



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Fitomejoramiento por cultivo de tejidos vegetales para incrementar la tolerancia a estrés por Ag en *Medicago sativa*”

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOTECNÓLOGO**

**PRESENTA:**

JUAN JOSÉ TORRES RUÍZ

**ASESOR:**

Dra. LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ

**CO-ASESOR:**

Dra CARLA GARCÍA MORALES



TOLUCA, MÉXICO

DICIEMBRE, 2017

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
2.1 METALES PESADOS .....	9
2.2 TOXICIDAD DE METALES PESADOS EN PLANTAS .....	10
2.2.1 <i>Estrés oxidativo</i> .....	11
2.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA A METALES PESADOS EN PLANTAS .....	11
2.2.1 <i>Tolerancia al estrés oxidativo</i> .....	12
2.3 TOLERANCIA Y ACUMULACIÓN DE METALES PESADOS POR CTV .....	12
2.4 <i>MEDICAGO SATIVA</i> .....	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
5.1 GENERAL .....	15
5.2 PARTICULARES .....	15
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>16</b>
6.1 OBTENCIÓN Y PROLIFERACIÓN DE BIOMASA DE <i>M. SATIVA</i> .....	16
6.2 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO .....	16
6.3 BIOENSAYO DE INCREMENTO DE TOLERANCIA A AG POR CULTIVOS DE CALLO DE <i>M. SATIVA</i> .....	16
6.4 ELABORACIÓN DE EXTRACTOS .....	18
6.5 PRUEBAS FITOQUÍMICAS .....	18
6.5.1 <i>Cuantificación de Fenoles Totales</i> .....	18
6.5.2 <i>Determinación de la Capacidad Antioxidante</i> .....	19
6.6 INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS .....	19
6.6.1 <i>Fase de inducción</i> .....	19
6.6.2 <i>Fase de regeneración</i> .....	20
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	21
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
7.1 EFECTO DE LA PRESENCIA DE AG EN EL CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLO DE <i>M. SATIVA</i> .....	21
7.1.1 <i>Modificación del medio de cultivo y crecimiento celular</i> .....	21
7.2 INCREMENTO DE LA TOLERANCIA A AG .....	22
7.2.1 <i>Crecimiento</i> .....	22
7.2.2 <i>Determinación de la IC<sub>50</sub> de Ag</i> .....	27
7.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE CULTIVOS DE <i>M. SATIVA</i> BAJO ESTRÉS POR AG .....	29
7.3.1 <i>Cuantificación de fenoles totales</i> .....	29
7.4 ORGANOGÉNESIS EN CULTIVOS DE CALLO DE <i>M. SATIVA</i> .....	33
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>37</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>43</b>

## Índice de Figuras

<b>FIG. 1.</b> Cultivos celulares de <i>m. sativa</i> transcurridos 30 días de incubación.	23
<b>FIG. 2.</b> Biomasa producida por los cultivos de alfalfa expuestos a diferentes concentraciones de plata.	24
<b>FIG. 3.</b> Tasa de crecimiento relativo de cultivos de células de <i>M. sativa</i>	26
<b>FIG. 4.</b> Fenoles totales en cultivos celulares de <i>M. sativa</i>	30
<b>FIG. 5.</b> Respuesta antioxidante de cultivos de <i>M. sativa</i> .	31
<b>FIG. 6.</b> Organogénesis inducida en callos de alfalfa, a los 30 días de cultivo en medio de regeneración.	34

## Índice de Tablas

<b>TABLA 1.</b> Tratamientos empleados para la inducción de organogénesis en callos de <i>Medicago sativa</i> .	20
<b>TABLA 2.</b> Concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) para los cultivos celulares de <i>M. sativa</i> expuestos a Ag.	28

## Abreviaturas

<b>Ag</b>	<b>Plata</b>
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de plata
<b>PS</b>	Peso Seco
<b>PF</b>	Peso Fresco
<b>MP</b>	Metales Pesados
<b>CTV</b>	Cultivo de Tejidos Vegetales
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>RCV</b>	Reguladores de Crecimiento Vegetal
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
<b>BA</b>	6-Benciladenina
<b>KIN</b>	Cinetina

## Licenciatura en Biotecnología

<b>MS</b>	Medio de cultivo Murashige & Skoog
<b>MSo</b>	Fórmula original del medio MS
<b>MSm</b>	Fórmula modificada del medio MS
<b>TCR</b>	Tasa de Crecimiento Relativo
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración Media Inhibitoria
<b>IT</b>	Índice de Tolerancia
<b>DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1-picrihidrazil

## Resumen

La plata en su forma iónica, es una de las formas de metal pesado más tóxicas, superado únicamente por el Hg. Hasta 1999, la liberación de plata al ambiente proveniente de los desechos industriales fue estimada en 2500 toneladas anuales. La Organización Mundial de la Salud consideró que una ingesta oral de por vida de alrededor de 10 g de plata, podría ser considerado como el nivel de efectos adversos no observables. Al igual que otros metaloides y metales pesados, la Ag no se puede degradar y por tanto es bioacumulable, alcanzando concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico de la cadena alimenticia. Existen diferentes tecnologías fisicoquímicas que se emplean para la remoción de iones existentes en sistemas contaminados. Otras tecnologías se basan en el empleo de organismos, como la fitoextracción, el cual es el proceso que hace uso de especies vegetales para absorber minerales que se hallan en el suelo. Las plantas hiperacumuladoras, caracterizadas porque acumulan grandes concentraciones de metales ( $\geq 0.1\%$  peso seco (PS)) sin mostrar signos de toxicidad, son una de las principales herramientas de dichas tecnologías. La fitoextracción presenta ciertas desventajas, como el periodo de tiempo necesario para que el sistema remueva una cantidad significativa de contaminante. Las técnicas propuestas para resolver este inconveniente incluyen el Cultivo de Tejidos Vegetales, que se ha usado para diversos propósitos, incluido el fitomejoramiento. El presente trabajo busca incrementar la tolerancia a Ag de *Medicago sativa*, a través de cultivos celulares.

La línea celular *a6B4D* de *M. sativa*, fue cultivada en medio MS suplementado con concentraciones crecientes (0, 25, 50, 100, 250 ppm) de  $\text{AgNO}_3$  como fuente de iones Ag. Los cultivos se incubaron en oscuridad a  $25^\circ\text{C}$  durante 30 y 60d. Posteriormente, la biomasa de los cultivos fue cosechada, una fracción fue empleada para realizar subcultivos a concentraciones crecientes de Ag, mientras que la fracción restante fue empleada para realizar las determinaciones de crecimiento, que fue estimado con los datos de peso seco al finalizar el periodo de incubación. Estos datos se emplearon para calcular parámetros de tolerancia como la tasa de crecimiento relativo (TCR), y la concentración media inhibitoria ( $\text{IC}_{50}$ ). Adicionalmente, se realizaron extractos metanólicos para cuantificar los compuestos fenólicos producidos por la biomasa expuesta a las diferentes concentraciones de plata, empleando el método de Folin-Ciocalteu, así como para determinar la capacidad antioxidante mediante el método DPPH. Por último, la biomasa expuesta a 100 ppm de  $\text{AgNO}_3$  se empleó para inducir organogénesis en medio MS enriquecido con diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento vegetal 2,4-D y KIN.

En general, la tolerancia de las células de *Medicago sativa* al estrés que ejercen los iones de Ag en el medio de crecimiento, mostró una notable mejora por los tratamientos de aclimatación a dosis crecientes durante uno y dos meses, misma que se reflejó en las TCR elevadas y en el incremento de la  $\text{IC}_{50}$  que se alcanzaron en los tratamientos de aclimatación, comparados con los datos derivados del tratamiento control. La capacidad antioxidante y la producción de compuestos fenólicos se vieron estimulados por la presencia del  $\text{AgNO}_3$  en el medio de cultivo, sin embargo, el efecto estimulante no parece ser producto de la exposición directa al metal, sino de los incrementos progresivos de la plata. Estos cultivos de tolerancia al estrés por metales pesados mostraron respuesta organogénica cuando el medio se suplementa con 2,4-D y KIN, formando brotes con relaciones 10:0.2 y raíces en relaciones 1:0.5. Los resultados del presente trabajo establecen las bases para un proceso de mejoramiento de *M. sativa* en los proceso de extracción/acumulación/tolerancia a la plata.

## 1. Introducción

La lista de elementos esenciales para la nutrición de las plantas supone un tema de amplio debate, aunque la composición elemental de cualquier suelo en donde crecen las plantas excederá de la pensada como esencial para su supervivencia. Esto es particularmente cierto para muchos metales pesados, definiendo estos como cualquier elemento con propiedades metálicas (conductividad, densidad, estabilidad como catión, especificidad de ligando, etc.) y un número atómico mayor a 20 [1]. Los metales pesados que son considerados como esenciales para al menos algunas formas de vida incluyen vanadio (V), cromo (Cr), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn) y molibdeno (Mo). Los metales requeridos por las plantas incluyen Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, y posiblemente Ni. La toxicidad de metales relativamente comunes como cadmio (Cd), Cu, mercurio (Hg), y Ni, es substancialmente mayor que la del plomo (Pb) o Zn [2]. Estos elementos están presentes en los suelos como componentes naturales o como resultado de actividades humanas, entre ellas la producción de energía y combustibles, minería, agricultura intensiva, las cuales aportan una cantidad importante de metales tóxicos a los suelos y cuerpos de agua, en consecuencia, estas áreas presentan concentraciones que exceden las permisibles por las agencias reguladoras [1].

La plata en su forma iónica, es una de las formas de metal pesado más tóxicas, superado únicamente por el Hg, se encuentra en dicha clasificación junto con el Cd, Cr (VI), Cu y el Hg [3,4]. Hasta 1999, la liberación de plata al ambiente proveniente de los desechos industriales fue estimada en 2500 toneladas anuales, de las cuales 150 toneladas se encontraron en los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales, y 80 toneladas fueron liberadas en aguas superficiales. Sin embargo, la toxicidad de la plata fue investigada después de la provocada por los demás metales pesados, comenzando hace aproximadamente 40 años, provocando que el comportamiento químico de la plata en el medio ambiente permaneciera escasamente comprendido [5]. Por otro lado, en la actualidad, el crecimiento acelerado de la nanotecnología ha resultado en la producción y utilización de una gran cantidad de nanopartículas (NPs) que varían en tamaño y propiedades fisicoquímicas. Entre las diferentes clases de NPs, hallamos a las NPs de plata (AgNPs), que son empleadas ampliamente por muchos productos comerciales debido a sus propiedades antimicrobianas. Las AgNPs liberadas por estos productos también pueden depositarse en los sitios antes mencionados e incluso incorporarse al ambiente terrestre a través de su aplicación en procesos agrícolas [6,7]. Benn et al. [8] reportó que telas que contienen AgNPs las cuales son lavadas con agua destilada cuatro veces, pueden liberar plata

a las aguas residuales y que la mayor concentración que podrían alcanzar era de 1,280 mg de plata por litro. Se ha reportado que la toxicidad de las AgNPs depende de los iones de plata que liberan y que bajas concentraciones de AgNPs en biosólidos (residuos orgánicos sólidos, semisólidos o líquidos que resultan del tratamiento de las aguas residuales procesadas) pueden causar un efecto adverso en los ecosistemas [9]. Aunque en 1993, la Organización Mundial de la Salud consideró que una ingesta oral total de por vida de alrededor de 10 g de plata, podría ser considerado el nivel de efectos adversos no observables [10], recientemente, en 2014, ha revisado varios de los efectos que provoca la plata, llegando a sugerir que dicho metal ya sea en forma iónica o como AgNPs, 2 mg/L y 11.3 mg/L, respectivamente, resulta tóxico para las células de mamífero aunque la sensibilidad varía de acuerdo con el tipo celular. No obstante, es preciso considerar que la información obtenida de estos hallazgos no se extrapola fácilmente a situaciones *in vivo*, sin embargo, se ha determinado que organismos como crustáceos y peces son los más sensibles a las especies de plata mencionadas, encontrando dosis medias letales (dosis requerida para matar a la mitad de los miembros de una población) de 0.01 mg/L de AgNPs y 0.00085 mg/L de iones  $\text{Ag}^+$  en el caso de crustáceos, y 1.36 mg/L y 0.058 mg/L, respectivamente, para peces [11].

Al igual que otros metaloides y metales pesados, la Ag no se puede degradar. Existen diferentes tecnologías fisicoquímicas que se emplean para la remoción de iones existentes en sistemas contaminados, como lo son la electrodiálisis, el intercambio iónico, lavado de suelos, remediación electrocinética, etc [12,13]. Recientemente, se ha determinado que algunas plantas son capaces de tolerar la presencia de altas concentraciones de metales contenidos en el suelo, y en algunos casos, acumularlos en sus tejidos. Esto último es la base para la tecnología conocida como fitoextracción, proceso que hace uso de especies vegetales para absorber minerales que se hallan en el suelo, sedimentos y agua, traslocando los metales desde las raíces hasta la biomasa cosechable, evento que es necesario para un protocolo efectivo de fitoextracción [14] Existen cuatro aplicaciones de la fitoextracción; 1) Fitominería, que tiene el potencial de ser una solución económicamente factible para la recuperación o extracción de metales preciosos como el oro (Au), plata (Ag), paladio (Pd), titanio (Ti) y platino (Pt) [15]; 2) Fitorremediación, donde se procura la remoción de metales contaminantes para su reúso o depósito seguro, sin la necesidad de excavar o remover el material contaminado (suelo o agua), esta tecnología se puede aplicar en la remediación de aire, agua o suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos; 3) Alimentos funcionales, donde se busca el suplemento de minerales esenciales para los cultivos mientras estos crecen, el empleo de cultivos con capacidad aumentada en la absorción

de minerales, puede contribuir al desarrollo de una agricultura sustentable y al mejoramiento de la salud humana mediante cosechas con un balance nutritivo mejorado [16]; y 4) Fitosíntesis, la biomasa vegetal es usada como fábrica biológica para sintetizar nanopartículas metálicas, ya sea empleando plantas completas o extractos, este ha sido un tema de gran interés en los últimos años debido a las diversas aplicaciones de los materiales nanoestructurados [17].

Las plantas hiperacumuladoras, caracterizadas porque acumulan grandes concentraciones de metales ( $\geq 0.1\%$  peso seco (PS)) sin mostrar signos de toxicidad [18], son una de las principales herramientas de dichas tecnologías. El término “hiperacumuladora” describe a un gran número de plantas que pertenecen a numerosas familias que comparten la habilidad de crecer en suelos metalíferos y que acumulan una gran cantidad de metales pesados (MP) en sus órganos aéreos, más allá de los niveles hallados en la mayoría de las especies, sin sufrir o mostrar efectos de toxicidad. Tres características son distintivas de las especies hiperacumuladoras: (1) una destacable tasa de secuestro de MP, (2) rápida traslocación desde la raíz hasta los órganos aéreos, y (3) una gran habilidad de detoxificación y secuestro de los MP en las hojas [19]. Entre las propiedades más deseadas en una planta para su empleo en la técnica de fitoextracción, se encuentra el poseer una tasa de crecimiento elevada y que cuente con un sistema radicular profundo.

