales, sales u otros compuestos, en concentraciones que por lo general no afectan las diferentes formas de vida (Londoño-Franco et al., 2016); siendo algunos de ellos esenciales como elementos traza [cobre (Cu), selenio (Se), zinc (Zn), manganeso (Mn)], dado que son imprescindibles para mantener el correcto metabolismo en plantas, animales y particularmente el cuerpo humano (Méndez et al., 2008).

Sin embargo, la concentración de los metales pesados en suelo, agua y sedimentos, ha incrementado en las últimas décadas como consecuencia de las actividades antropogénicas (Cortés et al., 2017); convirtiéndose así en un problema de contaminación medioambiental, esto debido a que no pueden ser degradados o eliminados fácilmente de manera natural o biológica (Méndez et al., 2008).

Las actividades antropogénicas que contribuyen al incremento de los metales pesados son la deposición de residuos industriales y domésticos; la agricultura, debido al uso de fertilizantes inorgánicos, agroquímicos; y las actividades minero-metalúrgicas (Onakpa et al., 2018). En los últimos años se han reportado problemas de contaminación por metales en estados como: Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo, Chihuahua, Coahuila, Sonora, Durango, Sinaloa, Nuevo León y Aguascalientes, debido a las altas concentraciones de estos en aguas subterráneas, atmósfera y áreas urbanas cercanas a zonas mineras-metalúrgicas, teniendo un impacto negativo en la salud y el ambiente (Soto-Jiménez et al., 2019).

Es por ello que, la contaminación por metales pesados se ha convertido en una preocupación mundial, a causa de su estrecha relación con el agua y suelo; siendo este último en el que reside el mayor peligro, debido a su acumulación en plantas y a la transferencia de estos metales a los animales incluido al ser humano a través de la cadena alimenticia, lo que eventualmente causará impactos adversos en la salud de los humanos; convirtiéndose en una amenaza para la seguridad alimentaria, el medio ambiente y el desarrollo sostenible del sector

agrícola (Awa & Hadibarata, 2020; C. Li et al., 2019). Mientras que, la exposición de plantas a metales pesados conduce a respuestas biológicas a nivel bioquímico, celular y fisiológico, que incluyen el aumento en la peroxidación lipídica, variaciones en la relación clorofila-carotenoides, aumento en la concentración de glutatión (GSH) y tioles, aparición de péptidos quelantes y fitoquelatinas, además del aumento en la actividad o inhibición de enzimas antioxidantes (Pernía et al., 2008).

## **2.2 Cadmio (Cd)**

El cadmio (Cd), es un elemento no esencial para la vida y tóxico incluso a bajas concentraciones; el cual casusa efectos perjudiciales en los seres vivos al ser almacenado en sus tejidos (Llatance et al., 2018; Willwater, 2018). A pesar de ello, este metal cuenta con fuentes naturales propias, siendo las actividades volcánicas e incendios forestales algunas de ellas (Mero et al., 2019). El Cd se encuentra en la corteza terrestre en concentraciones de 0.1 ppm junto a otros metales pesados, pero no como elemento puro, sino en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos de zinc, plomo y menas de cobre, contribuyendo así alrededor del 10 % de la contaminación total por Cd (García & Cruz, 2012; Huaraca-Fernández et al., 2020; Nieves et al., 2019).

En los últimos años la concentración de Cd en la naturaleza ha aumentado debido a que es liberado hacia el ambiente como consecuencia de las actividades industriales, las cuales utilizan este metal en la elaboración de bienes de consumo y productos como: baterías de níquel-cadmio, pigmentos, plásticos, cerámica, vidrios, dispositivos electrónicos, etc. (Gómez, 2020). Además de ello, existen otras actividades como la minería, el implemento de fertilizantes fosfatados, la fundición de metales y la quema de combustibles fósiles, las cuales representan una fuente importante de contaminación, liberando más del 90 % de Cd al medio ambiente, estimándose alrededor de 30,000 toneladas liberadas de este metal hacia el ecosistema por año, detectándose niveles de Cd en agua, suelo y plantas, que superan los límites permisibles establecidos (Hernández-Baranda et al., 2019; Huaraca-Fernandez et al., 2020).

Para el Cd no existe una degradación biológica o química en la naturaleza, esto debido a su interacción con otros metales pesados, como: el zinc, plomo y cobre, los cuales se encuentran presentes en el suelo (Rebollo Soto, 2012). Este metal cuenta con gran afinidad a la materia

orgánica, lo que provoca su absorción por parte de las plantas y por consiguiente la incorporación de este a la cadena trófica, siendo su fijación mayor en suelos con textura fina, mayor cantidad de materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico, permaneciendo el Cd en el suelo por periodos de tiempo prolongados, impidiendo así el rendimiento adecuado de los productos agrícolas, además de afectar la salud humana y el ecosistema (Zafra Sánchez & Flores Tique, 2020).

En los últimos años, el cadmio (Cd) ha adquirido una considerable importancia, siendo clasificado como la séptima sustancia más prioritaria en términos de peligrosidad por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Esta relevancia se debe a su alta toxicidad, capacidad de bioacumulación, persistencia y falta de biodegradabilidad (Contreras, 2018). El Cd desencadena una serie de efectos adversos en los seres humanos, los cuales varían según el tipo de exposición: inhalación de aire contaminado, ingesta de alimentos y agua contaminados. Entre las enfermedades asociadas a la exposición al Cd se incluyen trastornos renales, hipertensión, anemia, osteoporosis, osteomalacia, diabetes, anosmia, rinitis crónica, eosinofilia y diversos tipos de cáncer, como leucemia, cáncer de mama, páncreas, pulmón y próstata (Martínez Flores et al., 2013; Pernía et al., 2018). Mientras que la acumulación del Cd en plantas altera su metabolismo y fisiología, lo que eventualmente, puede causar su muerte, esto debido a que causa la inhibición de la germinación, retraso del crecimiento, elongación de las raíces y disminución de la biomasa. Además de ello, provoca cambios en el funcionamiento de la membrana, inhibición de la apertura estomática, inhibición de la síntesis de clorofila, alternancia de la actividad fotosintética, clorosis, reducción del contenido de carotenoides, disminución de la tasa de transpiración, aumento de los niveles de peroxidación lipídica, estrés oxidativo a causa de la formación de ROS, reducción de enzimas antioxidantes, inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial, interferencia en la toma, transporte y uso de macro y micronutrientes como Fe, Mn y Zn, y cambios a nivel de ADN (Aguirre et al., 2022; Bayona-Penagos, 2020).

Es por ello, que se han desarrollado diversas investigaciones con el fin de determinar la magnitud de este problema y proponer estrategias que contribuyan en la solución del mismo, priorizando el uso de alternativas biológicas, debido al bajo impacto que producen al ambiente (Covarrubias & Cabriales, 2017).

### 2.3 Fitorremediación

Fitorremediación es una palabra que deriva del prefijo griego “*phyto*” que significa planta y del sufijo latín “*remedium*” que significa limpiar o restaurar; es decir, que las plantas se utilizan para corregir o eliminar un compuesto xenobiótico (Moosavi & Seghatoleslami, 2013). Esta es una tecnología emergente que ha cobrado gran importancia, puesto que es una estrategia prometedora como alternativa a las técnicas convencionales de remediación de sitios contaminados, las cuales se basadas en procesos fisicoquímicos, siendo la precipitación, adsorción, evaporación, ósmosis inversa, intercambio iónico, entre otras, algunas de las técnicas empleadas. Sin embargo, a pesar de ser efectivas para la descontaminación de suelos, estas tecnologías presentan una serie de obstáculos, puesto que son de un alto costo, debido a que requieren insumos externos siendo su uso a gran escala una limitante, además de ser de naturaleza disociadora y finalmente ser insuficientes para la eliminación de altos niveles de metales en la mayoría de los casos (Apaza-Aquino & Valencia, 2020; Cartaya et al., 2011; Leyton et al., 2021). Mientras que la fitorremediación es una tecnología sustentable, no invasiva, ecológica y de bajo costo para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminantes naturales y antropogénicos (Delgadillo-López et al., 2011; Mendarte-Alquisira et al., 2021). Es por ello que se han optado por la implementación de esta tecnología, la cual pretende resolver los problemas de contaminación medioambiental, a través de la aplicación de plantas *in situ* o *ex situ* para la reducción, remoción o inmovilización de contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en agua, suelos, lodo y sedimentos (Betancur et al., 2005; Martínez-Manchego et al., 2021). La fitorremediación es eficiente para el tratamiento de suelos contaminados con compuestos orgánicos como hidrocarburos de petróleo, solventes clorados, desechos de nitrotolueno, agroquímicos clorados y organofosforados; además de compuestos inorgánicos como Cd, Cr (VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn (Betancur et al., 2005; Jadia & Fulekar, 2009).

## 2.4 Mecanismos de fitorremediación

La remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en agua, suelo y atmósfera puede llevarse a cabo a través de distintos procesos de fitorremediación, entre los que se encuentran la fitoextracción, fitovolatilización, fitoestabilización, rizofiltración, fitodegradación y fitoestimulación (**Figura 1**). La elección de un proceso u otro está sujeta a algunas variables como son: la superficie y las características del ambiente a remediar, la naturaleza del contaminante y de la especie vegetal elegida. (Cabo & Marconi, 2021).

La fitoextracción también conocida como fitoacumulación, fitoabsorción o fitosequestro, es la remoción de contaminantes de suelos y agua mediante su absorción, a través de las raíces de las plantas junto con su translocación y acumulación en tallo y brotes (Ali et al., 2013); siendo este proceso el más prometedora para restaurar suelos contaminados por metales pesados (Canales Farah, 2021).

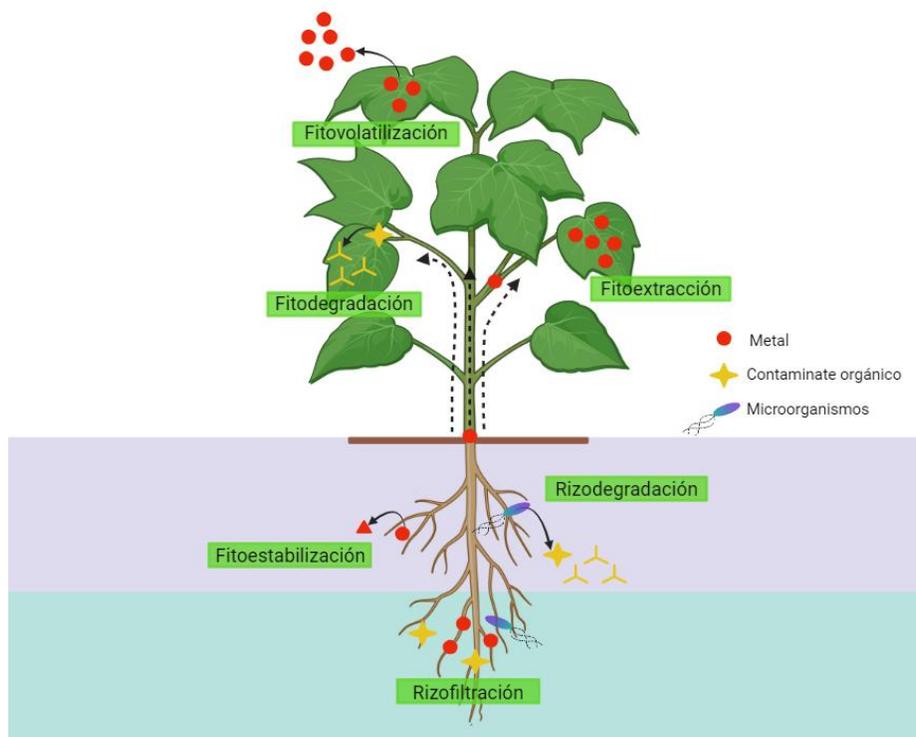
La fitoestabilización consiste en la estabilización del contaminante *in situ*, mediante la reducción de su movimiento e inmovilización, evitando así su migración a aguas subterráneas, a través de la adsorción en las raíces de la planta utilizada o precipitación del contaminante (Huaraca Huaman & Lujan Espinoza, 2020; Pancorbo Arias & Ruiz Sandoval, 2020).

En la rizofiltración se hace uso del sistema radicular de plantas cultivadas de forma hidropónica, siendo usadas estas en su forma madura. El sistema radicular de plantas absorbe y acumula contaminantes como: metales, radionúclidos, productos químicos orgánicos, nutrientes y patógenos; posteriormente este se recolecta al encontrarse saturado y terminan por su disposición final (Herath & Vithanage, 2015; Huanuco Evangelista & Temoche Cortez, 2020).

La fitovolatilización es la captación de los contaminantes por parte de las plantas a través del suelo, lo cuales son degradados a la forma menos tóxica y transformados en compuestos volátiles, para finalmente ser liberados a la atmósfera por transpiración a través de los estomas de las plantas (Lee et al., 2020; Muthusaravanan et al., 2018). Elementos tóxicos como Se, As y Hg son algunos de los metales que pueden ser convertidos en formas volátiles, al igual que ciertos compuestos orgánicos (Hooda, 2007).

En la fitodegradación, las plantas en asociación con microorganismos presentes en la zona rizosférica, degradan los contaminantes orgánicos mediante procesos metabólicos. En dicho proceso los contaminantes son metabolizados dentro del tejido vegetal de las plantas, donde se producen enzimas como la dehalogenasa y la oxigenasa, que contribuyen a catalizar la degradación. Además de ello, dichas enzimas pueden ser liberadas a la rizósfera, donde pueden desempeñar un papel activo en la transformación de los contaminantes; encontrándose nitrorreductasa, peroxidasa, lacasa y nitrilasa, en los sedimentos de las plantas y suelos. Empleándose esta tecnología en la remoción de disolventes clorados, explosivos como el TNT, herbicidas e insecticidas, etc. (Delgadillo-López et al., 2011; Jabeen et al., 2009).

La fitoestimulación también conocida como rizodegradación, es la descomposición de los contaminantes dentro la rizósfera de las plantas; la cual, es llevada a cabo por bacterias u otros microorganismos presentes ella, siendo su presencia y crecimiento estimulado por los exudados de las raíces. Esta técnica, tiene éxito en el tratamiento sustancias orgánicas como: los hidrocarburos de petróleo, disolventes clorados, pesticidas, benceno, tolueno, xilenos, etc. (Etim, 2012).



**Figura 1.** Mecanismos de fitorremediación.

## 2.5 El género de *Typha* spp.

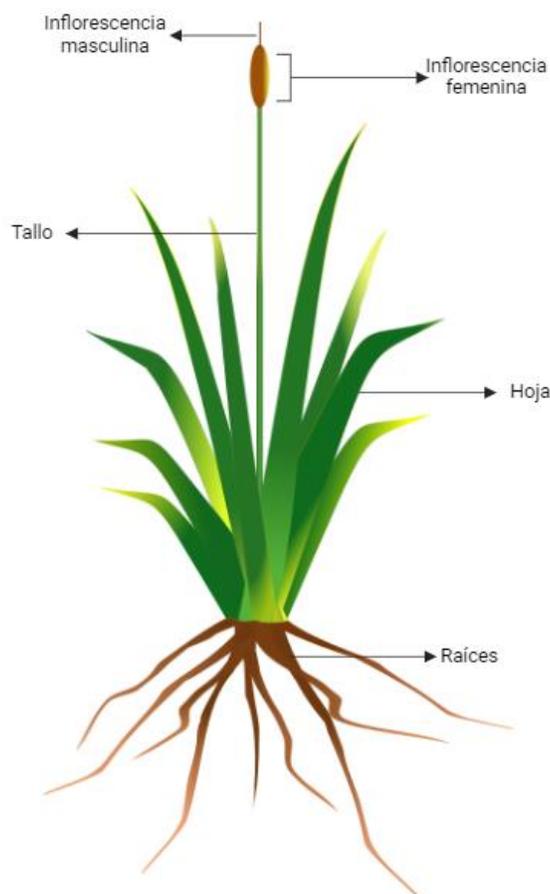
*Typha* spp., también conocida como “cattail”, es una hierba acuática erecta, rizomatosa y perenne que florece en un tallo delgado de 1 a 3 metros de altura (Baldwin & Cannon, 2007) (**Figura 2**). La cual, incluye nueve especies: *T. minima*, *T. elephantine*, *T. angustifolia*, *T. domingensis*, *T. capensis*, *T. latifolia*, *T. shuttleworthii*, *T. orientalis*, y *T. laxmannii*; esto de acuerdo con el último estudio taxonómico realizado (Zhou et al., 2018); siendo *T. latifolia*, *T. domingensis* y *T. angustifolia*, las especies mayormente extendidas (Hamdi et al., 2009). La propagación de dichas especies se lleva a cabo principalmente a través del crecimiento de sus rizomas, extendiéndose de manera horizontal bajo la superficie del suelo para iniciar un nuevo crecimiento vertical; sin embargo, también es posible a partir de sus semillas (Hamdi et al., 2009; Mitich, 2000), siendo estas de distribución geográfica global, encontrándose en todo el mundo a excepción de Groenlandia y la Antártida (Ciotir et al., 2017; Ganie et al., 2015).

*Typha* sp. es considerada una especie invasora, debido a que tiene la habilidad de adaptarse a diversas condiciones abióticas. Puesto que, puede crecer en una gran variedad de hábitats acuáticos y semiacuáticos, que van desde zonas tropicales hasta templadas, encontrándose en: orillas de lagos, cunetas de carreteras, ciénagas, embalses, prados húmedos, pantanos, etc; prosperando en ambientes salinos, deficientes de nutrientes, inundaciones y sequías (Baldwin & Cannon, 2007; Bellavance & Brisson, 2010).

Sin embargo, dentro de la historia de la humanidad el género de *Typha* ha sido relevante a través de los años. Debido a que, algunas especies de este género eran utilizadas por los nativos americanos como materia prima para la elaboración de alimentos como: pan, budín, jarabes, etc. En Rusia, los brotes jóvenes se utilizaban como sustituto del espárrago, llamándolo "espárrago cosaco", mientras que los primeros pobladores de Virginia degustaban las raíces cocidas. Así mismo, durante la Primera Guerra Mundial, el pueblo alemán hizo de “cattail” una de sus fuentes de alimento (Mitich, 2000; Pandey & R.k, 2018).

En la actualidad, “cattail” sigue siendo utilizada por algunos pobladores de Bolivia y Perú como material de construcción (Pandey & R.k, 2018). Así como en la medicina tradicional de países como: China, India y Turquía (Kumar et al., 2013), siendo objeto de estudio y reportándose propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias (Pawar & Landge, 2010;

Varghese et al., 2009). Sin mencionar que, *Typha* spp. juega un papel esencial en la biogeoquímica de los humedales, siendo las principales productoras y conductoras del ciclo de la materia orgánica, contribuyendo en la calidad del agua y la biodiversidad, al ser el hábitat en que residen ciertos microorganismos y especies animales (Sesin et al., 2021).



**Figura 2.** *Typha latifolia*.

### **2.6 *Typha* spp. y su papel en la fitorremediación**

Las especies vegetales presentes en los humedales juegan un papel importante en el mantenimiento y purificación de los sistemas acuáticos contaminados por compuestos orgánicos e inorgánicos (Denegri-Muñoz & Iannacone, 2020). Un claro ejemplo de ello es el género de *Typha*, macrófita perene emergente, de alta producción de biomasa radicular y adaptabilidad a condiciones abióticas poco favorables. La cual, posee un gran potencial en la remediación de sitios contaminados, debido a su capacidad para tolerar y remover contaminantes orgánicos, así como la habilidad de bioacumular metales pesados (Nandakumar et al., 2005; Pietrangelo et al., 2018; Ponce-Hernández et al., 2020); siendo

empleada en humedales naturales y/o construidos (Saha et al., 2016), para la eliminación de contaminantes de los ecosistemas acuáticos, permitiendo el desarrollo de la vida silvestre; así como la protección de las costas ante la erosión y los ambientes marinos (Baldwin & Cannon, 2007).

*Typha* spp., es eficiente en la eliminación de iones de los efluentes, dado a las características de su estructura interna. Las cuales, se encuentran formadas por tejidos con espacios abiertos permitiendo la absorción de contaminantes, una correcta evapotranspiración y transporte de oxígeno desde la atmósfera a las hojas y finalmente a las raíces (Petry et al., 2020). Empleándose especies como *T. domingensis*, *T. latifolia*, y *T. angustifolia* en la remoción de Al, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, y Zn de humedales naturales con aguas residuales municipales contaminadas por metales pesados (Bonanno & Cirelli, 2017). Así mismo, se ha reportado a *T. latifolia* con capacidad de remoción y acumulación de metales pesados como Zn, Ni, Cu, Pb, Co, Mn y Cd, sugiriéndola como un biomonitor; puesto que, solo acumulan metales en su sistema radicular, siendo su traslocación de raíces a brotes poco eficiente en algunos casos (Sasmaz et al., 2008).

Por otro lado, Carranza-Álvarez et al., 2008, la considera como una alternativa en la extracción de contaminantes inorgánicos de aguas residuales municipales e industriales. Si bien, ha observado una mayor concentración de metales pesados (Pb, Cd, Cr, Mn y Fe) en raíces en comparación con el tallo y hojas, sigue siendo una alternativa interesante para el tratamiento de sistemas de aguas contaminadas. Del mismo modo, en los estudios realizados por Amare & Workagegn, 2022, *T. latifolia* ha mostrado un potencial prometedor para la remoción de Zn, Pb y Cd. Observándose la capacidad de esta macrófita para remover y translocar el Cr de raíces a brotes; siendo idónea para los procesos de fitorremediación.

*T. latifolia*, *T. angustifolia* y *T. domingensis*, son las tres especies de “cattail” mayormente empleadas en los procesos de fitorremediación. Dado que, son las macrófitas más comunes de este género, siendo de distribución global, de rápido crecimiento y con gran biomasa (Bonanno & Cirelli, 2017). Empleándose en estudios enfocados en la eliminación de metales pesados de cuerpos de agua contaminados (**Tabla 1**); así como aquellos que involucran el tratamiento de aguas residuales domésticas, recuperadas y en la remoción de algunos fármacos (**Tabla 2**).

**Tabla 1.** Especies de *Typha* empleadas en la fitorremediación de metales pesados.

<b>Especie</b>	<b>Metal pesado</b>	<b>Sitio/sistema</b>	<b>Referencia</b>
<i>T. latifolia</i>	Mn, Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Co	Estanque	(Klink et al., 2013)
	Zn, Cu	Humedal construido	(Hejna et al., 2020)
	Cu, Cd, Cr, Ni, Fe, Pb, Zn	Humedal construido	(Kumari & Tripathi, 2015)
	Fe, Cu, Pb, Zn	Humedal construido	(Anning et al., 2013)
	Mn, Zn	Humedal construido	(Rana & Maiti, 2018)
	Cd, Ni, Zn, Cu	Rio	(Azizi et al., 2020)
	Pb, Cr, Mn	Humedal construido	(Santos-Díaz & Barrón-Cruz, 2011)
	As, Cd, Cr	Humedal construido	(Leura-Vicencio et al., 2013)
	Pb, Zn, Cu, Cd	Lagos	(Klink, 2017)
	Cd	Humedal construido	(Yang & Shen, 2020)
<i>T. domingensis</i>	Ba	Humedal natural	(Carvalho et al., 2019; Viana et al., 2019)
	Cd	Humedal natural	(Oliveira et al., 2017)
	Cr, Ni, Zn	Humedal construido	(Hadad et al., 2018)
	Hg	Rio	(Lominchar et al., 2019)
	Cr, Ni, Zn	Reactor de plástico	(Mufarrege et al., 2014)
	P, N	Humedal construido	(Di Luca et al., 2019)
	Ba	Humedal construido	(Ribeiro et al., 2018)
	Al, Fe, Zn, Pb	Estanque	(Hegazy et al., 2011)
	Hg	Humedal construido	(M. V. T. Gomes et al., 2014)
	Cr, Ni, Zn	Humedal construido	(Maine et al., 2022)
	Zn, Pb, Ni, Cr, Cd	Humedal construido	(Soudani et al., 2022)
	Fe, Mn, Ni, Pb, Cr	Humedal construido	(M. J. Shahid et al., 2020)
	<i>T. angustifolia</i>	Zn, Cd, Pb	Humedal construido
Cd, Pb		Humedal construido	(Panich-pat et al., 2010)
Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb		Humedal construido	(Chandra & Yadav, 2011)
Cd, Pb, Cr, Ni, Zn, Cu		Humedal natural	(Demirezen & Aksoy, 2004)
Cr		Hidroponía	(Vidayanti et al., 2017)

**Tabla 2.** Especies de *Typha* empleadas en el proceso de fitorremediación de compuestos orgánicos.

Especie	Compuestos orgánicos	Sitio/sistema	Referencia
<i>T. angustifolia</i>	Aguas residuales con ibuprofeno	Mesocosmos	(D. Zhang et al., 2016)
	Aguas residuales domésticas y agua embalsada	Lago	(Y. H. Li et al., 2011, 2013)
	Agua recuperada	Humedal artificial	(Y. Guo et al., 2015)
<i>T. latifolia</i>	Ácidos nafténicos	Sistema hidropónico	(Phillips et al., 2010)
	Atrazina	Zanja	(James et al., 2017; James & Singh, 2018)
	Diclofenaco y naproxeno	Humedal artificial	(Zapata-Morales et al., 2020).
	Aguas residuales municipales y porcinas	Mosaico jerárquico de ecosistemas artificiales	(Arroyo et al., 2010)
	Aguas residuales de curtiduría	Humedales artificiales	(Calheiros et al., 2009)
<i>Typha sp.</i>	Agua recuperada	Humedal artificial	(RuiJie et al., 2016)

### 2.7 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

Durante los procesos de fitorremediación, los microorganismos asociados a las especies vegetales empleadas en la remoción de metales pesados juegan un papel muy importante en la relación suelo-planta (D. Guo, Fan, et al., 2019). Siendo la rizósfera el lugar clave entre las raíces de las plantas y el suelo; puesto que, es colonizada por distintos microorganismos rizosféricos y endófitos. Los cuales, pueden mejorar la biodisponibilidad de los metales, brindar tolerancia ante su acumulación e incrementar la biomasa de las plantas (Fuke et al., 2021). Microorganismos entre los que se encuentran, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR); mismas que establecen una relación simbiótica con la especie vegetal ayudándola a hacer frente a los efectos tóxicos producidos por el contaminante, al estimular su crecimiento y siendo responsables del incremento o la disminución del suministro de nutrientes (He et al., 2020; Nedjimi, 2021). Esto a través de distintos mecanismos que involucran la solubilización de fosfatos y la fijación de nitrógeno. Así como la producción de sideróforos, ácidos orgánicos, fitohormonas y enzimas como: quitinasa,

glucanasa y 1-aminociclopropano-1- carboxilato (ACC-desaminasa) (Asad et al., 2019; Khanna et al., 2021; Sharma, 2021). Mientras que las plantas brindan las condiciones necesarias para el desarrollo de las comunidades bacterianas, siendo su composición y abundancia determinadas por los exudados de las raíces; así como la ubicación geográfica, la calidad del agua, pH, tipo y propiedades del suelo, etc. (Arroyo et al., 2015; Y. H. Li et al., 2013).

## **2.8 PGPR asociadas a *Typha latifolia* y su papel en la fitoextracción de metales pesados**

Se han realizado investigaciones enfocadas en la identificación de cepas de PGRP que realmente eficienten los procesos de fitorremediación y al ser *Typha* spp. considerada como una macrófita fitorremediadora, debido a su capacidad para acumular metales pesados, no es de extrañar que dichos estudios estén enfocados en esta especie vegetal. Pues bien, en los últimos años la identificación de las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera o raíces de esta especie vegetal han cobrado importancia; puesto que, contribuyen en la resistencia ante el estrés ocasionado por contaminantes, mejorando los procesos de fitorremediación de aguas eutrofizadas (Gao & Shi, 2018; Y. H. Li et al., 2011).

Tal es el caso reportado por Deng et al., 2017, quienes asilaron bacterias endófitas de *T. orientales* recolectada de un depósito de relaves de uranio, identificando a *Pseudomonas* spp. XNN8. Esta bacteria presento actividad ACC desaminasa, capacidad de producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos y tolerancia ante el uranio. Además de esto, se observó que su inoculación en *S. podophyllum* contribuye en la remoción uranio, siendo esto atribuido a los metabolitos producidos. Mientras que en *T. angustifolia* fueron aisladas tres bacterias asociadas a la rizosfera, siendo estas *Paenibacillus cookii* JGR8, *Pseudomonas jaduguda* JGR2 y *Bacillus megaterium* JGR9, las cuales mostraban actividades de promoción de crecimiento vegetal, que favorecían al tolerancia y desarrollo de *T. angustifolia* en condiciones de estrés ocasionado por metales (Ghosh et al., 2014).

Por otro lado, Rolón-Cárdenas, 2015 aisló y caracterizó una serie de bacterias endófitas a partir de las raíces de *Typha latifolia* colectada de un sitio impactado por metales; identificando molecularmente a cuatro cepas de *Pseudomonas rhodesiae* (GRC065, GRC066, GRC093 y GRC140), todas ellas presentaban características de promoción de crecimiento vegetal (producción de auxinas, síntesis de sideróforos, solubiliza fosfatos y

actividad ACC desaminasa). Sin embargo, GRC140 fue la cepa bacteriana con mayor versatilidad y adaptabilidad distintas condiciones de crecimiento, incrementando el contenido de Cd en brotes, así como su acumulación en *T. latifolia* (G. A. Rolón-Cárdenas, Martínez-Martínez, et al., 2022). Asimismo Rubio-Santiago et al., 2023, reportaron la presencia de bacterias asociadas a las raíces de *Typha latifolia*, identificando a *Pseudomonas azotoformans*(JEP3), *Pseudomonas fluorescens* (JEP8), *Pseudomonas gessardii* (JEP33) quienes presentaban tolerancia a Pb, así como *Pseudomonas veronii* (JEC8, JEC9, JEC11) cepas tolerantes a Cd. Todas ellas promueven el crecimiento de las plántulas de *T. latifolia* en presencia y ausencia de Pb o Cd, incrementando la longitud de brotes y raíces, gracias a la producción de sideróforos, ácido indol acético, actividad ACC desaminasa y solubilización de fosfatos.

En la breve recopilación de información sobre las bacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Typha* spp., es común destacar aquellas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Este género es prominente dentro de las PGPR debido a que muchas de sus especies poseen mecanismos tanto directos como indirectos que favorecen el desarrollo vegetal. Además, *Pseudomonas* es uno de los géneros más diversos de bacterias, y se encuentra en una variedad de hábitats ecológicos, incluyendo agua, suelo, sedimentos y plantas. Cabe mencionar que estas bacterias tienen requerimientos nutricionales simples. Además de ser rápidas colonizadoras del sistema radicular, así como de la rizósfera de las especies vegetales, esto gracias los exudados producidos por sus raíces, estableciendo así una relación simbiótica con esta especie vegetal (Fakhar et al., 2022; N et al., 2022; P. Singh et al., 2022).

