

**Análisis *in vitro* de la acumulación de metales pesados en plantas de la familia *Asparagaceae* tolerantes a la baja disponibilidad de agua**

***In vitro* analysis of the accumulation of heavy metals in plants of the family *Asparagaceae* tolerant to low water availability**

Lucila Perales Aguilar<sup>1</sup>

Ma. del Socorro Santos Díaz<sup>2</sup>

Yenny Adriana Gómez Aguirre<sup>1</sup>

Magdalena Samantha Ramos Gómez<sup>3</sup>

Eugenio Pérez Molphe Balch<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Química

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Fisiología y Farmacología

Autor para correspondencia: Eugenio Pérez Molphe Balch, E-mail: eperezmb@correo.uaa.mx

## **Resumen**

**Introducción:** La familia *Asparagaceae* incluye varios géneros adaptados para sobrevivir a altas temperaturas y con baja disponibilidad de agua. Entre éstos destacan *Agave*, *Beaucarnea*, *Dasylyrion*, *Nolina* y *Yucca*. México cuenta con una gran biodiversidad de estos grupos vegetales, así como con una tradición ancestral en cuanto a su uso. Los sistemas de propagación *in vitro* son eficientes para la producción de estas plantas, y además pueden ser usados para llevar a cabo diversos tipos de estudios. Entre estos, están los estudios de tolerancia a metales pesados, los cuales pueden servir para determinar qué especies son aptas para la reforestación y regeneración de áreas contaminadas por actividades mineras.

**Método:** En este trabajo se propagaron *in vitro* 20 especies de la familia *Asparagaceae*, y se evaluó su proceso de enraizamiento en medios de cultivo adicionados con Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Pb y Zn. Se analizó el desarrollo de las raíces en presencia de estos metales y se determinó su

capacidad de absorberlos mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama. Con estos datos se calcularon los factores de translocación y bioacumulación con el fin de caracterizar la respuesta de cada especie ante los metales pesados.

**Resultados:** El mayor número de brotes se presentó en las especies *Beaucarnea recurvata* con 5.7 y *Nolina durangensis* con 5.6 brotes por explante, respectivamente. El tratamiento con cromo fue tóxico para la mayoría de las especies. *Agave celsii*, *A. chiapensis*, *A. obscura*, *A. palmeri* y *A. salmiana* formaron raíz en todos los tratamientos con metales. De acuerdo a los factores de translocación y bioacumulación las especies analizadas se clasificaron como fitoestabilizadoras, exclusoras, bioacumuladoras e indicadoras. Las especies *A. chiapensis*, *A. obscura* y *A. palmeri* fueron bioacumuladoras para Mn. *A. celsii* y *A. salmiana* presentaron mecanismos de fitoestabilización y exclusión.

**Conclusión:** La propagación *in vitro* permite generar grandes cantidades de plantas y además estudiar sus respuestas ante la presencia de contaminantes. El género *Agave* mostró ser tolerante a los metales, por lo que se puede usar para fitoestabilizar y remediar suelos contaminados.

**Palabras clave:** *Agave*; exclusión; fitoestabilización; metales pesados; propagación *in vitro*

## Abstract

**Introduction:** The Asparagaceae family includes several genera adapted to survive at high temperatures and with low water availability. These include *Agave*, *Beaucarnea*, *Dasyilirion*, *Nolina* and *Yucca*. Mexico has a great biodiversity in these plant groups, as well as an ancestral tradition regarding its use. *In vitro* propagation systems are efficient for the production of these plants and can be used to perform various types of studies. Among these are the studies of tolerance to heavy metals, which can serve to determine which species are suitable for reforestation and regeneration of areas contaminated by mining activities.

**Method:** In this work, 20 species of the family Asparagaceae were propagated *in vitro* and their rooting process was evaluated in culture media added with Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Pb and Zn. The development of roots in the presence of these metals was analyzed and its absorption capacity was determined by flame atomic absorption spectrophotometry. With these data, translocation and bioaccumulation factors were calculated in order to characterize the response of each species to heavy metals.

**Results:** The highest number of shoots occurred in the species *Beaucarnea recurvata*, which generated 5.7 shoots per explant and *Nolina durangensis* with 5.6. Chromium treatment was toxic for most species. *Agave celsii*, *A. chiapensis*, *A. obscura*, *A. palmeri* and *A. salmiana* formed roots in all treatments. According to translocation and bioaccumulation factors, the analyzed species were classified as phytostabilizers, excludors, bioaccumulators and indicators. The species *A. chiapensis*, *A. obscura* and *A. palmeri* were bioaccumulators for Mn. *A. celsii* and *A. salmiana* presented mechanisms of phytostabilization and exclusion.