Las tecnologías de fitoextracción han ganado popularidad e interés en años recientes debido a que son una opción de costo accesible y uso amigable en comparación con técnicas tradicionales (físicoquímicas). Sin embargo, la fitoextracción presenta ciertas limitantes, pues requiere tiempos de acción relativamente largos, además de que su eficiencia está limitada por las capacidades de crecimiento y producción de biomasa de las especies vegetales empleadas, ya que, en sitios con concentraciones excesivamente altas del metal, el crecimiento de las especies vegetales se verá disminuido [14]. Se han propuesto varias estrategias cuyo propósito es hacer de la fitoextracción, una técnica más eficiente y viable en los próximos años, éstas incluyen el uso de herramientas biotecnológicas como la introducción de genes asociados a los procesos de hiperacumulación en plantas no hiperacumuladoras con alta producción de biomasa. Sin embargo, esto requiere de conocimientos amplios sobre los mecanismos genéticos y moleculares que gobiernan el secuestro de metales en los tejidos de la planta, mismos que no han sido elucidados y comprendidos completamente [16]. Pero la biotecnología involucra un conjunto de numerosas técnicas, entre ellas encontramos al Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), que consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones

asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas, como resultado se obtienen tejidos u órganos, e incluso la regeneración de organismos completos a partir de un fragmento vegetal. El CTV puede ser empleado para diversos propósitos como el fitomejoramiento. Entre las ventajas de esta técnica, se encuentra el hecho de que la producción de material vegetal nuevo, alcanza velocidades y rendimientos superiores al de las técnicas tradicionales [20], además de que pueden ocurrir ciertas variaciones genéticas al inducir la desdiferenciación celular del explante empleado. Dichas alteraciones pueden resultar en modificaciones fenotípicas muy estables que son transmisibles sexualmente a la progenie [21] y que posiblemente estén implicadas en la adaptación a ciertos factores de estrés.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Metales pesados

Aunque estos elementos químicos se encuentran de manera natural en los ecosistemas, mucha de la contaminación ambiental y exposición humana a los metales pesados se deriva de actividades antropogénicas como la minería, la producción industrial, y del uso doméstico y agrícola de productos que contienen metales pesados [22]. Descargados en ríos y lagos o filtrados en las aguas del subsuelo, estos elementos contaminan las reservas de agua y se acumulan en las cadenas alimenticias, además de que pueden trasladarse a grandes distancias desde su punto de origen acoplándose a los ciclos biogeoquímicos ya que son capaces de unirse a elementos como el azufre o el nitrógeno [23].

Se ha reportado que en los sistemas biológicos afectan organelos y componentes celulares como la membrana celular, la mitocondria, lisosomas, retículo endoplásmico, el núcleo, y algunas enzimas involucradas en la detoxificación y reparación de daño. También se ha hallado que los iones metálicos interactúan con biomoléculas como del DNA y proteínas nucleares, causando daño en el DNA y cambios conformacionales respectivamente, que pueden conducir a la carcinogénesis [22, 24]. Dependiendo de la exposición, los metales pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer, producción desequilibrada de glóbulos rojos y blancos en sangre, causar náuseas, vómito, diarrea, encefalopatías, neuropatías muy dolorosas, vómito azul, irritación del tracto gastrointestinal, hemólisis, depresión cardíaca, acidosis metabólica, hemorragias, supresión de la médula ósea, edema pulmonar, necrosis hepatorenal, entre otras afecciones [24].

## 2.2 Toxicidad de metales pesados en plantas

Los metales pesados pueden entrar a las plantas mediante el sistema de absorción de cationes esenciales, el cual incluye diferentes moléculas transportadoras de metales que sirven como quelantes. Algunos metales esenciales para las células son el Cu, Zn, Fe, Mn y Mo, ya que participan en reacciones redox y como cofactores de enzimas, sin embargo, si estos elementos llegan a absorberse en concentraciones altas pueden producir toxicidad en las células vegetales, de igual forma que la incorporación de elementos que no tienen alguna función biológica, tales como el Cd, Pb, Hg, Tl, As, Cr, Sb y Bi [25].

La toxicidad relativa de los metales pesados, depende de varios factores, entre ellos la composición química del suelo, el elemento específico, la concentración, la especie vegetal y la edad de la planta [26]. Los metales pesados pueden alterar procesos fisiológicos y bioquímicos como la adquisición de nutrientes o el balance de agua, el transporte de electrones para la producción de energía, etc. También pueden retardar el crecimiento de plantas completas o de alguno de sus órganos. Las partes de la planta que tienen contacto directo con el metal pesado exhiben una alta sensibilidad a cambios en su patrón de crecimiento. El principal mecanismo de afectación del crecimiento vegetal, es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que ejercen daño oxidativo a través de la degeneración de componentes celulares importantes [27].

La sensibilidad de plantas expuestas a plata es variable. Se han explorado los efectos tóxicos de nitrato de plata en la germinación y crecimiento de semillas de trigo, cebada, y chícharos. La germinación y crecimiento de las especies mencionadas fue significativamente menor con respecto al control, cuando las semillas fueron expuestas a 7.5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$  [28]. Otras especies que sufrieron afectaciones en su crecimiento son el maíz, el clavel de moro y el rábano, que fueron expuestas durante 7 días a diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ , se reportaron concentraciones de efectos no observables de 7.5 mg/L para maíz y rábano, mientras que para el clavel de moro se reportó de 75 mg/L [29]. Un trabajo de investigación que involucró plantas lechuga, avena, haba de soya, y nabos creciendo en lodos residuales contaminados con residuos de revelación fotográfica que contienen plata (5.2 y 120 mg Ag/ por kg de peso seco), no reveló ningún efecto negativo sobre las plantas, el peso fresco promedio de las hojas de lechuga fue significativamente mayor a la registrada por el control, aunque el peso seco de todas las plantas no fue diferente del de su control. El contenido de plata en el lodo residual tuvo un ligero efecto

(1%) sobre la longitud de los tallos de avena. El estudio concluyó que el efecto fertilizante del lodo residual no se vio reducido por el contenido de plata [30].

### 2.1.2 Estrés oxidativo

Las ERO son producidas cuando el oxígeno molecular acepta electrones de otras moléculas, y muchas reacciones intracelulares reducen oxígeno a superóxido ( $O_2^-$ ) o a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Aunque estas moléculas no son muy reactivas, pueden formar radicales hidroxil (-OH), que es probablemente el responsable de la mayor parte del daño oxidativo en sistemas biológicos. La reducción de una molécula de oxígeno al radical superóxido es una reacción termodinámicamente desfavorecida pero puede tener lugar cuando el  $O_2$  interactúa con metales de transición como lo son la mayoría de los metales pesados. El oxígeno y los metales de transición, como la plata, el hierro, o el cobre, están implicados en la peroxidación de los lípidos (las membranas biológicas ricas en ácidos grasos poliinsaturados son extremadamente susceptibles de estas reacciones), además de otras biomoléculas como el DNA, aminoácidos libres, o proteínas, conduciendo a un daño celular mayor, y por último a la muerte celular [31].

## 2.2 Mecanismos de tolerancia a metales pesados en plantas

Con el propósito de mantener la concentración de metales esenciales dentro de los límites fisiológicos y de minimizar el efecto perjudicial de los metales no esenciales, las plantas han desarrollado una red compleja de mecanismos homeostáticos que sirven para controlar el secuestro, la acumulación, el tráfico y la detoxificación de metales. Los principales componentes de la homeostasis son el transporte, el proceso de quelación, y el de secuestro. La actividad regulada de estos tres sistemas asegura una distribución adecuada de los iones metálicos a nivel celular y organismo completo, resultando en un nivel básico de tolerancia a la presencia de metales [32]. La pérdida de uno de estos procesos críticos conduce a la hipersensibilidad. Por ejemplo, una mutante de *Arabidopsis* (*cad1*), deficiente en la síntesis de fitoquelatinas, oligómeros de glutatión que actúan como agentes quelantes, es más sensible a  $Cd^{2+}$  que plantas de fenotipo silvestre [33,34].

Esta tolerancia básica es ubicua ya que existen evidencias que sugieren que las plantas comparten algunos mecanismos de tolerancia a metales. Sin embargo, algunas especies y genotipos vegetales, pueden crecer en suelo que de manera natural o debido a actividades

humanas, contienen altas concentraciones de metales pesados que inhiben el crecimiento. Estas plantas poseen niveles de tolerancia que han desarrollado gracias a la selección natural, aunque esta tolerancia suele ser específica a ciertos metales [32].

### 2.2.1 Tolerancia al estrés oxidativo

Las plantas han desarrollado complejos sistemas antioxidantes que las protegen ante las ERO, que se han clasificado como enzimáticos y no enzimáticos, este último compuesto por metabolitos secundarios, entre los más relevantes se encuentran los fenoles. La acción antioxidante de los fenoles se atribuye a su alta tendencia a quelar metales, poseen grupos hidroxil y carboxil capaces de unirse particularmente a iones de hierro y cobre. Las raíces de muchas plantas exudan altos niveles de fenoles, estos pueden inactivar iones de hierro mediante quelación y adicionalmente, suprimir la reacción de Fenton y la vía Haber-Weiss, la cual se creó que son las fuentes más importantes de ERO. Esta habilidad de quelación de los compuestos fenólicos está relacionada probablemente al gran carácter nucleofílico del anillo aromático más que a grupos queladores específicos dentro de la molécula. Adicionalmente y de acuerdo con Verstraeten y col. [35], los compuestos fenólicos pueden interactuar con los fosfolípidos de las membranas celulares a través de la unión por puente de hidrógeno a las cabezas polares de los fosfolípidos. Como consecuencia, estos compuestos pueden acumularse en la superficie de las membranas tanto en el interior como al exterior de las células. A través de este tipo de interacciones, los fenoles mantienen la integridad de las membranas previniendo el acceso de moléculas deletéreas a la región hidrofóbica de la bicapa lipídica, inhibiendo la lipoperoxidación, pues los lípidos son las principales moléculas objetivo en la oxidación por ERO [36].

### 2.3 Tolerancia y acumulación de metales pesados por CTV

Anderson y col. [37], reportaron que *Brassica juncea* es capaz de acumular 57 mg Au kg<sup>-1</sup> peso seco (PS) tras haber crecido durante siete días en un sustrato preparado con oro coloidal y tratado con tiocianato de amonio como agente solubilizante del Au, sin embargo, la concentración del metal en los tejidos resultó altamente tóxica para las plantas y presentaron necrosis. Por otro lado, en estudios recientes se ha evaluado la aplicación de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) como herramienta para incrementar la eficiencia de extracción de metales en suelos contaminados, los reportes muestran que algunas plantas como *Alyssum murale* son sensibles al tratamiento con citocininas para el mejoramiento de la extracción debido al incremento de la

biomasa. En un estudio conducido por Cabello-Conejo y col. [38], se evaluaron dos grupos de RCV (giberelinas y citocininas) sobre la capacidad de fitoextracción de Ni en cuatro especies del género *Alyssum*. Plantas de 2-3 cm de longitud (*A. corsicum*, *A. malacitanum*, *A. murale*, y *A. pintodasilvae*), fueron inoculadas en macetas con suelo serpentino con Ni ( $4707 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y enriquecidos con una solución nutritiva (Pro Mix®), tras 39 días de adaptación, fueron expuestas a diferentes mezclas de reguladores (mezcla comercial de tres citocininas Cytokin® y una mezcla comercial de citocinina y giberelina en relación 1:1 Promalin®) en concentraciones de 15 a 60  $\text{mg L}^{-1}$  y aplicados sobre las partes aéreas de las plantas. Los resultados mostraron que la aplicación de los RCV logró un aumento en la producción de biomasa, especialmente en la especie *A. corsicum*, sin embargo, no hubo un efecto significativo en la fitoextracción de Ni.

Las auxinas también han sido probadas en trabajos cuyo objetivo es el mejoramiento de especies para la fitorremediación. Se ha reportado la extracción de Au por plantas de *B. juncea* creciendo en un sistema hidropónico empleando la solución nutritiva Hoogland, suplementada con  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  de cloruro de oro (I) y con ácido indol-3-butírico (IBA; 0.0, 2.5, 5.0, y  $7.5 \mu\text{M}$ ). Transcurridas dos semanas de exposición al metal, las plantas tratadas con  $5.0 \mu\text{M}$  de IBA mostraron mayor acumulación de oro. Este tratamiento también incrementó la producción de biomasa, tanto del sistema radicular, como de las partes aéreas [39].

En los cultivos *in vitro* puede presentarse variación somaclonal, como resultado de la división celular acelerada, que ofrece una oportunidad de aumentar la variación genética de los cultivos y como resultado, el fenotipo del material vegetal puede ser alterado [40]. Esta ha sido una estrategia ampliamente usada para la selección y obtención de cultivos de una variedad de especies resistentes a ciertas enfermedades. Uno de los primeros casos exitosos fue el de la generación de clones de caña de azúcar resistentes a infecciones por *Helminthosporium sacchari*, *Sclerospora sacchari* y la enfermedad de Fiji a través de la regeneración de plantas a partir de callos provenientes de plantas susceptibles [41]. El CTV también ha contribuido al mejoramiento de especies con potencial aplicación en la fitoextracción. Taghizadeh y col. [42], reportaron un trabajo de mejoramiento de la capacidad acumuladora de plomo por *Cynodon dactylon L.*, partiendo de semillas, induciendo callo en medio MS con ácido 2,4-diclorofenoxiacético, formación de brotes con 6-benciladenina y enraizamiento con ácido naftalenacético. En todas las fases de la organogénesis, se suplementó el medio de cultivo con Pb. Las plantas micropropagas fueron aclimatadas a condiciones *ex vitro* y se evaluó el potencial de acumulación de Pb. Los resultados mostraron que los clones expuestos continuamente al

estrés por Pb, lograron acumular hasta 112% más plomo que el control, generando además 142% más biomasa que las plantas control.