## **2.9 Auxinas**

Como se ha mencionado previamente, las bacterias asociadas a las plantas acumuladoras de metales pesados juegan un papel muy importante durante el proceso de fitoextracción. Debido a que, favorecen la adaptación de las plantas a los sitios contaminados. Las bacterias propician el crecimiento vegetal e incrementa la biodisponibilidad de metales; características que son atribuidas a la producción de reguladores de crecimiento vegetal, conocidos como fitohormonas. Si bien, estas moléculas orgánicas son producidas de manera endógena por las especies vegetales, su síntesis no se limita a ellas. Puesto que, algunos microorganismos como

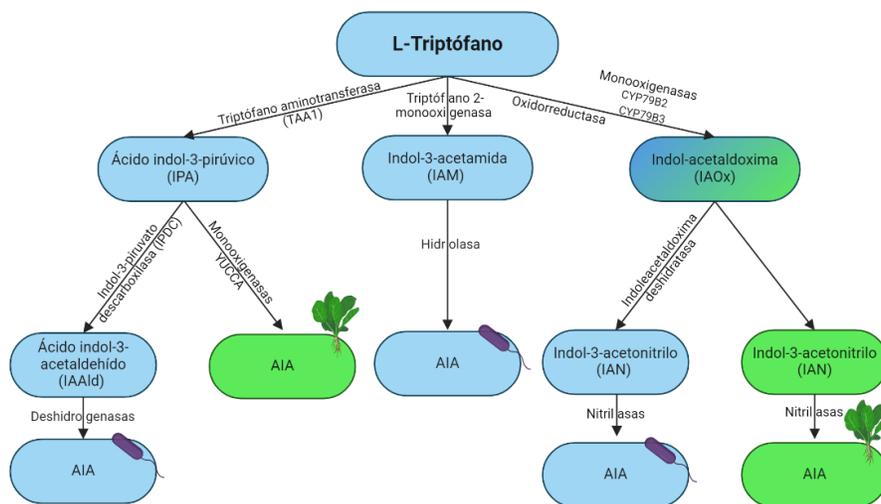
las bacterias presentes en el rizoplano son capaces de sintetizarlas siendo estas de producción exógena (Aguilar-Piedras et al., 2008). Entre estas moléculas se encuentran las auxinas.

Las auxinas son uno de los principales grupos de compuestos responsables de regular los procesos metabólicos en las plantas. Están directamente implicadas en la división y elongación celular, lo cual influye significativamente en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales. Un ejemplo notable de auxina es el ácido indol acético (AIA) (Borjas-Ventura et al., 2020). El AIA es uno de los primeros compuestos auxínicos descubiertos; si bien, no es la única auxina sintetizada por las especies vegetales, es la de mayor presencia en los tejidos vegetales. El AIA es sintetizado de manera endógena por los tejidos en crecimiento activo, lo que incluye las puntas de las raíces, los ápices de las hojas, coleóptilo, hojas jóvenes y frutos en desarrollo, donde coordina el crecimiento cambial y el desarrollo vascular (Flasiński & Hąc-Wydro, 2014; Ucea-Herrera et al., 2020). La producción exógena del AIA se ha reportado en bacterias del tipo PGPR, y actúan de manera similar al AIA endógeno debido a que, el AIA bacteriano incrementa el número de raíces laterales, pelos radiculares, así como la superficie total de la raíz, mejorando su exudación y absorción de minerales presentes en el suelo o sedimentos. En general el AIA exógeno incrementa la biomasa de las plantas, sin estar limitada solo al sistema radicular de las plantas; esto a través de la modulación de la expresión de proteínas que se encuentran relacionadas con el crecimiento y el metabolismo (Kong & Glick, 2017).

El AIA tanto endógeno como exógeno cuentan con múltiples vías para su biosíntesis, clasificándose estas como dependientes o independientes al triptófano, según sea el caso; siendo aquellas dependientes al triptófano las más relevantes. Puesto que, es el precursor más importante, dado que es utilizado por plantas y bacterias para llevar a cabo la síntesis del AIA; siendo en ocasiones sintetizada a través de la misma vía por ambos organismos (D. Duca et al., 2014) (**Figura 3**). Un ejemplo de ello es la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPA), la cual inicia con la desaminación del L-triptófano a IPA por el triptófano aminotransferasa (TAA1), después este es descarboxilado por el indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC) a ácido indol-3-acetaldehído (IAAld) y finalmente este es catalizado a AIA por deshidrogenasas, mientras que en plantas IPA es catalizado de manera directa por las monooxigenasas de la familia YUCCA para la biosíntesis de AIA (Ezeh et al., 2022; Garay-

Arroyo et al., 2014; D. Guo, Kong, et al., 2019). Si bien, la enzima IPDC, puede ser una limitante para que las bacterias lleven a cabo la síntesis de AIA a través de esta vía, se ha caracterizado el gen *ipdC* que codifica a dicha enzima, en especies como: *Azospirillum brasilense*, *E. cloacae*, *Pseudomonas putida*, *P. agglomerans* y *Paenibacillus polymyxa* (Vega-Celedón et al., 2016). Así mismo, la vía indol-3-acetamida (IAM) ha sido descrita en bacterias fitosimbióticas, siendo esta una reacción de solo dos pasos y teniendo como genes principales a *iaaM/tms-1* y *iaaH/tms-2* que codifica a las enzimas triptófano monooxigenasa e indoleacetamida hidrolasa/amidasa respectivamente. La reacción inicia con la conversión del triptófano a IAM por la enzima triptófano 2-monooxigenasa y posteriormente es catalizada por una hidrolasa/amidasa específica de IAM, que la hidroliza a IAA (D. Duca et al., 2014; D. R. Duca & Glick, 2020).

Por último, está la vía indol-acetaldoxima/indol-3-acetonitrilo (a IAOx/IAN); si bien, no ha sido del todo descrita en bacterias, el primer paso consiste en la conversión del triptófano a indol-3-acetaldoxima (IAOx) mediante una oxidorreductasa, después esta es catalizada por indoleacetaldoxima deshidratasa convirtiéndolo en indol-3-acetonitrilo (IAN) y finalmente es convertido a IAA; esto puede ser a través de dos vías, la primera por nitrilasas y la segunda por el sistema NHasa/amidasa (P. Zhang et al., 2019). Mientras que en plantas esta vía inicia convirtiendo al triptófano en IAOx, siendo catalizado por monooxigenasas CYP79B2 y CYP79B3 del citocromo P450, que al mismo tiempo es transformado en indol-3-acetonitrilo (IAN) y finalmente IAN es convertido a AIA mediante la acción de las enzimas nitrilasas (NIT) (G. A. Rolón-Cárdenas, Arvizu-Gómez, et al., 2022).



**Figura 3.** Vía de biosíntesis y conjugación del ácido indol acético (AIA).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Esterilización de material vegetal

Para lograr la asepsia de las semillas de *T. latifolia*, éstas se colocaron en un tubo falcón de 50 ml, enseguida se adicionaron 30 ml de agua destilada y se agitó durante 3 minutos. Posteriormente, las semillas se transfirieron a un microtubo estéril de 1.5 ml y se eliminaron los restos de agua por aspiración. Después, se adicionaron 500 µl de una solución de hipoclorito de sodio al 50 % + Tritón X-100 0.02 % y se resuspendieron e incubaron con agitación rotatoria durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se removió la solución de asepsia por aspiración y se lavó con 500 µl de agua estéril, seis veces.

Para comprobar la desinfección de las semillas, una asada del agua del último lavado se sembró en placa de agar Luria Bertani (LB) 1/5 y se incubó a 28°C por 24 h.

#### 3.2 Preparación de medio de cultivo MS 0.2X con glucosa

Para la germinación de las semillas de *T. latifolia* se preparó medio MS 0.2X enriquecido con glucosa a pH 5.7. Se disolvieron 0.068 gr de MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture), 0.8 gr de glucosa y 0.56 ml de Buffer MES (500 mM) (**Anexo 1**) en 80 ml de agua destilada; se llevó a ebullición y posteriormente se esterilizó en autoclave (15 minutos, 121°C, 15 lb de presión).

Para el cultivo *in vitro* de las semillas de *T. latifolia* se preparó medio MS 0.2X enriquecido con glucosa a pH 5.7. Se disolvieron 0.086 gr de MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture), 1 gr de glucosa, 1.5 gr de agar bacteriológico y 0.7 ml de Buffer MES (500mM), en 100 ml de agua destilada. Se llevó a ebullición hasta disolver el agar. Posteriormente, se dispensaron 20 ml del medio en frascos de vidrio con capacidad de 100 ml y se esterizaron en autoclave (15 minutos, 121°C, 15 lb de presión).

#### 3.3 Germinación *in vitro* del material vegetal

Las semillas estériles de *T. latifolia* se distribuyeron en tubos eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se adicionaron 500 µl de medio MS 0.2X con glucosa sin agar bacteriológico (sección 3.2). Las semillas se incubaron a 28 °C bajo luz fluorescente con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad durante 5 días.

### **3.4 Cultivo *in vitro* de *T. latifolia***

Las semillas *T. latifolia* con 5 días después de la germinación fueron transferidas y distribuidas en frascos con medio MS 0.2X enriquecido con glucosa y agar bacteriológico (véase sección 3.2). Estos frascos se incubaron a una temperatura de 28 °C, bajo luz fluorescente con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, durante un período de 15 días.

### **3.5 Preparación y ensamble del sistema hidropónico**

Se estableció un sistema hidropónico de acuerdo con lo reportado por Alatorre-Cobos et al., (2014). Para ello, se utilizaron recipientes de polietileno (PE), con capacidad de 1 L; el cual contenía en su interior un porta-semillas constituido por una malla de HDPE (en forma de círculo), sostenida entre dos anillos de PE (anillo inferior: 3 cm de altura y anillo superior: 2.5 cm de altura), apoyado sobre un aro de PE de 2.2 cm de altura aproximadamente. Cada sistema se colocó dentro de una bolsa termoplástica y se esterilizó a 151 °C, 15 lb de presión por 15 minutos.

### **3.6 Establecimiento de cultivo *in vitro* de *T. latifolia* en sistemas de hidroponía**

Se transfirieron tres plántulas de *T. latifolia* con 15 días de crecimiento a los sistemas de hidroponía, los cuales contenían 150 ml medio MS 0.2X enriquecido con glucosa. Los sistemas se incubaron a 28 °C durante 1 mes bajo luz fluorescente con fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad.

### **3.7 Efecto de las auxinas en *T. latifolia***

#### **3.7.1 Curva dosis-respuesta de auxinas en *T. latifolia***

Transcurrido el mes de desarrollo de *T. latifolia* en los sistemas de hidroponía (sección 3.6), las plántulas se expusieron a Ácido Indol Acético (AIA) y Ácido Naftalenacético (ANA), con base en el diseño experimental presentado en la **Tabla 3**. Para el experimento, se utilizó medio MS 0.2X sin glucosa + auxina (AIA o ANA) a tres concentraciones diferentes (**Tabla 3**) (**Anexo 2**). Finalmente se incubaron a 28 °C durante 10 días bajo luz fluorescente con fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad.

**Tabla 3.** Diseño experimental para evaluar el efecto de las auxinas en las plantas de *T. latifolia*.

Grupo	Tratamiento	Variables evaluadas
<i>T. latifolia</i> + AIA	○ 0.1 ppm	<b>Biomasa</b> ○ Peso fresco ○ Peso seco ○ pH ○ Cambios estructurales producidos en raíces.
	○ 0.5 ppm	
	○ 1 ppm	
	○ Control	
<i>T. latifolia</i> + ANA	○ 0.1 ppm	
	○ 0.5 ppm	
	○ 1 ppm	
	○ Control	

### 3.7.2 Germinación *in vitro* de *T. latifolia* suplementado con auxinas

#### 3.7.2.1 Preparación de agar agua

Para la germinación *in vitro* de las semillas de *T. latifolia* suplementada con auxinas se preparó agar agua al 0.5 %. Para ello, se pesaron 1.2 gr de agar bacteriológico y se disolvieron en 240 ml de agua destilada, se llevó a ebullición hasta homogenización. Se dispensaron 20 ml del agar en frascos de vidrio con capacidad de 100 ml y se esterilizó a 121 °C, 15 lb de presión por 15 minutos. Una vez terminado el periodo de esterilización, se dejó enfriar el medio a 45 °C y se adicionaron 134 µl de la auxina (AIA o ANA) a utilizar. Finalmente se homogenizó y dejó solidificar.

#### 3.7.2.2 Efecto de las auxinas en la germinación de *T. latifolia*

Se colocaron 20 semillas de *T. latifolia* previamente esterilizadas (sección 3.1) en agar agua (sección 3.7.2.1) suplementado con diferentes concentraciones de auxinas (AIA, ANA) de acuerdo con el diseño experimental presentado en la **Tabla 4**. Finalmente se incubaron a 28°C durante 15 días bajo luz fluorescente con fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad. La tasa de germinación se determinó a las 24 h, 48 h y 72 h posterior a la incubación. Tras 15 días, se determinaron parámetros de crecimiento. 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 4.** Diseño experimental para evaluar el efecto de las auxinas en la germinación de *T. latifolia*.

Grupo	Tratamiento	Variables evaluadas
<i>T. latifolia</i> + AIA	○ 0.1 ppm	○ Tasa de germinación (%) ○ Longitud de brotes ○ Longitud de raíces
	○ 0.5 ppm	
	○ 1 ppm	
	○ Control	
<i>T. latifolia</i> + ANA	○ 0.1 ppm	○ Número de brotes ○ Número de raíces
	○ 0.5 ppm	
	○ 1 ppm	
	○ Control	

### 3.8 Efecto de las auxinas en la captación de Cd por *T. latifolia*

Las plántulas con 1 mes de crecimiento en los sistemas de hidroponía (sección 3.6) se sometieron a un cambio de medio hidropónico suplementado con los diferentes tratamientos, de acuerdo con el diseño experimental presentado en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Diseño experimental para evaluar el efecto de las auxinas en la captación de Cd, por plántulas de *T. latifolia*.

Grupo	Tratamiento	Variables para evaluar
<i>T. latifolia</i> sin Cd	○ Control MS	○ Biomasa
		○ Contenido de clorofila
<i>T. latifolia</i> con Cd 40 ppm	○ MS + Cd ○ AIA (Sigma Aldrich) ○ ANA (Sigma Aldrich)	○ Contenido de glutatión
		○ Determinación de catalasa
		○ Fuga de electrolitos
		○ Contenido de Cd en raíces y hojas
		○ Cambios estructurales en las raíces producidos por el Cd.

### **3.9 Análisis fenotípico**

#### **3.9.1 Peso fresco**

Transcurrido el período de tratamiento, las plántulas de *T. latifolia* se recuperaron de los sistemas de hidroponía y se determinó el peso de la raíz y el tejido aéreo en una balanza analítica (OHAUS).

#### **3.9.2 Peso seco**

Las muestras de material vegetal se secaron a 28 °C durante 24 h, y posteriormente a 60 °C en una estufa (FELISA) por 24 h más. Terminado el proceso de secado, se determinó el peso seco de la raíz y tejido aéreo.

#### **3.9.3 Contenido de clorofila.**

Para la extracción de los pigmentos fotosintéticos se utilizó el método de etanol al 95 %, descrito por Lichtenthaler & Buschmann (2001). Para ello, se pesaron 50 mg de tejido fresco y se homogenizaron con 2 ml de etanol al 95 % en un mortero. El homogenizado se transfirió a un tubo de ensayo y se mantuvo en oscuridad durante 24 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm a 15 °C durante 10 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia del sobrenadante obtenido de las muestras a 664.1 nm (clorofila a), 648.6 (clorofila b) y 470 nm (carotenoides).

Finalizada las lecturas del espectrofotómetro se aplicaron las fórmulas para la obtención de los valores de clorofila a, clorofila b y clorofila total (a+b).

#### **Clorofila a**

$$Ch_a = \frac{[(13.36 * A_{664.1}) - (5.19 * A_{648.6})] * Vol.de solvente}{Muestra}$$

Donde:

Ch<sub>a</sub>: Clorofila a en mg/ml

A<sub>664.1</sub>: Absorbancia a 664.1 nm

A<sub>648.6</sub>: Absorbancia a 648.6 nm

### **Clorofila b**

$$Ch_b = \frac{[(27.43 * A_{648.6}) - (8.12 * A_{664.1})] * \text{Vol. de solvente}}{\text{Muestra}}$$

Donde:

$Ch_b$  = Clorofila b en mg/ml

$A_{664.1}$ : Absorbancia a 664.1 nm

$A_{648.6}$ : Absorbancia a 648.6 nm

### **Clorofila total (a+b)**

$$Ch_{\text{total}} = Ch_a + Ch_b$$

Donde:

$Ch_{\text{total}}$ : Clorofila total en  $\mu\text{g/ml}$

$Ch_a$ : Clorofila a en  $\mu\text{g/ml}$

$Ch_b$  = Clorofila b en  $\mu\text{g/ml}$

### **Carotenoides**

$$C_{x+c} = \frac{[(1000 * A_{470}) - (2.13 * Ch_a) - (97.64 * Ch_b)] * \text{Vol. solvente}}{\text{Muestra}}$$

Donde:

$C_{x+c}$  = Carotenoides en  $\mu\text{g/ml}$

$A_{470}$  = Absorbancia a 470 nm

$Ch_a$ : Clorofila a en mg/ml

$Ch_b$  = Clorofila b en mg/ml

### **3.9.4 Contenido de glutatión (GSH)**

La determinación de glutatión total (GSH) se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Rahman et al. (2006), el análisis se realizó utilizando el tejido radicular. Para ello, en un mortero se trituraron 250 mg de raíces con nitrógeno líquido y se transfirieron a un microtubo con 500  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfato de potasio (KPE) (**Anexo 3**). Las muestras se homogenizaron en un vórtex y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, tomando una alícuota de 150  $\mu\text{l}$  que posteriormente se mezcló con 150  $\mu\text{l}$  de

tampón de extracción (Tritón X-100 al 0.1 % y ácido sulfosalicílico al 0.6 % en KPE). Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C y se recuperaron alícuotas de 100 µl de cada sobrenadante. Posteriormente las alícuotas se trataron con 700 µl de buffer KPE, 60 µl DTNB 1.68 mM, 60 µl de Glutación 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 glutación se calculó de acuerdo con la curva estándar de GSH.

### **3.9.5 Actividad catalasa**

Se determinó la actividad catalasa en el tejido aéreo de las plántulas. Para ello, se pesaron y se trituraron 150 mg de tejido fresco con 1.5 ml de buffer KPE (buffer fosfatos 100 mM pH 7.5 con EDTA 5 mM). Después las muestras se centrifugaron a 10 °C durante 15 min a 13000 rpm y se determinó el contenido total de proteína del sobrenadante mediante el método de Bradford. A continuación, las muestras se ajustaron a 50 µg/ml de proteína (utilizando buffer KPE) y finalmente se determinó la actividad catalasa por espectrofotometría a 240 nm, mediante el método de Aebi (1984).

### **3.9.6 Fuga de electrolitos**

Se determinó de acuerdo a lo descrito por Umnajkitikorn et al., 2021. Se tomaron 100 mg de tejido radicular y se sumergieron en 10 mL de agua desionizada a 20 °C durante 24 h y se determinó la conductividad eléctrica inicial. Para la determinación de la conductividad eléctrica final, las muestras se calentaron a 120 °C en autoclave durante 15 minutos, posteriormente se dejaron enfriar y se determinó la conductividad eléctrica. Como blanco se utilizó agua desionizada. El porcentaje de la conductividad eléctrica se calculó de la siguiente manera:

$$\%EL = \left[ \frac{EC_i - EC_i \text{ blanco}}{EC_f - EC_f \text{ blanco}} \right] * 100$$

Donde:

$EC_i$  = Conductividad eléctrica inicial

$EC_i \text{ blanco}$  = Conductividad eléctrica inicial del blanco

$EC_f$  = Conductividad eléctrica final

$EC_f \text{ blanco}$  = Conductividad eléctrica final del blanco

### **3.9.7 Cuantificación de Cd (II)**

El contenido de Cd en los tejidos vegetales se determinó de acuerdo con la metodología desarrollada por Carranza-Álvarez et al. (2008). Las plántulas se lavaron con agua desionizada y después se enjuagaron con EDTA 0.01 M, eliminado así cualquier metal adsorbido. Posteriormente la planta se seccionó en raíz y hojas. El material vegetal se secó y se procedió a realizar las digestiones ácidas correspondientes. Asimismo, se cuantificó el Cd de los medios hidropónicos expuestos al metal.

#### **3.9.7.1 Digestión acida de raíces**

Se pesaron 25 mg de raíces de *T. latifolia*, y se colocaron en un recipiente de polietileno de alta densidad (HDPE) de 30 ml. Posteriormente se adicionaron 100 µl de HNO<sub>3</sub> (grado traza) por cada mg de muestra, los recipientes se cerraron y se dejaron reposar durante 5 días en oscuridad. Al sexto día, se adicionó 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (grado reactivo) y se dejó reposar durante 24 h. Finalmente se aforó a 12.5 ml con agua desionizada obteniéndose una muestra acidificada al 10 % HNO<sub>3</sub> (v/v).

#### **3.9.7.2 Digestión acidad de tejido aéreo.**

Se pesaron 100 mg de material vegetal; este se colocó en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 10 ml de una mezcla de HCl:HNO<sub>3</sub> en relación 3:1 v/v (agua regia). Las muestras se calentaron en una parrilla a 250°C aproximadamente, evaporando hasta sequedad. Posteriormente se adicionaron 3 ml de HNO<sub>3</sub> (grado traza) para redissolver el residuo y la mezcla se calentó nuevamente hasta un volumen de 500 µl en el matraz. Después se adicionaron 500 µl de HNO<sub>3</sub> y 2 ml de H<sub>2</sub>O desionizada para redissolver. Finalmente se transfirió la mezcla a un matraz volumétrico con ayuda de papel filtro y se aforó a 25 ml.

#### **3.9.7.3 Preparación de muestras líquidas**

Las muestras líquidas se diluyeron a 4 ppm y se acidificaron al 5 % con HNO<sub>3</sub> (Grado trazas). La determinación del metal en la planta, así como del medio hidropónico se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) 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™). Se calculó el contenido de Cd en raíces y hojas, la acumulación del metal, el porcentaje de remoción de

Cd, y otras relaciones como el factor de translocación, el factor de bioconcentración, y el coeficiente de bioacumulación, con las siguientes formulas:

$$\mathbf{TF} = [\mathbf{Cd}]_{\text{aéreo}} / [\mathbf{Cd}]_{\text{raíz}}$$

TF= Factor de translocación.

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

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

$$\mathbf{BCF} = [\mathbf{Cd}]_{\text{raíz}} / [\mathbf{Cd}]_{\text{medio}}$$

BCF= Factor de bioconcentración.

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

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

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

BAC= Coeficiente de bioacumulación.

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

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

### **3.10 Determinación de cambios estructurales producidos en raíces.**

#### **3.10.1 Preparación de las muestras**

Los cortes histológicos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Chen et al., 2016. Para ello, se tomarán muestras frescas de la raíz, las cuales se fijaron sumergiéndolas en formalina neutra (**Anexo 4**) durante 48 h. Después se colocaron en casetes y las muestras se deshidrataron en series de 25 ml de etanol a 60 °C, de la siguiente manera: 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % y 100 %, durante 30 min. Posteriormente se realizó la infiltración en parafina (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Infiltración en parafina.

<b>Relación solvente-parafina</b>	<b>Tiempo</b>
Etanol-Xileno (2:1, v/v)	30 minutos
Etanol-Xileno (1:1, v/v)	
Etanol-Xileno (1:2, v/v)	
Xileno-Parafina (2:1, v/v)	
Xileno-Parafina (1:1, v/v)	
Xileno-Parafina (1:2, v/v)	

Finalmente se realizó el cubo, para ello se colocó el contenido de los casetes dentro de un molde, se vertió parafina líquida en él y se llevó a refrigeración para su solidificación.

### **3.10.2 Cortes histológicos**

Para los cortes, se utilizó un micrótopo (ECOSHEL) donde se obtuvieron muestras de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, las cuales se fijaron en portaobjetos silanizados (**Anexo 5**). Estas se tiñeron realizando la tinción Ácido periódico-Schiff (PAS). Finalmente, las laminillas se observaron en un microscopio invertido.

### **3.11 Análisis estadístico**

El análisis de los datos se realizó utilizando RStudio versión 2021.09.2 con las librerías de ggplot2 y agricolae. Se determinó la normalidad de los datos de cada factor mediante el implemento de la prueba de Shapiro-Wilk, realizándose sobre los residuos; asimismo se realizó la prueba de Bartlett para cada factor (para determinar la homocedasticidad de los datos). Posterior a ello, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias mediante la prueba de Tukey, para los datos obtenidos de las curvas dosis-respuesta y el efecto de las auxinas en la captación de Cd por *T. latifolia*. Mientras que para los datos de germinación se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn. El trabajo gráfico se realizó utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 5.03, presentando las medias y desviación estándar.

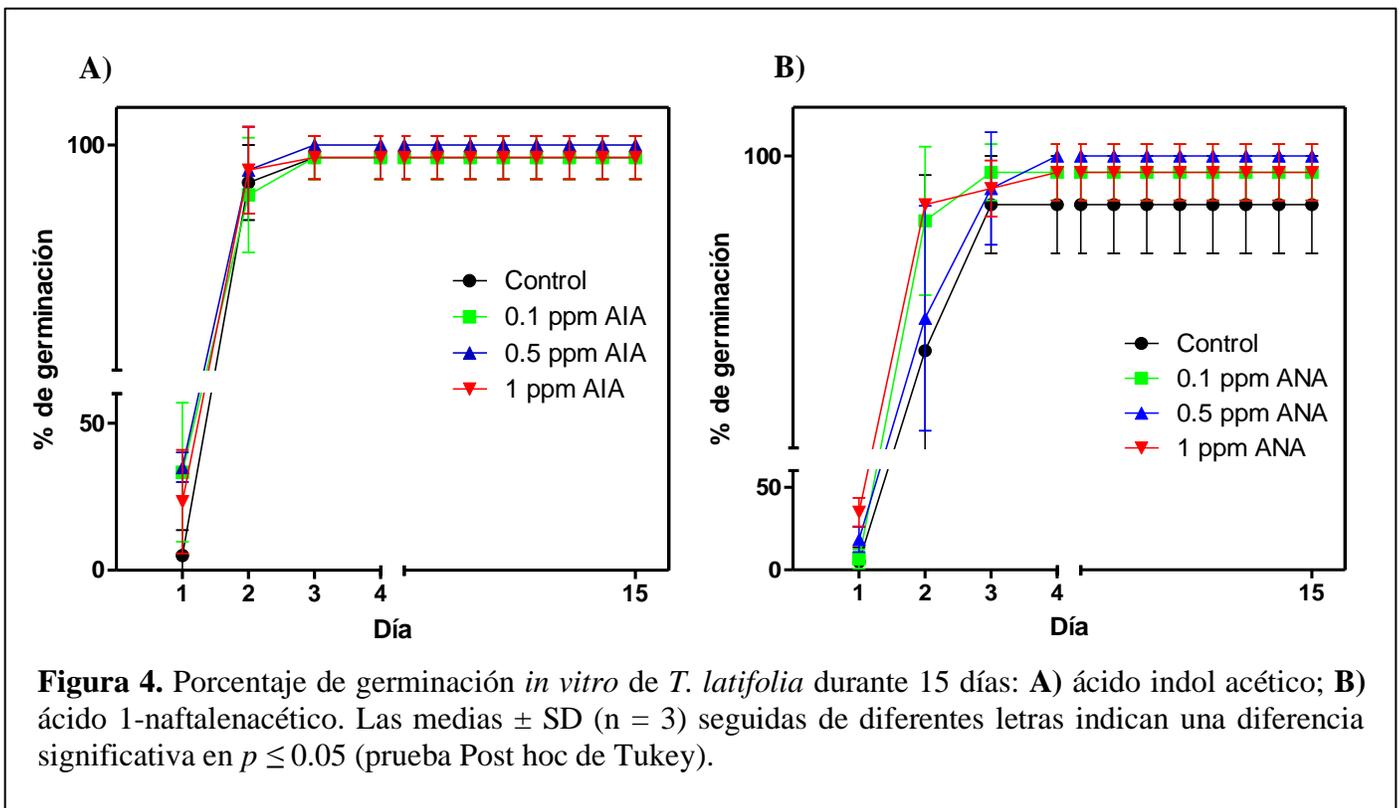
## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Viabilidad de las semillas de *T. latifolia*

Inicialmente, se determinó el porcentaje de germinación de las semillas de *T. latifolia* con y sin suplementación de auxinas. Se observó que más del 95 % de las semillas germinaron durante las primeras 48 - 72 h, independientemente de los tratamientos, indicando la viabilidad de las semillas.

En los tratamientos con AIA se obtuvieron valores de 98 %, 100 % y 98 % de germinación a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ppm, valores estadísticamente similares al control donde se obtuvo el 98 % de germinación de las semillas. Así mismo, para las semillas expuestas a ANA, se obtuvieron valores similares en los porcentajes de germinación a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ppm, los cuales fueron estadísticamente similares al control donde germinó el 95 % de las semillas (**Figura 4**).