**Conclusion:** *In vitro* propagation allows to work and study a wide range of species in the presence of contaminants. The *Agave* genus is tolerant to metals and can be used to phytostabilize and remediate contaminated soils.

**Keywords:** *Agave*; exclusion; heavy metals; *in vitro* propagation; phytostabilization

Recibido en: 15-07-2019

Aceptado en: 04-11-2019

## Introducción

Las zonas áridas, semiáridas y subhúmedas representan el 41% de la superficie del mundo, y albergan el 20% de la diversidad vegetal (Bran y Gaitán, 2012). México no es la excepción en este sentido, y este tipo de ecosistemas ocupan la mayor parte del territorio. Esto ha convertido a nuestro país en uno de los mayores centros de distribución de especies vegetales adaptadas a estas condiciones. La familia *Asparagaceae* agrupa a varios géneros de gran importancia, como *Agave*, *Beaucarnea*, *Dasyllirion*, *Nolina* y *Yucca*, mismos que incluyen una gran cantidad de especies endémicas. Muchas de estas especies se encuentran bajo protección especial, amenazadas, o en peligro de extinción, debido a la sobreexplotación y destrucción de su hábitat (Eguiarte *et al.*, 2013; Encina-Domínguez *et al.*, 2013; Magallán-Hernández *et al.*, 2014).

Por otro lado, estos grupos vegetales han sido aprovechados desde la época prehispánica debido a sus innumerables usos. Son fuente de alimentos, bebidas, fibras y materias primas para

la elaboración de artesanías. Recientemente se les han encontrado usos no tradicionales, como la producción de compuestos químicos de alto valor, edulcorantes y biocombustibles, lo que le confiere más importancia a su conservación y uso racional (García *et al.*, 2017). En este sentido, la propagación *in vitro* es una herramienta útil para la conservación de especies de estos grupos. Esta metodología consiste en la rápida multiplicación de plantas mediante el uso de medios de cultivo artificiales adicionados con reguladores de crecimiento en un ambiente controlado (fotoperiodo y temperatura), todo bajo condiciones axénicas.

La propagación *in vitro* permite también evaluar de una manera más sencilla y controlada la capacidad de respuesta de las plantas ante diversos factores de estrés, por ejemplo la presencia de metales pesados. Esto debido a que los mismos pueden ser incorporados al medio de cultivo en cantidades precisas con el fin de analizar la respuesta de la planta ante los mismos (Di Lonardo *et al.*, 2011; Ashrafzadeh y Leung, 2015). De esta forma pueden estudiarse los diversos mecanismos de tolerancia a los metales tales como sistemas antioxidantes, unión de moléculas orgánicas con el metal, fitoestabilización, exclusión y acumulación (Srivastava, 2016; Sruthi *et al.*, 2017).

De acuerdo con el mecanismo de tolerancia que posean, las plantas pueden clasificarse en las siguientes categorías: a) Bioacumuladoras. También conocidas como hiperacumuladoras. Toman el metal a través de la raíz y lo translocan a la parte aérea en donde se acumula y alcanza concentraciones mayores a las del suelo, esto sin mostrar síntomas de toxicidad. Estas plantas pueden ser usadas para la biorremediación ya que pueden remover los metales del suelo. b) Fitoestabilizadoras. Estas plantas toman y acumulan el metal en la raíz, pero sin translocarlo a la parte aérea. Este mecanismo también es útil para la biorremediación ya que fija los metales pesados impidiendo su lixiviación y posterior llegada a los cuerpos de agua (Memon *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2017). c) Excluseras. No permiten la entrada de los metales a la raíz, esto a través de la excreción de compuestos orgánicos que forman complejos con los metales en el suelo. d) Indicadoras. Permiten el paso del metal a través de la raíz y su llegada a la parte aérea, alcanzando concentraciones en sus tejidos similares a las presentes en el suelo. Suelen presentar síntomas visibles que son proporcionales a la cantidad de metal presente en el suelo (Baker and Brook 1989; Tosié *et al.*, 2016).