### 2.4 *Medicago sativa*

*Medicago sativa* (alfalfa) es una especie perene de raíces profundas perteneciente a la familia de las leguminosas, sus hojas son pequeñas y divididas, posee flores parecidas a un trébol y de coloración púrpura. Ha sido cultivada ampliamente desde tiempos ancestrales para la alimentación del ganado y como cobertura vegetal, se caracteriza por sus altos rendimientos y por ser un forraje de alta calidad, es capaz de desarrollar sistemas radiculares que alcanzan más de 15 metros de profundidad. Esta planta, además de ser más tolerante a la sequía que los pastos, representa un sistema de estabilidad de producción agrícola, ya que mejora la productividad del suelo previniendo la reducción del mismo y la pérdida de agua [43]. *M. sativa*, ha sido empleada en estudios de fitorremediación de Cd [44], Pb [45], y en la fitosíntesis de nanopartículas de Au y Ag [46-47]. Se ha reportado la acumulación de plata en *M. sativa* (136 mg g<sup>-1</sup> PS) después de 24 horas de exposición al metal por hidroponía, lo que representa el 13.6% de PS, cifra que la coloca como especie potencialmente hiperacumuladora de Ag [17]. Las características de crecimiento y tolerancia de la alfalfa, la hacen un modelo de estudio, cuyas capacidades de tolerancia y/o extracción pueden ser mejoradas empleando el CTV.

### 3. Justificación

La contaminación del medio ambiente por metales pesados representa un problema de salud para todos los organismos que integran un ecosistema. En el caso de la plata, los organismos más susceptibles a los efectos por la exposición crónica a este metal son los peces y crustáceos, que representan una fuente de alimento importante en la dieta humana. Una de las alternativas para la remediación de suelos y aguas contaminadas por metales pesados es la fitorremediación, que presenta ciertas ventajas sobre las técnicas fisicoquímicas. Sin embargo, como toda técnica, es susceptible de ser mejorada, para ello es necesario realizar estudios de diversa índole, entre ellos, incrementar la eficiencia de extracción en organismos previamente validados.

*Medicago sativa* es una planta que presenta una alta producción de biomasa y un ciclo de vida adecuado para los propósitos de la fitoextracción. Por ello, es importante explorar los alcances

de las técnicas que provee el CTV en el aprovechamiento y mejoramiento de las capacidades de organismos vegetales que permitan hacer de estos, herramientas más eficientes, particularmente en la capacidad de tolerancia y acumulación de plata.

### 4. Hipótesis

La exposición continua de los cultivos celulares de *Medicago sativa* al estrés inducido por concentraciones crecientes de  $\text{AgNO}_3$ , generará una respuesta de adaptación en las células, permitiendo obtener una línea celular altamente tolerante a Ag.

### 5. Objetivos

#### 5.1 General.

Incrementar la capacidad de tolerancia y/o acumulación de plata en cultivos celulares de *Medicago sativa*.

#### 5.2. Particulares.

- a. Evaluar el efecto de Ag en el crecimiento de los cultivos celulares de *M. sativa* expuestas a dosis crecientes del metal, en 1 y 2 periodos de incubación.
- b. Determinar la  $\text{IC}_{50}$  de los cultivos celulares expuestos a Ag.
- c. Determinar el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en extractos de cultivos celulares de *M. sativa* en presencia y ausencia de Ag.
- d. Evaluar el efecto de cinetina y 6-benciladenina en la organogénesis en cultivos de callo de *M. sativa* expuestos a Ag.

## 6. Metodología

### 6.1 Obtención y proliferación de biomasa de *M. sativa*

Cultivos de callo formados en hipocótilos, creciendo en medio Murashige & Skoog [48] suplementado con 30 g/L de sacarosa, 6.9  $\mu\text{M}$  de 6-benciladenina (BA) y 4.52  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (línea celular a6B4D) fueron proliferados para obtener la biomasa necesaria en el bioensayo de incremento de tolerancia a Ag. Se realizaron subcultivos cada 30 d en medio fresco con la misma formulación del medio, y se incubaron en una cámara de crecimiento para plantas (ICP-54 Lumistell, México) a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  bajo un fotoperiodo de 16 h luz.

### 6.2 Formulación del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo MS fue modificada, debido a que la sal empleada como fuente de iones  $\text{Ag}^+$  para los ensayos de incremento de tolerancia en la línea celular a6B4D tiende a reaccionar con los compuestos clorados provocando que el metal precipite, y por lo tanto disminuyendo su biodisponibilidad para las células vegetales, por lo cual se reemplazaron todos los constituyentes del medio MS que incluyeran cloro por sales equivalentes libres cloro. La sustitución se realizó manteniendo el mismo balance de elementos que en la formulación original del medio de cultivo. Adicionalmente, en el proceso de elaboración del medio MS se protegió de la luz directa, dado que el  $\text{AgNO}_3$  es fotosensible.

Para evaluar el efecto de la modificación del medio de cultivo en el crecimiento de la biomasa celular, se inocularon frascos de cultivo conteniendo medio MS de formulación modificada (MSm) ó de formulación original (MSo) como control, con 2 g de biomasa (peso fresco; PF) y se incubaron durante 20 d. Al inicio y al final del periodo de cultivo, se cosechó la biomasa, registrando el PF y tras la deshidratación en horno de secado a  $60^\circ\text{C}$  durante 72 h, se registró el peso seco (PS), realizando el experimento por duplicado.

### 6.3 Bioensayo de incremento de tolerancia a Ag por cultivos de callo de *M. sativa*

Para determinar el efecto de la adaptación de las células en medio MSm antes de su exposición al metal, las células fueron cultivadas en medio MSm libre de plata durante 30 d. Al término del periodo de adaptación, los cultivos de callo fueron expuestos a 0, 25, 50, 100 y 250 ppm de Ag. Posteriormente, los cultivos provenientes de un periodo de cultivo en el tratamiento MSm, fueron

expuestos durante 30 y 60 días (Tratamientos TA1 y TA2 respectivamente) a 25 ppm de  $\text{AgNO}_3$ . Al finalizar los periodos de cultivo, los callos se expusieron a dosis crecientes de la sal de plata (50, 100 y 250 ppm), renovando el medio de cultivo en los casos de 2 periodos de incubación cada 30 d. Por otro lado, se inició un bioensayo con 25 ppm de  $\text{AgNO}_3$  suplementadas en el medio MSm. Concluidos uno y dos periodos de cultivo, se inoculó la biomasa en medio MSm fresco, suplementado con una concentración mayor de  $\text{AgNO}_3$  (50 ppm, tratamientos TSA1 y TSA2 respectivamente). Las unidades experimentales se inocularon con 2 g de callo de *M. sativa* (PF), bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar horizontal, empleando biomasa de la línea celular a6B4D previamente establecida y proliferada. Los cultivos se incubaron a 25°C y en ausencia de luz durante 30 ó 60 d. Al término de cada periodo de incubación, se cosechó la biomasa de dos unidades experimentales de todos los tratamientos evaluados. La biomasa fue extraída del medio de cultivo, seguido de lavados con una solución 10 mM de EDTA, y dos lavados con agua desionizada de forma alternada, para eliminar trazas de metal adsorbidas. Posterior a los lavados y cosecha por filtración al vacío, se registró el PF y tras la deshidratación de las muestras en horno de secado a 60 ° C durante 72 h se determinó el PS. Cada experimento consistió en lotes de 4 frascos de cultivos y contó con dos réplicas. Los registros de biomasa seca se emplearon para calcular la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR, Eq. 1), la cual está definida como la relación inversamente proporcional entre una variable medible en las plantas expuestas al metal y la misma variable determinada en las plantas control, expresado en porcentaje; y en la determinación de la  $IC_{50}$  definida como la concentración mínima requerida de una sustancia para inhibir en un 50% una actividad biológica o bioquímica, la cual es calculada mediante regresión lineal en la gráfica del valor de una variable medible relacionada directamente con la función biológica o bioquímica estudiada vs la concentración de la sustancia inhibitoria (Eq. 2). La variable medible empleada en el presente estudio fue el índice de tolerancia (IT), que relaciona la biomasa total producida por los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  con la biomasa total producida por los cultivos control (Eq. 3).

$$TCR = \frac{Biomasa(PS)_{Ag}}{Biomasa(PS)_{control}} \quad \dots \text{Eq. 1}$$

$$IC_{50} = \frac{D_{50}-b}{m} \quad \dots \text{Eq. 2}$$

$$IT = \frac{Biomasa (PS)_{Ag}}{Biomasa (PS)_{control}} \quad \text{Eq. 3}$$

Donde:

$D_{50}$  es  $\frac{1}{2}$  del valor de la variable medible alcanzada en el control

$b$  es la ordenada al origen en la curva ajustada

$m$  es la pendiente de la misma.

## 6.4 Obtención de extractos

Las muestras de biomasa seca de los ensayos de incremento de tolerancia se pulverizaron con ayuda de mortero y pistilo. Posteriormente, se tomaron 20 mg de muestra, que se vertieron en frascos de vidrio ámbar, adicionando 2 ml de solvente (metanol-agua; 1:1). La mezcla se mantuvo en oscuridad y agitación constante a 100 rpm durante 24 horas, posteriormente se sometió a baño ultrasónico a 40°C y 53 kHz durante 60 minutos. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos para separar la fracción sólida, y el sobrenadante fue recuperado para realizar las pruebas fitoquímicas.

## 6.5 Pruebas fitoquímicas

### 6.5.1 Cuantificación de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales en los extractos fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu [49]. La mezcla de reacción consistió en 50  $\mu$ l de extracto crudo, 125  $\mu$ l de reactivo de Folin, 375  $\mu$ l de  $\text{NaCO}_3$  al 7% ( $p/v$ ), ajustando a un volumen final de reacción de 1 ml, con agua desionizada. La mezcla se sometió a agitación vigorosa con ayuda de un vortex e incubada a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 760 nm de las mezclas de reacción en espectrofotómetro UV-Vis (Cintra 1010, GBC Australia). Todas las reacciones de cuantificación se prepararon por duplicado. El contenido de fenoles en los extractos, se calculó en términos de miligramos de equivalentes de ácido gálico por miligramos de biomasa seca (mgEAG/mg de PS). Los valores de equivalentes de ácido gálico fueron calculados a partir de la curva patrón con concentraciones conocidas de 0.5-5 mg/L ( $R^2=0.99$ ).

## 6.5.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante

Se empleó el ensayo de DPPH, que mide la capacidad de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil [50]. La mezcla de reacción consistió en 100 µL de extracto mezclado con 3.9 ml de solución metanólica de DPPH (0.025 mg/L). La reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se midió la absorbancia de las mezclas de reacción a 515 nm, y la capacidad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición del radical (Eq. 3). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$\%IR = \frac{A_{DPPH} - A_S}{A_{DPPH}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3}$$

Donde:

$A_S$ , representa la absorbancia de la mezcla de reacción con la muestra problema

$A_{DPPH}$ , es la absorbancia de la solución de DPPH.

## 6.6 Inducción de organogénesis

Con el propósito de obtener plantas completas partiendo de la línea celular de alfalfa a6B4D, previamente y durante el bioensayo de inducción de organogénesis expuesta continuamente a 100 ppm de Ag, se evaluaron 9 tratamientos derivados de las combinaciones de los reguladores del crecimiento vegetal (RCV): 2,4-D y cinetina (KIN), ambos en concentraciones de 0, 10, 50, y 100 µM. El proceso se dividió en dos etapas, la primera fue la exposición de los cultivos celulares a los estímulos químicos (RCV), llamada fase de inducción y durante la segunda etapa, llamada de regeneración, las células crecieron en medio de cultivo libre de RCV. El periodo de incubación en cada etapa fue de 30 días.

### 6.6.1 Fase de inducción

Tubos de cultivo (25 x 150 mm) conteniendo medio de cultivo suplementado con las combinaciones hormonales previamente descritas, fueron inoculados con material vegetal de fuentes diferentes: (Fuente 1) 0.3 g de biomasa (PF) de la línea celular a6B4D de *M. sativa*. Esta biomasa provenía de cultivos de callo previamente expuestos a 100 ppm de Ag. (Fuente 2)

Semillas de alfalfa desinfectadas superficialmente, a través de lavados con solución de detergente al 1% (p/v) durante 15 minutos, seguido de una solución de etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos, y finalmente su inmersión durante 20 minutos, en solución de hipoclorito de sodio al 1.2% (v/v), conteniendo 3 gotas de tween 20 por cada 100 ml de solución. Tras 30 días de cultivo, se registró el porcentaje de germinación e inducción de callo. (Fuente 3) 0.5 g de biomasa (PF) de 30 d de edad, proveniente de cultivos de callo inducidos en semillas, inoculada en medio de cultivo MS adicionado con 2,4-D (4.52  $\mu\text{M}$ ) y BAP o KIN (6.9  $\mu\text{M}$ ). La inoculación de los cultivos se realizó en campana de flujo laminar horizontal.

Tabla 1. Tratamientos empleados para la inducción de organogénesis en callos de *Medicago sativa*.

	<b>Fuente 1</b>			<b>Fuente 2</b>			<b>Fuente 3</b>						
	<b>KIN (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			<b>KIN (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			<b>KIN (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			<b>KIN (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	
<b>2,4-D (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>10</b>	<i>F<sub>1</sub>A</i>	<i>F<sub>1</sub>D</i>	<i>F<sub>1</sub>G</i>	<i>F<sub>2</sub>A</i>	<i>F<sub>2</sub>D</i>	<i>F<sub>2</sub>G</i>	<i>F<sub>3</sub> KA</i>	<i>F<sub>3</sub> KD</i>	<i>F<sub>3</sub> KG</i>	<i>F<sub>3</sub>BA</i>	<i>F<sub>3</sub>BD</i>	<i>F<sub>3</sub>BG</i>
	<b>50</b>	<i>F<sub>1</sub>B</i>	<i>F<sub>1</sub>E</i>	<i>F<sub>1</sub>H</i>	<i>F<sub>2</sub>B</i>	<i>F<sub>2</sub>E</i>	<i>F<sub>2</sub>H</i>	<i>F<sub>3</sub> KB</i>	<i>F<sub>3</sub> KE</i>	<i>F<sub>3</sub> KH</i>	<i>F<sub>3</sub>BB</i>	<i>F<sub>3</sub>BE</i>	<i>F<sub>3</sub>BH</i>
	<b>100</b>	<i>F<sub>1</sub>C</i>	<i>F<sub>1</sub>F</i>	<i>F<sub>1</sub>i</i>	<i>F<sub>2</sub>C</i>	<i>F<sub>2</sub>F</i>	<i>F<sub>2</sub>j</i>	<i>F<sub>3</sub> KC</i>	<i>F<sub>3</sub> KF</i>	<i>F<sub>3</sub> Ki</i>	<i>F<sub>3</sub>BC</i>	<i>F<sub>3</sub>BF</i>	<i>F<sub>3</sub>Bi</i>

\*Biomasa proveniente de cultivos iniciados en medio MS suplementado con 2,4-D y KIN (*F<sub>3</sub>K*) ó 2,4-D y BAP (*F<sub>3</sub>B*).

## 6.6.2 Fase de regeneración

Transcurridos 30 días de incubación, los cultivos de callo expuestos a los tratamientos de inducción de organogénesis (2,4-D + KIN), fueron subcultivados en medio libre de RCV, los cultivos proliferaron durante 30 d. Al término del periodo de incubación, se registraron los resultados de inducción de brotes o respuestas morfogenéticas. Todos los cultivos fueron incubados a 25°C y bajo un fotoperiodo de 16 h luz. El experimento se realizó en lotes de 2 tubos y por duplicado.