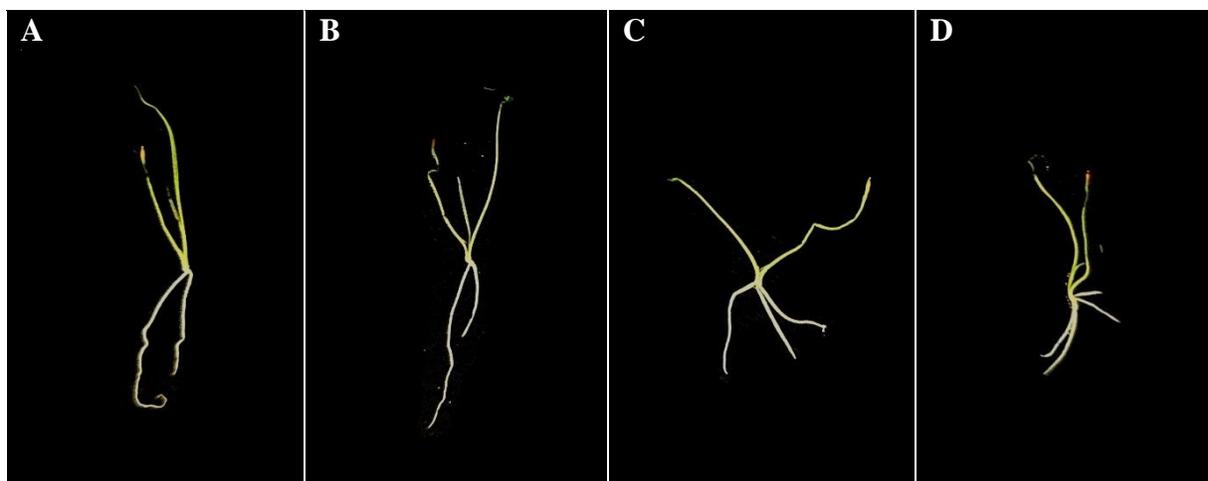
## 4.2 Efecto de las auxinas en *T. latifolia*

### 4.2.1 Germinación de *T. latifolia* suplementada con Ácido Indol Acético *in vitro*

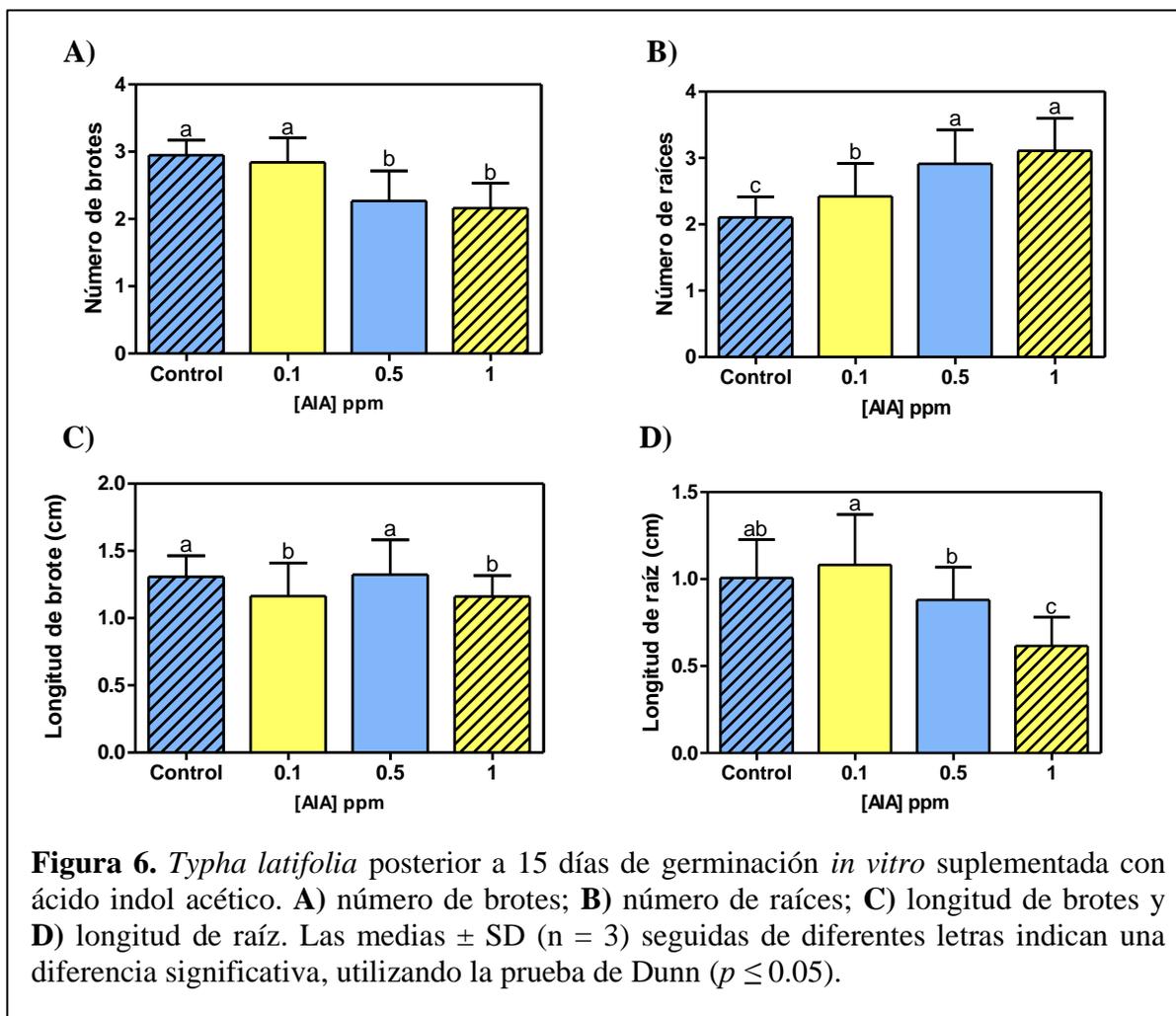
Para evaluar el efecto de ácido indol acético (AIA) en *T. latifolia*, se realizaron ensayos de germinación *in vitro*. Para ello, se expusieron semillas de *T. latifolia* a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ppm de AIA (Sigma Aldrich) durante un periodo de 15 días.

Los resultados indican que a mayor concentración de AIA disminuye el número de brotes en *T. latifolia*, observándose menor número de brotes a 0.5 y 1 ppm de AIA con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ). En cuanto a la longitud de los brotes, se observó una disminución a concentraciones de 0.1 y 1 ppm de AIA con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ), mientras que la longitud de los brotes a 0.5 ppm de AIA es estadísticamente similar al control.

Por otro lado, se observó que a mayor concentración de AIA se incrementa el número de raíces de las plántulas, siendo los tratamientos de 0.5 y 1 ppm de AIA los que inducen la formación de mayor número de raíces con respecto a 0.1 ppm de AIA y a las plantas control ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, la longitud de las raíces disminuyó en relación directa con la concentración de AIA, siendo significativa a 1 ppm, donde se observó una longitud menor (0.61 cm) en comparación con el control (1 cm) ( $p \leq 0.05$ ) (**Figura 5** y **Figura 6**).



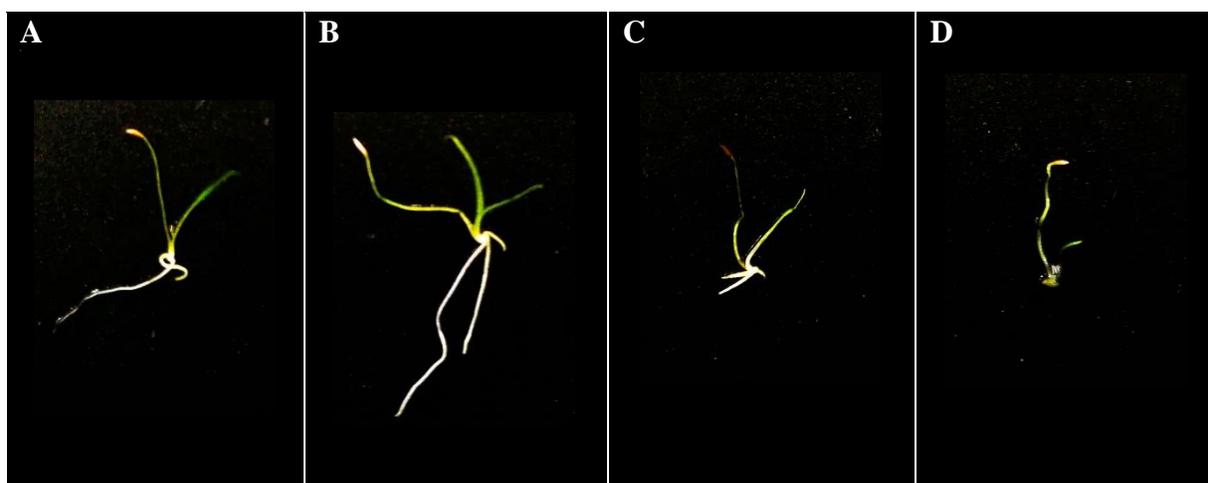
**Figura 5.** Crecimiento y desarrollo vegetal de *Typha latifolia* después de 15 días de germinación *in vitro* suplementada con ácido indol acético. **A)** control; **B)** 0.1 ppm; **C)** 0.5 ppm y **D)** 1 ppm.



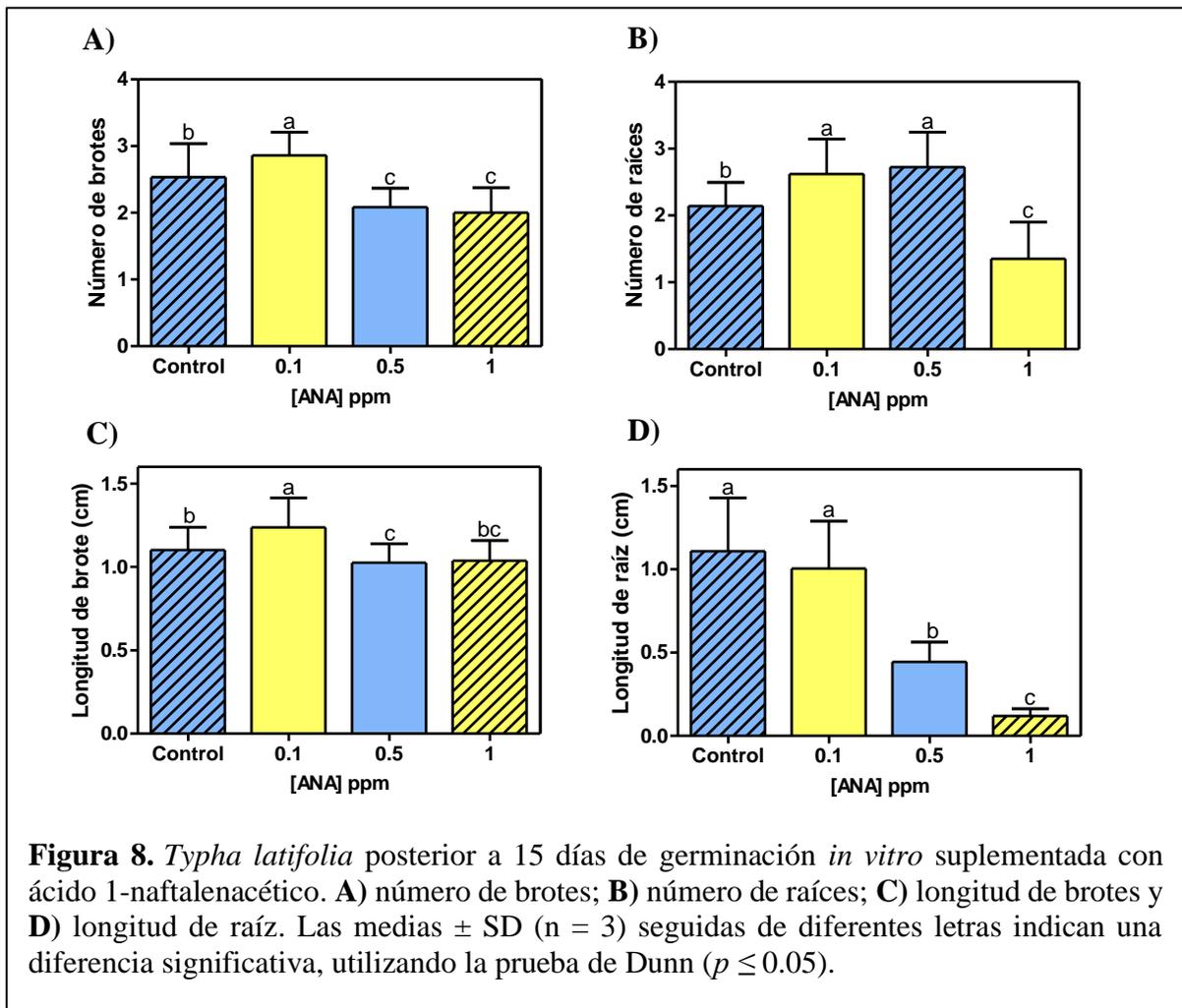
#### 4.2.2 Germinación de *T. latifolia* suplementada con Ácido 1-naftalenacético *in vitro*

En lo que respecta a las plántulas suplementadas con ácido 1-naftalenacético (ANA) se observaron diferencias significativas en los cuatro parámetros evaluados. Los resultados indican que a 0.1 ppm de ANA incrementa el número de brotes con respecto al control, mientras que a 0.5 y 1 ppm de ANA disminuyó el número de éstos. En cuanto a la longitud de los brotes, se observó que a 0.1 ppm de ANA se incrementa significativamente 1.12 veces con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, a 0.5 ppm de ANA la longitud de los brotes disminuyó 0.9 veces con respecto al control, mientras que a 1 ppm se obtuvieron valores sin diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento con 0.5 ppm de ANA y al control sin ANA ( $p \leq 0.05$ ).

En el caso del número de raíces de las plántulas se observó un incremento significativo a concentraciones de 0.1 y 0.5 ppm de ANA, así como una disminución a 1 ppm con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ). Asimismo, la longitud de las raíces disminuyó, respectivamente, 2.5 y 10 veces a concentraciones de 0.5 y 1 ppm de ANA, con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ), mientras que a 0.1 ppm de ANA no se observan diferencias significativas con respecto al control sin ANA (**Figura 7** y **Figura 8**). Los resultados indican que 0.1 ppm de ANA incrementan el número y longitud de brotes y el número de raíces de *T. latifolia*, siendo 0.1 ppm la concentración de ANA que incrementa significativamente la tasa de crecimiento con respecto a las concentraciones de 0.5 y 1 ppm, donde se obtuvo un retraso en el desarrollo de las plántulas.



**Figura 7.** Crecimiento y desarrollo vegetal de *Typha latifolia* tras 15 días de germinación *in vitro* suplementada con ácido 1-naftalenacético. **A)** control; **B)** 0.1 ppm; **C)** 0.5 ppm y **D)** 1 ppm.

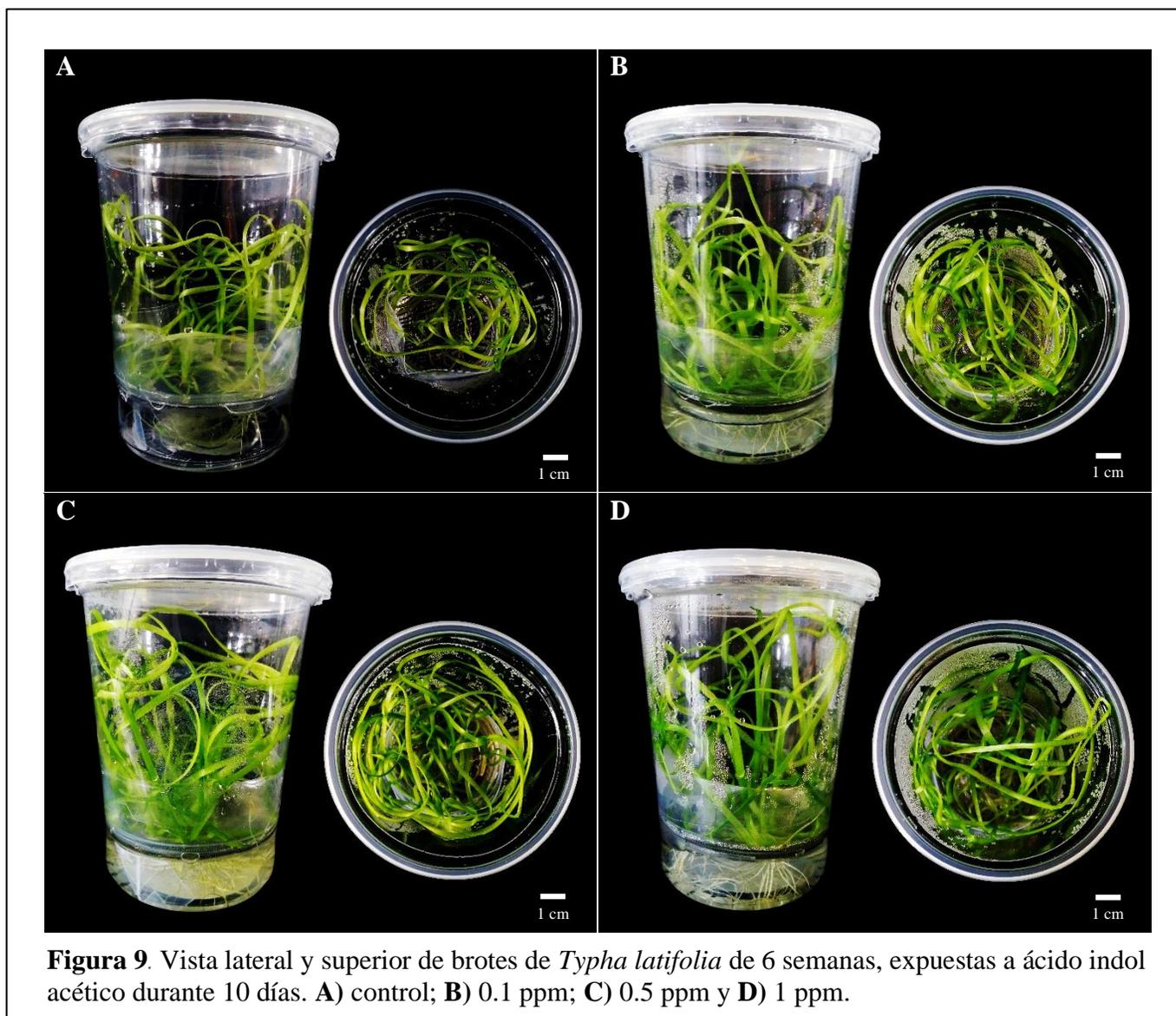


### 4.3 Curva dosis-respuesta de auxinas en *T. latifolia*

Con la finalidad de determinar la concentración óptima de auxinas para promover el desarrollo del tejido aéreo y radicular de *T. latifolia*, se evaluó el efecto del ácido indol acético (AIA) y del ácido 1-naftalenacético (ANA). Para ello, se realizaron curvas dosis-respuesta utilizando plántulas de 1 mes de crecimiento en sistemas de hidroponía. Las plántulas fueron expuestas a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ppm de AIA y ANA (Sigma Aldrich) durante un periodo de 10 días, finalizado el tiempo de exposición se determinó su efecto sobre el desarrollo de la planta en comparación con un control sin auxinas.

#### 4.3.1 Curva dosis-respuesta de AIA en *T. latifolia*

Las plántulas de *T. latifolia* fueron expuestas a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ppm de AIA durante 10 días. Al término del periodo de exposición, las plántulas en presencia de AIA mostraron un desarrollo similar al control sin auxinas. El aspecto del tejido aéreo no mostró cambios perceptibles con respecto al control (**Figura 9**).

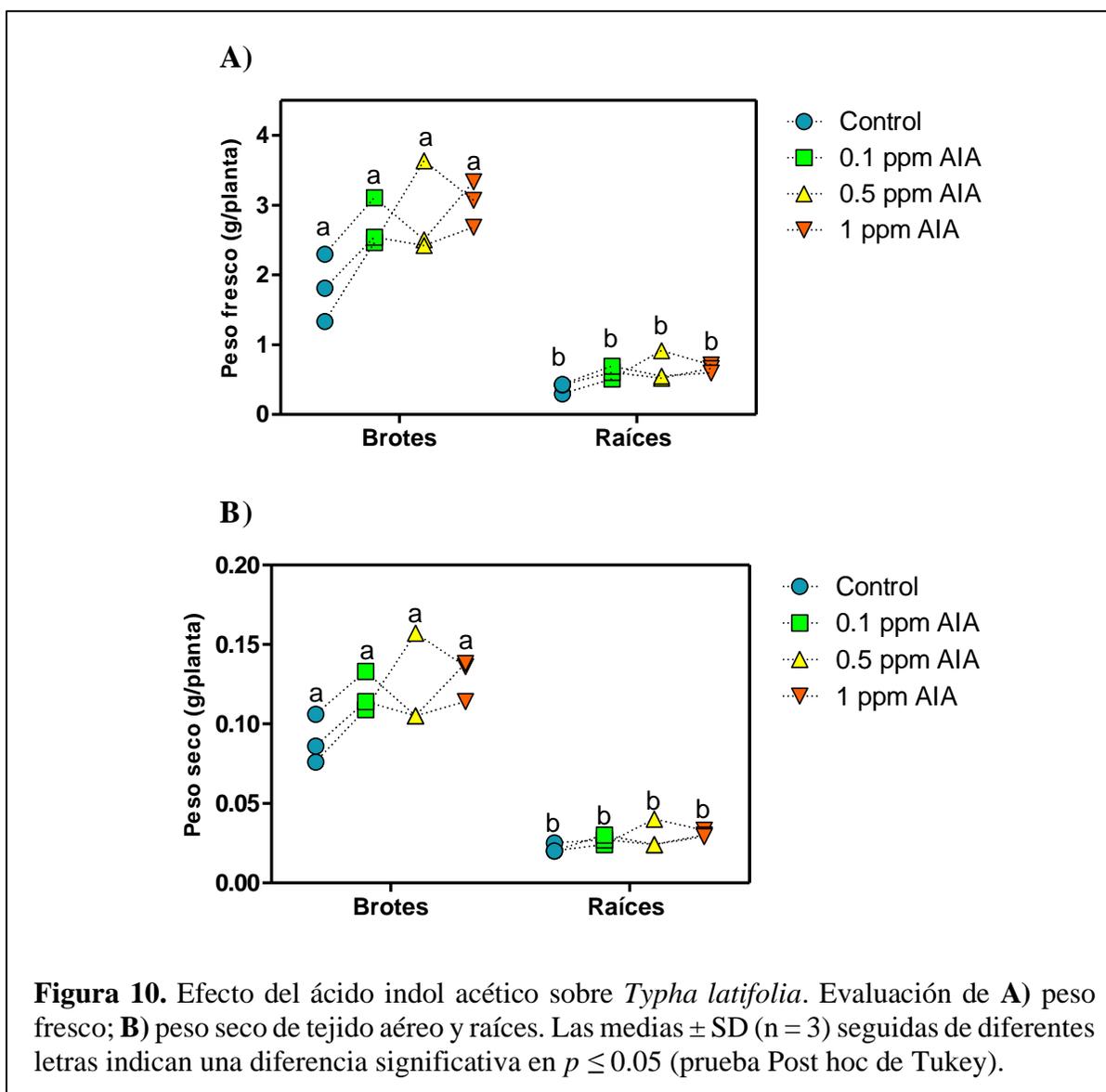


**Figura 9.** Vista lateral y superior de brotes de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuestas a ácido indol acético durante 10 días. **A)** control; **B)** 0.1 ppm; **C)** 0.5 ppm y **D)** 1 ppm.

#### 4.3.1.1 El AIA no modifica los pesos fresco y seco de *T. latifolia*

Se determinó el peso fresco y seco del tejido aéreo y raíz posterior a la exposición de *T. latifolia* a AIA durante 10 días (**Figura 10**). En cuanto al peso fresco del tejido aéreo, los resultados indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. Se obtuvieron pesos de 2.07, 2.85 y 3.03 g/planta para 0.1, 0.5 y 1 ppm de auxina, respectivamente, mientras que el grupo control presentó 1.81 g/planta.

Con respecto al sistema radicular los valores de los tratamientos son estadísticamente similares al valor del control. Se obtuvieron pesos de 0.601, 0.661 y 0.655 g/planta, y para el control 0.382 g/planta (**Figura 10 A**).



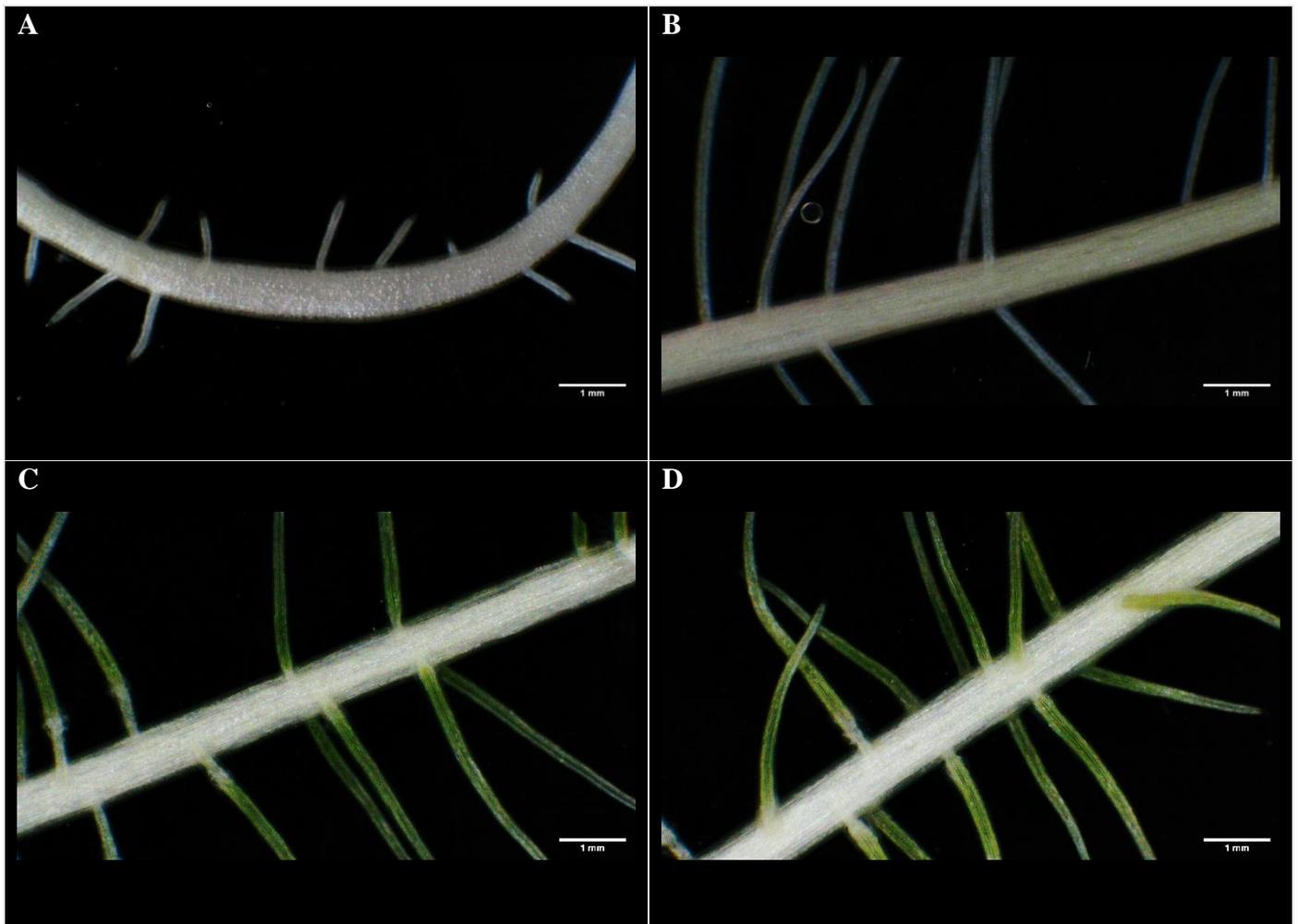
En cuanto al peso seco de brotes y raíces, los valores entre tratamientos oscilaron entre 0.118-0.129 y 0.027-0.030 g/planta respectivamente; mientras que para el control se obtuvieron valores de 0.089 y 0.021 g/planta para brotes y raíces, respectivamente. Si bien, se observó una tendencia al incremento en el peso fresco y seco del tejido aéreo y de la raíz; no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con respecto al control (**Figura 10 B**). Los resultados indican que el AIA no modifica los pesos fresco y seco de brotes y raíces de *T. latifolia*.

#### 4.3.1.2 El AIA incrementa la formación de pelos radiculares en *T. latifolia*

Los resultados muestran que las raíces de *T. latifolia* expuestas a AIA presentaron un incremento de los pelos radiculares en relación directa con la concentración de AIA, siendo más abundantes los pelos radiculares de plántulas expuestas a 1 ppm de AIA con respecto a las plantas control sin AIA (**Figura 11 y Figura 12**).



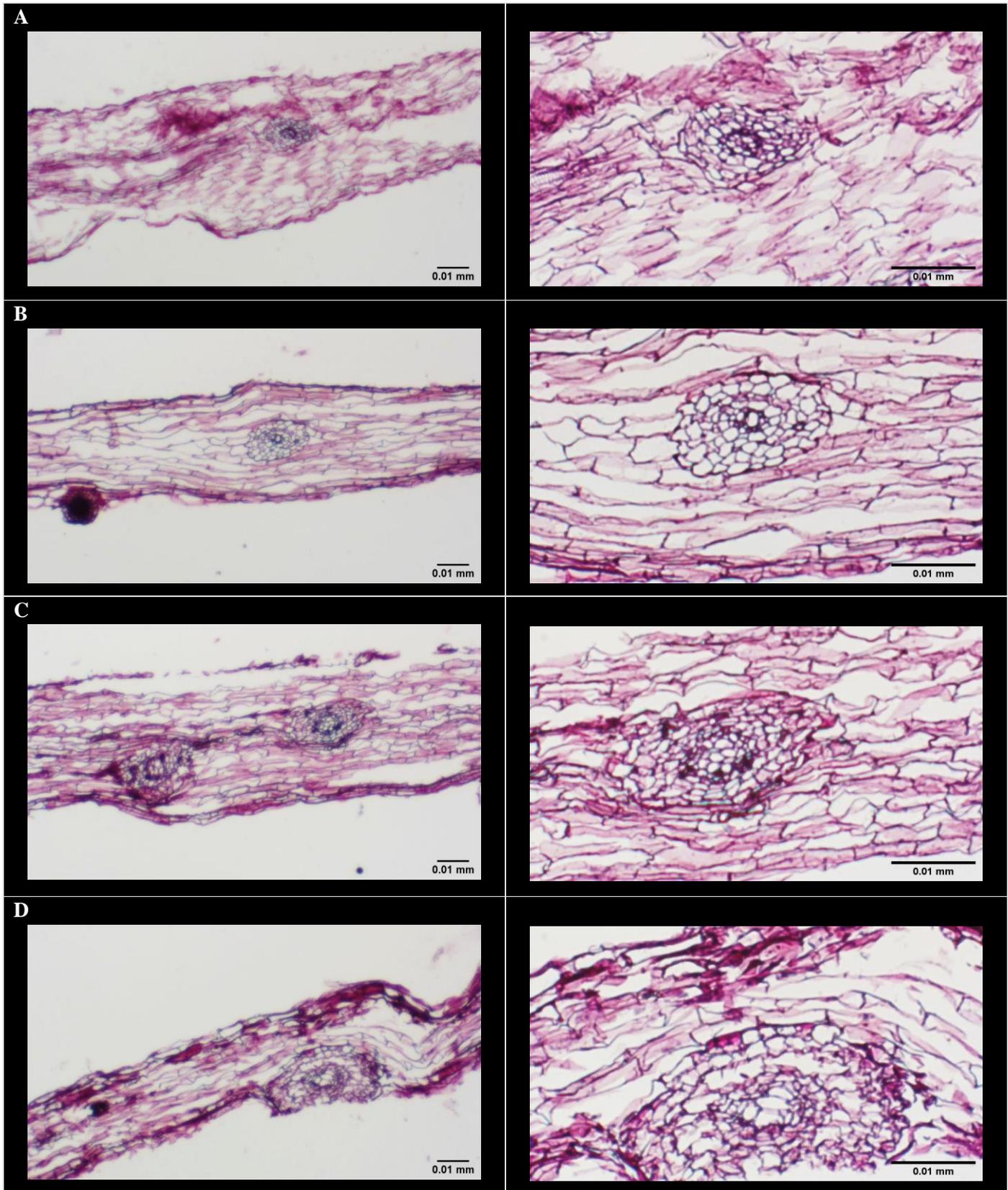
**Figura 11.** Sistema radicular de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a ácido indol acético durante 10 días. A) control; B) 0.1 ppm; C) 0.5 ppm y D) 1 ppm.