Existe elevada vulnerabilidad en los ecosistemas de zonas áridas a las actividades mineras, mismas que contaminan el suelo con metales pesados afectando su potencial ecológico y

biológico, llegando a la degradación y posteriormente a la pérdida del suelo (Alipur *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018). El *Agave americana* tiene mecanismos de exclusión para Cr debido a que se acumula principalmente en las raíces por lo que tiene un enorme potencial de fitoestabilización de Cr (Ramana *et al.*, 2016). Los *Agaves*, y otros géneros relacionados, son elementos clave para la estructura y funcionamiento de los ecosistemas de las zonas áridas y semiáridas, por lo que es importante conocer su respuesta ante la presencia de metales pesados en el suelo. El contar con plantas de zonas áridas y semiáridas tolerantes a metales permitiría utilizar estas especies para procesos de rehabilitación de áreas contaminadas (Solanki y Dhankhar, 2011). El objetivo de este estudio fue analizar la susceptibilidad de especies de la familia *Asparagaceae* tolerantes a la baja disponibilidad de agua ante los metales pesados Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Pb y Zn en condiciones *in vitro*.

## **Materiales y Métodos**

### **Material vegetal**

Se seleccionaron 20 especies de la familia *Asparagaceae* de talla mediana y grande, que pudieran ser usadas en la restauración de ecosistemas contaminados por metales pesados. Los tejidos se tomaron del Banco de Germoplasma *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), México. Las especies seleccionadas fueron: *Agave bracteosa* S. Watson ex Engelm, *A. celsii* Hook., *A. chiapensis* Jacobi, *A. difformis* A. Berger, *A. funkiana* K. Koch & C. D. Bouché, *A. obscura* Schiede ex Schltdl., *A. palmeri* Engelm, *A. peacockii* Croucher, *A. potatorum* Zucc., *A. victoria-reginae* T. Moore, *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *A. titanota* Gentry, *Beaucarnea goldmanii* Rose, *B. recurvata* Lem., *Dasylyrion acrotriche* (Shiede) Zucc., *D. glaucophyllum* Hook., *Nolina durangensis* Trel., *Yucca carnerosana* (Trel.) Mckelvey, *Y. filamentosa* L. y *Y. filifera* Chabaud.

## **Propagación *in vitro* del material vegetal**

Se usaron plántulas generadas *in vitro*, de las cuales se eliminó la parte apical de las hojas para obtener un explante basal. Se colocaron cuatro explantes en frascos de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio Murashige y Skoog, (MS) (1962), pH de 5.7 con 3% (w/v) de sacarosa y 8 g L<sup>-1</sup> de agar como gelificante. Se adicionaron 2 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) para los géneros *Agave* y *Yucca*, para el resto de las especies se usó el mismo medio pero adicionados con 2.5 mg L<sup>-1</sup> de BA. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C, con fotoperiodo de 18/6. A los tres meses se cuantificó el número de brotes generados y su longitud, con una n=16 (explantes). Los brotes generados se utilizaron en las fases posteriores del estudio.

### **Enraizamiento de brotes *in vitro* y análisis de la susceptibilidad a los metales pesados**

Los brotes obtenidos en la etapa de propagación se transfirieron a medio MS sin metales (control) o en medio MS conteniendo metales pesados para su enraizamiento. Las concentraciones de metales seleccionados fueron a) 0.005 mM de CdCl<sub>2</sub>; b) 0.2 mM de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; c) 1 mM de KCr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; d) 1 mM de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; e) 0.4 mM de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; f) 1.6 mM de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y g) 0.48 mM de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, todas las sales presentaban 99% de pureza, de grado de reactivo y marca SIGMA. Las concentraciones de metales a probar se seleccionaron de acuerdo a lo reportado en la literatura (Gatti, 2008; Ayari *et al.*, 2010; Perveen y Anis, 2012; Wiszniewska *et al.*, 2017). Se incluyeron tres brotes por tratamiento con tres réplicas. Los brotes se mantuvieron a 25 ± 2 °C, con fotoperiodo de 18/6. Después de dos meses de iniciado el experimento se registraron los datos de supervivencia y enraizamiento de los brotes. Posteriormente, las plántulas que

sobrevivieron y generaron raíz se sacaron del recipiente de cultivo y las raíces se lavaron cuidadosamente para eliminar restos de medio. Las plántulas fueron fotografiadas con una cámara SONY® de 20.1 megapíxeles y las fotografías fueron analizadas con el procesador de imágenes Imagen Java 1.46 , que determina la posición de puntos específicos por lo que se puede calcular el área de las raíces desarrolladas para conocer el efecto de los metales. Los datos antes descritos se analizaron con un ANOVA,  $n=9$  y prueba de Dunnett ( $P \leq 0.05$ ) usando el paquete estadístico GraphPad Prism 7.09.