## 6.7 Análisis estadístico

Todos los datos registrados fueron sujetos a un análisis de varianza usando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. Para la comparación de medias se empleó la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD;  $p \leq 0.05$ ).

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Efecto de la presencia de Ag en el crecimiento de cultivos de callo de *M. sativa*

#### 7.1.1 Modificación del medio de cultivo y crecimiento celular

La evaluación del medio de cultivo MS modificado sobre el crecimiento celular, no mostró diferencias en la cantidad de biomasa producida en cada formulación, siendo de  $0.3617 \pm 0.008$  y  $0.3714 \pm 0.019$  g en el medio MSm y MSo, respectivamente (PS), transcurridos 30 días de incubación.

Las modificaciones del medio de cultivo MS consistieron en la sustitución de dos sales minerales que contienen cloro en su composición: cloruro de calcio que forma parte del conjunto de sales catalogadas como macronutrientes, y cloruro de cobalto, como micronutriente, reemplazadas con nitrato de calcio y cobalto respectivamente. El  $\text{AgNO}_3$  en solución, se disocia formando iones  $\text{Ag}^+$  y  $\text{NO}_3^-$  y al encontrarse con iones  $\text{Cl}^-$  reacciona para producir  $\text{AgCl}$ , compuesto insoluble en agua y que precipita en forma de agregados blanquecinos, impidiendo que la plata se encuentre biodisponible en el medio de cultivo [51].

Por otro lado, en la nutrición de las plantas, el cloro está catalogado como micronutriente debido a que es requerido en concentraciones relativamente bajas ( $< 0.5$  mg/L). El cloro, al introducirse en la célula vegetal, se acumula sobre todo en los cloroplastos ya que desempeña un papel en la formación fotosintética de oxígeno estimulando la oxidación de la molécula de agua, sin embargo, en cultivos *in vitro*, la fotosíntesis de las células vegetales está afectada por las condiciones de cultivo [52, 53]. La represión de la fotosíntesis por la adición de azúcares metabolizables es una propiedad generalizada en los cultivos de células vegetales. La sacarosa

inhibe la acumulación de clorofila y conduce a una reducción de la fijación de carbón inorgánico a través de la inhibición de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa [54]. La presencia de RCV en la formulación del medio de cultivo, también puede afectar la actividad fotosintética, ya que pueden ser fuertes inhibidores del sistema fotosintético (auxinas), o estimular la producción de clorofila y el desarrollo de cloroplastos (citocininas) [55]. Respecto a sustancias orgánicas que se produzcan en las plantas que contengan cloro, se han descrito aproximadamente 130, pero ninguna de ellas es de importancia vital para el metabolismo, otra participación del cloro, es como osmoregulador [53]. Un estudio en sistema hidropónico, dirigido a determinar el efecto de la deficiencia de  $\text{Cl}^-$  en *Beta vulgaris*, mostró que hubo una disminución en el crecimiento del 60%, se inhibió la multiplicación celular además de hallar síntomas reportados como “comunes” en cultivos con deficiencia de Cl (manchas amarillas en la superficie foliar) [56, 57]. De nuestro conocimiento, no existen reportes del efecto en el crecimiento de las plantas por ausencia de cloro en cultivos *in vitro* de células vegetales.

En el presente trabajo, al evaluar el medio MSm, se encontró una TCR de 97.38% que no muestra diferencias respecto al control, además de que no se observó ningún síntoma de deficiencia del elemento en los cultivos. Este resultado es similar a lo reportado en un estudio donde se evalúa el efecto de la sustitución de KCl como fuente de potasio con  $\text{KNO}_3$  en cultivos de tomate, empleando combinaciones de ambas fuentes de K en distintas proporciones (100:0, 60:40, 40:60, 0:100), no se encontró diferencia significativa en ninguno de los tratamientos al evaluar el tamaño de las plantas, contenido de nutrientes en la fruta y en hojas, y número y tamaño de frutas [58].

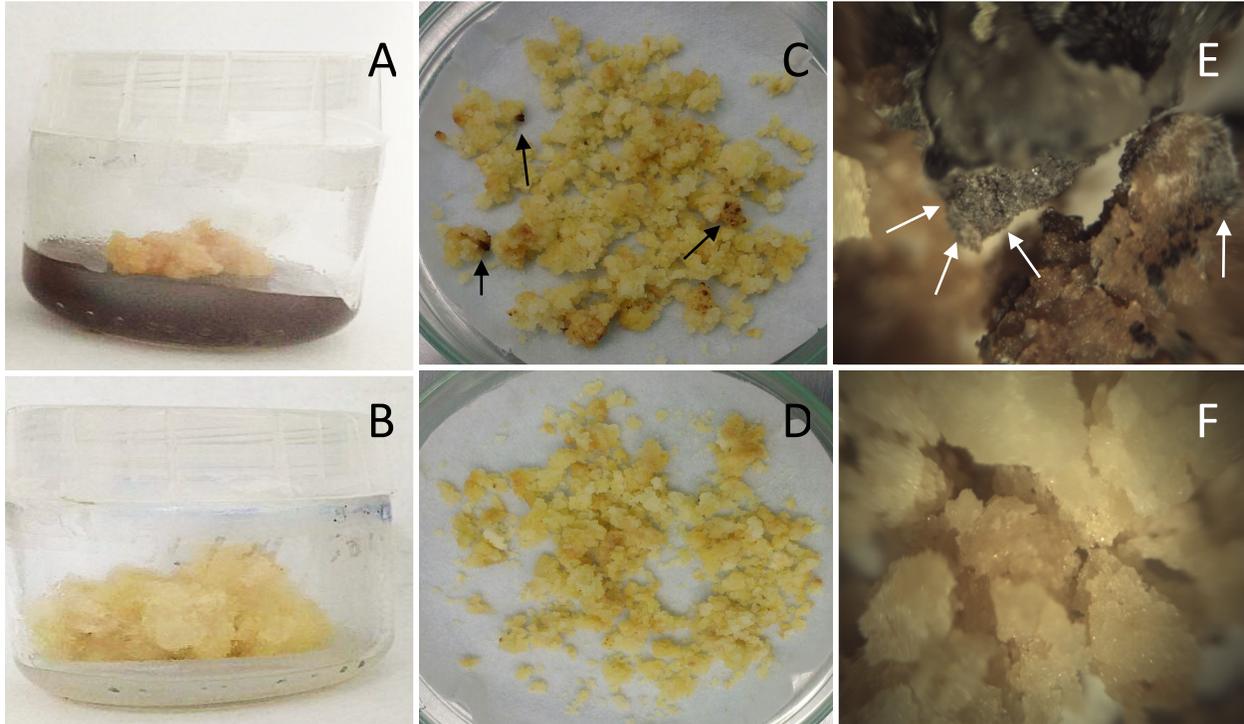
### 7.2 Incremento de la tolerancia a Ag

#### 7.2.1 Crecimiento

Los metales pesados provocan efectos adversos en la absorción y transporte de elementos esenciales y alteraciones metabólicas que finalmente impactan en el crecimiento y reproducción. El crecimiento de una planta completa o de alguna de sus partes se usa frecuentemente como un parámetro fácilmente medible para monitorear el efecto de un agente estresante. Los cambios en el crecimiento son las primeras y más obvias reacciones de una planta bajo estrés [59, 60].

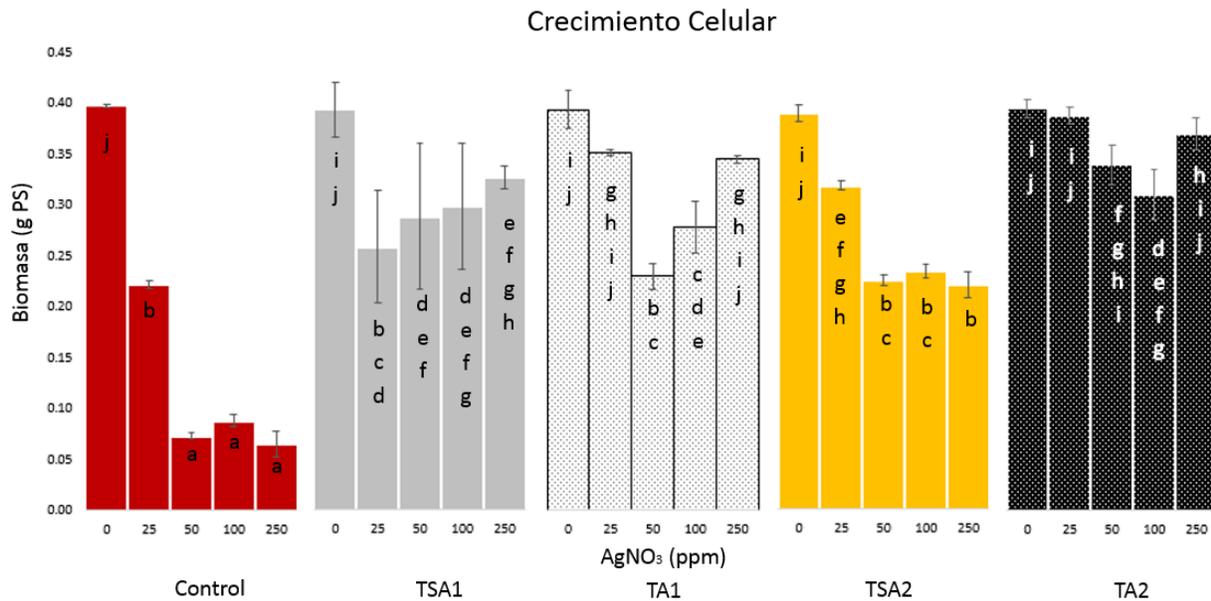
En este estudio, además de las concentraciones crecientes de  $\text{AgNO}_3$  se probó el efecto de la aclimatación previa de la línea celular en el medio de cultivo MSm sobre el crecimiento en los

medios suplementados con la sal de plata. El desarrollo de los callos de alfalfa se vio alterado tras una semana de incubación, se observaron signos de clorosis (una progresión de coloración verde hacia amarillo), síntoma reportado en plantas expuestas a metales pesados [61, 62], además de proliferación retardada y formación de agregados compactos (Fig 1 A).



**Fig. 1. Cultivos celulares de *M. sativa* transcurridos 30 días de incubación. (A) Suplementados con 50 ppm de Ag y, (B) en ausencia de Ag. En (C) y (D) se muestran las células cosechadas del cultivo con y sin plata, mostrado en A y B respectivamente, las flechas negras indican sitios de oxidación. En E) y F) se muestran fotomicrografías (4.5X) de ambos cultivos, las flechas blancas se encuentran evidenciando los depósitos de metal.**

El crecimiento de los cultivos celulares mostró en tres de los tratamientos, TSA1, TA1, y TA2, la misma tendencia en todas las concentraciones de plata evaluadas, evidenciando mejor crecimiento en el tratamiento TA2 (Fig. 2), obteniendo los mejores registros de crecimiento en 25 ppm y 250 ppm de plata, y con una TCR de  $93.817 \pm 0.978$  y  $93.0218 \pm 4.949$  % (Fig. 3), en ambos casos sin mostrar diferencia estadística con el crecimiento de las células en ausencia de Ag. Lo que muestra que dos periodos (60 d) consecutivos de exposición a la misma concentración del metal, tiene un efecto de aclimatación y que el previo tratamiento con el medio modificado durante 60 d, también ejercen un efecto en el incremento en la tolerancia al metal.



**Fig. 2. Biomasa producida por los cultivos de alfalfa expuestos a diferentes concentraciones de plata.** Los datos mostrados son el promedio  $\pm$  DE. Letras diferentes en las barras, indican diferencias significativas

La tasa de crecimiento relativo (TCR) es un parámetro que nos permite ver el efecto del metal en el crecimiento con respecto al tratamiento control (sin exposición a la plata). En la figura 2 se muestran las TCR para los tratamientos evaluados. En términos generales, los resultados muestran que el crecimiento celular se ve disminuido por la exposición al metal y que la previa aclimatación al medio modificado (MSm) disminuye el efecto del estrés. En el caso del tratamiento TSA2, los cultivos mostraron inicialmente (25ppm) mejor crecimiento que los expuestos durante un periodo de crecimiento (TSA1), sin embargo, a partir de los cultivos expuestos con 50 y hasta las 250 ppm de AgNO<sub>3</sub>, el crecimiento permanece constante, las TCR registradas en este tratamiento fueron iguales o mayores al 50% (Fig 3).

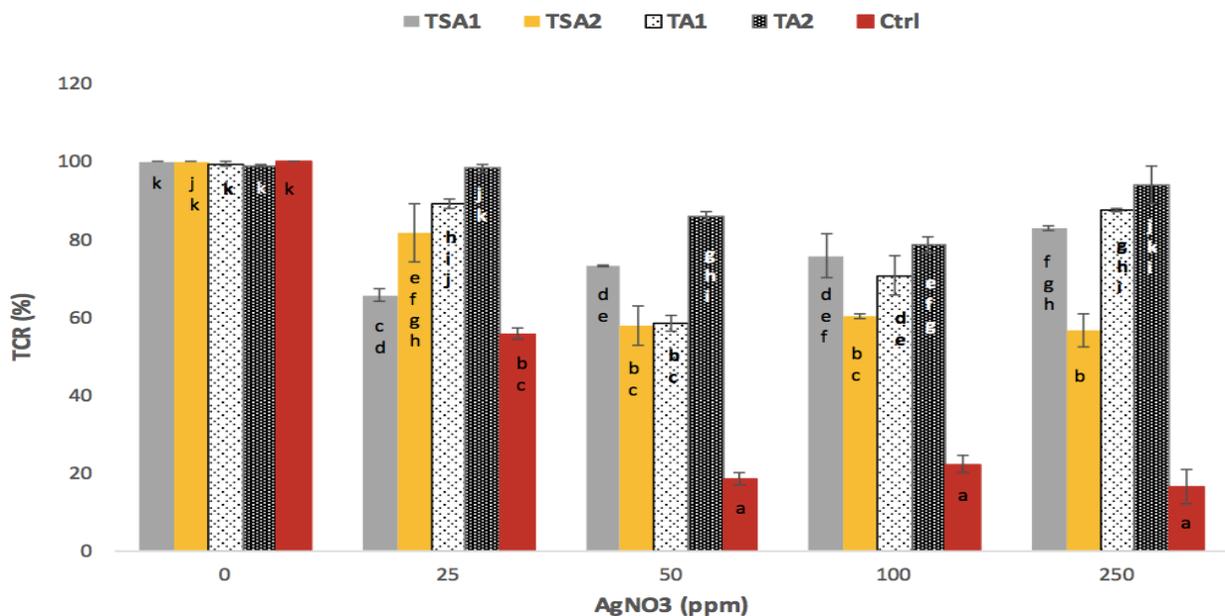
Al término del primer periodo de incubación de los cultivos expuestos a 25 ppm se presentó una significativa disminución en el crecimiento celular, se registraron TCRs de  $88.61 \pm 0.702$  % para el tratamiento TA1 y  $75.8477 \pm 1.438$  % para TSA1, con una diferencia de 11 y 24 % respectivamente en comparación con las células cultivadas en ausencia de Ag (control). Sin embargo, los cultivos mostraron una incremento en el crecimiento en los tratamientos con dos periodos de incubación expuestos a la misma concentración de metal, encontrando TCRs

mayores en un 9 % en TA2 y 5.8 % en el caso de los TSA2 respecto a los tratamientos de un solo periodo, sin mostrar diferencia estadística con el control.