**Figura 12.** Raíz de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a ácido indol acético (10 días). **A)** control; **B)** 0.1 ppm; **C)** 0.5 ppm y **D)** 1 ppm.

#### 4.3.1.3 El AIA incrementa el diámetro de pelos radiculares de *T. latifolia*

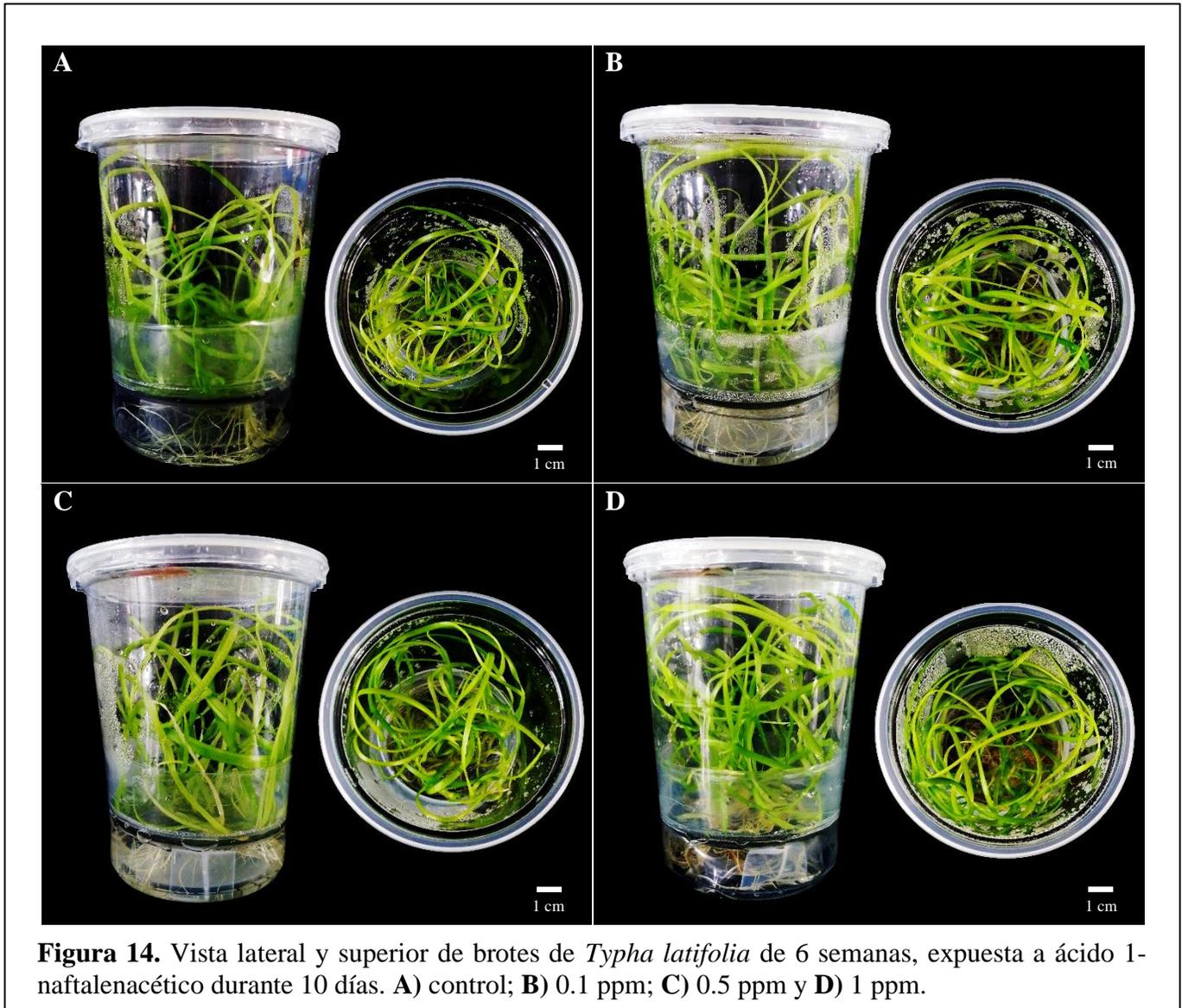
En lo que respecta a los cortes histológicos realizados a las raíces *T. latifolia* expuestas a AIA, se observó que el diámetro de los pelos radiculares incrementó a medida que aumentaba la concentración de la auxina. Las células se tiñeron en tonalidades que iban de rosa a fucsia, siendo el tono fucsia el que se observa principalmente en las células de las raíces expuestas a 1 ppm de AIA (**Figura 13**). Estos resultados sugieren que la adición de AIA favorece la síntesis de los compuestos de la pared celular de *T. latifolia* como la pectina, puesto que la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) tiene afinidad hacia los carbohidratos, y una mayor coloración dentro del rango de rosa a fucsia indica una mayor cantidad de ellos.



**Figura 13.** Estructura radical de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a ácido indol acético (10 días). A) control; B) 0.1 ppm; C) 0.5 ppm y D) 1 ppm.

#### 4.3.2 Curva dosis-respuesta de ANA en *T. latifolia*

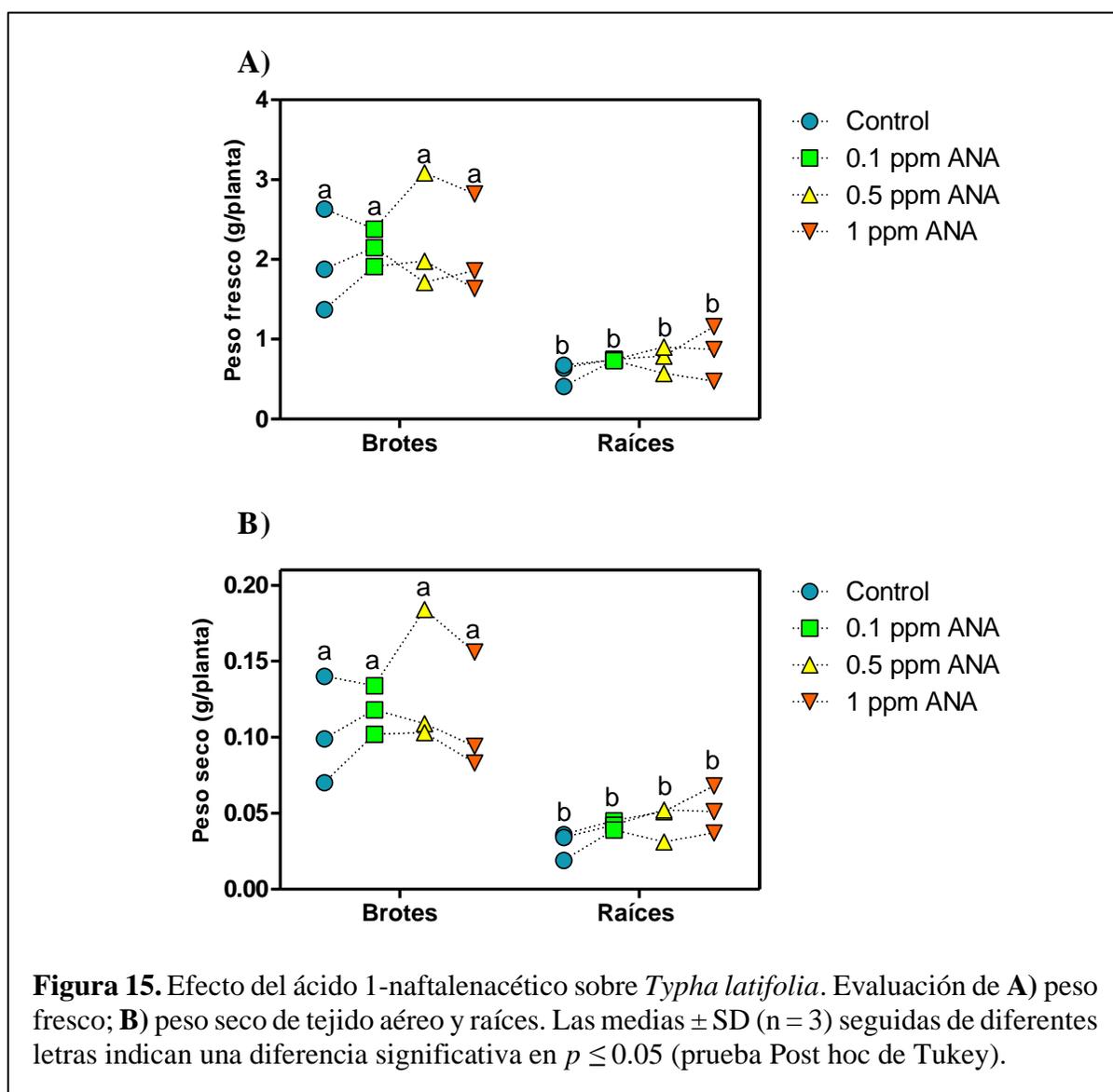
Las plántulas de *T. latifolia* fueron expuestas a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 ppm de ANA durante 10 días. Al término del periodo de exposición, las plántulas en presencia de ANA mostraron un desarrollo similar al control sin auxina. El aspecto del tejido aéreo no mostró cambios perceptibles con respecto al control (**Figura 14**).



**Figura 14.** Vista lateral y superior de brotes de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético durante 10 días. **A)** control; **B)** 0.1 ppm; **C)** 0.5 ppm y **D)** 1 ppm.

#### 4.3.2.1 El ANA no influye en los pesos fresco y seco de *T. latifolia*

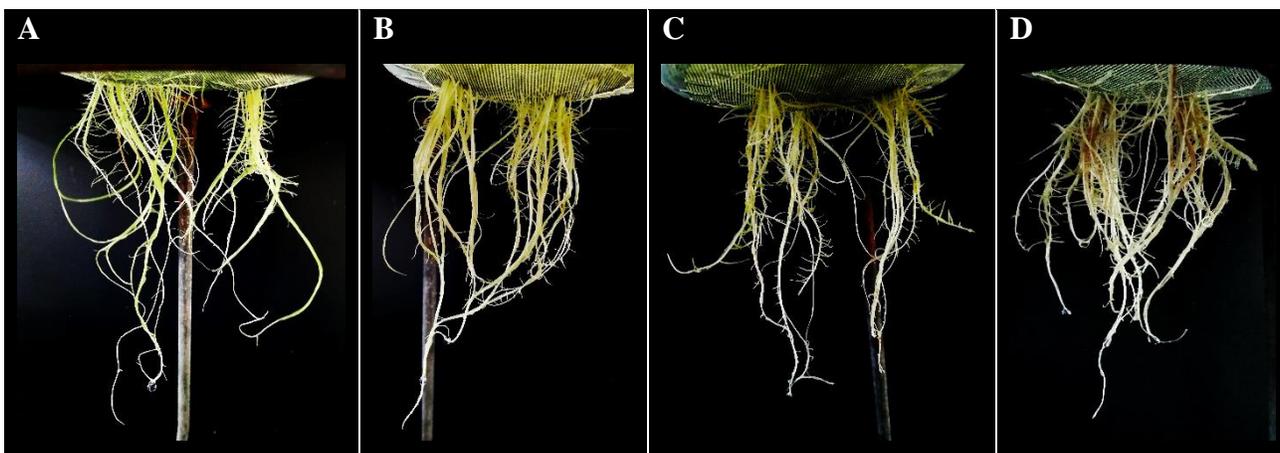
Se evaluó el efecto del ácido 1-naftalenacético (ANA) en *T. latifolia*, para ello se determinó el peso fresco y seco del tejido aéreo y raíz después de 10 días de exposición (**Figura 15**). Para el peso fresco del tejido aéreo los valores fueron similares entre los tratamientos y el control, siendo de 2.14, 2.25 y 2.10 g/planta para 0.1, 0.5 y 1 ppm de ANA respectivamente, mientras que para el grupo control fue de 1.96 g/planta. En cuanto al sistema radicular se obtuvieron valores de 0.740, 0.754 y 0.834 g/planta para 0.1, 0.5 y 1 ppm de ANA, respectivamente, y 0.574 g/planta para el control (**Figura 15 A**).



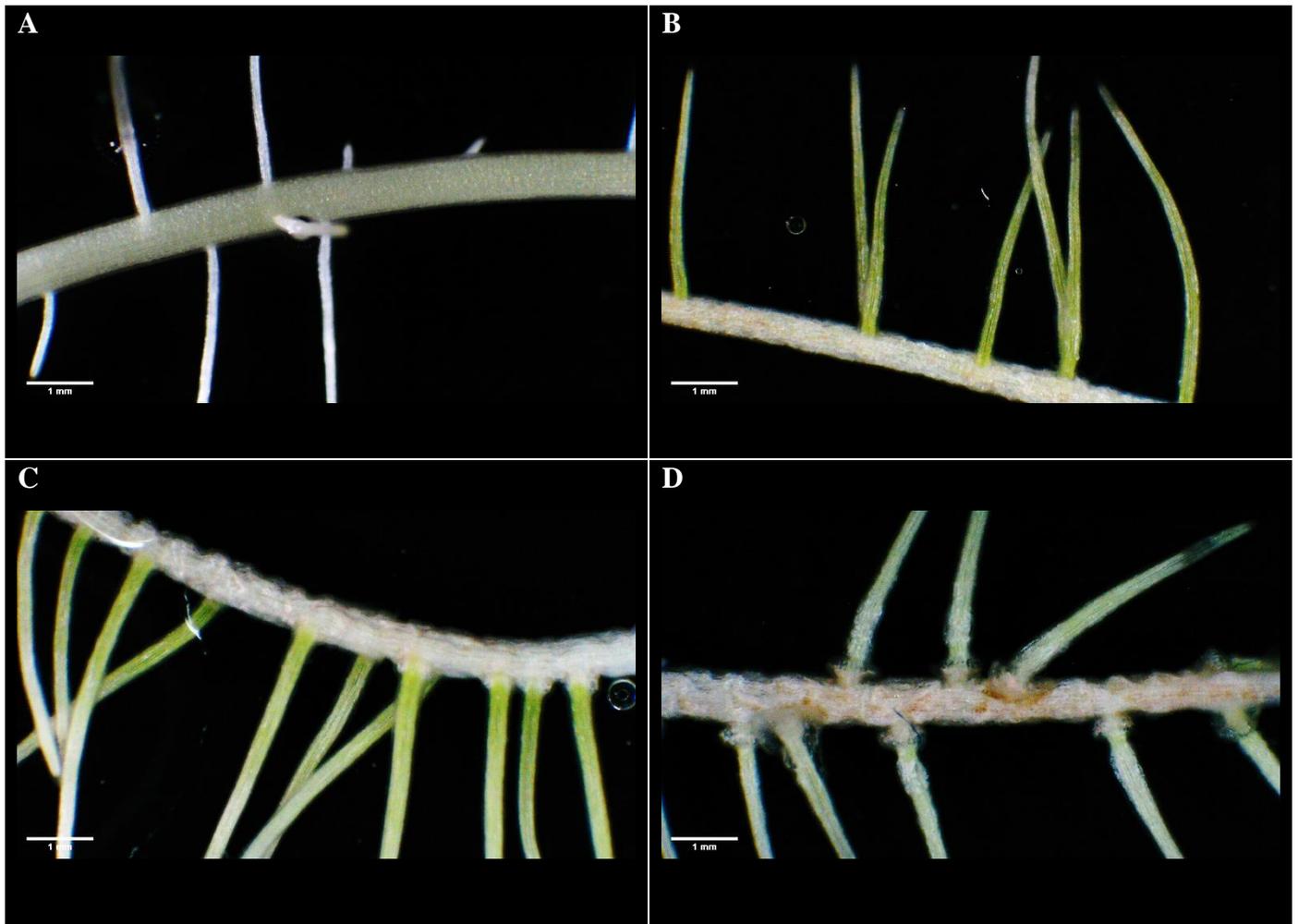
Con respecto al peso seco de brotes los valores obtenidos entre tratamientos fueron de 0.118, 0.132 y 0.111g/planta; mientras que para el caso de las raíces fue de 0.042, 0.044 y 0.052 g/planta, y para los controles 0.103 y 0.029 g/planta para brotes y raíces, respectivamente (**Figura 15 B**). Si bien, se observa una tendencia al incremento de biomasa del tejido aéreo fresco y seco a concentraciones de 0.1 a 0.5 ppm de ANA, no existen diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control. Para el tejido radicular fresco y seco se observa tendencia al incremento en presencia de ANA, sin embargo, no existen diferencias significativas. Los resultados indican que el ANA no modifica los pesos fresco y seco de brotes y raíces de *T. latifolia*.

#### 4.3.2.2 El ANA incrementa la formación de pelos radiculares en *T. latifolia*

El sistema radicular de *T. latifolia* se modifica en presencia del ácido 1-naftalenacético (ANA), de manera similar a lo observado en este trabajo con los tratamientos con AIA. Los resultados indican que el ANA induce la formación de pelos radiculares a medida que se incrementa la concentración de dicha auxina (**Figura 16**). No obstante, a 1 ppm de ANA, el sistema radicular de *T. latifolia* presentó oscurecimiento en color café en comparación con el control y el resto de los tratamientos con ANA y AIA (**Figura 16 D y Figura 17 D**).



**Figura 16.** Sistema radicular de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético durante 10 días. **A)** control; **B)** 0.1 ppm; **C)** 0.5 ppm y **D)** 1 ppm.

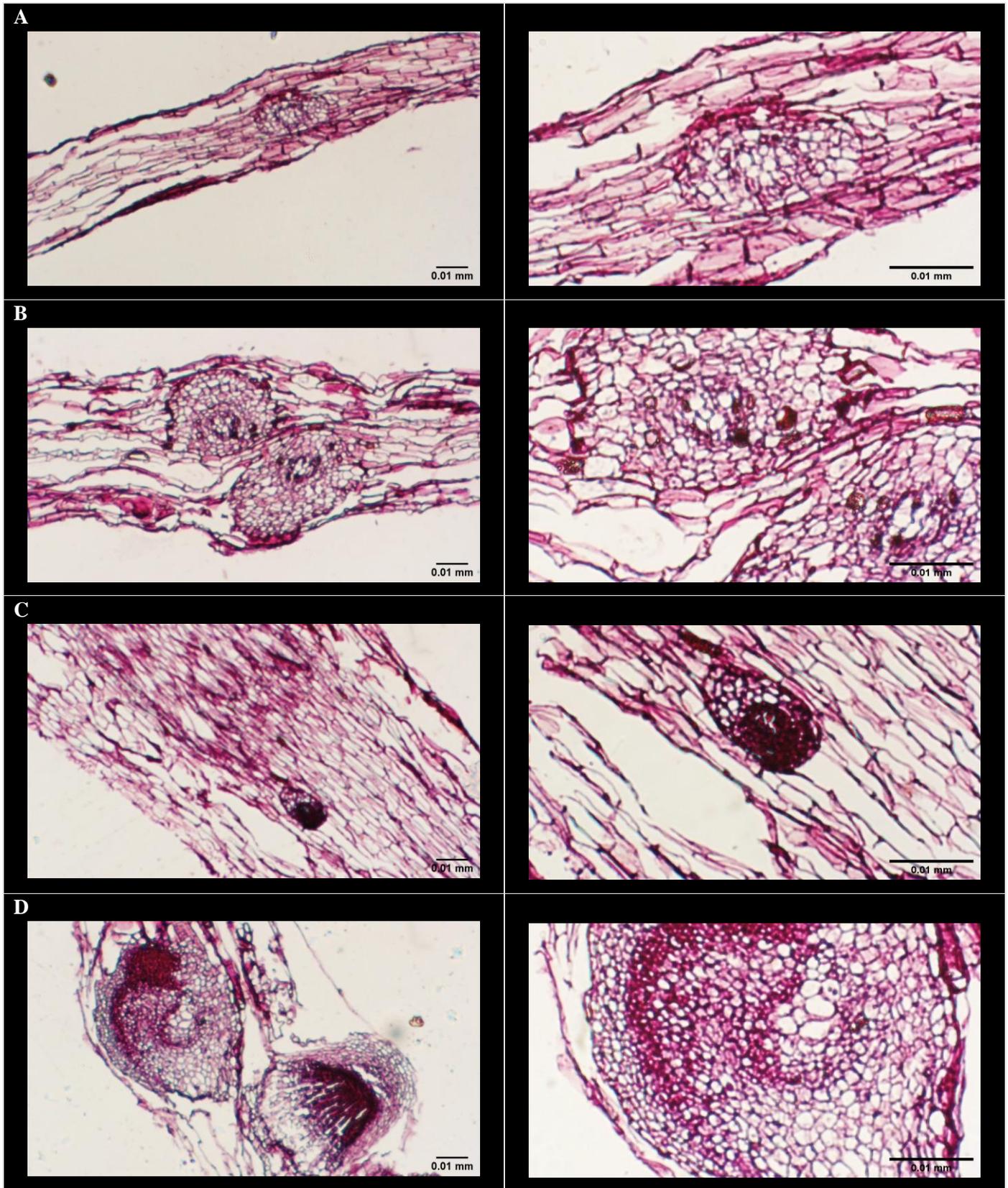


**Figura 17.** Raíz de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético (10 días). **A)** control; **B)** 0.1 ppm; **C)** 0.5 ppm y **D)** 1 ppm.

#### 4.3.2.3 Efecto del ANA en el incremento del diámetro de pelos radiculares de *T.*

##### *latifolia*

Para el caso de los cortes histológicos de las raíces de las plantas expuestas a ANA, se observó el incremento del diámetro de los pelos radiculares a 0.1 y 1 ppm de auxina con respecto al control. Si bien, para el tratamiento de 0.5 ppm no se logró obtener una fotografía representativa como en los casos anteriores, esto no impidió observar que las células se tiñeron en tonalidades que iban de rosa a fucsia, estando más presente las tonalidades fucsias a medida que incrementaba la concentración de auxinas; sin embargo, la fragilidad de las raíces también incrementaba, por lo que fue la principal causa técnica para la obtención de fotografías representativas (**Figura 18**).

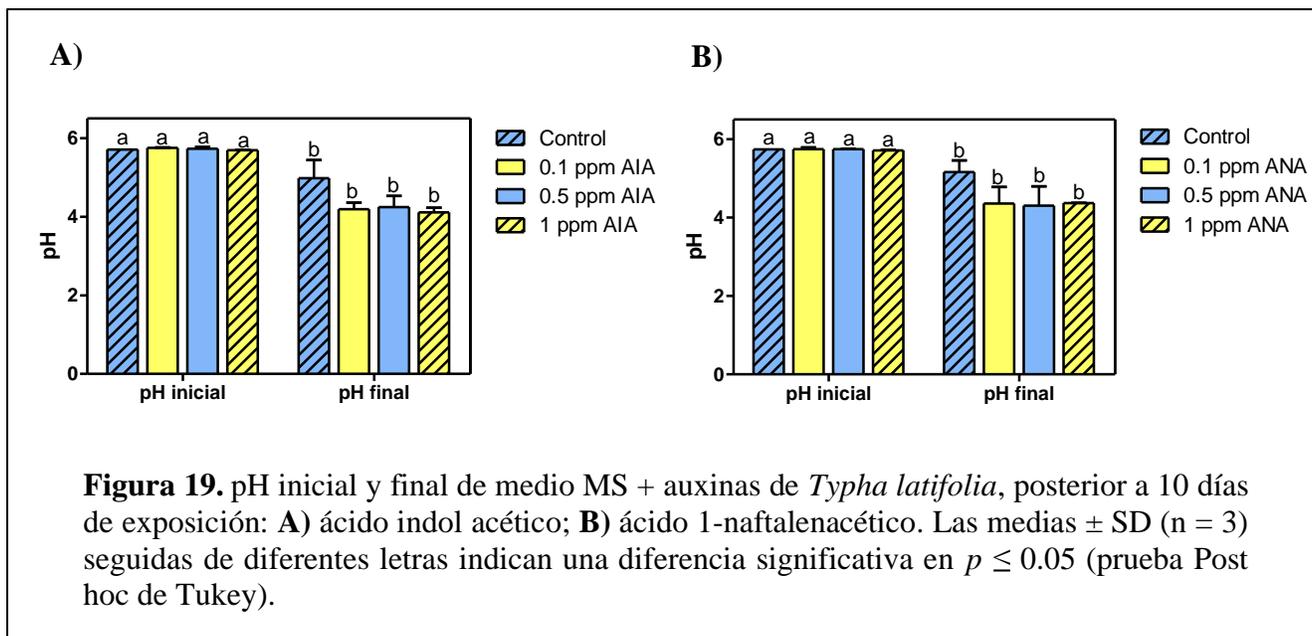


**Figura 18.** Estructura radical de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a ácido 1-naftalenacético (10 días). A) control; B) 0.1 ppm; C) 0.5 ppm y D) 1 ppm.

#### 4.4 Cambios en el pH del medio hidropónico y la absorción de auxinas

Adicionalmente se determinó el pH del medio suplementado con las auxinas (AIA y ANA). Esto para determinar si las auxinas contenidas en el medio utilizado eran absorbidas por *T. latifolia*. Para ello, se midió el pH del medio al inicio y al final de cada experimento. Para el caso del ácido indol acético (AIA), el pH inicial oscilaba entre 5.69 y 5.78 para los tratamientos y para el medio control un pH de 5.71. Al término del experimento el pH de los tratamientos disminuyó hasta 4.19, 4.24 y 4.11 para 0.1, 0.5 y 1 ppm, mientras que para el control se obtuvo un valor de 4.98 (**Figura 19 A**).

Por otro lado, el pH inicial del medio que contenía el ácido 1-naftalenacético (ANA) iba de 5.70 a 5.78 para los tratamientos y de 5.74 para el control. Al finalizar el experimento los valores obtenidos fueron de 4.36, 4.30 y 4.36 para 0.1, 0.5 y 1 ppm de ANA y 5.15 para el control. Si bien, para ambos casos (AIA y ANA) el pH de los tratamientos al término de cada experimento disminuyó en comparación con los controles, estadísticamente no existen diferencias significativas (**Figura 19 B**). Los resultados indican una mayor segregación de ácidos orgánicos por parte de las raíces de *T. latifolia* expuesta a auxinas, lo que sugiere la absorción del AIA y ANA.



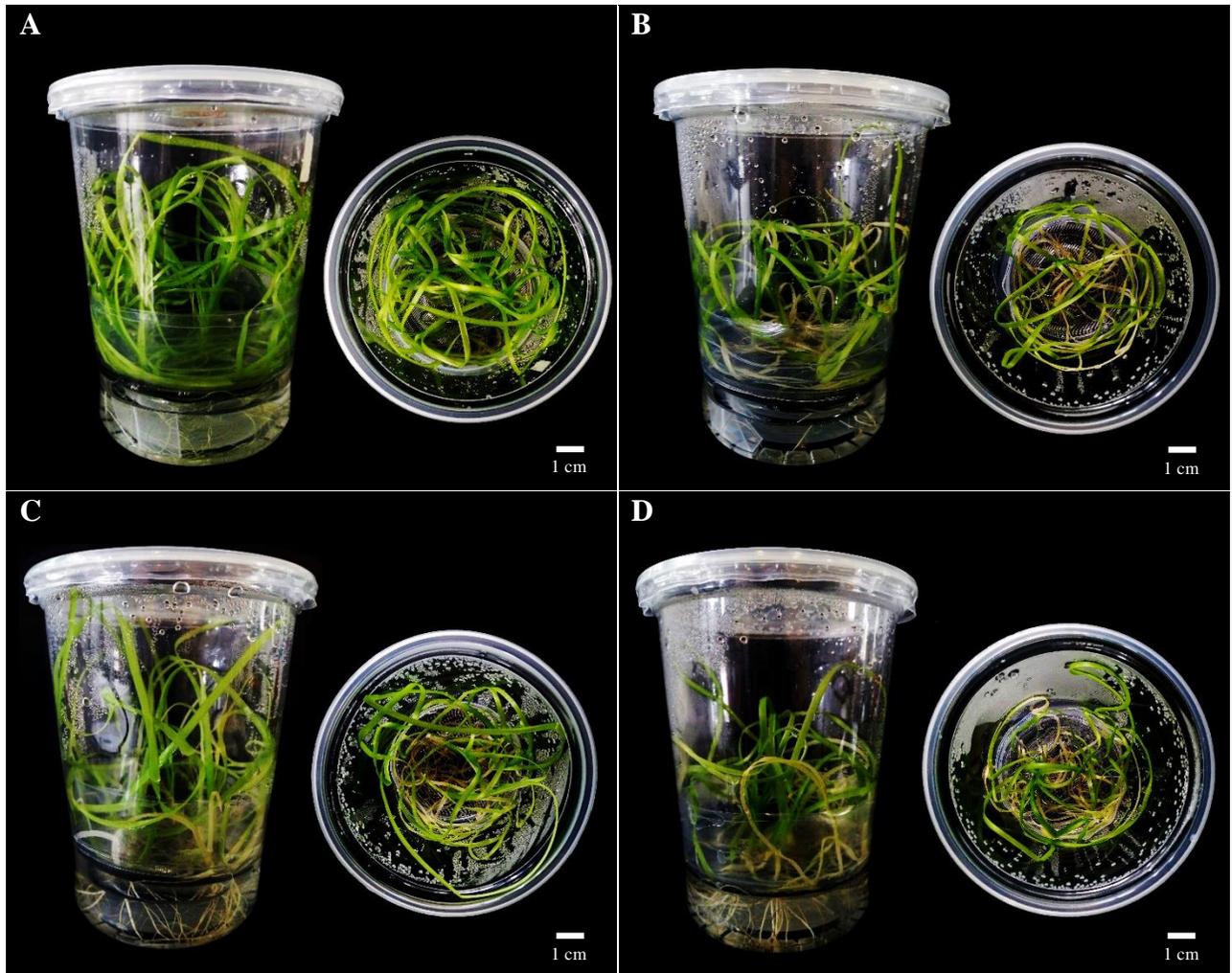
## **4.5 Ácido indol acético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) en la captación de Cd por *T. latifolia***

### **4.5.1 Efecto de las auxinas sobre el fenotipo de *T. latifolia* expuesta a Cd**

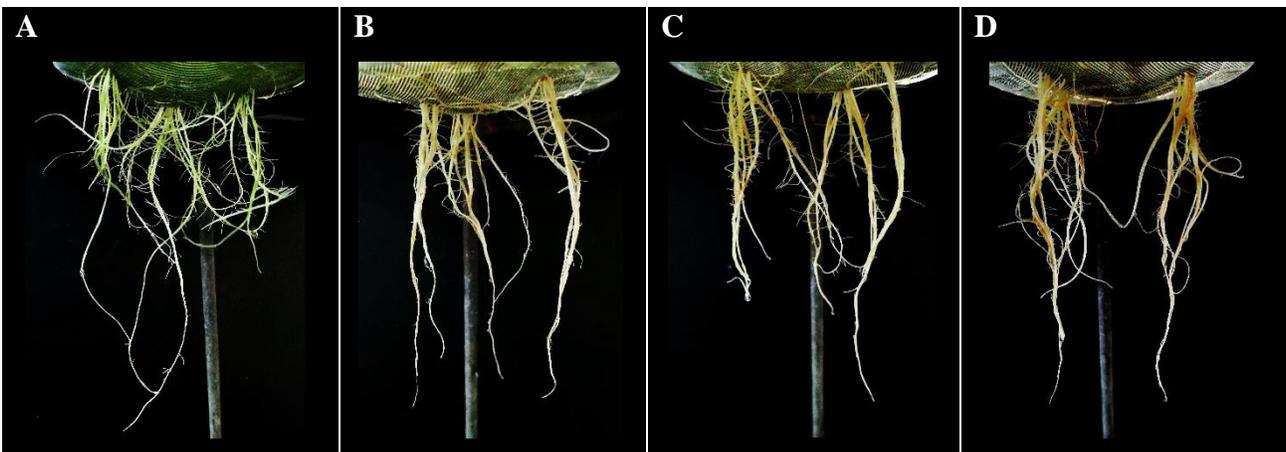
Para evaluar el efecto del ácido indol acético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) en la captación de Cd por *T. latifolia*, se utilizaron plántulas de 1 mes de desarrollo en sistemas de hidroponía, implementado el diseño experimental mostrado en la (**Figura 20**). La concentración de auxina empleada en este experimento se determinó con base a los resultados obtenidos de la germinación *in vitro* y la curvas dosis repuestas, estableciendo concentraciones de 1 ppm y 0.5 ppm de ácido indol acético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) respectivamente.