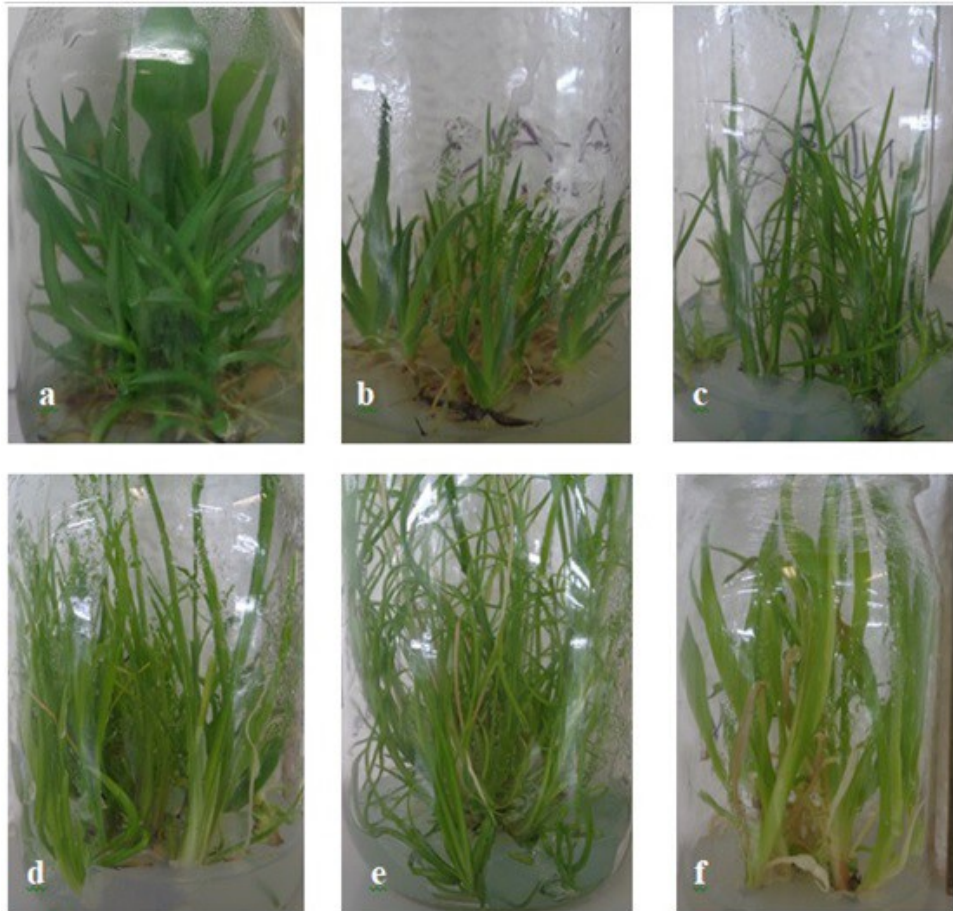
## **Cuantificación de metales pesados**

Se seleccionaron sólo las especies que desarrollaron raíz en todos los tratamientos con metales pesados. Las plantas generadas *in vitro* se dividieron en parte aérea y raíz, que se liofilizaron (liofilizador Freezone® 4.5 Labconco). Las muestras se homogenizaron con el equipo TissueLyser II QIA GEN® y se digirieron por 24 horas con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) aforando a un volumen de 30 mL. La cuantificación de metales pesados se realizó por absorción atómica (espectrofotómetro PerkinElmer, Atomic Absorption Spectrometer, PineAACLE900H). Para evaluar la exactitud de la medición se incluyó un blanco (mezcla sin muestra); un estándar (metal conocido); un fortificado (metal conocido + muestra); no fortificado (muestra); duplicado uno (muestra); y duplicado dos (muestra), con una  $n=3$ . El factor de translocación (TF) se calculó dividiendo la concentración del metal de la parte aérea entre la concentración del metal de la raíz y el factor de bioacumulación (BAC) se calculó dividiendo la concentración del metal en el tejido (parte aérea) entre la concentración del metal en el medio de cultivo (Chang-Kee *et al.*, 2018).