En términos generales, el nitrato de plata ejerció un efecto adverso sobre las células de alfalfa, alterando la producción de biomasa en los cultivos expuestos al metal, en un inicio (0.0, 25 y 50 ppm), inversamente proporcional a la concentración de plata (a mayor concentración, menor cantidad de biomasa recuperada) y por arriba de 50 ppm, el crecimiento experimenta una mejoría. Se ha observado una respuesta similar en *Arabidopsis thaliana*, especie modelo en el que se ha evaluado el efecto tóxico de nanopartículas de plata (AgNPs) y de iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) en el crecimiento de plantas completas, cultivadas *in vitro* en medio MS enriquecido con AgNPs ó  $\text{Ag}^+$  (añadido como  $\text{AgNO}_3$ ), en concentraciones de 0.2, 0.5 y 3.0 mg/L para las dos fuentes de plata. Ambas formas del metal tuvieron un notable efecto inhibitorio, en la longitud de la raíz y en la producción de biomasa (peso fresco) de las plantas, encontrando un decremento pronunciado en la concentración más elevada de AgNPs. Después de una y dos semanas de exposición, se registró un decremento en la biomasa fresca de las plantas de 57.3 y 46.1 % respectivamente, en comparación con el control. Adicionalmente se observó que las concentraciones menores (0.2 y 0.5 mg/L) de  $\text{Ag}^+$  incrementaron la producción de biomasa [60]. Mientras que en estudios reportados en plantas completas de *M. sativa* se ha observado cierto efecto estimulante del crecimiento de raíces y tallos, en concentraciones relativamente bajas (5 y 10 ppm) de algunos metales pesados (Cd(II), Cr(VI), Cu(II), Ni(II) y Zn(II)), se registran incrementos de hasta 166 % (5 ppm de Cr(VI)) y 54% (10 ppm Cu(II)) respecto del crecimiento de plantas no expuestas [61]. Este fenómeno es conocido como hormesis, término que es definido como una respuesta adaptativa de las células u organismos ante un estrés moderado [62]. La estimulación hormética del crecimiento se ha observado de forma frecuente en plantas expuestas a bajas concentraciones de iones metálicos tóxicos. Los iones metálicos pueden actuar como elicitores de respuestas de defensa que sucesivamente estimularán el crecimiento de las plantas, particularmente bajo condiciones de estrés [63].

La producción de biomasa en los cultivos celulares se debe a la división de las células en el medio de cultivo, característica susceptible a estrés biótico o abiótico. La inhibición de la división celular por presencia de metales pesados puede involucrar diferentes mecanismos que incluyen la unión directa con el DNA, aberraciones inducidas por el metal, expansión del ciclo mitótico, inhibición del desarrollo de microtúbulos y reducción de la plasticidad de la pared celular. Además, la mitosis puede verse afectada por las interacciones de iones metálicos con los grupos

–SH de las proteínas y por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) [65, 66]. La exposición a metales pesados induce estrés oxidativo, debido a que estos contaminantes están involucrados en diferentes mecanismos de generación de ERO. Aunque algunas ERO pueden funcionar como moléculas señalizadoras que modulan la actividad de proteínas de defensa, son extremadamente dañinas en altas concentraciones ya que pueden oxidar proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos, frecuentemente llevando a alteraciones en la estructura celular. Gran variedad de proteínas funcionan como depuradores de ERO, entre ellas las superóxido dismutasa (SOD) [66]. Se ha reportado que la actividad enzimática de la SOD dependiente de Zn, medida en hojas de *Phaseolus vulgaris* tratadas con concentraciones tóxicas de Zn y Cd, se ve disminuida de forma significativa debido probablemente a interacciones de los metales con los grupos –SH de la enzima, además de la probable disociación en subunidades, también atribuidas a interacciones del Cd con los grupos –SH [71]. La plata se ha catalogado como uno de los elementos metálicos más tóxicos para las plantas superiores debido en buena medida a su gran afinidad por los grupos -SH y –S-S- esenciales en la estructura de muchas proteínas [63], dada esta afinidad, cabe esperar que los iones de  $Ag^+$  suplementados al medio de cultivo, tenga un efecto importante sobre la actividad enzimática de los cultivos involucrada no solo en la depuración de ERO, sino en todo el metabolismo celular.



**Fig. 3. Tasa de Crecimiento Relativo de cultivos de células de *M. sativa* expuestos a diferentes concentraciones de  $AgNO_3$ . Letras diferentes indican diferencias significativas.**

Durante la cosecha de los cultivos celulares se detectaron aglomerados, de células oxidadas, dispersos en la superficie de la masa callosa (Fig. 1C), en todos los tratamientos que incluían suplemento de Ag a partir de 50 ppm, los cuales no se observaron en los cultivos libres de Ag (Fig 1 D). El análisis por microscopía óptica, de los aglomerados descritos, permitieron determinar que son posibles depósitos del metal que las células de alfalfa logran remover del medio de cultivo y que en las células sin exposición al metal, no se observan (Fig 1E, F). La capacidad de remoción de plata suplementada en el medio de crecimiento ha sido reportada en *M. sativa* en estudios en los que se ha expuesto a la planta completa al metal en distintos intervalos de tiempo con un máximo de 6 días, por medio de cultivos hidropónicos [72, 73] y en medio de cultivo sólido [74], evaluando concentraciones que van desde 3 hasta 10,000 ppm de  $\text{Ag}^+$ . En los estudios se reportan cifras del metal acumulado de 2.043 mg/Kg de peso seco después de 6 días de exposición al sustrato con plata. Los autores señalan que la acumulación de Ag en este modelo muestra dependencia del tiempo de exposición al mismo.

### 7.2.2 Determinación de la $\text{IC}_{50}$ de Ag

Los registros de producción de biomasa en los callos expuestos a Ag (0-100 ppm) se emplearon para estimar el índice de tolerancia (IT), así como la concentración media inhibitoria ( $\text{IC}_{50}$ ), calculada a partir de una curva dosis-respuesta de la biomasa vegetal contra los niveles de  $\text{AgNO}_3$  probados. El valor de este parámetro corresponde a la concentración de  $\text{AgNO}_3$  en la cual, el peso seco total de la biomasa vegetal disminuye 50% con respecto al valor registrado en el cultivo libre de Ag (control). A partir de los resultados de IT, se observó que todos los tratamientos probados para el incremento de tolerancia influyeron en un aumento en el valor de la  $\text{IC}_{50}$  de forma significativa, registrando 28.416 ppm para el tratamiento control, concentración que se triplicó en el tratamiento TSA2, y alcanzando el valor más alto en el tratamiento TA2 (253.9 ppm de  $\text{AgNO}_3$ ), lo cual representa un incremento de casi 9 veces respecto del control (Tabla 2).

Se han realizado pruebas de toxicidad de AgNPs que se han efectuado sobre brotes de un día de edad obtenidos en cultivos *in vitro* de *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor*, inoculados en dos tipos de medio de crecimiento: agar y suelo artificial OECD, suplementado con distintas concentraciones de AgNPs en cada medio (0, 10, 20, y 40 ppm para la prueba en agar, y 0, 500, 1000 y 2000 ppm en la prueba en suelo) e incubados durante 2 y 5 días respectivamente. Los

autores reportan una IC<sub>50</sub> para los cultivos en agar de 13 y 26 mg/L de AgNPs para *P. radiatus* y *S. bicolor*, respectivamente y para los experimentos empleando como sustrato suelo artificial OECD, las plantas mostraron una disminución en su crecimiento de 20% aproximadamente en la concentración máxima evaluada (2000 ppm) y registraron una IC<sub>50</sub> >500 ppm en ambas especies evaluadas. El crecimiento de las plantas en el suelo OECD, no se inhibió a pesar de la alta concentración de AgNPs respecto al experimento con agar. La explicación a este fenómeno observado, probablemente involucre cambios en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas en el suelo. Los lixiviados albergan una gama de electrolitos que incrementa la agregación de AgNPs en el suelo, lo que se refleja en la alta capacidad de amortiguamiento del suelo [75]. Es posible que los agregados adquirieran dimensiones más grandes que el tamaño de poro de las células de las raíces, imposibilitando así su internalización en las células vegetales. La formación de agregados grandes puede ser la principal razón para la fitotoxicidad reducida de las AgNPs en el suelo de cultivo. Otra posible explicación es que la plata tiende a formar enlaces S-Ag-S cuando se une al azufre orgánico e inorgánico y por consecuencia, la cantidad de nanopartículas disponibles para las plantas se ve reducida [76].

**Tabla 2. Concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) para los cultivos celulares de *M. sativa* expuestos a Ag.**

Tratamiento	IC <sub>50</sub> (ppm)	Incremento respecto del control
Control	28.41 ± 9.4 <sup>a</sup>	-
TSA1	135 ± 24.7 <sup>c</sup>	4.7
TSA2	85.37 ± 17.5 <sup>b</sup>	3.004
TA1	144.71 ± 18.66 <sup>c</sup>	5.09
TA2	253.9 ± 16.2 <sup>d</sup>	8.9

\*Los datos representan el promedio de tres réplicas ± DE. Letras diferentes en columna, indican diferencias significativas

En el mismo estudio mencionado [75], se evalúa la toxicidad de los iones de plata liberados de las AgNPs. La máxima concentración liberada en los tratamientos en agar y en suelo fueron de 1.3 y 2.7 ppm, respectivamente. La exposición de ambas especies vegetales a iones Ag<sup>+</sup> en agar, dio como resultado la inhibición del crecimiento en 34% para *P. radiatus* y 55% en el caso de *S.*

*bicolor*, obteniendo una  $IC_{50}$  para esta última especie  $>1$  ppm de  $Ag^+$ . La influencia de la concentración de  $Ag^+$  en el suelo fue despreciable, pero resalta el efecto del medio de exposición sobre la fitotoxicidad del metal evaluado. Con base en lo anterior y considerando que el sistema empleado en el presente estudio permite que los iones de plata se encuentren en forma soluble y por lo tanto biodisponibles, los resultados indican que la línea celular de *M. sativa* a6b4d cuenta con una tolerancia sobresaliente al  $AgNO_3$  y que esta tiene el potencial de mejoramiento.

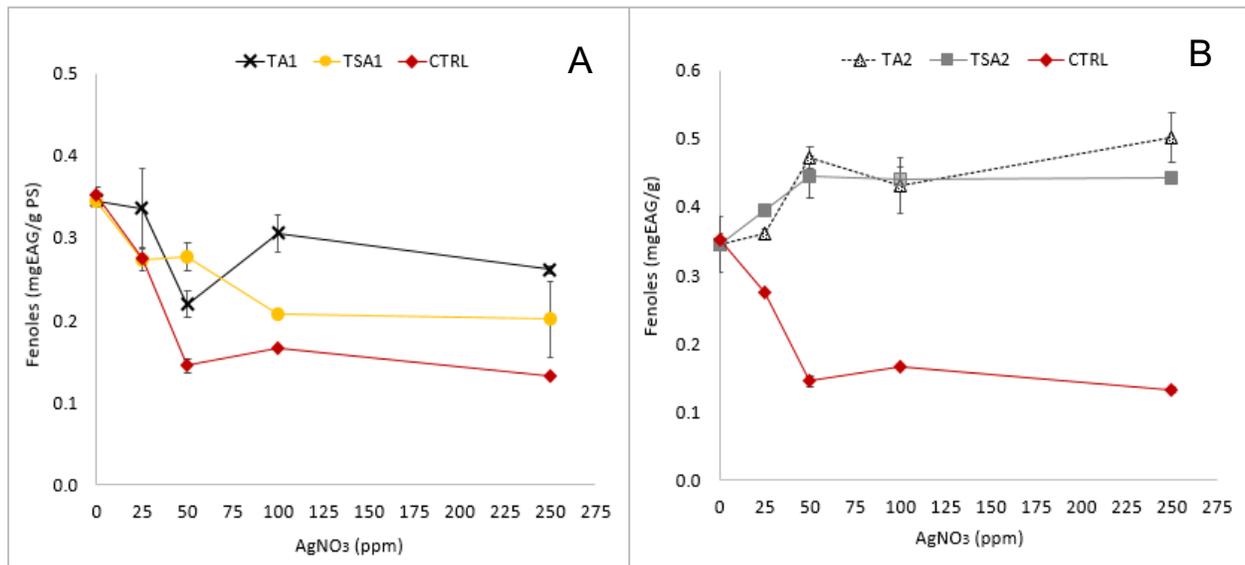
### 7.3 Análisis fitoquímico de cultivos de *M. sativa* bajo estrés por Ag

#### 7.3.1 Cuantificación de fenoles totales

Uno de los efectos adversos de los metales sobre las plantas es la generación de ERO, desencadenando estrés oxidativo. El daño a la planta ocurre cuando la capacidad de neutralización de estas especies químicas es menor que la cantidad de ERO producidas. Las plantas han desarrollado complejos sistemas antioxidantes que las protegen ante las ERO, que se han clasificado como enzimáticos y no enzimáticos, este último, está constituido por metabolitos secundarios, entre los más relevantes se encuentran los fenoles. La tolerancia de las plantas al estrés ocasionado por los metales pesados mediada por los antioxidantes ha sido demostrada y estudiada por muchos autores. Estos mecanismos pueden proveer una estrategia para mejorar la tolerancia de la planta ante el estrés ya que pueden disminuir o incluso detener la oxidación de biomoléculas [77, 78]. Por tal razón, resulta relevante evaluar el efecto de la exposición de las células vegetales a concentraciones crecientes de plata sobre la producción de compuestos fenólicos y la respuesta antioxidante.