Al término del periodo de exposición (10 días), a nivel de fenotipo las plántulas en presencia de Cd, AIA+Cd y ANA+Cd, presentaron marchitamiento de su tejido aéreo con respecto al control, siendo dicho fenómeno ocasionado por la presencia de Cd en el medio (**Figura 20**).

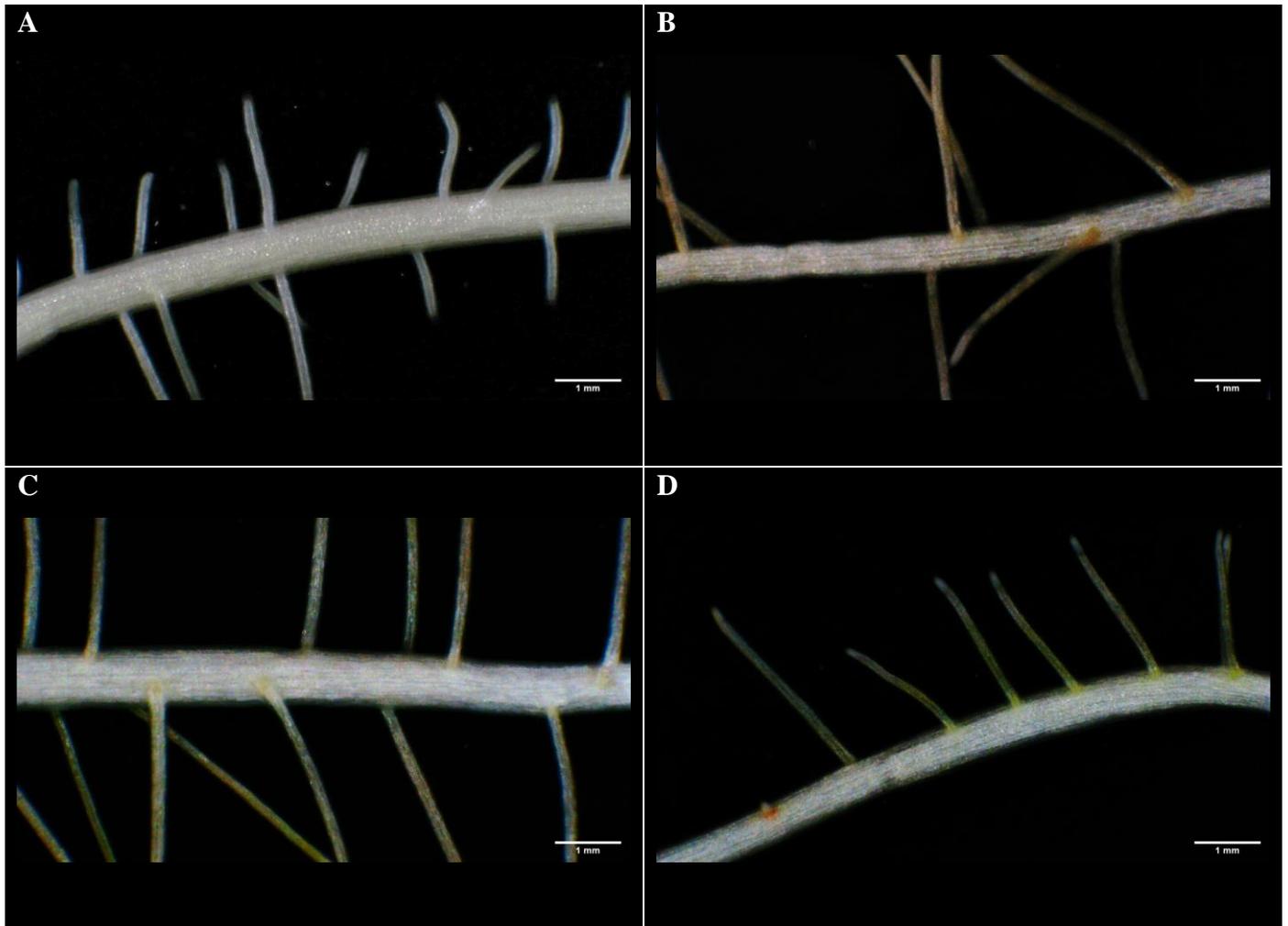
Por otro lado, el sistema radicular de *T. latifolia* expuesta a Cd sin suplementación de auxinas presentó una disminución de pelos radiculares, un ligero oscurecimiento en tonalidades café del tejido radicular, al igual que adelgazamiento de las raíces con respecto al control no expuesto (**Figura 21 B** y **Figura 22 B**). Mientras que, el sistema radicular de las plántulas expuesta a Cd con suplementación de auxinas (AIA y ANA), presentaron una disminución de los pelos radiculares y adelgazamiento de las raíces, siendo esta menor en comparación con el sistema radicular de las plantas expuesta a Cd sin suplementación de AIA y ANA, pero evidente en comparación con el control no expuesto (**Figura 21** y **Figura 22**).



**Figura 20.** Vista lateral y superior de brotes de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd. **A)** control; **B)** MS+ Cd; **C)** 1 ppm AIA + Cd y **D)** 0.5 ppm ANA + Cd.

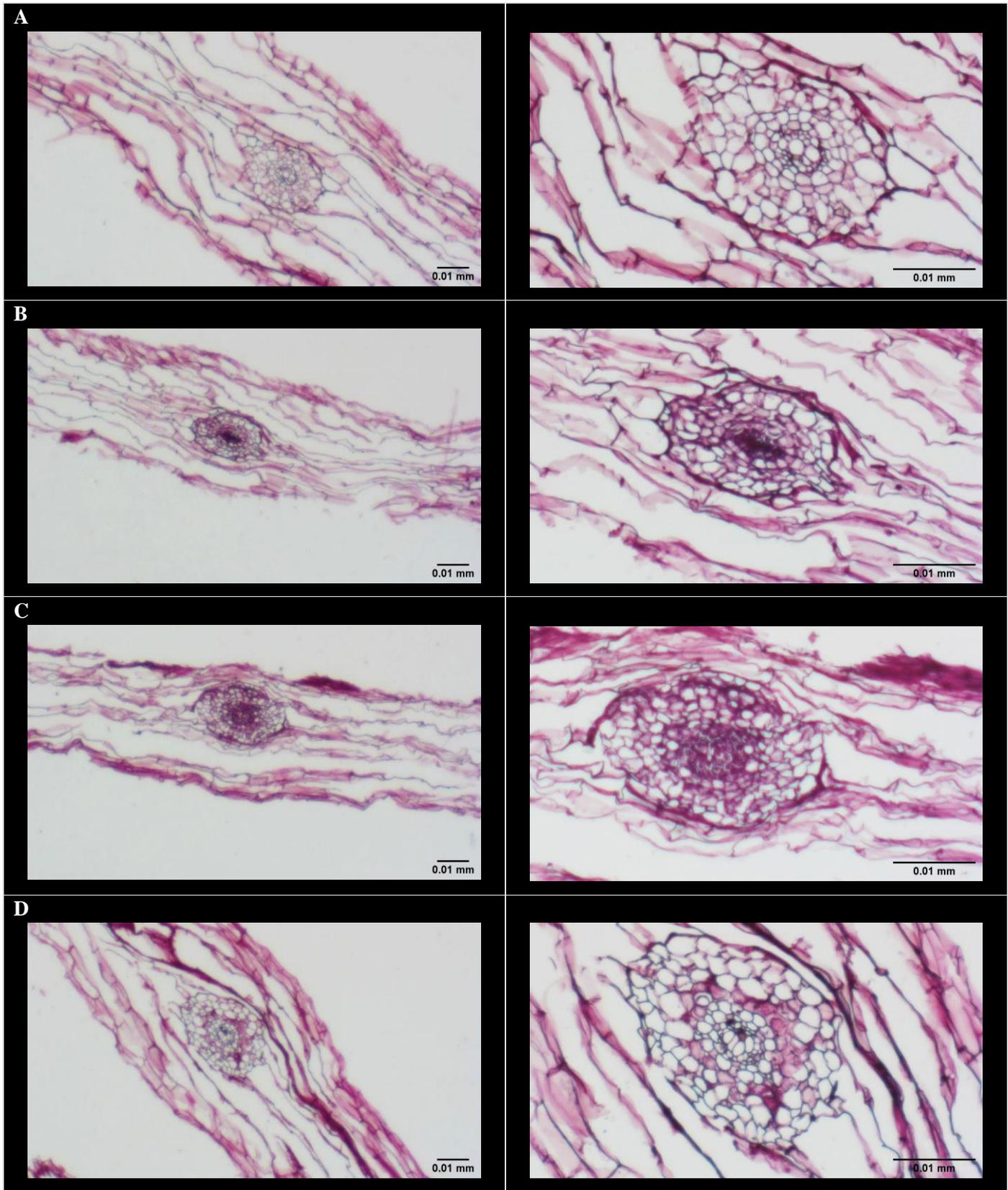


**Figura 21.** Sistema radicular de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd. **A)** control; **B)** MS+ Cd; **C)** 1 ppm AIA + Cd y **D)** 0.5 ppm ANA + Cd.



**Figura 22.** Raíz de *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd (10 días). **A)** control; **B)** MS+ Cd; **C)** 1 ppm AIA + Cd y **D)** 0.5 ppm ANA + Cd.

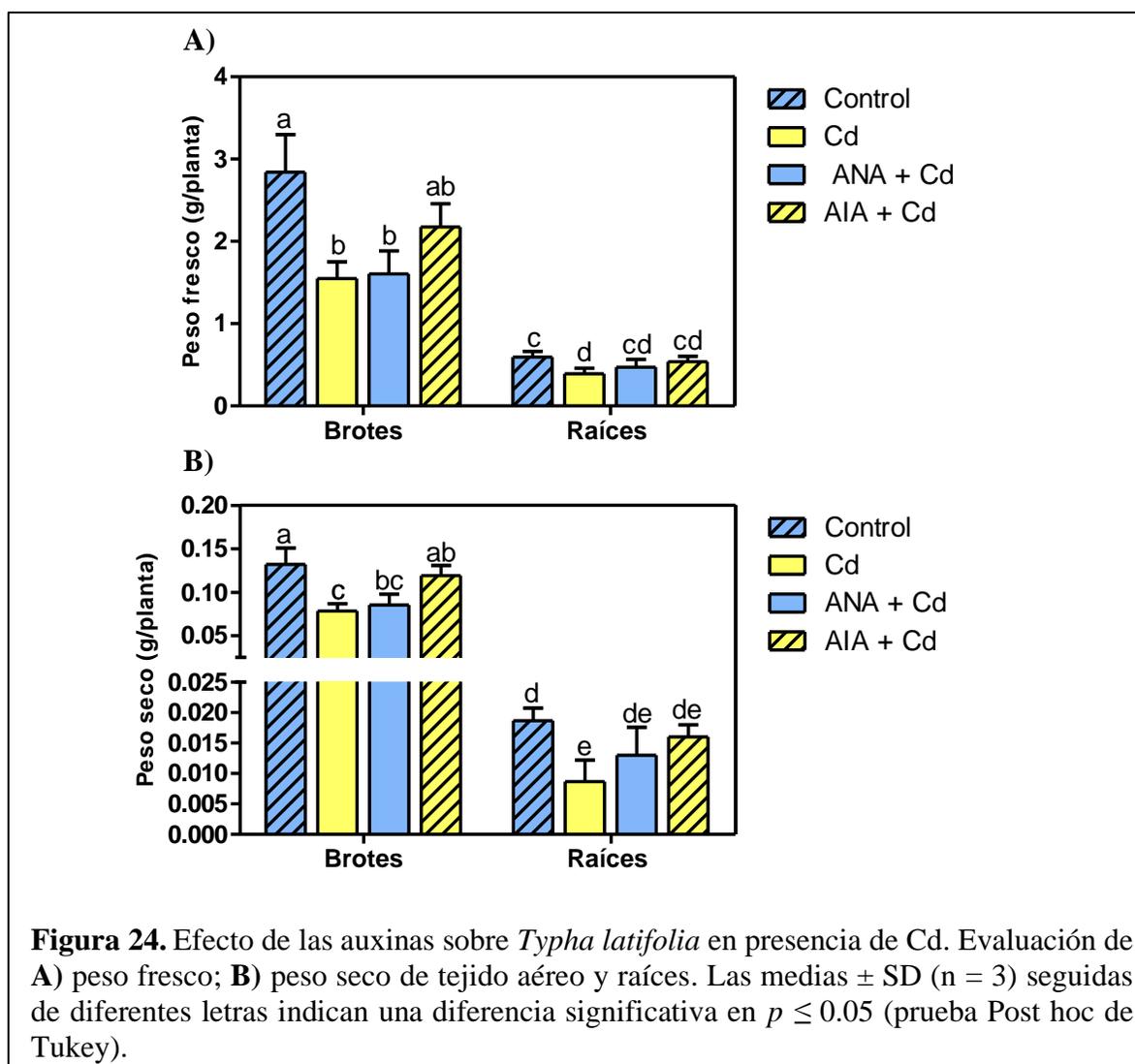
Además de ello, se realizaron los cortes histológicos de las raíces de las plantas expuestas a los tratamientos. Las células se tiñeron en tonalidades que iban de rosa a fucsia, observándose una mayor intensidad de estas en los tratamientos expuestos a Cd, AIA+Cd y ANA+Cd, con respecto al control (**Figura 23**). Lo cual, sugiere una mayor síntesis de los compuestos que conforman la pared celular en las plantas expuestas a auxinas.



**Figura 23.** Estructura radical *Typha latifolia* de 6 semanas, expuesta a 40 ppm de Cd (10 días). **A)** control; **B)** MS+ Cd; **C)** 1 ppm AIA + Cd y **D)** 0.5 ppm ANA + Cd.

#### 4.5.2 Efecto de las auxinas sobre la biomasa de *T. latifolia* expuesta a Cd

Asimismo, se evaluaron parámetros como el peso fresco y seco tanto del tejido aéreo como radicular de *Typha latifolia* posterior a la exposición a Cd con y sin suplementación de auxinas (AIA y ANA). En general, los resultados mostraron una disminución de la biomasa de las plántulas al estar expuestas a 40 ppm de Cd con respecto al control (sin Cd). Sin embargo, al ser suplementadas con el ácido indol acético (AIA) generan mayor biomasa, siendo similar a la biomasa de plántulas no expuestas a Cd. Estos resultados sugieren que el AIA ejerce efecto protector en plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd (**Figura 24**).



**Figura 24.** Efecto de las auxinas sobre *Typha latifolia* en presencia de Cd. Evaluación de **A)** peso fresco; **B)** peso seco de tejido aéreo y raíces. Las medias  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en  $p \leq 0.05$  (prueba Post hoc de Tukey).

#### 4.5.3 Efecto de las auxinas sobre el pH de *T. latifolia* expuesta a Cd

Para finalizar con la primera etapa del efecto de las auxinas en la captación de Cd por *T. latifolia*, se determinó el pH del medio hidropónico. Para ello, se evaluó el pH del medio al inicio y al término del experimento.

Tras el del periodo de exposición (10 días), se observó una disminución del pH, obteniéndose valores de pH < 3 para los tratamientos que contenían Cd y suplementación con auxinas, mientras que en el medio control se obtuvo un valor de pH > 4, observado una disminución con respecto al pH inicial, pero sin diferencias significativas (**Tabla 7**).

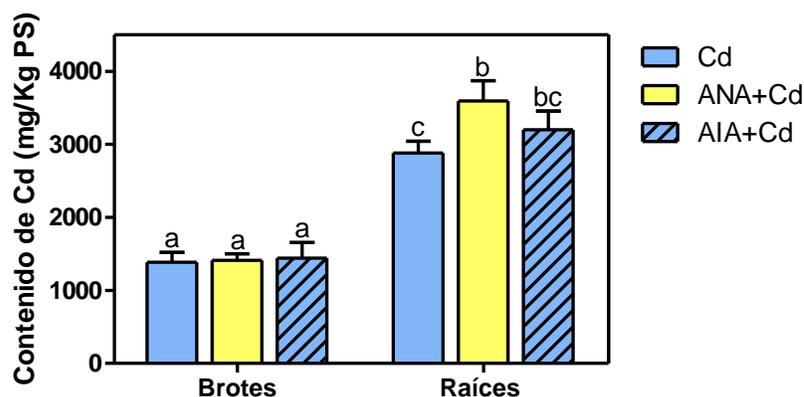
**Tabla 7.** pH inicial y final de medio MS + Cd, con y sin suplementación de auxinas de *Typha latifolia*.

Tratamiento	pH inicial	pH final
Control	5.7	4.05 ± 0.74 <sup>a</sup>
MS + Cd		2.81 ± 0.02 <sup>b</sup>
1-naftalenacético (ANA) + Cd		2.79 ± 0.06 <sup>b</sup>
ácido indol acético (AIA) + Cd		2.83 ± 0.02 <sup>b</sup>

\*Todos los tratamientos se realizaron por triplicado; letras diferentes indican diferencias significativas entre ellos, utilizando la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5.4 El ANA y AIA incrementan la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*

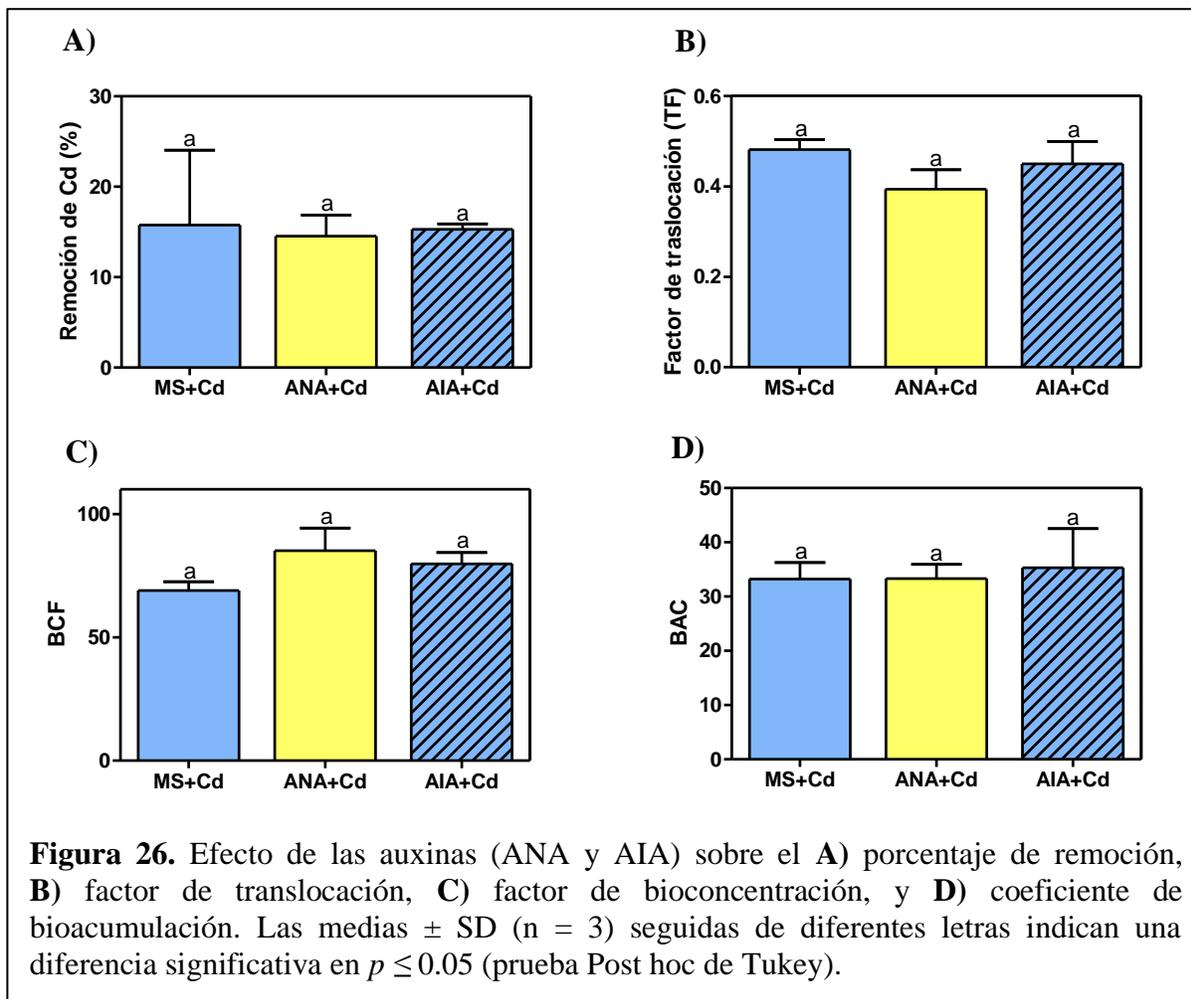
Con el objetivo de conocer el efecto del ANA y AIA sobre la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*, así como su contribución en la remoción de este metal, se determinó el contenido de Cd en los tejidos vegetales. Los resultados mostraron que independientemente del tratamiento empleado, el contenido de Cd es mayor en raíces, observando incremento significativo en los tratamientos con ANA (3595.44 mg/kg) y AIA (3200.77 mg/Kg) con respecto al control (2900 mg/Kg). Por otro lado, para el caso de contenido de Cd en brotes no existieron diferencias significativas entre tratamientos oscilando los valores entre 1387.40 - 1442.36 mg/Kg de Cd (**Figura 25**). Los resultados indican que las auxinas ANA y AIA incrementan la fitoextracción de Cd por *T. latifolia*.



**Figura 25.** Efecto de las auxinas (ANA y AIA) en la acumulación de Cd por *T. latifolia*. Las medias  $\pm$  SD (n = 3) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en  $p \leq 0.05$  (prueba Post hoc de Tukey).

Además, se determinaron otros parámetros para evaluar la contribución de las auxinas en el proceso de fitoextracción de *T. latifolia*, tales como el porcentaje de remoción, el factor de translocación (TF), el factor de bioconcentración (BCF) y el coeficiente de bioacumulación (BAC).

En general, los resultados no muestran diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los 4 parámetros previamente mencionados. Sin embargo, se observó que al adicionar 0.5 ppm de ANA, disminuye la capacidad de *T. latifolia* para translocar el metal de la raíz al tejido aéreo (TF). Por otro lado, la adición de auxinas (AIA y ANA) incrementa la capacidad de esta especie vegetal para captar el metal en el tejido radicular (BCF), siendo el tratamiento con ANA el que presentó los resultados más favorables. Finalmente, en relación con la capacidad de bioacumulación (BAC) y el porcentaje de remoción, no se observó ningún cambio significativo en los tratamientos expuestos a auxinas (**Figura 26**).



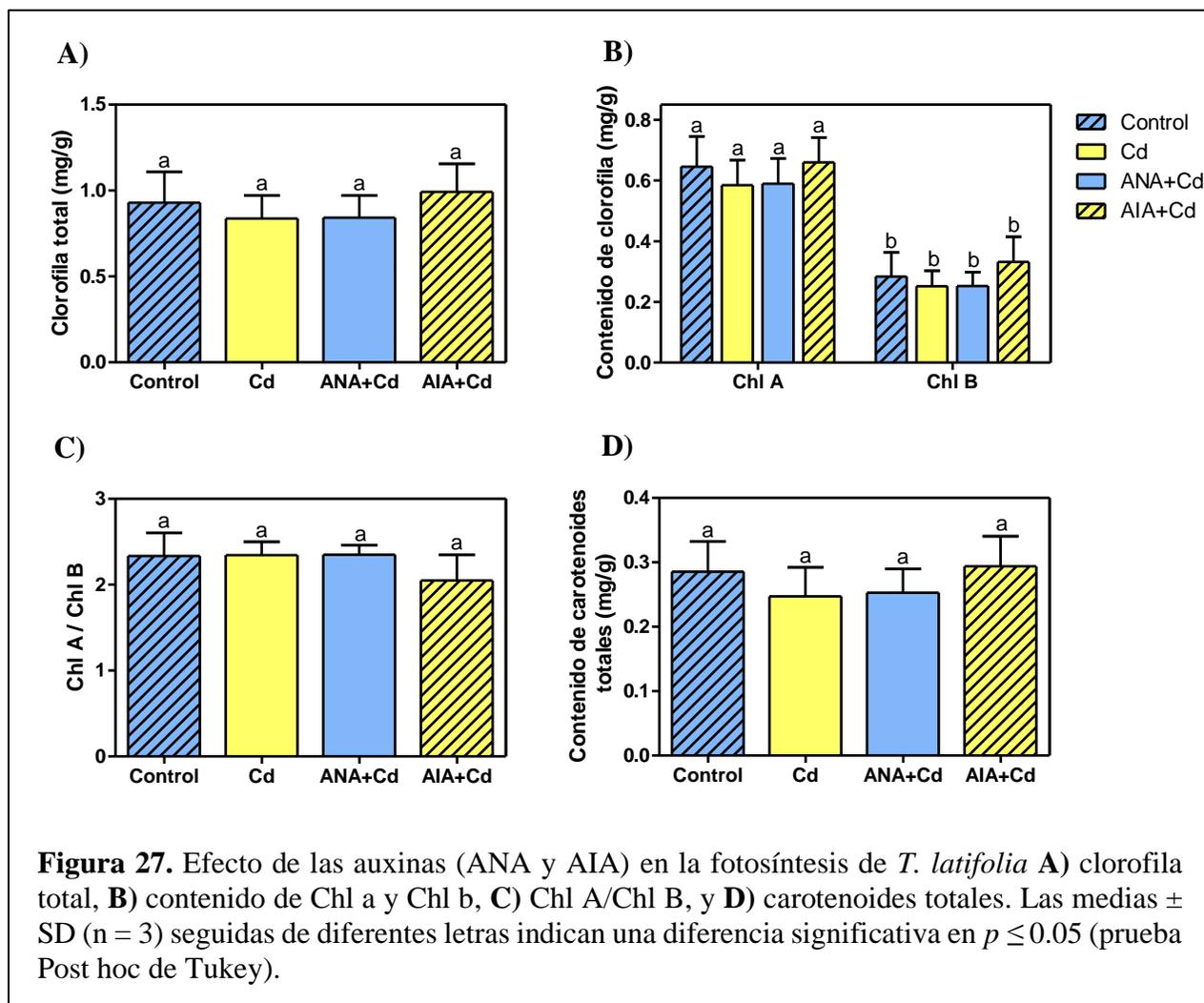
#### 4.5.5 Efectos las auxinas frente a la toxicidad del Cd en *T. latifolia*

##### 4.5.5.1 Actividad fotosintética de *T. latifolia* expuesta a Cd

Con la finalidad de conocer el efecto de las auxinas sobre la actividad fotosintética, se evaluó el contenido de clorofila y carotenoides del tejido aéreo de *T. latifolia* expuestas a Cd.

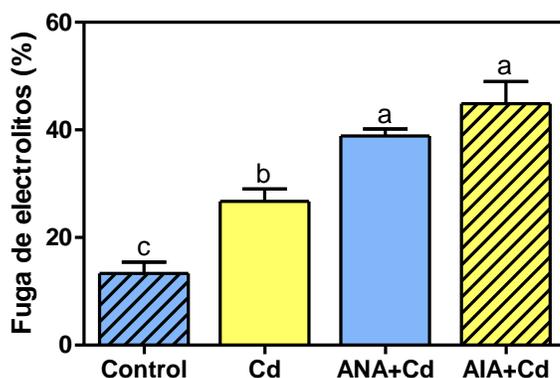
Si bien, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, los resultados obtenidos mostraron que el Cd disminuye el contenido de clorofila total, clorofila a y b, así como el contenido de carotenoides con respecto al control no expuesto; siendo este, el mismo caso para el tratamiento con ANA + Cd. Mientras que el tratamiento de AIA + Cd presentó resultados favorables, puesto que no se observó disminución alguna en ninguno de los cuatro parámetros mencionados previamente, obteniendo resultados similares al control no expuesto (**Figura 27**).

En cuanto a la relación clorofila a/b, no existieron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con AIA + Cd, presentó una disminución de este parámetro con respecto al control (**Figura 27 C**).



#### 4.5.5.2 Fuga de electrolitos

Se determinó la fuga de electrolitos del tejido radicular, puesto que este parámetro mide el daño de la membrana celular durante el estrés de las plantas. Los resultados mostraron un aumento significativo de este parámetro al encontrarse expuesta a Cd (26 %), incrementando aún más al ser suplementada con ácido 1-naftalenacético (ANA+Cd) y ácido indol acético (AIA+Cd), obtenido valores del 38 % y 44 % respectivamente (**Figura 28**).

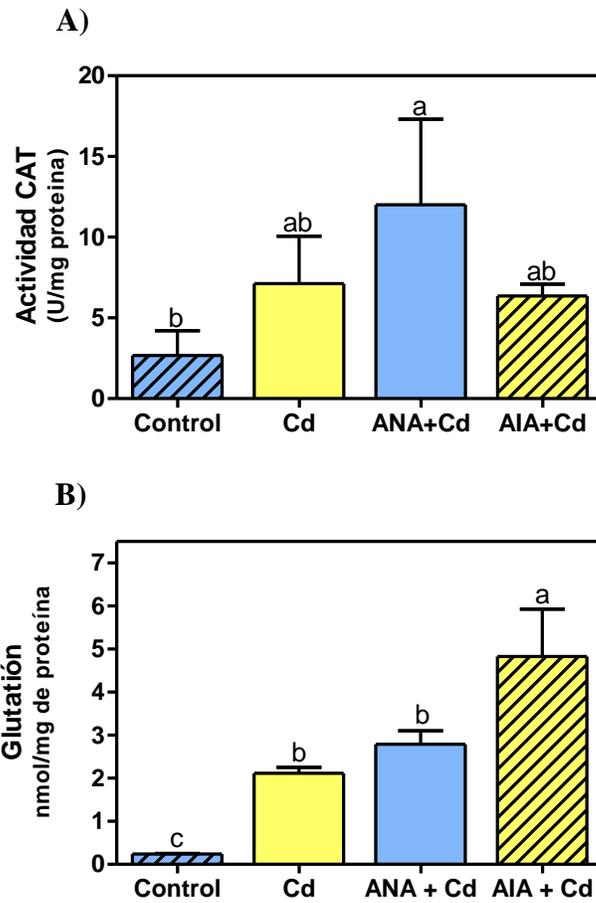


**Figura 28.** Fuga de electrolitos del tejido radicular de *T. latifolia* expuesta a Cd. Las medias  $\pm$  SD (n = 3) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en  $p \leq 0.05$  (prueba Post hoc de Tukey).