## **Resultados**

## Propagación *in vitro* del material vegetal

Todas las especies generaron brotes de 2 a 8 cm de longitud después de los 3 meses de cultivo. *B. recurvata* fue la especie que generó el mayor número de brotes con 5.7 brotes en promedio por explante, seguido por *N. durangensis* con 5.6 brotes, *D. glaucophyllum* y *Agave obscura* con 4.4 brotes (Fig. 1). Las especies que generaron el menor número de brotes fueron *A. palmeri*, *A. peacockii* y *A. difformis* con 2 brotes por explante. En la Fig. 1 se muestra el aspecto los brotes generados.



**Fig. 1.** Generación de brotes *in vitro* en seis de las especies incluidas en el estudio.

**a)** *Agave celsii*; **b)** *A. obscura*; **c)** *Beaucarnea recurvata*; **d)** *Dasyilirion glaucophyllum*; **e)** *Nolina durangensis*; **f)** *Yucca filifera*.

**Fig. 1.** *In vitro* generation of shoots in six of the species included in the study.



a) *Agave celsii*; b) *A. obscura*; c) *Beaucarnea recurvata*; d) *Dasyllirion glaucophyllum*; e) *Nolina durangensis*; f) *Yucca filifera*.

## Enraizamiento de brotes *in vitro* y análisis de la susceptibilidad a los metales pesados

La supervivencia de las especies evaluadas durante el enraizamiento es un indicador directo de su sensibilidad ante el tóxico (susceptibilidad). La supervivencia de las especies estudiadas fue alta, oscilando entre 80 y 95%. La supervivencia fue mayor en el medio con Mn, y disminuyó en el siguiente orden: Cu > Zn > Cd > Fe > Pb > Cr. El tratamiento con cromo generó los porcentajes más bajos de supervivencia de las especies analizadas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Supervivencia de las especies evaluadas expuestas a metales pesados en la etapa de enraizamiento.

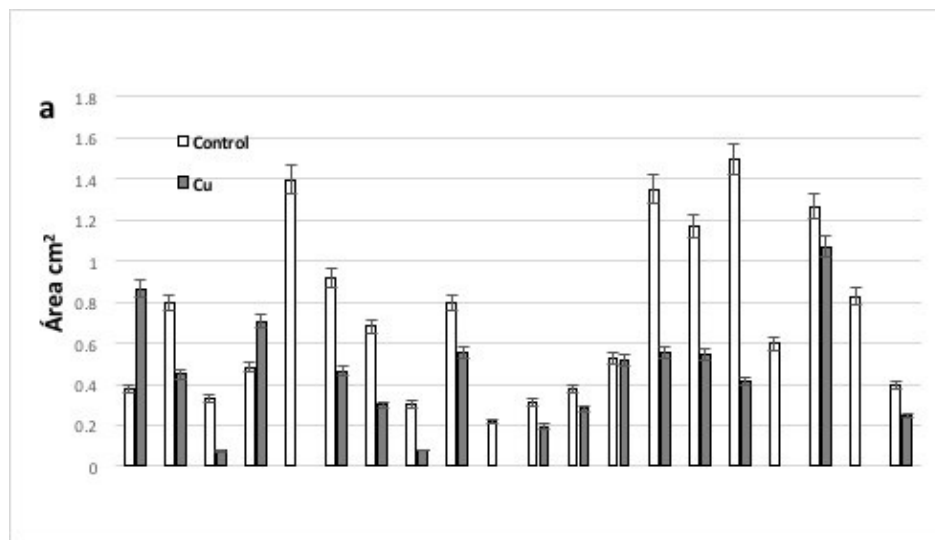
**Table 1.** Survival of the evaluated species exposed to heavy metals in the rooting stage.