En términos generales, se observó que la producción de compuestos fenólicos en los cultivos de células de alfalfa fue estimulada por la exposición a las diferentes concentraciones de plata probadas, ya que los tratamientos con suplemento del metal pesado mostraron concentraciones de fenoles totales superiores a los determinados en los cultivos libres del metal (control). Sin embargo, la producción de compuestos fenólicos, permanece constante, una vez que las células son expuestas a  $\geq 50$  ppm de  $AgNO_3$  (Fig 4A). También, se observa que la concentración de fenoles en los cultivos muestra un incremento cuando las células son expuestas al metal de forma progresiva (TSA1, TSA2, TA1 y TA2) y no de forma directa (control). En el caso de los tratamientos control, TA1 y TSA1, la concentración de fenoles decrece conforme aumenta la concentración de plata, y permanece constante a partir de 50 ppm, registrando una concentración

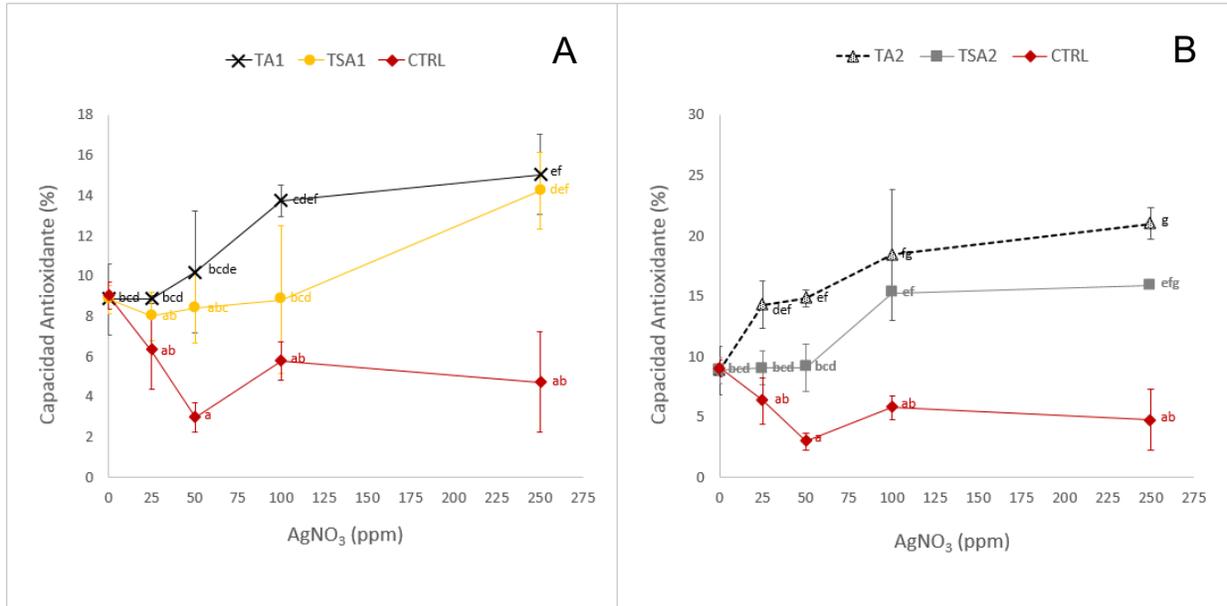
máxima de  $0.3531 \pm 0.008$  mgEAG/g PS y una mínima de  $0.1323 \pm 0.004$  mgEAG/g PS en 0 y 250 ppm, respectivamente. En los tratamientos de incremento de tolerancia con dos periodos de incubación (60 días), la tendencia en la producción de fenoles es un incremento, en los cultivos suplementados con 0-50 ppm, a partir de entonces se observó un comportamiento similar al descrito para los tratamientos de 30 días de incubación (permanece constante la producción) (Fig 4B). La significativamente mayor concentración de fenoles totales se registró en TA2 y TSA2 con cantidades máximas de  $0.5012 \pm 0.036$  (en 250 ppm de  $\text{AgNO}_3$ ) y  $0.4447 \pm 0.03$  (en 50 ppm), siendo significativamente diferentes al control.



**Fig. 4. Fenoles totales en cultivos celulares de *M. sativa*** (A) En cultivos expuestos a 30 d; (B) Cultivos expuestos a 60 d. Las barras muestran la DE. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Respecto a la capacidad antioxidante, medida a través de la inhibición del radical DPPH mostrada por los extractos de los cultivos celulares, en general, mostró un incremento al aumentar la concentración de Ag suplementada en el medio de cultivo, aunque no se observó diferencia significativa, en las concentraciones más bajas (0 y 25 ppm) con el tratamiento control (Fig 5A). Se observó que la significativamente mayor capacidad de inhibición del radical, se registró en los cultivos expuestos a las concentraciones más elevadas de Ag (250 ppm) durante 60 días (TA2, TSA2) (Fig 5B), alcanzando registros de  $20.98 \pm 1.34$  % y  $15.80 \pm 0.138$  % de inhibición del radical, respectivamente. Es evidente que la presencia de la plata en el medio de cultivo induce a un incremento de la capacidad antioxidante en los cultivos y de forma muy marcada en los tratamientos con exposición progresiva del metal, sin embargo, en el tratamiento control no se observan cambios en la respuesta evaluada que permanece prácticamente

constante en todas las concentraciones probadas y al igual que en la producción de fenoles, probablemente la respuesta antioxidante, también depende del tratamiento de aclimatación de los cultivos en concentraciones crecientes de  $\text{AgNO}_3$  (Fig. 5).



**Fig. 5. Respuesta antioxidante de cultivos de *M. sativa*.** Se muestran las respuestas halladas en los tratamientos de 30 (A) y 60 días (B). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas.

En la literatura se reporta que cultivos de callo de *Camellia sinensis*, inducidos a partir de explantes foliares, tallos y raíces, creciendo en un medio de cultivo con suplemento de nitrato de cadmio en concentración de  $6.3 \times 10^{-5}$  y  $10.6 \times 10^{-5}$  M, incubados durante 45 días. La concentración más baja de Cd, logró estimular la producción de fenoles, registrando un aumento respecto de los tratamientos control de 0.5 y 0.87 veces en raíces y tallos respectivamente, en el caso de las hojas se registró un decremento ligero. Se observó el mismo efecto sobre los callos en la concentración de Cd más elevada aunque menos pronunciada, pues en callos derivados de raíces y tallos se encontró que la acumulación de fenoles fue 0.13 y 0.6 veces mayor respecto al control y en el caso de los callos derivados de hojas solo se acumuló el 80% de lo producido en los controles, hecho que permitió concluir que la intensidad de la síntesis de compuestos fenólicos en los callos, depende de la concentración de Cd y del explante primario, pues la variabilidad en la respuesta se atribuye a que las características genéticas y epigenéticas de los tejidos iniciales se conservan bajo condiciones *in vitro*. [79]. En el caso de *M. sativa* también se observan aumentos en la producción de compuestos fenólicos respecto del control, aunque en

el presente estudio se registran incrementos más significativos, logrando el mayor registro en TA2 con 3.78 veces mayor concentración de fenoles que en el tratamiento control.

Los compuestos fenólicos como los flavonoides y precursores de lignina han sido reconocidos como antioxidantes que pueden actuar en contra de las especies reactivas de oxígeno (ERO) potencialmente peligrosas. La síntesis de fenoles es una estrategia efectiva contra las ERO, ya que además de actuar solos, pueden funcionar en conjunto con diferentes peroxidasas [77]. En un estudio llevado a cabo en *Brassica oleracea*, la producción de fenoles significó la primer línea de defensa contra el estrés inducido por Cu. Los resultados hallados por los autores señalan que el contenido de fenoles así como la actividad de peroxidasas (mecanismos enzimáticos), incrementó en *B. oleracea* tratada con  $\text{Cu}^{2+}$ . En el mismo reporte se propone una reacción fenoles-peroxidasa como mecanismo de depuración de ERO [80]. La acción conjunta de fenoles con enzimas antioxidantes ha sido demostrada y se ha establecido que los flavonoides pueden donar electrones a las peroxidasas para la destoxificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producidos bajo condiciones de estrés [81]. Se ha reportado un incremento de los compuestos fenólicos correlacionado con el incremento en la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de dichos metabolitos, sugiriendo que bajo estrés inducido por metales pesados, se estimula la síntesis *de novo* de fenoles. En contraste, algunas evidencias indican que el incremento en la concentración de flavonoides se debe principalmente a la hidrólisis de conjugados glicosídicos preformados y no a la biosíntesis *de novo* [82].

La acción antioxidante de los fenoles se atribuye a su alta tendencia a quelar metales, poseen grupos hidroxilo y carboxilo capaces de unirse particularmente a iones de hierro y cobre. Las raíces de muchas plantas exudan altos niveles de fenoles, estos pueden inactivar iones de hierro mediante quelación y adicionalmente, suprimiendo la reacción de Fenton y la vía Haber-Weiss, la cual se creó que son las fuentes más importantes de ERO. Esta habilidad de quelación de los compuestos fenólicos está relacionada probablemente al gran carácter nucleofílico del anillo aromático más que a grupos queladores específicos dentro de la molécula. De acuerdo con Verstraeten et al. [83], los compuestos fenólicos pueden interactuar con los fosfolípidos de las membranas celulares a través de la unión por puentes de hidrógeno a las cabezas polares de los fosfolípidos. Como consecuencia, estos compuestos pueden acumularse en la superficie de las membranas tanto en el interior como al exterior de las células, A través de este tipo de interacciones, los fenoles mantienen la integridad de las membranas previniendo el acceso de

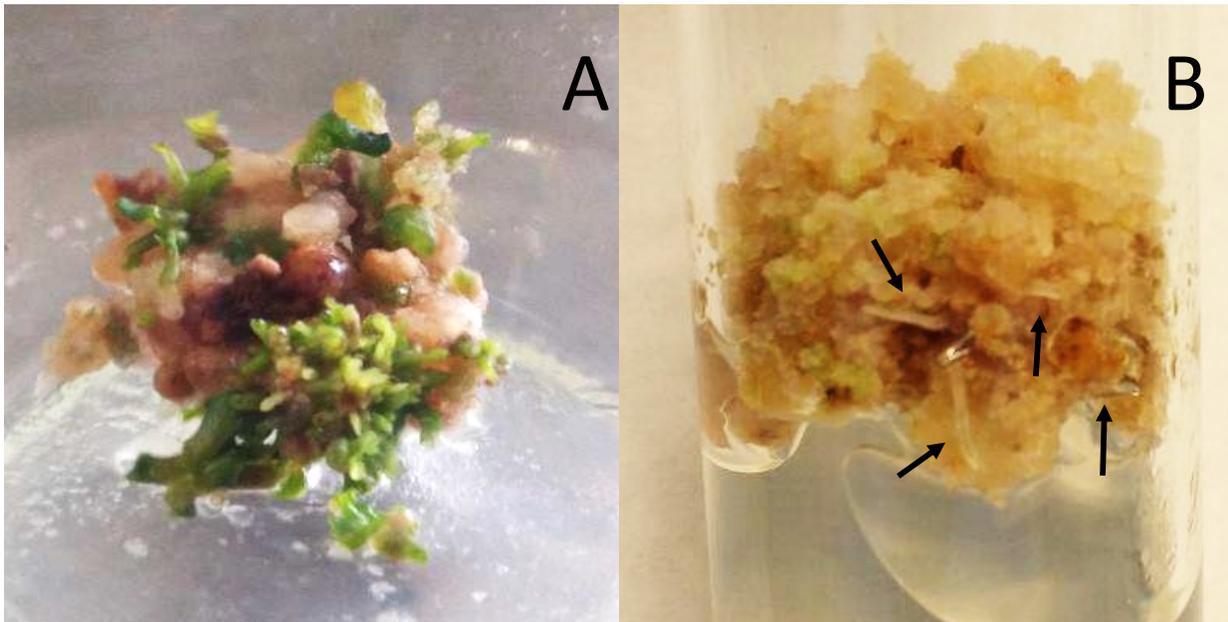
moléculas deletéreas a la región hidrofóbica de la bicapa lipídica, inhibiendo la lipoperoxidación, dado que los lípidos son las principales moléculas objetivo en la oxidación por ERO [84].

Aunque en este estudio, los cultivos de células de *M. sativa*, con las concentraciones más elevadas de compuestos fenólicos corresponden a las capacidades de respuesta antioxidante más elevadas, en la literatura se encuentran análisis de respuestas antioxidantes al estrés ocasionado por metales pesados (y en general, por factores abióticos) que han encontrado respuestas variables y controversiales como en el caso de *Betula pendula*, donde se midió la cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de hojas, floema y corteza. Los resultados arrojaron concentraciones de fenoles de 38.4, 85.5, 2.0 equivalentes de ácido gálico/g PS, con un porcentaje de inhibición del radical Metil linoleato de 63, 91 y 87%, respectivamente. No encontrándose correlación entre la cantidad de fenoles y la actividad antioxidante de los extractos vegetales [85]. Además de que la variación en la respuesta antioxidante puede atribuirse a: (1) los factores abióticos ejercen diferentes mecanismos de inducción de estrés, (2) los diferentes mecanismos de respuesta al estrés oxidativo (enzimas o moléculas antioxidantes) se encuentran compartimentadas y, en consecuencia, se hallan diferencias en la respuesta en organelos, células y tejidos, y (3) la planta es capaz de desintoxicarse, al reducir el efecto del estrés oxidativo inducido por los factores abióticos [85]. Los diferentes compuestos fenólicos tienen respuestas, igualmente diferentes al método de cuantificación de Folin-Ciocalteu y de manera similar, la respuesta molecular antioxidante ante las distintas especies de ERO es variable de forma-dependiente de la estructura química de los fenoles. Así, la actividad antioxidante de un cultivo de células o un tejido no puede ser predicha con base en el contenido de fenoles [86], sin embargo, para los propósitos del presente estudio, ambos parámetros sirven como indicativo de que se ha presentado una respuesta adaptativa de los cultivos celulares ante el estrés causado por la presencia de plata en el medio de crecimiento.

### 7.4 Organogénesis en cultivos de callo de *M. sativa*

La regeneración de plantas completas vía organogénesis es de crucial importancia en la aplicación de los métodos del Cultivo de Tejidos Vegetales para el mejoramiento vegetal. La relevancia de los RCV, especialmente las auxinas y citocininas en la inducción de callo y la regeneración de plantas, ha sido reportada en monocotiledóneas y dicotiledóneas [87].

De todos los tratamientos evaluados para inducir brotes en cultivos de callo de *M. sativa*, únicamente dos combinaciones hormonales lograron formar brotes. Tras 30 días de incubación en el medio de regeneración, el tratamiento F<sub>3</sub>BD generó un porcentaje de inducción de brotes del 75% con un promedio de  $36.08 \pm 28.27$  brotes por cultivo, y en el tratamiento F<sub>1</sub>B se registró 50% de inducción de brotes con  $74 \pm 51.85$  brotes por cultivo (Fig. 6A). Por otro lado, el tratamiento F<sub>3</sub>KC, logró la formación de raíces con un porcentaje de 100% y con  $>80$  raíces por cultivo después de 30 días de incubación en el medio de regeneración (Fig. 6B). En ningún tratamiento se observó la formación de raíces y brotes de forma simultánea.