#### 4.5.5.3 Mecanismos enzimáticos y no enzimático de reparación

Las células vegetales a través de mecanismos enzimáticos y no enzimático logran mantener el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Es por ello, que en este estudio se determinó la actividad catalasa en el tejido aéreo y el contenido de glutatión en raíces de esta especie vegetal.

En cuanto a la actividad catalasa (mecanismo enzimático), se observó un incremento significativo de este parámetro al encontrarse expuesta a Cd, siendo el tratamiento suplementado con 1-naftalenacético (ANA+Cd) quien presentó la mayor actividad enzimática. Asimismo, para el caso del glutatión (no enzimático, la exposición a Cd induce de manera significativa la síntesis de GSH en el tejido radicular de *T. latifolia*, incrementado aún más este parámetro al ser suplementada con ácido indol acético (AIA+Cd) (**Figura 29**).



**Figura 29.** **A)** actividad catalasa; **B)** glutación de *T. latifolia* expuesta a Cd. Las medias  $\pm$  SD (n = 3) seguidas de diferentes letras indican una diferencia significativa en  $p \leq 0.05$  (prueba Post hoc de Tukey).

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 5.1 Efecto de las auxinas en *T. latifolia*

Las auxinas son hormonas y/o reguladores de crecimiento de las plantas, se encuentran abundantemente en los tejidos vegetales, participando en la organogénesis, en el desarrollo del tejido vascular y en el crecimiento diferencial de las plantas (Tan et al., 2021). A diferencia de la biosíntesis de auxinas en plantas, en bacterias, el AIA se sintetiza a partir de L-Trp por cinco vías biosintéticas. La síntesis bacteriana de AIA es parte de la estrategia de colonización de las bacterias en las raíces de plantas.

En estudios previos de interacción planta-bacteria se ha demostrado que mediante la producción de ácido indol acético (AIA), las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) promueven el desarrollo de las plantas, y contribuyen a su adaptación a diferentes condiciones ambientales, incluyendo metales pesados, salinidad y estrés por sequía (Khanna et al., 2021). Por lo que en este trabajo se determinó el efecto del ácido indol acético (AIA) y el ácido 1-naftalenacético (ANA) en dos fases vegetativas de *T. latifolia* (etapa de germinación y plántulas de 1 mes).

Se ha demostrado que la germinación de las semillas está controlada por el equilibrio que existe entre los niveles de los reguladores del crecimiento vegetal y la expresión espacio-temporal de la red de genes específicos en las semillas; el cual se ve concluido una vez que la radícula ha crecido lo suficiente para anclarse al sustrato que lo rodea (Pieruzzi et al., 2011; W. M. Barendse & J. M. Peeters, 1995). Los resultados muestran que el 25 % de las semillas de *T. latifolia* inician la germinación a las 24 h cuando son suplementadas con AIA o ANA, mientras que las semillas sin auxinas inician la germinación hasta las 48 h (98 % con AIA y 60 % con ANA). A las 48 h, el porcentaje de germinación en las semillas control es similar a las plántulas expuestas a 0.1, 0.5 y 1 ppm de AIA. En cuanto al ANA, se observó una tasa de germinación del 95 % a concentraciones de 0.1 y 1 ppm a las 48 horas, mientras que en las semillas sin tratamiento con ANA se obtuvo un 60 % de germinación. Sin embargo, fue necesario esperar hasta las 72 horas para que las semillas sin esta auxina alcanzaran el mismo nivel de germinación acumulativa del 95 %, equiparando así los porcentajes obtenidos con las diferentes concentraciones de ANA (**Figura 4**). Estos resultados demuestran que la

adición de reguladores del crecimiento vegetal como AIA y ANA induce la germinación temprana de las semillas y no afecta negativamente el proceso de germinación. Después de las 48 horas, se observan porcentajes de germinación acumulativa similares, alcanzando un 98 % y 100 % para las plantas tratadas (con AIA y ANA, respectivamente) y las plantas de control. Ullah et al., (2023) ha mencionado que el empleo de AIA y AIB promueve el proceso de germinación en *Zea mays*, reportando una germinación acumulativa del 60 % después de 48 h y 100 % después de 72 h; mientras que sin ellas se obtiene valores del 20 % después de 24 h, 50 % después de 48 h y 90 % después de 72 h. Asimismo, se ha reportado que el AIA mejora el proceso de germinación de semillas de especies como *Nicotiana tabacum*, *Araucaria angustifolia* y *Helianthus annuus* (Pieruzzi et al., 2011).

En lo que respecta al aspecto de las plántulas germinadas en presencia de las auxinas, los resultados demuestran que el AIA y el ANA favorecen el crecimiento y desarrollo de *T. latifolia*, siendo evidente el incremento del número de raíces por plántula durante la primera fase (0-15 días) (**Figura 6** y **Figura 8**). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rolón-Cárdenas et al., (2021), quienes observaron que el tratamiento con AIA exógeno durante 15 días incrementa en un 40 % el número de raíces en plántulas de *T. latifolia* de 2 meses de edad. Del mismo modo, Al-Qudah et al., (2023) emplearon las auxinas AIA, IBA y ANA para favorecer el desarrollo de raíces en segmentos de brotes de *Salvia dominica L.*, logrando el enraizamiento y la formación de raíces funcionales en *S. dominica L.* con la aplicación de las auxinas. Además, Abu-Zahra et al., (2012) y Solano et al., (2023) demostraron que el ANA y AIA favorecen el desarrollo del sistema radicular al incrementar el número de raíces en *Parthenocissus quinquefolia* y *Allium cepa L.*, respectivamente.

Los estudios previos han demostrado que el empleo de auxinas exógenas provoca cambios morfológicos en el tejido radicular, mejorando el anclaje de las plantas al sustrato e incrementando la superficie de contacto (Al-Qudah et al., 2023; Correa et al., 2019; G. A. Rolón-Cárdenas et al., 2021; Solano et al., 2023). Recientemente, autores como Araniti et al. (2023) y Ronzan et al., (2018) han realizado investigaciones enfocadas en la determinación de los cambios estructurales inducidos en el tejido radical de especies vegetales por la exposición a Cd, observando que dicho metal ocasiona un desequilibrio en la homeostasis de las auxinas (AIA) afectado su biosíntesis, transporte y distribución, lo que provoca cambios

importantes en la arquitectura del sistema radicular, que puede influir de manera negativa en la supervivencia de plantas.

Con el objetivo de determinar cambios morfológicos en las raíces de plántulas de *T. latifolia* expuestas y no expuestas a AIA y ANA, se obtuvieron cortes histológicos de las raíces de plántulas tratadas y no tratadas. Los cortes obtenidos se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS), el cual tiene afinidad por los carbohidratos de las paredes celulares. En la observación de los cortes histológicos teñidos con PAS, se notó una mayor intensidad de color en las raíces tratadas con AIA y ANA, lo que sugiere un mayor contenido de carbohidratos en comparación con las plantas no tratadas. Asimismo, se observó que el diámetro de los pelos radiculares en las plantas tratadas con auxinas (AIA y ANA) es mayor que en las plántulas de control, que no fueron expuestas a las auxinas (**Figura 13** y **Figura 18**). Los resultados sugieren que las auxinas incrementan la síntesis de carbohidratos como la pectina, involucrada en el soporte de las paredes de las células radiculares (Majda & Robert, 2018; Šípošová et al., 2023). Esto indica que el AIA y ANA inducen cambios morfológicos para reforzar las paredes celulares de las células radiculares de *T. latifolia*.

Por otro lado, los resultados en la segunda fase vegetativa (plántulas de 1 mes) no solo mostraron el efecto benéfico de las auxinas sobre el sistema radical con el aumento del número de pelos radiculares (**Figura 12** y **Figura 17**); sino también se observa una mayor biomasa del tejido aéreo. Si bien, para esta última fase no existen diferencias significativas entre tratamientos; puesto que el desarrollo y comportamiento de la planta modelo es impredecible, es evidente una tendencia en cuanto al incremento de los parámetros evaluados (**Figura 10** y **Figura 15**). Y. Xu et al., (2012) reportaron un efecto similar con el ácido indol acético (AIA) y el ácido indol butírico (AIB) en especies de *Pinus yunnanensis Franch*, observando que la adición de auxinas no solo propicia el desarrollo del sistema radicular al incrementar su biomasa (13.10 % - 35.60 %) en *P. yunnanensis Franch*, sino también de tallos (21.10 % - 61.10 %) y acículas (53 % - 58 %). Asimismo, Agami & Mohamed (2013) y S. Singh & Prasad (2015) obtuvieron resultados similares, observando que el AIA promueve de manera general el desarrollo del tejido vegetal. Esto se reflejó en un aumento en la superficie foliar de las hojas, el crecimiento de brotes y una mayor longitud de las raíces en especies como *Triticum aestivum* y *Solanum melongena*.

Se hace evidente que la aplicación de auxinas exógenas induce cambios morfológicos significativos en el sistema radicular de *T. latifolia*, aumentando tanto el número como el tamaño de las raíces mediante el transporte de auxinas presentes en el medio de nutrientes hacia el interior de las plántulas. Este proceso se lleva a cabo a través del transporte polar de auxinas (PTA), también conocido como movimiento activo de auxinas de célula a célula, que constituye una de las dos principales vías de transporte. (G. L. B. Gomes & Scortecci, 2021). Pues bien, las plantas a través de sus raíces absorben los nutrientes que se encuentran en el medio hidropónico (pH 5.7), así como las auxinas (AIA y ANA) presentes en él, y el AIA al ser una molécula que puede asumir dos formas químicas diferentes [protonada (AIAH) en ambientes con un pH ácido y la forma iónica (AIA) en un ambiente con pH neutro], ingresa a la membrana celular atravesando la pared celular (pH 5.5). Una vez en el citoplasma (pH neutro), la auxina se desprotona, lo que dificulta que el AIA atraviese nuevamente la membrana plasmática (Hu et al., 2021; Vanneste & Friml, 2009).

Además de esto, también se considera la hipótesis del crecimiento inducido por la acidificación del apoplasto, la cual estimula la expansión celular. (Haruta et al., 2015), la cual, propone que el alargamiento inducido por las auxinas podría estar relacionado con la hiperpolarización de la membrana plasmática causada por la activación de PM  $H^+$ -ATPasas mediada por auxinas, lo que resulta en la acidificación del apoplasto y posteriormente en el ablandamiento de la pared celular, permitiendo la expansión de las células (Hu et al., 2021). Siendo esto benéfico para la especie vegetal, en especial el incremento del grosor y número de pelos radiculares observados en este trabajo con *T. latifolia* (**Figura 30**). Al ser extensiones unicelulares no ramificadas de la raíz, incrementan el contacto con el sustrato, extendiéndose sobre el área en que se encuentran y potenciando el anclaje de la planta al sustrato (Correa et al., 2019). El sistema radicular desempeña un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento de las plantas, siendo responsable de la absorción de agua y nutrientes. (Fitter, 1987; Jansen et al., 2013). A su vez, las raíces participan como intermediario en la actividad simbiótica entre la especie vegetal y los microorganismos, sintetizando metabolitos que contribuirán a la selección y abundancia de los mismos (Y. H. Li et al., 2013; O'Toole & Bland, 1987).

También, es importante mencionar que durante la primera etapa experimental, no solo ha sido evidente el efecto benéfico que trae consigo la aplicación de auxinas a especies vegetales como *T. latifolia*; sino también se ha observado que el empleo de ellas en concentraciones superiores de 1 (AIA) y 0.5 (ANA) ppm, en etapas tempranas del desarrollo vegetal inhiben el crecimiento del sistema radical (**Figura 5** y **Figura 7**); mientras que en plántulas de 1 mes, concentraciones superiores a 0.5 ppm de ANA ocasionan daños al sistema radicular (**Figura 17 D**), indicando que el efecto benéfico de las auxinas es dependiente a la concentración así como al tipo de auxina empleada, tal como lo reporta Márquez et al. (2016). Puesto que, altas concentraciones de ellas desencadenan la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que produce efectos inhibitorios en la elongación de las células radiculares, afectando el crecimiento de las raíces (Ivanchenko et al., 2013).

## **5.2 Ácido indol acético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA) en la captación de Cd por *T. latifolia***

El empleo de estrategias ecológicas para la remoción de contaminantes en suelo, agua o sedimentos tienen sus limitaciones. Un ejemplo de ello es la fitorremediación de metales pesados, ya que, al ser tóxicos para la mayoría de las plantas, alteran el metabolismo de la especie vegetal e inhiben su crecimiento (X. Li et al., 2019). Sin embargo, actualmente existen estudios dirigidos a encontrar herramientas que compensen este inconveniente, como investigaciones enfocadas en la fitorremediación asistida por microorganismos, así como en la comprensión del papel que desempeñan los metabolitos producidos por estos microorganismos.

Se ha descrito que las bacterias productoras de AIA (características de las PGPR) mejoran los procesos de fitoextracción al aumentar la acumulación de Cd en brotes y raíces, ya que favorecen el desarrollo del tejido aéreo y radicular, así como la síntesis de pigmentos fotosintéticos. en especies vegetales como *Sedum alfredii* y *Linum usitatissimum* L. (B. Chen et al., 2017; M. Shahid et al., 2019; K. Wu et al., 2018). No obstante, aún no está del todo claro el efecto del AIA y ANA en la tolerancia ante el estrés provocado por Cd en *T. latifolia*. Por lo que, en este trabajo se evaluó el efecto de dichas auxinas, observando que estas favorecen el crecimiento de la especie vegetal aún en presencia de Cd, siendo evidente el incremento del peso seco y fresco en brotes y raíces (**Figura 24**). Respecto al crecimiento,

en un estudio previo L. Chen et al., (2020) encontraron un incremento significativo en la biomasa seca de brotes (32 %) y raíces (58 %), tras la adición de AIA exógeno en *Brassica juncea* L. expuesta a metales (Cd y U); caso contrario de aquellas plántulas no tratadas que mostraron una disminución de su biomasa. Resultados similares se han reportado en *Solanum nigrum* L. cultivada en suelo contaminado por Cd, mencionando que el AIA incrementa de manera significativa la biomasa de brotes (124 %), lo que a su vez favoreció la acumulación de dicho metal (Ji et al., 2015). Lo anterior sugiere que la aplicación de auxinas asiste a las especies vegetales para hacer frente a los efectos deletéreos provocados por la absorción de metales, lo que a su vez eficientiza el proceso de fitorremediación; dado que en gran parte la absorción de ellos radica en la biomasa disponible, así como la concentración del contaminante (L. Chen et al., 2020; Shah et al., 2023).

Los pigmentos fotosintéticos son imprescindibles en la biogénesis del aparato fotosintético de las plantas ( Wang et al., 2014), por lo que una disminución de estos es un reflejo de la respuesta de las plantas ante el estrés (Osman et al., 2023), afectando la morfología, fisiología y bioquímica de las plantas. Diversas investigaciones mencionan que la acumulación de metales pesados interviene en la actividad fotosintética, reduciendo los niveles de clorofila; dado que los metales pueden sustituir el ión  $Mg^{2+}$  en la molécula de clorofila, impidiendo la captación de fotones (Pernía et al., 2008; Youssef & Diatta, 2023).

En este estudio, los resultados no mostraron diferencias estadísticas entre en el contenido de carotenoides y clorofila respecto al control. Sin embargo, los promedios de carotenoides mostraron una ligera disminución al encontrarse expuestas a Cd; por consiguiente, también disminuyó el contenido de clorofila. Sin embargo, el tratamiento con AIA restauró los niveles de clorofila (**Figura 27**), esto se puede atribuir a que la síntesis de clorofila y carotenoides se lleva a cabo en los cloroplastos, donde los carotenoides forman complejos fotosintéticos en las membranas tilacoides y desempeñan un papel importante en la protección de la clorofila; por lo que es de esperar que la reducción en los niveles de carotenoides se acompañe con la disminución en los niveles de clorofilas ( Wang et al., 2014). Por su parte Ran et al., (2020), describieron que el AIA favorece la síntesis de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides) en especies como *Solanum melongena* y *Solanum nigrum* expuestas a Cd, mencionado que la acumulación de este metal en tejido aéreo se encuentra correlacionado al

contenido de carotenoides dado que estos protegen el aparato fotosintético eliminando el oxígeno singlete, lo que aumenta la biomasa de la planta y promueve la acumulación de Cd. Otras especies que se han visto beneficiadas por el empleo de AIA son *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Sedum alfredii* H., las cuales presentaron un incremento en el contenido de clorofila de un 46 % y 20 %, respectivamente (B. Chen et al., 2017; Sun et al., 2020). Asimismo, se ha reportado el empleo de ANA en *Chlorella vulgaris*, teniendo efectos positivos en la síntesis de pigmentos fotosintéticos bajo el estrés por metales pesados (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012).

En cuanto a la relación clorofila a/b, los estudios previos mencionan que este parámetro es un indicador de estrés en plantas y está asociado con la disminución de la intensidad lumínica; provocando una reducción en la actividad fotosintética y una mayor concentración clorofila b, lo que afecta la relación clorofila a/b (Jaramillo-Salazar et al., 2018). De modo que, el ligero decremento observado en la relación clorofila a/b en el tratamiento con AIA, indica el daño mínimo en las plantas provocado por la aplicación de auxinas (**Figura 27 C**).

Efectivamente, la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática son indicadores clave de la fitotoxicidad frente al estrés por metales, ya que estos provocan daños a nivel celular mediante la sobreproducción e hiperacumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS); esto incluye el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ), oxígeno singlete ( $O_2$ ) y los radicales hidroxilos ( $OH^-$ ). Si bien, el metabolismo aeróbico de las plantas genera ROS como subproducto, desempeña un papel fundamental en la señalización homeostática y celular; su sobreproducción conduce al estrés oxidativo, dañando la membrana plasmática y da lugar a la fuga de membrana. Puesto que las ROS activan los canales iónicos, liberando iones de potasio ( $K^+$ ) intracelular, estimulando así las enzimas hidrolíticas que conducen a la muerte celular (Giannakoula et al., 2021; Hayat et al., 2021; Rolón-Cárdenas, Martínez-Martínez, et al., 2022). Daño que puede ser evaluado a través de determinación de la fuga de electrolitos (EL), la cual aporta información acerca de la integridad de la membrana celular (Prado et al., 2015; Rahim et al., 2022). En el presente estudio, se determinó la EL sobre el tejido radicular, mostrando un incremento significativo en las plántulas de *T. latifolia* expuestas a Cd; lo cual coincide con lo reportado previamente por Y. Xu et al., (2015), quienes mencionan que el estrés por Cd conlleva al aumento de la

fuga de electrolitos en *T. angustifolia*, ya que la exposición a este metal aumenta el superóxido ( $O_2^-$ ) de manera dependiente a la concentración (Ren et al., 2020). Otros estudios que han reportado el incremento de la EL, como consecuencia del estrés generado por Cd en especies como *Trifolium repens* y *Brassica oleracea* L., son los realizados por Jia et al., (2023) y Wu et al., (2022), claramente sus resultados sugieren una alteración en la integridad de la membrana celular, ocasionado por las lesiones oxidativas al promover la peroxidación lipídica de las membranas. Asimismo, los tratamientos con suplementación de auxinas (AIA y ANA) mostraron un incremento de este parámetro, siendo incluso mayor al observado en las plantas expuestas únicamente a Cd (**Figura 28**). No obstante, un estudio similar realizado por Rolón-Cárdenas, Martínez-Martínez, et al., (2022), menciona que la aplicación de auxinas exógenas (AIA) como coadyuvante a los efectos tóxicos provocados por la exposición a Cd, no genera ningún cambio significativo en la EL de plántulas de *T. latifolia* de dos meses de edad. Mientras que, en las plántulas de 1 mes, utilizadas en este estudio, si se observaron efectos deletéreos, lo cual puede deberse a la fragilidad de las raíces de plántulas más jóvenes, en comparación con las raíces de plántulas de dos meses.

Por otro lado, Khan et al., (2019) y S. Singh & Prasad, (2015) han observado que la aplicación de AIA en especies como *Lycopersicon esculantum* y *Solanum melongena* mitiga los efectos del Cd, observado la disminución de la fuga de electrolitos hasta en un 50 %. De manera que, los resultados obtenidos en este estudio sugieren una acumulación de ROS, así como daño asociado a lípidos y membrana en las plántulas de un mes de *T. latifolia*.

Como se ha mencionado previamente, el aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede provocar daños significativos en la estructura celular. Sin embargo, las plantas tienen la capacidad de mitigar este daño mediante la activación de sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Raihan et al., 2022). En este estudio, se evaluó la defensa antioxidante mediante la cuantificación de la actividad de la catalasa (CAT) en los brotes y el contenido total de glutatión (GSH) en las raíces.

Dentro del sistema antioxidante enzimático, la catalasa (CAT) es una de las principales enzimas implicadas en la reducción del daño ocasionado por las ROS al disminuir los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) ( Rolón-Cárdenas, Martínez-Martínez, et al., 2022), catalizando de reacciones que transforman las ROS en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno ( $O_2$ ),

reduciendo así el estrés oxidativo al mantener en equilibrio las ROS (Elgawad et al., 2020; Rolón-Cárdenas, Arvizu-Gómez, et al., 2022). Es por ello, que al evaluar la actividad CAT se ha observado un aumento de este parámetro al encontrarse expuesto a Cd, lo que indica un incremento en la producción de ROS como resultado del estrés oxidativo provocado por el metal, tal como lo reporta Guo, Qin, et al., (2019). Así mismo, los tratamientos con AIA y ANA mostraron un incremento de la actividad catalasa; siendo significativamente mayor en el tratamiento con auxinas con respecto al tratamiento de Cd no suplementado (**Figura 29 A**). Estudios realizados por Guan et al., (2022), Zhan et al., (2017) y C. Zhang et al., (2020), reportan un aumento en la actividad CAT tras la adición de auxinas (ANA y AIA) en especies como *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor* y *Camellia sinensis* expuestas a Cd; mencionado que la aplicación exógena de auxinas disminuye la toxicidad del metal al mejorar y estimular las actividades antioxidantes, puesto que altas concentraciones de Cd inhiben la actividad CAT (G. A. Rolón-Cárdenas, Martínez-Martínez, et al., 2022). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la adición de auxinas contribuye a mitigar el estrés generado por la exposición al Cd en *T. latifolia*.

Por su parte, el glutatión (GSH) es un mecanismo de defensa antioxidante no enzimático que desempeña un papel importante en la desintoxicación del Cd, esto a través de diferentes vías. Por un lado, el GSH contribuye en el alivio del estrés generado por el metal, participando en la regulación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante el sistema ascorbato-glutatión (Foyer & Noctor, 2011; G.-Z. Li et al., 2021); mientras que por otra parte, hace frente al ion metálico ( $Cd^{2+}$ ) quelándolo al unirse al grupo tiol de GSH. Además de ello, el glutatión es precursor en la síntesis de fitoquelatinas (PC), el cual forma complejos con los iones Cd (PCs-Cd) que transporta el metal hacia las vacuolas donde son atrapados y fijados como elementos no tóxicos (Hoang et al., 2021; F. Wu et al., 2022). En este estudio, se observó un incremento significativo en el contenido de glutatión con respecto al control no expuesto como respuesta al estrés generado por Cd; lo que coincide con lo reportado previamente en *T. angustifolia*, donde se observó que dicho metal propicia la síntesis de glutatión y fitoquelatinas (Liu et al., 2016; Ren et al., 2020). Del mismo modo, se vio favorecido el aumento en el contenido de GSH en las plántulas expuestas a Cd+auxinas, obteniendo un mayor efecto al adicionar AIA (**Figura 29 B**). Bashri & Prasad, (2016) y Khan et al., (2019) han reportado un efecto similar en *Lycopersicum esculantum* y *Trigonella foenum-graecum*

con la adición de AIA bajo estrés por Cd. Sugiriendo estos resultados que la adicción exógena de auxinas incrementado el sistema de defensa antioxidante, estando la acumulación de GSH asociada a la tolerancia de Cd en *T. latifolia*, tal como lo menciona G. A. Rolón-Cárdenas, Martínez-Martínez, et al., (2022).

En lo que respecta a la fitoextracción de metales, *T. latifolia* cuenta con una gran versatilidad en la tolerancia, absorción y eliminación de contaminantes como: Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Co y Zn; sin mencionar lo notable de su capacidad para la producción de biomasa (Martínez-Martínez et al., 2023). La fitoacumulación consiste en la absorción de metales a través del sistema radicular de la especie vegetal, el cual es transferido posteriormente al tejido aéreo siendo almacenado en vacuolas, pared celular, membrana celular, así como áreas vegetales metabólicamente inactivas. (Barathi et al., 2023). Esto a través del mecanismo de defensa para la neutralización de los iones metálicos, que consiste en la formación de agentes quelantes como las fitoquelatinas y metalotioneínas. Por su parte, las fitoquelatinas forman complejos con los iones metálicos (M-PC) en las células vegetales, cabe destacar que el  $Cd^{2+}$  se ha reportado como un estimulador eficaz en la síntesis de estas; por lo que, al estar la especie vegetal expuestas a Cd, este agente quelante llega a ser un buen mecanismo de defensa. Así mismo, las metalotioneínas contribuyendo en la desintoxicación de metales pesados (Putri & Moersidik, 2021).

En este estudio *T. latifolia* fue expuesta a una concentración de Cd determinada (40 ppm) con y sin suplementación de auxinas; evaluando parámetros que aportaron información del efecto de la auxina en la fitoextracción de este metal. En primer lugar, se determinó el contenido de Cd (mg/Kg), observando que independientemente de la concentración y auxina empleada, este es mucho mayor en raíces (2880-3200 mg/Kg) que en brotes (1387-1442 mg/kg) (**Figura 25**), lo que no es inusual. Puesto que, autores como Alonso-Castro et al., (2009), Hejna et al., (2020) y Yang & Shen, (2020) han reportado una mayor acumulación de Cd en el tejido radicular de *T. latifolia*, dado que la mayoría de las especies pertenecientes al género de *Typha* poseen un factor de bioconcentración (BCF) > 1, mientras que el de traslocación (TF) < 1, indicando la poca habilidad de esta especie vegetal para transportar el metal hacia el tejido aéreo (Martínez-Martínez et al., 2023). Otro aspecto importante a resaltar es el incremento en la acumulación de Cd en raíces tras la adición de auxinas, en

especial con ANA siendo estadísticamente significativo; un efecto similar fue reportado en *Arabidopsis thaliana* por Zhu et al., (2013), quienes observaron un aumento en la acumulación de Cd en el sistema radical con la adición de esta auxina, mencionado que favorece la síntesis de hemicelulosa en raíz, incrementando la fijación de  $\text{Cd}^{2+}$  a la pared celular. Así mismo, especies como *Solanum nigrum* y *Helianthus annuus* L. se han visto beneficiadas con la adición de AIA favoreciendo la acumulación metales en el sistema radical (L. Chen et al., 2021; Ran et al., 2020).

Por su parte, los factores de bioconcentración (BCF) y traslocación (TF) contribuyeron a estimar el potencial fitorremediador de *T. latifolia*; siendo estos un índice de la capacidad de acumulación de metales con respecto a su concentración en suelo, así como el transporte de los metales de la raíz al tejido aéreo (Madanan et al., 2021). Los resultados de estos dos parámetros mostrando que si bien, las auxinas tienen un efecto sobre ellos, éste es apenas notable; dado que los valores obtenidos de BCF se encontraban entre  $68.99 \pm 3$  a  $85.11 \pm 9$  observando un sutil incremento con la adición de AIA y ANA, mientras que los valores de TF iban de  $0.39 \pm 0.04$  a  $0.48 \pm 0.02$  disminuyendo ligeramente en presencia de ANA (**Figura 26 C; B**), por lo que no existieron diferencias significativas entre tratamientos. Caso contrario a lo reportado por Hadi et al., (2021), Ji et al., (2015) y Ran et al., (2020) quienes obtuvieron resultados favorables con la adición de auxinas exógenas, mencionando que estas mejoran el BCF en *Ricinus communis* y *Solanum nigrum*. Por lo que estos hallazgos sugieren que las auxinas solo favorecen la inmovilización del metal en el tejido radical y no su traslocación; siendo *T. latifolia* excluida de las plantas hiperacumuladora, ya que para ser catalogada dentro de este grupo los valores de TF y BCF deben ser mayor a 1.0 y 1000 respectivamente (Dinu et al., 2020); sin embargo esto no demerita la capacidad de esta especie vegetal para tolerar y acumular metales, así como para ser empelada con fines fitorremediadores.