**Fig. 6. Organogénesis inducida en callos de alfalfa, a los 30 días de cultivo en medio de regeneración.** (A) Brotes obtenidos en medio de inducción suplementado con 2,4-D y KIN en concentraciones de 50 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente; y (B) inducción de rizogénesis, las flechas de color negro señalan las raíces formadas en medio de inducción con 10 y 5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y KIN, respectivamente.

La formación de brotes y raíces bajo las combinaciones de 2,4-D y KIN es similar a lo reportado por Walker et al. [87], quienes observan que callos de alfalfa originados de ovarios inmaduros, tallos y peciolas, generaron brotes en medios suplementados con altos niveles de 2,4-D respecto a los niveles de KIN; y formaron raíces cuando el suplemento de KIN fue mayor al de 2,4-D. El requerimiento de 2,4-D en el medio de inducción y la subsecuente remoción para la promoción de la diferenciación subraya la dualidad de la función de esta hormona en los cultivos de tejidos. Procedimientos de dos fases para la obtención de órganos o para la embriogénesis en cultivos

de tejidos vegetales no son poco comunes, particularmente cuando se emplea 2,4-D como regulador de crecimiento. Varios autores [88, 89] señalan, que mientras el 2,4-D estimula la proliferación del callo *in vitro* antagoniza la organogénesis. La influencia del 2,4-D en la desorganización del tejido de zanahoria fue reportada por Halperin [88] quien propuso que dicho regulador mantiene el estado desorganizado en los cultivos de zanahoria debido que ejerce una continua estimulación de la proliferación celular. La necesidad de remover el 2,4-D del medio de cultivo para la inducción de organogénesis en alfalfa puede atribuirse a circunstancias similares. Otros trabajos reportan que el mayor efecto de la KIN en la formación de órganos, se hace evidente cuando está presente en concentraciones mayores a 2.3  $\mu\text{M}$ , y aunque la KIN no es requerida para la formación de brotes en alfalfa, su presencia incrementa la formación de los mismos hasta en un 160%. Sin embargo, concentraciones relativamente altas pueden inhibir la formación de los brotes [90]. La noción de que la formación de órganos ocurre a través de un proceso de dos fases ha sido revisada y se ha propuesto que durante la primer fase, se produce un primordio de órgano generalizado y durante la segunda etapa se determina el tipo de órgano que se va a formar, si este fuera el caso para los callos de alfalfa, entonces los niveles de 2,4-D y KIN en el medio de inducción y el acarreo residual de los RCV que se presenta durante el momento de la transferencia al medio de cultivo parece ser importante para la determinación del patrón de la formación de órganos.

Además de los RCV, se ha detectado que otros factores son importantes a considerar en las organogénesis, tales como la composición del medio de cultivo o el potencial morfogénico de los callos o explante empleado. Brotes de alfalfa se han obtenido en medios de Blaydes, Linsmaier & Skoog, B5, Shenk & Hildebrandt [87, 92] y en nuestro caso, en medio MS, con diferentes resultados. Las principales diferencias en la composición de los medios mencionados radican en la cantidad y fuentes de nitrógeno. Se ha reportado que niveles reducidos de nitrógeno en el medio de regeneración de alfalfa, afecta el patrón de morfogénesis *in vitro*. También, se han reportado problemas en la obtención de brotes y embriones, cuando el medio de cultivo contiene iones de amonio como única fuente de nitrógeno [93], aunque el suplemento de extracto de levadura como fuente alterna de nitrógeno puede causar ruido, debido a que el extracto probablemente aporta cantidades desconocidas de RCV, convirtiendo el medio de cultivo en un sustrato de composición indefinida [92]. En ciertas circunstancias, la nula formación de órganos, después de un tratamiento con inductores activos, ha sugerido que se ha perdido la capacidad morfogénica de los callos [94]. Los resultados de Walker et al. [87] demostraron que la capacidad de respuesta de callos de alfalfa a tratamientos de inducción de organogénesis es dependiente

del tamaño de agregados celulares que conforman el callo. Los autores encontraron que células individuales y agregados con un tamaño menor a 105  $\mu\text{m}$  de diámetro, no son capaces de responder a la inducción morfogénica.

### 8. Conclusiones

La plata tiene un efecto inversamente proporcional sobre el crecimiento (TCR) de cultivos celulares de *M. sativa*, sin embargo, la exposición a concentraciones crecientes del metal durante periodos de 30 y 60 días, parece estimular la adaptación de las células al estrés que ocasiona el metal pesado.

La  $\text{IC}_{50}$  de las células de alfalfa es de  $28.41 \pm 9.4$  ppm, cuando los cultivos se exponen a tratamientos de aclimatación en medios con incrementos progresivos de  $\text{AgNO}_3$  hasta 100 ppm durante 30 o 60 días, la  $\text{IC}_{50}$  puede incrementarse hasta 5.09 y 8.9 veces respectivamente.

El análisis por microscopía (4.5X) de las secciones oxidadas de los callos expuestos a plata permitió detectar posibles cúmulos de plata que las células de alfalfa remueven del medio de cultivo, hecho que hace posible suponer la capacidad acumuladora de la especie vegetal en estudio.

Tanto la producción de compuestos fenólicos como la capacidad antioxidante de los cultivos celulares de alfalfa se ven estimulados por la presencia del  $\text{AgNO}_3$  en el medio de cultivo, sin embargo, el efecto estimulante no parece ser producto de la exposición directa al metal, sino de los incrementos progresivos de la plata en el medio de cultivo.

La tolerancia de las células de *Medicago sativa* al estrés que ejercen los iones de Ag en el medio de crecimiento, mostró un notable incremento, que se reflejó en las TCR elevadas y en el aumento en los valores de la  $\text{IC}_{50}$  que se alcanzaron en los tratamientos de aclimatación.

Los callos de alfalfa muestran respuesta organogénica cuando el medio de cultivo MS se suplementa con 2,4-D y KIN, al formar brotes con concentraciones de 50 y 1  $\mu\text{M}$ , y raíces en concentración de 10 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

## 9. Bibliografía

1. Raskin, I., Kumar, P. N., Dushenkov, S., & Salt, D. E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in biotechnology*, 5(3), 285-290.
2. Niober E, Richardson DHS; The replacement of the Non-descript term "Heavy Metals" by a Biologically and Chemically Significant Classification of Metal ions. *Env Pollution [B]* 1980, 1:3-26.
3. Doudoroff, P., & Katz, M. (1953). Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish: II. The metals, as salts. *Sewage and Industrial Wastes*, 802-839.
4. Albright, L. J., Wentworth, J. W., & Wilson, E. M. (1972). Technique for measuring metallic salt effects upon the indigenous heterotrophic microflora of a natural water. *Water Research*, 6(12), 1589-1596.
5. Ratte, H. T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 89-108.
6. Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts. *Waste management*, 30(3), 504-520.
7. Oleszczuk, P., Joško, I., & Xing, B. (2011). The toxicity to plants of the sewage sludges containing multiwalled carbon nanotubes. *Journal of hazardous materials*, 186(1), 436-442.
8. Benn, T. M., & Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ. Sci. Technol*, 42(11), 4133-4139.
9. Nair, P. M. G., & Chung, I. M. (2014). Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 112, 105-113.
10. Fawell, JK., Lund, U., Mintz, B. (1993). Silver in drinking water. Recuperado de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/silver.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/silver.pdf).
11. Fewtrell, L. (2014). Silver: water disinfection and toxicity. *Aberystwyth University, Aberystwyth*.
12. Ahalya, N., Ramachandra, T. V., & Kanamadi, R. D. (2003). Biosorption of heavy metals. *Res. J. Chem. Environ*, 7(4), 71-79.
13. Trejo, J. A. V. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología.
14. Rahman, M. A., Reichman, S. M., De Filippis, L., Sany, S. B. T., & Hasegawa, H. (2016). Phytoremediation of Toxic Metals in Soils and Wetlands: Concepts and Applications. In *Environmental Remediation Technologies for Metal-Contaminated Soils* (pp. 161-195). Springer Japan.
15. Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
16. Guerinot, M. L., & Salt, D. E. (2001). Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiology*, 125(1), 164-167.
17. Harris, A. T., & Bali, R. (2008). On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(4), 691-695.

18. Brooks, R. R., & Robinson, B. H. (1998). The potential use of hyperaccumulators and other plants for phytomining. *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, 327-356.
19. Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science*, 180(2), 169-181.
20. Segratin María Eugenia. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones. INGENI-CONICET-Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA.
21. Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 1-18.
22. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology* (pp. 133-164). Springer Basel.
23. Robert Smith, Thomas Smith. (2004). *Elements of Ecology*. Estados Unidos: Pearson Addison Wesley.
24. *Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases*. Recuperado de <https://heavy-metal-toxicity-diseases.imedpub.com/>
25. Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., & Kizek, R. (2008). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 6(4), 189-213.
26. Cuypers, A., Smeets, K., & Vangronsveld, J. (2009). Heavy metal stress in plants. *Plant Stress Biology: From genomics to systems biology*, 161-178.
27. Shah, F. U. R., Ahmad, N., Masood, K. R., & Peralta-Videa, J. R. (2010). Heavy metal toxicity in plants. In *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 71-97). Springer Netherlands.
28. Ratte, H. T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 89-108.
29. Ewell, W. S., Gorsuch, J. W., Ritter, M., & Ruffing, C. J. (1993, August). Ecotoxicological effects of silver compounds. In *Proc. 1st Argentum Int. Conf. on the Transport, Fate, and Effects of Silver in the Environment, Madison, USA* (p. 9).
30. Hirsch, M. P. (1998). Availability of sludge-borne silver to agricultural crops. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 610-616.
31. Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216.
32. Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212(4), 475-486.
33. Ha, S. B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., ... & Cobbett, C. S. (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*, 11(6), 1153-1163.

34. Howden, R., Goldsbrough, P. B., Andersen, C. R., & Cobbett, C. S. (1995). Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology*, *107*(4), 1059-1066.
35. Posmyk, M. M., Kontek, R., & Janas, K. M. (2009). Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*(2), 596-602.
36. Zagorskina, N. V., Goncharuk, E. A., & Alyavina, A. K. (2007). Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant. *Russian Journal of Plant Physiology*, *54*(2), 237-243.
37. Anderson, C. W., Brooks, R. R., Stewart, R. B., & Simcock, R. (1998). Harvesting a crop of gold in plants. *Nature*, *395*(6702), 553-554.
38. Cabello-Conejo, M. I., Centofanti, T., Kidd, P. S., Prieto-Fernández, Á., & Chaney, R. L. (2013). Evaluation of plant growth regulators to increase nickel phytoextraction by *Alyssum* species. *International journal of phytoremediation*, *15*(4), 365-375.
39. Kulkarni, M. G., Stirk, W. A., Southway, C., Papenfus, H. B., Swart, P. A., Lux, A., ... & Staden, J. V. (2013). Plant growth regulators enhance gold uptake in *Brassica juncea*. *International journal of phytoremediation*, *15*(2), 117-126.
40. Van den Bulk, R. W. (1991). Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding—a review. *Euphytica*, *56*(3), 269-285.
41. Heinz, D. J., Krishnamurthi, M., Nickell, L. G., & Maretzki, A. (1977). Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*, 3-17.
42. Taghizadeh, M., Kafi, M., & Ftahi Moghadam, M. R. (2015). Breeding by In vitro Culture to Improve Tolerance and Accumulation of Lead in *Cynodon Dactylon* L. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *17*, 1851-1860.
43. Chekol, T., & Vough, L. R. (2001). A Study of the Use of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) for the Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil. *Remediation Journal*, *11*(4), 89-101.
44. Singh, A., Eapen, S., & Fulekar, M. H. (2009). Potential of *Medicago sativa* for uptake of cadmium from contaminated environment. *Romanian Biotechnology Letters*, *14*(2), 4164-4169.
45. Niu, Z. X., Sun, L. N., Sun, T. H., Li, Y. S., & Hong, W. A. N. G. (2007). Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of environmental sciences*, *19*(8), 961-967.
46. Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, *19*(4), 1357-1361

47. Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J. G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H. E., Santiago, P., & Yacaman, M. J. (2002). Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano letters*, 2(4), 397-401
48. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
49. Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
50. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
51. Precipitation Reactions. (sin fecha). Recuperado el 18 de Mayo de 2017 de: faculty.ncc.edu.
52. Strasburger E., Noll F., et.al. (2002). Tratado de Botánica. Platón, Barcelona, España: Ediciones Omega.
53. Salisbury F., Ross C., et.al. (2000). Fisiología de las Plantas. España: Thomson Editores.
54. Dalton, C. C., & Street, H. E. (1977). The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacia oleracea* L.) cells. *Plant Science Letters*, 10(2), 157-164.
55. Creche, J., Rideau, M., & Leclerc, J. C. (1994). Photosynthesis in callus cultures of *Choisya ternata* (Rutaceae). *Plant cell, tissue and organ culture*, 37(1), 9-14.
56. Terry, N. (1977). Photosynthesis, growth, and the role of chloride. *Plant Physiology*, 60(1), 69-75.
57. Ulrich, A., & Ohki, K. (1956). Chlorine, bromine and sodium as nutrients for sugar beet plants. *Plant physiology*, 31(3), 171.
58. Chapagain, B. P., Wiesman, Z., Zaccari, M., Imas, P., & Magen, H. (2003). Potassium chloride enhances fruit appearance and improves quality of fertigated greenhouse tomato as compared to potassium nitrate. *Journal of plant nutrition*, 26(3), 643-658.
59. Baker, A. J. M., & Walker, P. (1989). Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 1(1), 7-17.
60. Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4), 523-544.
61. Kim, E., Kim, S. H., Kim, H. C., Lee, S. G., Lee, S. J., & Jeong, S. W. (2011). Growth inhibition of aquatic plant caused by silver and titanium oxide nanoparticles. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(1), 1-6.
62. John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S. (2012). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, 3(3), 65-76.
63. Woolhouse, H. W. (1983). Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In *Physiological plant ecology III* (pp. 245-300). Springer Berlin Heidelberg.
64. Cheng, S. (2003). Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(4), 256-264.