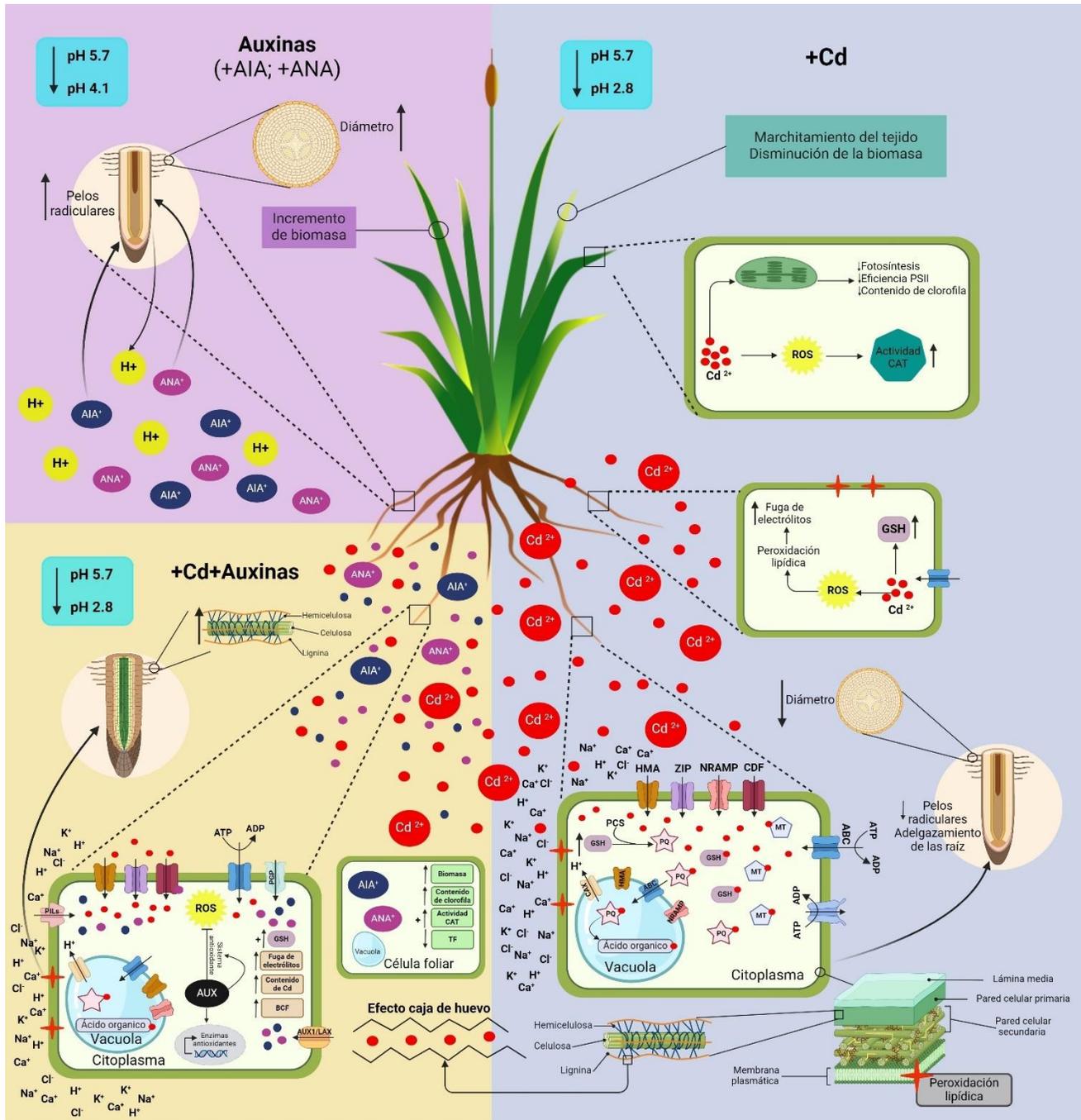
Finalmente, se determinó el porcentaje de remoción y coeficiente de bioacumulación (BAC) de Cd en *T. latifolia*, siendo este último un parámetro que indica la capacidad de acumulación de metales en tejido aéreo con relación a su concentración en suelo (Bader et al., 2020; Vasilache et al., 2023). Los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas entre tratamiento, puesto que las auxinas no tienen efecto alguno sobre estos dos parámetros

(Figura 26 A; D). Por otro lado, estudios anteriores han reportado el efecto benéfico que trae consigo la aplicación de AIA exógeno en especies como *T. latifolia* y *Helianthus annuus L.* favoreciendo la remoción de Cd (Martinez-Martinez., 2021; L. Chen et al., 2021). Si bien, no es el caso en este estudio dado las condiciones experimentales empleadas, *T. latifolia* sigue siendo una opción viable para la remoción de contaminantes inorgánicos.

Los resultados anteriores sugieren que la adicción de auxinas exógenas (AIA y ANA) en *T. latifolia* mejora la tolerancia y acumulación de Cd en el tejido radicular en plántulas de 1 mes de desarrollo, convirtiéndola en una alternativa para la remediación de sitios contaminados.

Por otra parte, el tejido radicular de las plantas expuestas a Cd mostró una disminución del diámetro de sus pelos radiculares, afectando de manera negativa la estructura del tejido; sin embargo, aquellos tratamientos suplementados con auxinas (AIA y ANA) no presentaron dicho fenómeno. Coincidiendo con estudios previos, donde se ha observado que el empleo de auxinas exógenas como AIA ayuda en la recuperación de la estructura celular dañada por la exposición a metales como  $Al^{3+}$  en *Medicago sativa* (S. Wang et al., 2016); asimismo *Oryza sativa* se han visto beneficiada con la adición de AIA incrementando los primordios de las raíces laterales bajo estrés por Cd (H.-Q. Wang et al., 2021). Finalmente, los resultados histológicos sugieren una mayor síntesis de carbohidratos en los tratamientos expuestos a auxinas; puesto que, las células del tejido mostraron una mayor afinidad por reactivo de Schiff de la tinción PAS (Periodic Acid-Schiff) tras la oxidación de los carbohidratos (Figura 23). En este sentido, se ha reportado el ácido peryódico actúa sobre el enlace de 1,2 glicol de los carbohidratos del tejido produciendo aldehídos que posteriormente se tiñen con la fucsia básica del reactivo de Schiff, adquiriendo así una coloración que va de rosa a fucsia; siendo esta tinción la más empleada para carbohidratos (Serviansky et al., 2013; Shedge et al., 2020).





**Figura 31.** Modelo propuesto de los mecanismos implicados en la interacción auxinas-*T. latifolia* en ausencia y presencia de Cd en sistema hidropónico. Las auxinas favorecen del desarrollo radicular incrementando el número y/o tamaño de las raíces y pelos radiculares. La exposición a  $\text{Cd}^{2+}$  afecta el fenotipo de las plantas, disminuye los niveles de clorofila y daña el sistema radical. Por otro lado, el empleo de AIA y ANA mejora la tolerancia de *T. latifolia* bajo el estrés por Cd, estimula los mecanismos de reparación enzimáticos (CAT) y no enzimáticos (GSH) e incrementan el contenido de Cd en raíces y el BCF. Se sugieren una mayor síntesis de componentes celulares (carbohidratos) en raíces.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

- El uso de AIA y ANA exógenos durante la etapa de germinación de *T. latifolia* promueve el crecimiento y desarrollo de la especie vegetal, y estos efectos están relacionados con la concentración y el tipo de auxina empleada.
- Las auxinas exógenas (AIA y ANA) alteran la estructura del tejido radicular, aumentando el tamaño y el número de pelos radiculares, lo que favorece el crecimiento y desarrollo de *T. latifolia*.
- Las concentraciones de 0.5 y 1 ppm de auxinas exógenas (ANA y AIA respectivamente), contrarrestan los efectos adversos provocados por la exposición al Cd en *T. latifolia*, aumentando la actividad de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de reparación, como GSH y catalasa.
- El AIA y ANA mejora la tolerancia y acumulación de Cd en el tejido radicular de *T. latifolia*, lo que las convierte en una opción viable para la remediación de sitios contaminados.
- Los análisis histológicos sugieren que empleo de auxinas exógenas (ANA y AIA) promueve la síntesis de carbohidratos en el tejido radicular de *T. latifolia*, incluso aun encontrándose bajo estrés por Cd.

## PERSPECTIVAS

El ácido indol acético (AIA) y el ácido naftalenacético (ANA) puede mejorar la tolerancia de *T. latifolia* al Cd y aumentar su capacidad de acumulación, convirtiéndola en una alternativa prometedora para la fitorremediación de sitios contaminados con este metal pesado. Los resultados de estos estudios ofrecen una perspectiva prometedora sobre el potencial de las auxinas exógenas en la mejora de los procesos de fitorremediación y en la restauración de ambientes contaminados. Por ello, algunas de las perspectivas de este trabajo son las siguientes:

- Evaluar el efecto del ácido fenil acético (AFA) en la germinación de las semillas de *T. latifolia* en condiciones *in vitro*, así como el desarrollo del sistema aéreo y radicular de esta especie vegetal.
- Establecer el efecto del ácido fenil acético en la estructurales del tejido radicular en plantas de *T. latifolia* expuestas y no expuestas a Cd en sistemas de hidroponía.
- Determinar la contribución del ácido fenil acético en la tolerancia, fitoextracción y acumulación de Cd en plantas de *T. latifolia* de 1 mes cultivadas en sistemas de hidroponía.
- Determinar la síntesis de los compuestos que conforman la pared celular del tejido radicular de *T. latifolia* expuesto a auxinas (AIA, ANA y AFA) a través de análisis inmunohistoquímico.

## BIBLIOGRAFÍA

- AbdElgawad, H., Zinta, G., Hamed, B. A., Selim, S., Beemster, G., Hozzein, W. N., Wadaan, M. A. M., Asard, H., & Abuelsoud, W. (2020). Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity. *Environmental Pollution*, 258, 113705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113705>
- Abu-Zahra, T., Hasan, M., & Hasan, H. (2012). Effect of different auxin concentrations on virginia creeper (*Parthenocissus quinquefolia*) rooting. *World Applied Sciences Journal*, 16, 07-10.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. En *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aeron, A., Khare, E., Jha, C. K., Meena, V. S., Aziz, S. M. A., Islam, M. T., Kim, K., Meena, S. K., Pattanayak, A., Rajashekara, H., Dubey, R. C., Maurya, B. R., Maheshwari, D. K., Saraf, M., Choudhary, M., Verma, R., Meena, H. N., Subbanna, A. R. N. S., Parihar, M., ... Meena, R. K. (2020). Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: Lessons from the past and objectives for the future. *Archives of Microbiology*, 202(4), 665-676. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01779-w>
- Aguilar-Piedras, J. J., Xiqui-Vásquez, Ma. L., García-García, S., & Baca, B. (2008). Indole-acetic acid production in *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50, 29-37.
- Aguirre, H., Viteri, P., León, P., Mayía, Y., Cobos, P., Mero, M., & Pernía, B. (2022). Fitotoxicidad del Cadmio sobre la germinación y crecimiento inicial de variedades de maíz ecuatorianas. *Bioagro*, 34(1), 3-14.
- 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, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Alonso-Castro, A. J., Carranza-Alvarez, C., Alfaro-De la Torre, M. C., Chávez-Guerrero, L., & García-De la Cruz, R. F. (2009). Removal and accumulation of cadmium and lead

- by *Typha latifolia* exposed to single and mixed metal solutions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(4), 688-696. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9351-6>
- Al-Qudah, T. S., Shibli, R. A., Zatimeh, A., Tahtamouni, R. W., & Al-Zyoud, F. (2023). A Sustainable Approach to *In Vitro* Propagation and Conservation of *Salvia dominica* L.: A Wild Medicinal Plant from Jordan. *Sustainability*, 15(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/su151914218>
- Amare, T. A., & Workagegn, K. B. (2022). Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Heavy Metals from the Offshore of Lake Hawassa using *Typha Latifolia* L. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 31(2), 240-252. <https://doi.org/10.1080/15320383.2021.1924619>
- Anning, A. K., Korsah, P. E., & Addo-Fordjour, P. (2013). Phytoremediation of Wastewater with *Limnocharis Flava*, *Thalia Geniculata* and *Typha Latifolia* in Constructed Wetlands. *International Journal of Phytoremediation*, 15(5), 452-464. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.716098>
- Apaza-Aquino, H., & Valencia, M. R. E. V. (2020). Eficiencia de la biomasa de *Rhizopus sp* en la remoción de cadmio (II). *Revista de Investigaciones*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.26788/riepg.v9i4.2288>
- Arroyo, P., Ansola, G., Blanco, I., Molleda, P., Calabuig, E. de L., & Sáenz de Miera, L. E. (2010). Comparative analysis of the composition of bacterial communities from two constructed wetlands for municipal and swine wastewater treatment. *Journal of Water and Health*, 8(1), 147-157. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.123>
- Arroyo, P., Sáenz de Miera, L. E., & Ansola, G. (2015). Influence of environmental variables on the structure and composition of soil bacterial communities in natural and constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, 506-507, 380-390. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.039>
- Asad, S. A., Farooq, M., Afzal, A., & West, H. (2019). Integrated phytobial heavy metal remediation strategies for a sustainable clean environment—A review. *Chemosphere*, 217, 925-941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.021>
- Awa, S. H., & Hadibarata, T. (2020). Removal of Heavy Metals in Contaminated Soil by Phytoremediation Mechanism: A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(2), 47. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4426-0>
- 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>
- Baldwin, B., & Cannon, A. (2007). *Typha* review. *Utah State University: Logan, UT, USA*.
- Barathi, S., Lee, J., Venkatesan, R., & Vetcher, A. A. (2023). Current Status of Biotechnological Approaches to Enhance the Phytoremediation of Heavy Metals in India—A Review. *Plants*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/plants12223816>
- Bashri, G., & Prasad, S. M. (2016). Exogenous IAA differentially affects growth, oxidative stress and antioxidants system in Cd stressed *Trigonella foenum-graecum* L. seedlings: Toxicity alleviation by up-regulation of ascorbate-glutathione cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132, 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.015>
- Bayona-Penagos, L. V. (2020). Efecto y mitigación de la toxicidad por arsénico y cadmio en cultivo de arroz. *Ciencias Agropecuarias*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.36436/24223484.327>
- Begum, N., Afzal, S., Zhao, H., Lou, L., & Cai, Q. (2018). Shoot endophytic plant growth-promoting bacteria reduce cadmium toxicity and enhance switchgrass (*Panicum virgatum* L.) biomass. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(9), 170. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2737-1>
- Bellavance, M.-E., & Brisson, J. (2010). Spatial dynamics and morphological plasticity of common reed (*Phragmites australis*) and cattails (*Typha* sp.) in freshwater marshes and roadside ditches. *Aquatic Botany*, 93(2), 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2010.04.003>
- Betancur, L. M. A., Mazo, K. I. M., & Mendoza, A. J. S. (2005). Fitorremediación: La alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de investigación*, 2(1), 57-60.
- 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>

- Borjas-Ventura, R., Julca-Otiniano, A., & Alvarado-Huamán, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150-164.
- Cabo, L., & Marconi, P. (2021). Estrategias de remediación para las cuencas de dos ríos urbanos de llanura: *Matanza-Riachuelo y Reconquista*.
- Calheiros, C. S. C., Duque, A. F., Moura, A., Henriques, I. S., Correia, A., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2009). Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. *Ecological Engineering*, 35(5), 744-753. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.11.010>
- Canales Farah, J. D. (2021). Revisión sistemática de diferentes métodos de fitorremediación en suelos contaminados con metales pesados. *Repositorio Institucional - UCV*. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/61315>
- 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(1), 297-309. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9545-3>
- Cartaya, O. E., Reynaldo, I., Peniche, C., & Garrido, M. L. (2011). Empleo de polímeros naturales como alternativa para la remediación de suelos contaminados por metales pesados. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(1), 41-46.
- Carvalho, C. F. M. de, Viana, D. G., Pires, F. R., Egreja Filho, F. B., Bonomo, R., Martins, L. F., Cruz, L. B. S., Nascimento, M. C. P., Cargnelutti Filho, A., & Rocha Júnior, P. R. da. (2019). Phytoremediation of barium-affected flooded soils using single and intercropping cultivation of aquatic macrophytes. *Chemosphere*, 214, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.096>
- Caselis, V., & Santamaría-Juárez, D. (2018). Formación de biopelículas en *Chrysanthemum* spp por bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 9(21), 1688-1694.
- Castro, G., & Valdés, J. (2012). Concentración de metales pesados (Cu, Ni, Zn, Cd, Pb) en la biota y sedimentos de una playa artificial, en la bahía San Jorge 23°S, norte de Chile. *Latin american journal of aquatic research*, 40(2), 267-281.
- Chandra, R., & Yadav, S. (2011). Phytoremediation of CD, CR, CU, MN, FE, NI, PB and ZN from Aqueous Solution Using *Phragmites Cummunis*, *Typha Angustifolia* and

*Cyperus Esculentus*. *International Journal of Phytoremediation*, 13(6), 580-591.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2010.495258>

- 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.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02538>
- Chen, L., Hu, W., Long, C., & Wang, D. (2021). Exogenous plant growth regulator alleviate the adverse effects of U and Cd stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*) and improve the efficacy of U and Cd remediation. *Chemosphere*, 262, 127809.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127809>
- Chen, L., Long, C., Wang, D., & Yang, J. (2020). Phytoremediation of cadmium (Cd) and uranium (U) contaminated soils by *Brassica juncea L.* enhanced with exogenous application of plant growth regulators. *Chemosphere*, 242, 125112.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125112>
- Chen, T.-K., Yang, H.-T., Fang, S.-C., Lien, Y.-C., Yang, T.-T., & Ko, S.-S. (2016). Hybrid-Cut: An Improved Sectioning Method for Recalcitrant Plant Tissue Samples. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 117, e54754. <https://doi.org/10.3791/54754>
- Ciotir, C., Szabo, J., & Freeland, J. (2017). Genetic characterization of cattail species and hybrids (*Typha* spp.) in Europe. *Aquatic Botany*, 141, 51-59.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2017.03.005>
- Contreras, F., & Maryev, L. (2018). El tecolote llanero (*Athene cunicularia*) como especie indicadora de contaminación por metales pesados en la ciudad de Pachuca, Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Correa, J., Postma, J. A., Watt, M., & Wojciechowski, T. (2019). Soil compaction and the architectural plasticity of root systems. *Journal of Experimental Botany*, 70(21), 6019-6034. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz383>
- Cortés, L. E., Martín, F. J., & Sarria, M. M. (2017). Evaluación de la toxicidad de metales pesados en dos suelos agrícolas de Colombia mediante bioensayos. *Temas Agrarios*. <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/view/943/1175>
- Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21.  
<https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>

- Cueva Cruz, J. P., & Urquiza Rojas, N. A. (2020). *Presencia de Metales Pesados (Cadmio y Mercurio) bajo distintos usos del Suelo en la Comunidad Boayacu Perteneciente a la Parroquia Teniente Hugo Ortíz*.  
<https://repositorio.uea.edu.ec/handle/123456789/816>
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). *Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación*. 16.
- Demirezen, D., & Aksoy, A. (2004). Accumulation of heavy metals in *Typha angustifolia* (L.) and *Potamogeton pectinatus* (L.) living in Sultan Marsh (Kayseri, Turkey). *Chemosphere*, 56(7), 685-696. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.011>
- Denegri-Muñoz, J. E., & Iannacone, J. A. (2020). Tratamiento de drenaje ácido de minas mediante humedales artificiales. *Biotempo*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v17i2.3349>
- Deng, Q., Wang, Y., Ding, D., Hu, N., Sun, J., He, J., & Xu, F. (2017). Construction of the *Syngonium podophyllum-Pseudomonas sp.* XNN8 Symbiotic Purification System and Investigation of Its Capability of Remediating Uranium Wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5134-5143. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6392-z>
- Di Luca, G. A., Mufarrege, M. M., Hadad, H. R., & Maine, M. A. (2019). Nitrogen and phosphorus removal and *Typha domingensis* tolerance in a floating treatment wetland. *Science of The Total Environment*, 650, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.042>
- Dibal, N. I., Garba, S. H., & Jacks, T. W. (2022). Histological stains and their application in teaching and research. *Asian Journal of Health Sciences*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.15419/ajhs.v8i2.514>
- Dinu, C., Vasile, G.-G., Buleandra, M., Popa, D. E., Gheorghe, S., & Ungureanu, E.-M. (2020). Translocation and accumulation of heavy metals in *Ocimum basilicum* L. plants grown in a mining-contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments*, 20(4), 2141-2154. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02550-w>
- Duca, D., Lory, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

- Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(20), 8607-8619. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10869-5>
- Etim, E. (2012). Phytoremediation and its mechanisms: A review. *Int J Environ Bioenergy*, *2*, 120-136.
- Ezeh, C. C., Obi, C. J., & Moneke, A. N. (2022). Application of microbial synthesized phytohormones in the management of environmental impacts on soils. *Bio-Research*, *20*(1), Article 1. <https://doi.org/10.4314/br.v20i1.3>
- Fakhar, A., Gul, B., Gurmani, A. R., Khan, S. M., Ali, S., Sultan, T., Chaudhary, H. J., Rafique, M., & Rizwan, M. (2022). Heavy metal remediation and resistance mechanism of *Aeromonas*, *Bacillus*, and *Pseudomonas*: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *52*(11), 1868-1914. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1863112>
- Fitter, A. H. (1987). An Architectural Approach to the Comparative Ecology of Plant Root Systems. *New Phytologist*, *106*(s1), 61-77. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04683.x>
- Flasiński, M., & Hąc-Wydro, K. (2014). Natural vs synthetic auxin: Studies on the interactions between plant hormones and biological membrane lipids. *Environmental Research*, *133*, 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.05.019>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, *155*(1), 2-18. <https://doi.org/10.1104/pp.110.167569>
- Fuke, P., T, M. M., Kumar, M., Sawarkar, A. D., Pandey, A., & Singh, L. (2021). Role of microbial diversity to influence the growth and environmental remediation capacity of bamboo: A review. *Industrial Crops and Products*, *167*, 113567. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113567>
- Ganie, A. H., Dar, A. R., Ashraf, M., & Reshi, Z. A. (2015). *Typha orientalis* Presl (Typhaceae): A new species record for India. *Check List*, *11*(2), 1567-1567.
- Gao, T., & Shi, X.-Y. (2018). Taxonomic structure and function of seed-inhabiting bacterial microbiota from common reed (*Phragmites australis*) and narrowleaf cattail (*Typha angustifolia* L.). *Archives of Microbiology*, *200*(6), 869-876. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1493-3>

- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.
- García, P. E. P., & Cruz, M. I. A. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 199-205.
- 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>
- Giannakoula, A., Therios, I., & Chatzissavvidis, C. (2021). Effect of Lead and Copper on Photosynthetic Apparatus in Citrus (*Citrus aurantium L.*) Plants. The Role of Antioxidants in Oxidative Damage as a Response to Heavy Metal Stress. *Plants*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/plants10010155>
- Gomes, G. L. B., & Scortecci, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: Structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology*, 23(6), 894-904. <https://doi.org/10.1111/plb.13303>
- Gomes, M. V. T., de Souza, R. R., Teles, V. S., & Araújo Mendes, É. (2014). Phytoremediation of water contaminated with mercury using *Typha domingensis* in constructed wetland. *Chemosphere*, 103, 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.071>
- Gómez, N. L. M. (2020). *Procesos de fitorremediación en suelos contaminados con cadmio: Revisión de Literatura*. 21.
- Guan, X., Sui, C., Luo, K., Chen, Z., Feng, C., Dong, X., Zeng, B., Dong, X., & Liu, X. (2022). Effects of  $\alpha$ -Naphthylacetic Acid on Cadmium Stress and Related Factors of Tomato by Regulation of Gene Expression. *Agronomy*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092141>
- Guo, D., Fan, Z., Lu, S., Ma, Y., Nie, X., Tong, F., & Peng, X. (2019). Changes in rhizosphere bacterial communities during remediation of heavy metal-accumulating plants around the Xikuangshan mine in southern China. *Scientific Reports*, 9(1), 1947. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38360-2>
- Guo, D., Kong, S., Chu, X., Li, X., & Pan, H. (2019). De Novo Biosynthesis of Indole-3-acetic Acid in Engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02048>

- Guo, J., Qin, S., Rengel, Z., Gao, W., Nie, Z., Liu, H., Li, C., & Zhao, P. (2019). Cadmium stress increases antioxidant enzyme activities and decreases endogenous hormone concentrations more in Cd-tolerant than Cd-sensitive wheat varieties. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 380-387. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.069>
- Guo, Y., Gong, H., & Guo, X. (2015). Rhizosphere bacterial community of *Typha angustifolia* L. and water quality in a river wetland supplied with reclaimed water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2883-2893. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6182-9>
- Hadad, H. R., Mufarrege, M. de las M., Di Luca, G. A., & Maine, M. A. (2018). Long-term study of Cr, Ni, Zn, and P distribution in *Typha domingensis* growing in a constructed wetland. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(18), 18130-18137. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2039-6>
- Hadi, F., Ahmad, A., & Ullah, R. (2021). Cadmium Phytoextraction Potential of *Ricinus communis* Significantly Increased with Exogenous Application of Growth Regulators and Macronutrients. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 30(6), 663-685. <https://doi.org/10.1080/15320383.2021.1885345>
- Hamdi, S. M. M., Assadi, M., & Ebadi, M. (2009). Revision of study of *Typha* genus: Three new records species of the genus *Typha* (Typhaceae) in Iran and their micromorphological pollen and capsule studies. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(7), 455-464.
- Haruta, M., Gray, W. M., & Sussman, M. R. (2015). Regulation of the plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) by phosphorylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.09.005>
- Hayat, K., Khan, A., Bibi, F., Salahuddin, Murad, W., Fu, Y., Batiha, G. E.-S., Alqarni, M., Khan, A., & Al-Harrasi, A. (2021). Effect of Cadmium and Copper Exposure on Growth, Physio-Chemicals and Medicinal Properties of *Cajanus cajan* L. (Pigeon Pea). *Metabolites*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/metabo11110769>
- He, X., Xu, M., Wei, Q., Tang, M., Guan, L., Lou, L., Xu, X., Hu, Z., Chen, Y., Shen, Z., & Xia, Y. (2020). Promotion of growth and phytoextraction of cadmium and lead in *Solanum nigrum* L. mediated by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111333>
- Hegazy, A. K., Abdel-Ghani, N. T., & El-Chaghaby, G. A. (2011). Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*. *International Journal of*

- Hejna, M., Moscatelli, A., Stroppa, N., Onelli, E., Pilu, S., Baldi, A., & Rossi, L. (2020). Bioaccumulation of heavy metals from wastewater through a *Typha latifolia* and *Thelypteris palustris* phytoremediation system. *Chemosphere*, 241, 125018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125018>
- Herath, I., & Vithanage, M. (2015). Phytoremediation in Constructed Wetlands. En A. A. Ansari, S. S. Gill, R. Gill, G. R. Lanza, & L. Newman (Eds.), *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 2* (pp. 243-263). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10969-5\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10969-5_21)
- 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/>
- Hoang, M. T. T., Doan, M. T. A., Nguyen, T., Tra, D.-P., Chu, T. N., Dang, T. P. T., & Quach, P. N. D. (2021). Phenotypic Characterization of *Arabidopsis* Ascorbate and Glutathione Deficient Mutants under Abiotic Stresses. *Agronomy*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040764>
- Hooda, V. (2007). Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology*, 28(2 Suppl), 367-376.
- Hu, Q.-Q., Shu, J.-Q., Li, W.-M., & Wang, G.-Z. (2021). Role of Auxin and Nitrate Signaling in the Development of Root System Architecture. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.690363>.
- Huanuco Evangelista, L. K., & Temoche Cortez, K. L. (2020). Revisión sistemática sobre los métodos de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados como Níquel, Zinc y Mercurio.
- Huaraca Huaman, A., & Lujan Espinoza, C. R. (2020). Revisión sistemática: Fitorremediación empleando plantas hiperacumuladoras acuáticas para la eliminación de metales pesados en aguas contaminadas.
- Huaraca-Fernandez, J. N., Pérez-Sosa, L., Bustinza-Cabala, L. S., Pampa-Quispe, N. B., Huaraca-Fernandez, J. N., Pérez-Sosa, L., Bustinza-Cabala, L. S., & Pampa-Quispe, N. B. (2020). Enmiendas orgánicas en la inmovilización de cadmio en suelos agrícolas contaminados: Una revisión. *Información tecnológica*, 31(4), 139-152. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000400139>

- Hussain, A., Amna, Kamran, M. A., Javed, M. T., Hayat, K., Farooq, M. A., Ali, N., Ali, M., Manghwar, H., Jan, F., & Chaudhary, H. J. (2019). Individual and combinatorial application of *Kocuria rhizophila* and citric acid on phytoextraction of multi-metal contaminated soils by *Glycine max L.* *Environmental and Experimental Botany*, *159*, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.006>
- Ivanchenko, M. G., den Os, D., Monshausen, G. B., Dubrovsky, J. G., Bednářová, A., & Krishnan, N. (2013). Auxin increases the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Annals of Botany*, *112*(6), 1107-1116. <https://doi.org/10.1093/aob/mct181>
- 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>
- Jadia, C. D., & Fulekar, M. H. (2009). Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. *African Journal of Biotechnology*, *8*(6), Article 6. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i6.59987>
- Jansen, L., Hollunder, J., Roberts, I., Forestan, C., Fonteyne, P., Van Quickenborne, C., Zhen, R.-G., McKersie, B., Parizot, B., & Beeckman, T. (2013). Comparative transcriptomics as a tool for the identification of root branching genes in maize. *Plant Biotechnology Journal*, *11*(9), 1092-1102. <https://doi.org/10.1111/pbi.12104>
- Jaramillo-Salazar, M. T., Marín-Giraldo, Y., Ocampo-Serna, D. M., Jaramillo-Salazar, M. T., Marín-Giraldo, Y., & Ocampo-Serna, D. M. (2018). Efectos en el nivel fotosintético en tres especies de plantas acuáticas sometidas a un tratamiento con agua residual de origen minero. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, *22*(1), 43-57. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.3>
- Ji, P., Jiang, Y., Tang, X., Nguyen, T. H., Tong, Y., Gao, P., & Han, W. (2015). Enhancing of Phytoremediation Efficiency Using Indole-3-Acetic Acid (IAA). *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, *24*(8), 909-916. <https://doi.org/10.1080/15320383.2015.1071777>
- Jia, K., Zhan, Z., Wang, B., Wang, W., Wei, W., Li, D., Huang, W., & Xu, Z. (2023). Exogenous Selenium Enhances Cadmium Stress Tolerance by Improving Physiological Characteristics of Cabbage (*Brassica oleracea L.* var. *Capitata*) Seedlings. *Horticulturae*, *9*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9091016>

- Jiménez, M., Herrera, J., & Arguello Garcia, E. (2020). Fitorremediación: una estrategia tecnológica para la recuperación de suelos contaminados en el sureste. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.21085.03043>
- Khan, M. Y., Prakash, V., Yadav, V., Chauhan, D. K., Prasad, S. M., Ramawat, N., Singh, V. P., Tripathi, D. K., & Sharma, S. (2019). Regulation of cadmium toxicity in roots of tomato by indole acetic acid with special emphasis on reactive oxygen species production and their scavenging. *Plant Physiology and Biochemistry*, *142*, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.006>
- Khanna, K., Ohri, P., Bhardwaj, R., & Ahmad, P. (2021). Unsnarling Plausible Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Mitigating Cd-Toxicity from Plants: An Environmental Safety Aspect. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10445-9>
- Klink, A. (2017). A comparison of trace metal bioaccumulation and distribution in *Typha latifolia* and *Phragmites australis*: Implication for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(4), 3843-3852. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8135-6>
- Klink, A., Macioł, A., Wisłocka, M., & Krawczyk, J. (2013). Metal accumulation and distribution in the organs of *Typha latifolia* L. (cattail) and their potential use in bioindication. *Limnologica*, *43*(3), 164-168. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2012.08.012>
- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). Chapter Two—The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Metal Phytoremediation. En R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 71, pp. 97-132). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.04.001>
- 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>
- Kumar, A., Manoharan, S. K., & Doreddula, S. (2013). A review on *Typha angustata*. 277-281.
- 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>