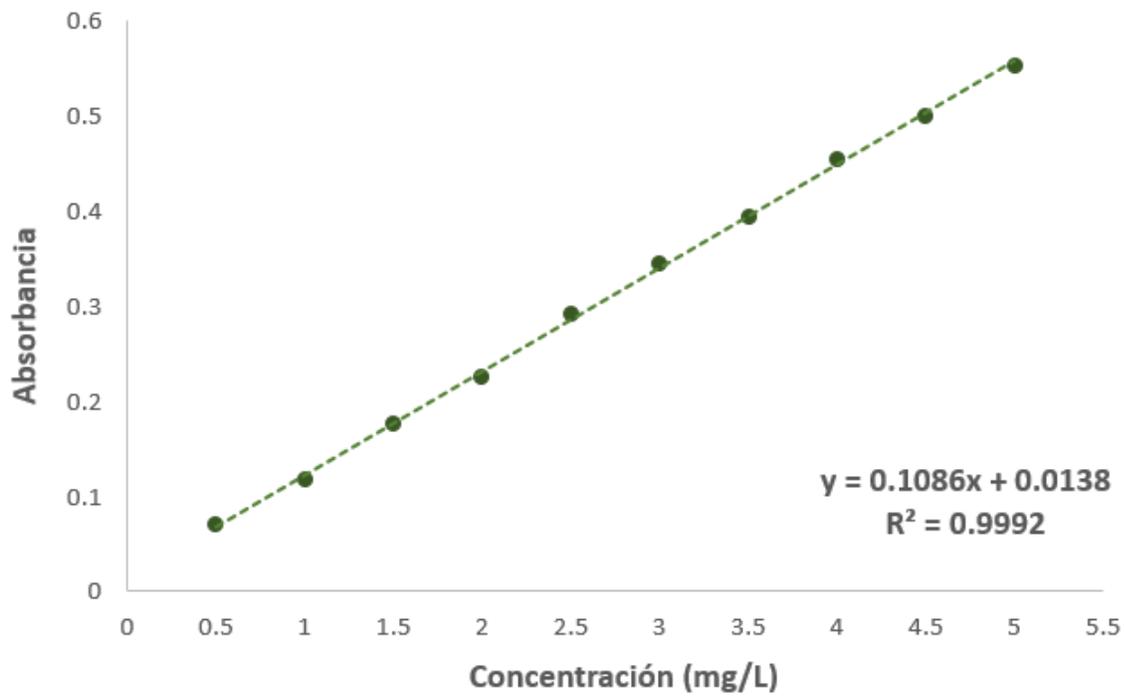
65. Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366), 1-11.
66. Ashraf, M., Ozturk, M. A., & Ahmad, M. S. A. (2010). *Plant adaptation and phytoremediation*. New York, NY: Springer.
67. Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., & Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*, 25(9), 1947-1956.
68. Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., & Parsons, J. G. (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology*, 66(6), 727-734.
69. Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews*, 7(1), 1-7.
70. Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., & Barceló, J. (2013). Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant science*, 212, 15-25.
71. Assche, F. V., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment*, 13(3), 195-206.
72. Stegemeier, J. P., Schwab, F., Colman, B. P., Webb, S. M., Newville, M., Lanzirrotti, A., ... & Lowry, G. V. (2015). Speciation matters: Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental science & technology*, 49(14), 8451-8460.
73. Harris, A. T., & Bali, R. (2008). On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(4), 691-695.
74. Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4), 1357-1361.
75. Lee, W. M., Kwak, J. I., & An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), 491-499.
76. Bell, R. A., & Kramer, J. R. (1999). Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: Critical review. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(1), 9-22
77. Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4).
78. Posmyk, M. M., Kontek, R., & Janas, K. M. (2009). Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 596-602.
79. Zagoskina, N. V., Goncharuk, E. A., & Alyavina, A. K. (2007). Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(2), 237-243.

80. Posmyk, M. M., Kontek, R., & Janas, K. M. (2009). Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 596-602.
81. Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., & Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4), 985-999.
82. Parry, A. D., Tiller, S. A., & Edwards, R. (1994). The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant physiology*, 106(1), 195-202.
83. Verstraeten, S. V., Keen, C. L., Schmitz, H. H., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2003). Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(1), 84-92.
84. Diwan H., Khan I., Ahmad A., Iqbal M. 2010. Induction of phytochelatins and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regulation*. 61: 10725-010-9454-0.
85. Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.
86. Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481-494.
87. Walker, K. A., Wendeln, M. L., & Jaworski, E. G. (1979). Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction processes from differentiation processes. *Plant Science Letters*, 16(1), 23-30.
88. Halperin, W. (1965). Alternative morphogenetic events in cell suspension culture. *Am J Bot*, 53, 443-453.
89. Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.
90. Saunders, J. W., & Bingham, E. T. (1975). Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. *American Journal of Botany*, 850-855.
91. Saunders, J. W., & Bingham, E. T. (1972). Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Science*, 12(6), 804-808.
92. Walker, K. A., Yu, P. C., Sato, S. J., & Jaworski, E. G. (1978). The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured in vitro. *American journal of botany*, 654-659.
93. Walker, K. A., & Sato, S. J. (1981). Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 1(1), 109-121.
94. Halperin, W. (1969). Morphogenesis in cell cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 20(1), 395-418

## 10. Anexos

### Anexo 1.

Curva patrón empleada para la cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos realizados a los cultivos de *M. sativa* expuesto a concentraciones crecientes de Ag.



**Anexo 2.**

Formulación original del medio Murashige & Skoog.

<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentración final mg/L</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170

<b>Micronutrientes</b>	<b>mg/L</b>
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
NaMoO <sub>5</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025

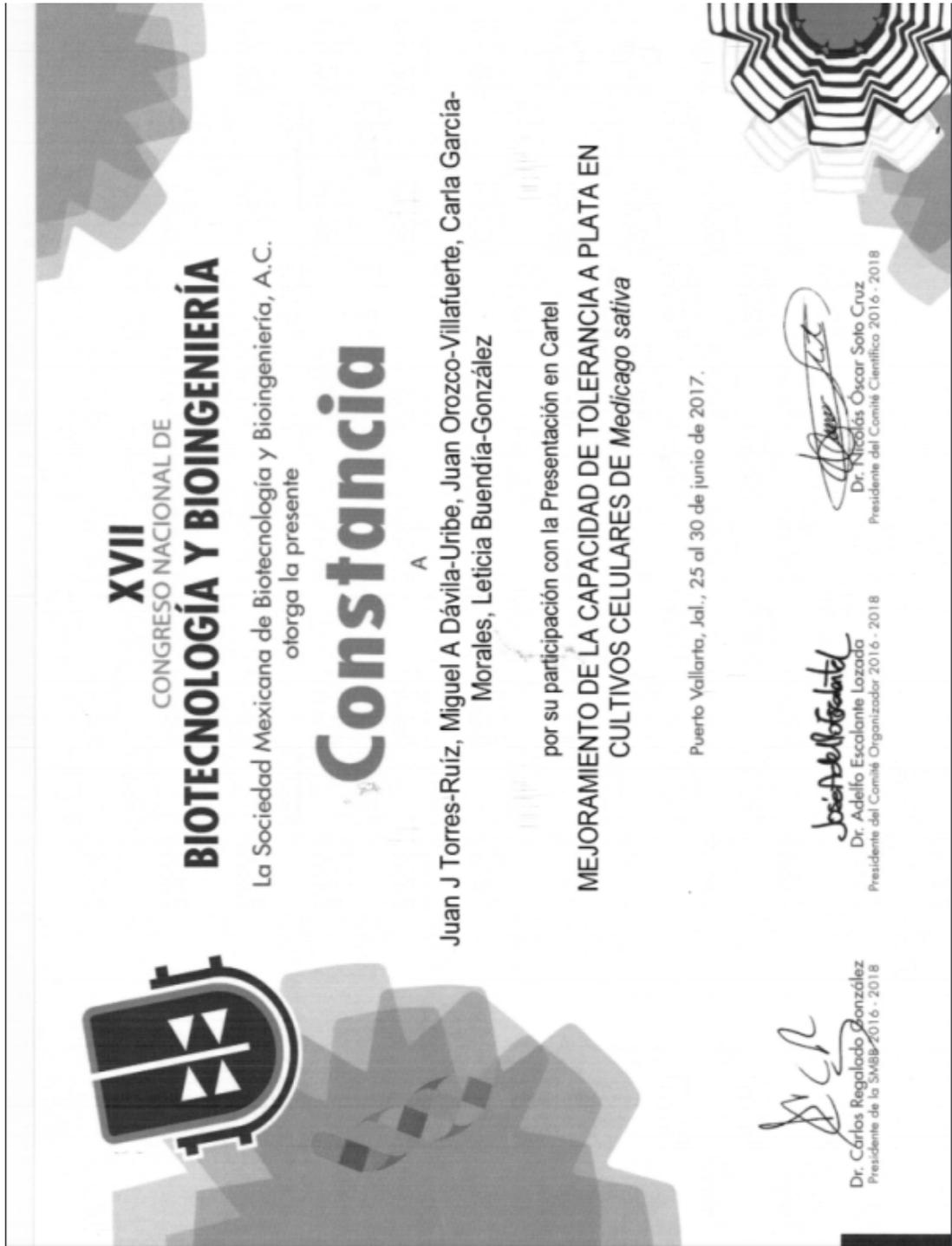
<b>Fe-EDTA</b>	<b>mg/L</b>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8

<b>Vitaminas</b>	<b>mg/L</b>
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2.0
Mioinositol	1000

Anexo 3.

Presentación de cartel en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.



Anexo 4.

Presentación de cartel en el 10º Encuentro Nacional de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional.



**Instituto Politécnico Nacional**  
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos

1936-2016  
**ANOS IPN**  
"La Técnica al Servicio de la Patria"

RED de Biotecnología

Otorga el presente reconocimiento a:  
**Juan J Torres-Ruiz, Miguel A Dávila-Urbe, Carla García-Morales,  
Juan Orozco-Villafuerte y Leticia Buendía-González**  
por la presentación del trabajo titulado:  
**Incremento de la tolerancia de Medicago sativa al estrés por Ag**  
**en el 10º Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN**

Llevado a cabo en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos del 26 al 28 de octubre  
Cuernavaca, Morelos., 28 de octubre de 2016

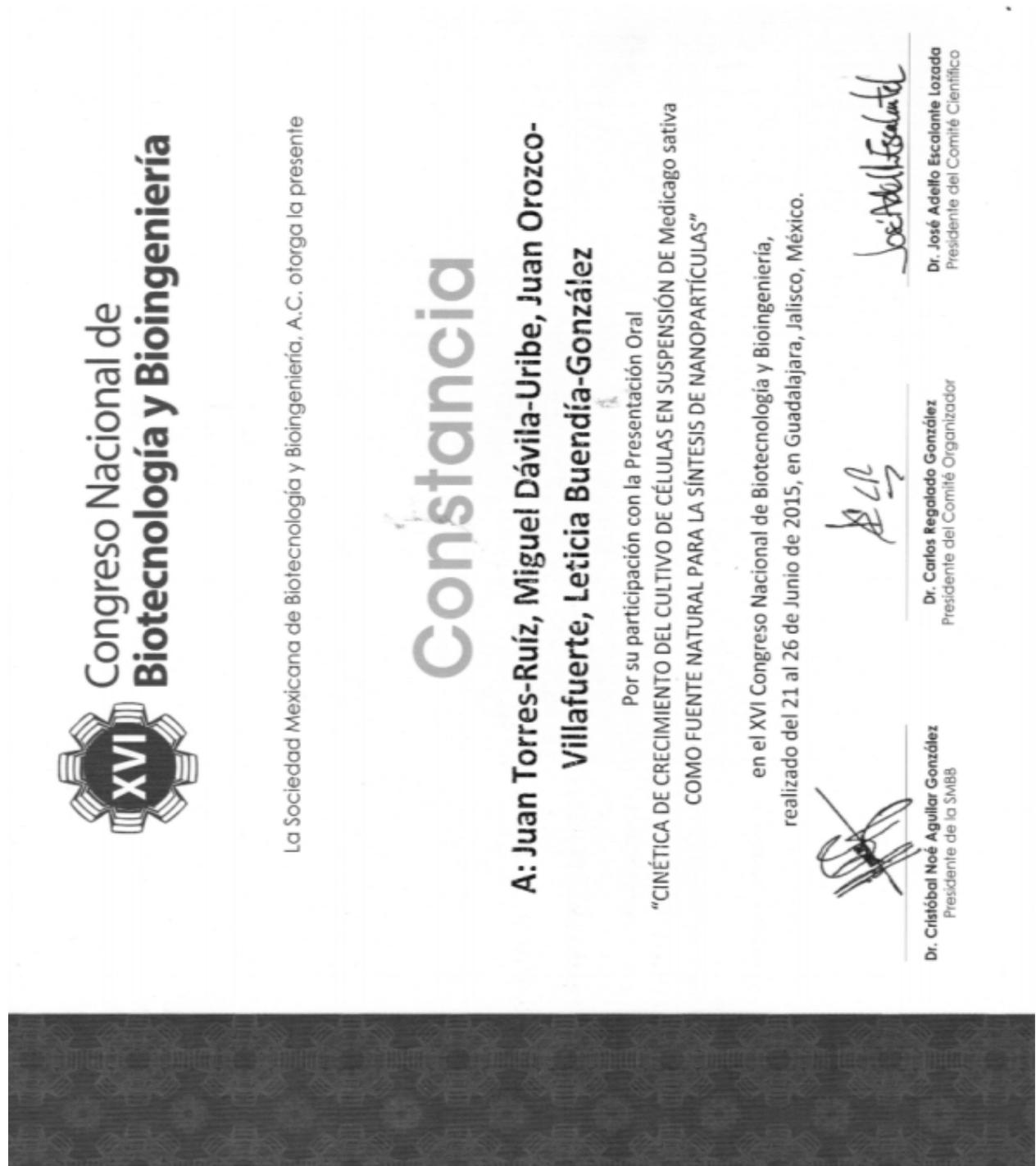
**Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo**  
Coordinadora Red de Biotecnología del IPN

**Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio**  
Director - CEPROBI-IPN

**Dra. Alma Leticia Martínez Ayala**  
Coordinadora del Encuentro

Anexo 5.

Presentación oral en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.



La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. otorga la presente

# Constancia

**A: Juan Torres-Ruiz, Miguel Dávila-Urbe, Juan Orozco-Villafuerte, Leticia Buendía-González**

Por su participación con la Presentación Oral

**“CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE Medicago sativa  
COMO FUENTE NATURAL PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS”**

en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,  
realizado del 21 al 26 de Junio de 2015, en Guadalajara, Jalisco, México.

**Dr. Cristóbal Noé Aguilar González**  
Presidente de la SMBB

**Dr. Carlos Regalado González**  
Presidente del Comité Organizador

**Dr. José Adolfo Escalante Lozada**  
Presidente del Comité Científico

Anexo 6.

Presentación de cartel en las Terceras Jornadas de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México.



Anexo 7.

Presentación de cartel en las XIV Jornadas de las Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
a través de la  
**DES DE CIENCIAS NATURALES**  
otorgan el presente

# Reconocimiento

**A: Dávila-Urbe Miguel Ángel, Torres-Ruiz Juan José, Orozco-Villafuerte Juan, Hernández-Jaimes Carmen, Buendía-González Leticia**

Por su participación en el cartel :

**EFFECTO DE Au Y Ag EN EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Medicago sativa*, en la XXIX Semana de Investigación "Dr. J. Félix Frijas Sánchez" XIV Jornadas de las Ciencias Biológicas y Encuentro de Estudiantes de Ciencias Naturales**

**Por una humanidad culta**

**Biól. Juan Carlos Sandoval Manrique**  
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

U. A. E. M.  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Cuernavaca, Morelos Septiembre de 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Dependencia de Educación Superior de Ciencias Naturales