- Lara Mantilla, C., Oviedo Zumaqué, L. E., & Betancur Hurtado, C. A. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 187-194.
- Lee, B. X. Y., Hadibarata, T., & Yuniarto, A. (2020). Phytoremediation Mechanisms in Air Pollution Control: A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231(8), 437. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04813-6>
- Leura-Vicencio, A., Alonso-Castro, A. J., Carranza-Álvarez, C., Loredó-Portales, R., Alfaro-De la Torre, M. C., & García-De la Cruz, R. F. (2013). Removal and Accumulation of As, Cd and Cr by *Typha latifolia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(6), 650-653. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-0962-2>
- Leyton, A. A. A., Rodríguez, J. D. L. P., Vásquez, B. L. A., & Orcón, I. S. G. (2021). Enmiendas orgánicas y fitorremediación de cadmio y plomo por lechuga (*Lactuca sativa L.*) en un suelo agrícola contaminado. *Agroindustrial Science*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.03.06>
- Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., & Han, W. (2019). A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 28(4), 380-394. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1592108>
- 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, X., Yan, Z., Gu, D., Li, D., Tao, Y., Zhang, D., Su, L., & Ao, Y. (2019). Characterization of cadmium-resistant rhizobacteria and their promotion effects on *Brassica napus* growth and cadmium uptake. *Journal of Basic Microbiology*, 59(6), 579-590. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800656>
- Li, Y. H., Liu, Q. F., Liu, Y., Zhu, J. N., & Zhang, Q. (2011). Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia L.* in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China). *Research in Microbiology*, 162(2), 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.021>
- Li, Y. H., Zhu, J. N., Liu, Q. F., Liu, Y., Liu, M., Liu, L., & Zhang, Q. (2013). Comparison of the diversity of root-associated bacteria in *Phragmites australis* and *Typha angustifolia L.* in artificial wetlands. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(8), 1499-1508. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1316-2>

- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4.2.1-F4.2.6. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0402s01>
- Liu, Y., Chen, J., Lu, S., Yang, L., Qian, J., & Cao, S. (2016). Increased lead and cadmium tolerance of *Typha angustifolia* from Huaihe River is associated with enhanced phytochelatin synthesis and improved antioxidative capacity. *Environmental Technology*, 37(21), 2743-2749. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1162848>
- Llatance, W. O., Gonza Saavedra, C. J., Guzmán Castillo, W., & Pariente Mondragón, E. (2018). Bioacumulación de cadmio en el cacao (*Theobroma cacao*) en la Comunidad Nativa de Pakun, Perú. *Revista Forestal del Perú*, 33(1), 63. <https://doi.org/10.21704/rfp.v33i1.1156>
- Lominchar, M. Á., Sierra, M. J., Jiménez-Moreno, M., Guirado, M., Martín-Doimeadios, R. C. R., & Millán, R. (2019). Mercury species accumulation and distribution in *Typha domingensis* under real field conditions (Almadén, Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(4), 3138-3144. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1861-1>
- Londoño-Franco, L. F., Londoño-Muñoz, P. T., & Muñoz-García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)
- Madanan, M. T., Shah, I. K., Varghese, G. K., & Kaushal, R. K. (2021). Application of Aztec Marigold (*Tagetes erecta* L.) for phytoremediation of heavy metal polluted lateritic soil. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2020.10.007>
- Majda, M., & Robert, S. (2018). The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms19040951>
- Maine, M. A., Hadad, H. R., Camaño Silvestrini, N. E., Nocetti, E., Sanchez, G. C., & Campagnoli, M. A. (2022). Cr, Ni, and Zn removal from landfill leachate using vertical flow wetlands planted with *Typha domingensis* and *Canna indica*. *International Journal of Phytoremediation*, 24(1), 66-75. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1926909>
- 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>
- Márquez, G., Alarcón, M. V., & Salguero, J. (2016). Differential responses of primary and lateral roots to indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, and 1-naphthaleneacetic acid in maize seedlings. *Biologia Plantarum*, 60(2), 367-375. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0576-0>
- Martínez Flores, K., Souza Arroyo, V., Bucio Ortiz, L., Gómez Quiroz, L. E., & Gutiérrez Ruiz, M. C. (2013). Cadmio: Efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta toxicológica argentina*, 21(1), 33-49.
- Martínez-Manchego, L., Sarmiento-Sarmiento, G., & Bocardo-Delgado, E. (2021). Especies vegetales nativas con potencial para la fitorremediación de suelos alto andinos contaminados por residuos de actividad minera. *Bioagro*, 33(3), Article 3. <https://doi.org/10.51372/bioagro333.2>
- 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>
- Martínez-Martínez, J.G (2021). *Efecto de Pseudomonas rhodesiae GRC140 en la tolerancia y fitoextracción de Cadmio en Typha latifolia*. Licenciatura, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca.
- Martínez-Martínez, J.G (2024). Establecimiento de las condiciones para el análisis de expresión diferencial de la interacción *Typha latifolia*-*Pseudomonas rhodesiae*. Maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca.
- Mendarte-Alquisira, C., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Mendarte-Alquisira, C., Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2021). Fitorremediación: Alternativa biotecnológica para recuperar suelos contaminados con DDT. Una revisión. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.326>
- Mendez, J. P., RamÃ- rez, C. A. G., GutiÃ© rez, A. D. R., & Garcia, F. P. (2008). Plant contamination and phytotoxicity due to heavy metals from soil and water. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), Article 1.
- Mero, M., Pernía, B., Ramírez-Prado, N., Bravo, K., Ramírez, L., Larreta, E., & Egas, F. (2019). Concentración de Cadmio en agua, sedimentos, *Eichhornia crassipes* y

*Pomacea canaliculata* en el Río Guayas (Ecuador) y sus afluentes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 35(3), 623-640.

Mitich, L. M. (2000). Common Cattail, *Typha latifolia* L. *Weed Technology*, 14(2), 446-450. [https://doi.org/10.1614/0890-037X\(2000\)014\[0446:CCTLL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2000)014[0446:CCTLL]2.0.CO;2)

Moosavi, S., & Seghatoleslami, M. J. (2013). Phytoremediation: A review. *Adv. Agric. Biol.*, 1, 5-11.

Moreno-Sanz, P., D'Amato, E., Nebish, A., Costantini, L., & Grando, M. S. (2020). An optimized histological proceeding to study the female gametophyte development in grapevine. *Plant Methods*, 16(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00604-6>

Mufarrege, M. M., Hadad, H. R., Di Luca, G. A., & Maine, M. A. (2014). Metal dynamics and tolerance of *Typha domingensis* exposed to high concentrations of Cr, Ni and Zn. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.008>

Munive Cerrón, R., Loli Figueroa, O., Azabache Leyton, A., & Gamarra Sánchez, G. (2018). Fitorremediación con Maíz (*Zea mays* L.) y compost de Stevia en suelos degradados por contaminación con metales pesados. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 551-560. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.11>

Muthusarayanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Paramasivan, T., Naushad, Mu., Prakashmaran, J., Gayathri, V., & Al-Duaij, O. K. (2018). Phytoremediation of heavy metals: Mechanisms, methods and enhancements. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1339-1359. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0762-3>

Muyulema-Allaica, J. C., Canga-Castillo, S. M., Pucha-Medina, P. M., & Espinosa-Ruiz, C. G. (2019). Evaluación de la contaminación por metales pesados en suelos de la Reserva Ecológica de Manglares Cayapas Mataje (REMACAM)-Ecuador. *RIIIT. Revista internacional de investigación e innovación tecnológica*, 7(41), 40-61.

N, A., Ram, A. B., P, R., R, A., & Dj, B. (2022). *Pseudomonas* Species in Soil as a Natural Resource for Plant Growth Promotion and Biocontrol Characteristics—An Overview. *Madras Agricultural Journal*, 108. <https://doi.org/10.29321/MAJ.10.000571>

Nandakumar, R., Chen, L., & Rogers, S. M. D. (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L. (Broadleaf cattail). *Plant Cell Reports*, 23(10), 744-750. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0890-z>

- Nedjimi, B. (2021). Phytoremediation: A sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. *SN Applied Sciences*, 3(3), 286. <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04301-4>
- Neira-Moscoso, C., Rojas-Sánchez, J. M., & Rodas-Espinoza, C. (2021). Metales Pesados. *COLOQUIO*, (66), 72-77.
- Netro Soto, S. K. (2018). Evaluación de la interacción bacteriana endófitas-*Typha latifolia* (Espadaña) en la remoción de Cd (II) en solución.
- Nieves, Y., Parra, N., Villanueva Velásquez, S., & Henríquez, M. (2019). *Tech note: Bioremediation, enemy of cadmium*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24585.70249>
- Oliveira, J. P. V., Pereira, M. P., Duarte, V. P., Corrêa, F. F., Castro, E. M., & Pereira, F. J. (2017). Cadmium tolerance of *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae) as related to growth and leaf morphophysiology. *Brazilian Journal of Biology*, 78, 509-516. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.171961>
- Onakpa, M. M., Njan, A. A., & Kalu, O. C. (2018). A review of heavy metal contamination of food crops in Nigeria. *Annals of global health*, 84(3), 488.
- Osman, H. E., Fadhlallah, R. S., Alamoudi, W. M., Eid, E. M., & Abdelhafez, A. A. (2023). Phytoremediation Potential of Sorghum as a Bioenergy Crop in Pb-Amendment Soil. *Sustainability*, 15(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/su15032178>
- O'Toole, J. C., & Bland, W. L. (1987). Genotypic Variation in Crop Plant Root Systems. En N. C. Brady (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 41, pp. 91-145). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60803-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60803-2)
- Pabón Guerrero, S. E., Benítez Benítez, R., Sarria Villa, R. A., & Gallo Corredor, J. A. (2022). Water contamination by heavy metals, analysis methods and removal technologies. A review. *Entre ciencia e ingeniería; Vol 14 No 27 (2020); 9-18*. <http://repositorio.ucp.edu.co/handle/10785/10010>
- Pandey, A., & R.k, V. (2018). Taxonomical and pharmacological status of *Typha*: A Review. *Annals of Plant Sciences*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.21746/aps.2018.7.3.2>
- Pancorbo Arias, S. A., & Ruiz Sandoval, G. M. (2020). Revisión sistemática: Fitoestabilización de cadmio para la recuperación de suelo.
- Panich-pat, T., Upatham, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., & Lanza, G. R. (2010). Phytoextraction of Metal Contaminants by *Typha Angustifolia*: Interaction of Lead

and Cadmium in Soil-Water Microcosms. *Journal of Environmental Protection*, 01(04), Article 04. <https://doi.org/10.4236/jep.2010.14050>

- Pawar, C. R., & Landge, A. D. (2010). Anti-inflammatory activity of *Typha angustata* (TYPHACEAE), (4), 542-545.
- Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R., & Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*, 33(2), 112-119.
- Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D., Muñoz, J., Zambrano, J., Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D., Muñoz, J., & Zambrano, J. (2018). Determinación de cadmio y plomo en agua, sedimento y organismos bioindicadores en el Estero Salado, Ecuador. *Enfoque UTE*, 9(2), 89-105. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.246>
- Petry, C. T., Costa, D. T., & Droste, A. (2020). REMOVAL OF AMMONIACAL NITROGEN FROM MUNICIPAL LANDFILL LEACHATE WITH FLOATING *Typha domingensis* (TYPHACEAE)/Elimination del nitrogeno amoniacal del lixiviado de vertedero municipal con *Typha domingensis* (TYPHACEAE) en flotation. *Revista Acta Biologica Colombiana*, 25(1), NA-NA.
- Phillips, L. A., Armstrong, S. A., Headley, J. V., Greer, C. W., & Germida, J. J. (2010). Shifts in Root-Associated Microbial Communities of *Typha Latifolia* Growing in Naphthenic Acids and Relationship to Plant Health. *International Journal of Phytoremediation*, 12(8), 745-760. <https://doi.org/10.1080/15226510903535106>
- Pieruzzi, F. P., Dias, L. L. C., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Santos, A. L. W. dos, & Floh, E. I. S. (2011). Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108(2), 337-345. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr133>
- Pietrangelo, L., Bucci, A., Maiuro, L., Bulgarelli, D., & Naclerio, G. (2018). Unraveling the Composition of the Root-Associated Bacterial Microbiota of *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01650>
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E., & Godlewska-Żyłkiewicz, B. (2012). Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.11.009>

- Ponce-Hernández, A., Maldonado-Miranda, J. J., Medellín-Castillo, N. A., Alonso-Castro, A. J., & Carranza-Alvarez, C. (2020). Phytoremediation Technology: Sustainable Solution for Cleaning Up of Recalcitrant Pollutants from Disturbed Environs. En R. A. Bhat, K. R. Hakeem, & N. B. Saud Al-Saud (Eds.), *Bioremediation and Biotechnology, Vol 3: Persistent and Recalcitrant Toxic Substances* (pp. 245-268). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-46075-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-46075-4_11)
- Prado, C., Prado, F. E., Pagano, E., & Rosa, M. (2015). Differential Effects of Cr(VI) on the Ultrastructure of Chloroplast and Plasma Membrane of *Salvinia minima* Growing in Summer and Winter. Relationships With Lipid Peroxidation, Electrolyte Leakage, Photosynthetic Pigments, and Carbohydrates. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(2), 8. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2284-3>
- Putri, M. P., & Moersidik, S. S. (2021). Effectiveness of *typha latifolia* for phytoremediation of cadmium in acid mine drainage. *Journal of Physics: Conference Series*, 1811(1), 012025. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1811/1/012025>
- Rahim, W., Khan, M., Al Azzawi, T. N. I., Pande, A., Methela, N. J., Ali, S., Imran, M., Lee, D.-S., Lee, G.-M., Mun, B.-G., Moon, Y.-S., Lee, I.-J., & Yun, B.-W. (2022). Exogenously Applied Sodium Nitroprusside Mitigates Lead Toxicity in Rice by Regulating Antioxidants and Metal Stress-Related Transcripts. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijms23179729>
- Raihan, M. 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), Article 20. <https://doi.org/10.3390/plants11202738>
- Ramírez Revilla, S., Medina Pérez, J., & Villanueva Salas, J. (2018). Evaluación de la capacidad acumuladora de Cd(II), Pb(II) y Cr(VI) por colonias de *Nostoc commune* "Murmunta. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(2), 239-246.
- Ran, J., Zheng, W., Wang, H., Wang, H., & Li, Q. (2020). Indole-3-acetic acid promotes cadmium (Cd) accumulation in a Cd hyperaccumulator and a non-hyperaccumulator by different physiological responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110213. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110213>
- Rana, V., & Maiti, S. K. (2018). Municipal wastewater treatment potential and metal accumulation strategies of *Colocasia esculenta* (L.) Schott and *Typha latifolia* L. in a constructed wetland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(6), 328. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6705-4>

- Rebollo Soto, J. M. (2012). Eliminación de cadmio (II) de efluentes urbanos tratados mediante procesos de bioadsorción: El efecto competitivo de otros metales pesados. <https://repositorio.upct.es/handle/10317/2862>
- 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>
- Ribeiro, P. R. C. de C., Viana, D. G., Pires, F. R., Egreja Filho, F. B., Bonomo, R., Cargnelutti Filho, A., Martins, L. F., Cruz, L. B. S., & Nascimento, M. C. P. (2018). Selection of plants for phytoremediation of barium-polluted flooded soils. *Chemosphere*, 206, 522-530. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.056>
- Rodríguez, A. G. M., & Martínez-Trujillo, M. (2018). Las auxinas. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 20(1), 1-7.
- Rolón-Cárdenas, G. A. 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la raíz de *Typha latifolia* tolerantes a cadmio Licenciatura, UASLP.
- 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., Arvizu-Gómez, J. L., Soria-Guerra, R. E., Pacheco-Aguilar, J. R., Alatorre-Cobos, F., & Hernández-Morales, A. (2022). The role of auxins and auxin-producing bacteria in the tolerance and accumulation of cadmium by plants. *Environmental Geochemistry and Health*. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01179-4>.
- 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>.

- Rolón-Cárdenas, G., Carranza Alvarez, C., & Hernández-Morales, A. (2015). Establecimiento de un sistema in vitro para evaluar el efecto tóxico del Cadmio en la arquitectura radicular de plantas. 2, 255-262.
- Rubio-Santiago, J., Hernández-Morales, A., Rolón-Cárdenas, G. A., Arvizu-Gómez, J. L., Soria-Guerra, R. E., Carranza-Álvarez, C., Rubio-Salazar, J. E., Rosales-Loredo, S., Pacheco-Aguilar, J. R., Macías-Pérez, J. R., Aldaba-Muruato, L. R., & Vázquez-Martínez, J. (2023). Characterization of Endophytic Bacteria Isolated from *Typha latifolia* and Their Effect in Plants Exposed to Either Pb or Cd. *Plants*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/plants12030498>
- RuiJie, Z., QiongQiong, Z., XingRu, H., & XiaoYu, G. (2016). Endophytic bacterial diversity in roots of *typha* and the relationship of water quality factors in reclaimed water replenishment constructed wetland. *China Environmental Science*, 36(3), 875-886.
- Saha, C., Mukherjee, G., Agarwal-Banka, P., & Seal, A. (2016). A consortium of non-rhizobial endophytic microbes from *Typha angustifolia* functions as probiotic in rice and improves nitrogen metabolism. *Plant Biology*, 18(6), 938-946. <https://doi.org/10.1111/plb.12485>
- Salcedo Recalde, E. L. (2019). Evaluación de concentración de plomo y cromo en poblaciones de *typha latifolia* en la laguna de Yahuarcocha. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/9410>
- Santos-Díaz, M. del S., & Barrón-Cruz, M. del C. (2011). Lead, Chromium and Manganese Removal by in Vitro Root Cultures of Two Aquatic Macrophytes Species: *Typha Latifolia* L. and *Scirpus Americanus* Pers. *International Journal of Phytoremediation*, 13(6), 538-551. <https://doi.org/10.1080/15226511003671379>
- Sasmaz, A., Obek, E., & Hasar, H. (2008). The accumulation of heavy metals in *Typha latifolia* L. grown in a stream carrying secondary effluent. *Ecological Engineering*, 33(3), 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.05.006>
- Serviansky, T. H., Tronik, N. S. K., Coutiño, G. M., Arenas, R., & Memije, M. E. V. (2013). *Utilidad de la tinción pas para el diagnóstico histopatológico*.
- 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>
- Shah, N., Irshad, M., Hussain, A., Qadir, M., Murad, W., Khan, A., Awais, M., Alrefaei, A. F., & Ali, S. (2023). EDTA and IAA Ameliorates Phytoextraction Potential and

Growth of Sunflower by Mitigating Cu-Induced Morphological and Biochemical Injuries. *Life*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/life13030759>

- 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>
- Shahid, M., Javed, M. T., Masood, S., Akram, M. S., Azeem, M., Ali, Q., Gilani, R., Basit, F., Abid, A., & Lindberg, S. (2019). *Serratia* sp. CP-13 augments the growth of cadmium (Cd)-stressed *Linum usitatissimum* L. by limited Cd uptake, enhanced nutrient acquisition and antioxidative potential. *Journal of Applied Microbiology*, 126(6), 1708-1721. <https://doi.org/10.1111/jam.14252>
- Sharma, P. (2021). Efficiency of bacteria and bacterial assisted phytoremediation of heavy metals: An update. *Bioresource Technology*, 328, 124835. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124835>
- Shedge, S., Roy, P., Shedge, A., & Doshi, M. A. (2020). Periodic acid schiff (PAS) staining: A useful technique for demonstration of carbohydrates. *Prof.(Dr) RK Sharma*, 20(4), 41405.
- Singh, P., Singh, R. K., Zhou, Y., Wang, J., Jiang, Y., Shen, N., Wang, Y., Yang, L., & Jiang, M. (2022). Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: A review. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 220-238. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Singh, S., & Prasad, S. M. (2015). IAA alleviates Cd toxicity on growth, photosynthesis and oxidative damages in eggplant seedlings. *Plant Growth Regulation*, 77(1), 87-98. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0039-9>
- Šípošová, K., Labancová, E., Hačkuličová, D., Kollárová, K., & Vivodová, Z. (2023). The changes in the maize root cell walls after exogenous application of auxin in the presence of cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(37), 87102-87117. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28029-3>
- Solano, C., Artola, A., Barrena, R., Ballardo, C., & Sánchez, A. (2023). Effect of the Exogenous Application of Different Concentrations of Indole-3-Acetic Acid as a Growth Regulator on Onion (*Allium cepa* L.) Cultivation. *Agronomy*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/agronomy13092204>

- Soto Jiménez, M. F., Olvera-Balderas, D., Soto Jiménez, M. F., & Olvera-Balderas, D. (2019). Elementos potencialmente tóxicos (Cd, Hg, Pb Y Zn) en suelos impactados por planta recicladora de plomo (Zacatecas, México), a una década de parar operaciones. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 35(3), 651-669. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.03.11>
- Soudani, A., Gholami, A., Mohammadi Roozbahani, M., Sabzalipour, S., & Mojiri, A. (2022). Heavy metal phytoremediation of aqueous solution by *Typha domingensis*. *Aquatic Ecology*, 56(2), 513-523. <https://doi.org/10.1007/s10452-022-09945-x>
- Sricoth, T., Meeinkuirt, W., Pichtel, J., Taeprayoon, P., & Saengwilai, P. (2018). Synergistic phytoremediation of wastewater by two aquatic plants (*Typha angustifolia* and *Eichhornia crassipes*) and potential as biomass fuel. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6), 5344-5358. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0813-5>
- Sun, S., Zhou, X., Cui, X., Liu, C., Fan, Y., McBride, M. B., Li, Y., Li, Z., & Zhuang, P. (2020). Exogenous plant growth regulators improved phytoextraction efficiency by *Amaranthus hypochondriacus* L. in cadmium contaminated soil. *Plant Growth Regulation*, 90(1), 29-40. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00548-5>
- Tan, C.-Y., Dodd, I. C., Chen, J. E., Phang, S.-M., Chin, C. F., Yow, Y.-Y., & Ratnayeke, S. (2021). Regulation of algal and cyanobacterial auxin production, physiology, and application in agriculture: An overview. *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 2995-3023. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02475-3>
- Ucea-Herrera, J. I., Quiroz-Velásquez, J. D. C., & Hernández-Mendoza, J. L. (2020). Impacto de *Azospirillum Brasilense*, una Rizobacteria que estimula la producción del Ácido Indol-3-Acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas. *Revista Boliviana de Química*, 37(1), 34-39.
- Ullah, G., Ibrahim, M., Nawaz, G., Khatoon, A., Jamil, M., Rehman, S. U., Ali, E. A., & Tariq, A. (2023). Plant-Derived Smoke Mitigates the Inhibitory Effects of the Auxin Inhibitor 2,3,5-Triiodo Benzoic Acid (TIBA) by Enhancing Root Architecture and Biochemical Parameters in Maize. *Plants*, 12(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/plants12142604>
- 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>
- Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*, 136(6), 1005-1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>

- Varghese, A., Gavani, U., Abraham, S., Parambi, B. G. T., Sathianarayanan, & Jose, A. (2009). Phytochemical screening and antimicrobial investigation of *Typha angustifolia* Linn. *International Journal of Chemical Sciences*, 7(3), 1905-1910.
- Vasilache, N., Diacu, E., Cananau, S., Tenea, A. G., & Vasile, G. G. (2023). Evaluation of the Phytoremediation Potential of the *Sinapis alba* Plant Using Extractable Metal Concentrations. *Plants*, 12(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/plants12173123>
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
- Viana, D. G., Pires, F. R., Egreja Filho, F. B., Bonomo, R., Martins, L. F., Costa, K. A., Ferreira, A. D., Madalão, J. C., Rocha Junior, P. R. da, Nascimento, M. C. P., Cruz, L. B. S., & Dias, O. S. (2019). Cutting frequency effect on barium phytoextraction by macrophytes in flooded environment: A field trial. *Journal of Hazardous Materials*, 362, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.091>
- Vidayanti, V., Choesin, D. N., & Iriawati, I. (2017). Phytoremediation of Chromium: Distribution and Speciation of Chromium in *Typha angustifolia*. *International Journal of Plant Biology*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.4081/pb.2017.6870>
- W. M. Barendse, G., & J. M. Peeters, T. (1995). Multiple hormonal control in plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 44(1), 3-17.
- Wang, H.-Q., Xuan, W., Huang, X.-Y., Mao, C., & Zhao, F.-J. (2021). Cadmium Inhibits Lateral Root Emergence in Rice by Disrupting OsPIN-Mediated Auxin Distribution and the Protective Effect of OsHMA3. *Plant and Cell Physiology*, 62(1), 166-177. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa150>
- Wang, L., Yue, C., Cao, H., Zhou, Y., Zeng, J., Yang, Y., & Wang, X. (2014). Biochemical and transcriptome analyses of a novel chlorophyll-deficient chlorina tea plant cultivar. *BMC Plant Biology*, 14(1), 352. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0352-x>
- Wang, S., Ren, X., Huang, B., Wang, G., Zhou, P., & An, Y. (2016). Aluminium-induced reduction of plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) is mediated by interrupting auxin transport and accumulation in roots. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep30079>
- Willwater, K. P. R. (2018). Efectos del cadmio sobre el crecimiento y la composición elemental de la alfalfa en cultivo de arena. *Anales Científicos*, 79(2), 406-414.

- Wu, F., Fan, J., Ye, X., Yang, L., Hu, R., Ma, J., Ma, S., Li, D., Zhou, J., Nie, G., & Zhang, X. (2022). Unraveling Cadmium Toxicity in *Trifolium repens* L. Seedling: Insight into Regulatory Mechanisms Using Comparative Transcriptomics Combined with Physiological Analyses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms23094612>
- Wu, K., Luo, J., Li, J., An, Q., Yang, X., Liang, Y., & Li, T. (2018). Endophytic bacterium *Buttiauxella* sp. SaSR13 improves plant growth and cadmium accumulation of hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21844-21854. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2322-6>
- Wu, Y., Ma, L., Liu, Q., Vestergård, M., Topalovic, O., Wang, Q., Zhou, Q., Huang, L., Yang, X., & Feng, Y. (2020). The plant-growth promoting bacteria promote cadmium uptake by inducing a hormonal crosstalk and lateral root formation in a hyperaccumulator plant *Sedum alfredii*. *Journal of Hazardous Materials*, 395, 122661. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122661>
- Xu, S., Xing, Y., Liu, S., Huang, Q., & Chen, W. (2019). Role of novel bacterial *Raoultella* sp. Strain X13 in plant growth promotion and cadmium bioremediation in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3887-3897. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09700-7>
- 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>
- Xu, Y., Zhang, Y., Li, Y., Li, G., Liu, D., Zhao, M., & Cai, N. (2012). Growth Promotion of Yunnan Pine Early Seedlings in Response to Foliar Application of IAA and IBA. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms13056507>
- 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(5), 4905-4916. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07256-7>
- Youssef, N., & Diatta, J. (2023). Potential Efficiency of Wild Plant Species (*Pluchea dioscoridis* (L.) DC.) for Phytoremediation of Trace Elements on Contaminated Locations. *Sustainability*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/su15010119>

- Zafra Sánchez, C. D., & Flores Tique, J. P. (2020). Biorremediación de suelo contaminado con cadmio mediante la aplicación de *Rhizopus sp.* y *Rhodobacter sphaeroides*: Revisión. <https://repositorio.upeu.edu.pe/handle/20.500.12840/3742>
- 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(8), 423. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04781-x>
- Zhan, Y., Zhang, C., Zheng, Q., Huang, Z., & Yu, C. (2017). Cadmium stress inhibits the growth of primary roots by interfering auxin homeostasis in *Sorghum bicolor* seedlings. *Journal of Plant Biology*, 60(6), 593-603. <https://doi.org/10.1007/s12374-017-0024-0>
- Zhang, C., He, Q., Wang, M., Gao, X., Chen, J., & Shen, C. (2020). Exogenous indole acetic acid alleviates Cd toxicity in tea (*Camellia sinensis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110090. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110090>
- Zhang, D., Luo, J., Lee, Z. M. P., Maspolim, Y., Gersberg, R. M., Liu, Y., Tan, S. K., & Ng, W. J. (2016). Characterization of bacterial communities in wetland mesocosms receiving pharmaceutical-enriched wastewater. *Ecological Engineering*, 90, 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.12.043>
- Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules*, 24(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>
- 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>
- Zhu, X. F., Wang, Z. W., Dong, F., Lei, G. J., Shi, Y. Z., Li, G. X., & Zheng, S. J. (2013). Exogenous auxin alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by stimulating synthesis of hemicellulose 1 and increasing the cadmium fixation capacity of root cell walls. *Journal of Hazardous Materials*, 263, 398-403. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.018>

## ANEXOS

### Anexo 1. \_Soluciones buffer

- Buffer MES pH 5.7 (500mM)

Para preparar el buffer MES se disolvieron 4.881 gr de MES hydrate (PM: 195.24 g/mol) en 35 ml de agua destilada, se llevó a agitación para su incorporación adicionando 2-3 escamas de KOH. Una vez incorporado el MES hydrate, se aforó a 50 ml y se ajustó el pH a 5.7 con KOH.

### Anexo 2. \_Preparación de auxinas

- AIA

Se preparó un stock de AIA a 1500 ppm. Para ello, se pesó 15 mg de AIA y se disolvió utilizando de 3 a 4 gotas de EtOH. Finalmente se aforó 10 ml.

- ANA

Se preparó un stock de ANA a 1500 ppm. Para ello, se pesó 15 mg de ANA y se disolvió utilizando de 3 a 4 gotas de NaOH 1 N. Finalmente se aforó 10 ml.

A partir de los stocks preparados de cada auxina, se realizaron diluciones de estas para obtener la concentración requerida para la parte experimental (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Preparación de diluciones de las auxinas (AIA y ANA).

Concentración (ppm)	Stock	Vol. stock a tomar (µl)	Vol. agua (µl)
0.1	15 ppm	100	9, 900
0.5	75 ppm	500	9, 500
1	150 ppm	1000	9, 000
10	1500 ppm	----	----

### Anexo 3. \_Buffer de fosfatos (KPE)

100 ml, 0.1 M (KPE) + 5 mM EDTA pH: 7.5

pka:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 7.21$

$$\text{pH} = \text{pka} + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$$7.5 = 7.21 + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$$7.5 - 7.21 = \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$$0.29 = \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$$\text{Anti-log } 0.29 = \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$$1.9498 = \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]}$$

$$[\text{B}] = 1.9498 [\text{A}]$$

### Anexo 4. \_Preparación de formalina neutra

La formalina neutra requiere de la preparación previa de PBS 10X (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** PBS 10X, reactivos y concentraciones (250 ml):

Reactivo	Concentración	Volumen a pesar
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (PM: 136.09 g/mol)	0.02 M	0.68 gr
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PM: 141.96 g/mol)	0.08 M	2.825 gr
NaCl (PM: 58.44)	1.54 M	22.5 gr

\*Ajustar el pH a 7 con NaOH, previo a aforar a 250 ml.

- 500 ml de PBS 1X

Tomar 50 ml de PBS 10X y aforar a 500 ml.

- Formalina neutra 10 % (4 %)

Tomar 25 ml de formol al 37 % y disolver en 200 ml de PBS 1X, ajustar a pH 7 y finalmente aforar a 250 ml.

## **Anexo 5. \_Silanizado de portaobjetos**

Los portaobjetos se silanizarón con ayuda de un tren de solventes. Para ello se utilizaron 7 frascos coplin, cada uno de ellos contenían 60 ml de un solvente o solución diferente en los cuales se colocaron de 7-9 laminillas, comenzando son el No. 1 y dejando 5 minutos en él, como se muestra en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Tren de solventes

<b>No.</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
1	Agua ácida 1:1	
2	Agua destilada	
3	Alcohol absoluto	
4	Acetona	5 minutos
5	Acetona 98 % / Silano 2 %	
6	Acetona	
7	Acetona	