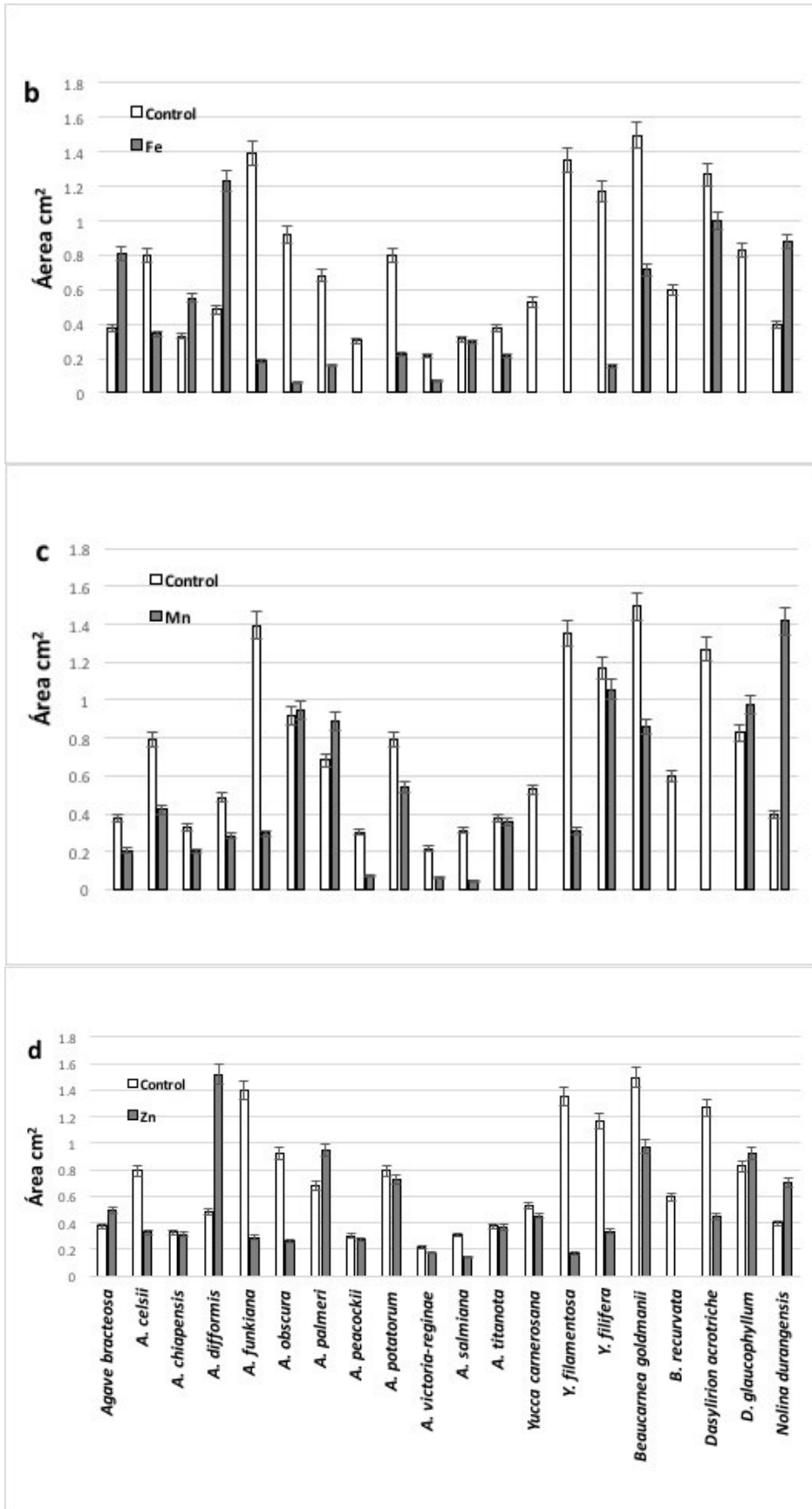
Familia	Control	Cd	Cu	Cr	Fe	Mn	Pb	Zn
<i>Asparagaceae</i>	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1. <i>A. bracteosa</i>	93.3 ± 0.6	96.7 ± 2.1	93 ± 5.2	78.3 ± 16.1	96 ± 5.2	60 ± 24*	79 ± 13.5	77.7 ± 13.7
2. <i>A. celsii</i>	100 ± 0	97.7 ± 2.3	99.3 ± 0.6	60.3 ± 35.4*	97.7 ± 1.5	96.3 ± 5.5	97.7 ± 1.5	97.7 ± 1.5
3. <i>A. chiapensis</i>	99.3 ± 0.6	98.3 ± 0.6	90.7 ± 1.2	66.3 ± 3.5*	98 ± 1.7	95 ± 1.7	96.7 ± 2	97 ± 1.7
4. <i>A. difformis</i>	100 ± 0	97.3 ± 1.5	93.3 ± 5.8	70 ± 10*	97.3 ± 2.1	96 ± 3	99.3 ± 0.6	96.9 ± 1.6
5. <i>A. funkiana</i>	99 ± 0	97 ± 1.7	94 ± 1.7	36.3 ± 15*	92 ± 3.5	98.3 ± 1.2	89.7 ± 3.5	97.7 ± 0.6
6. <i>A. obscura</i>	100 ± 0	98.3 ± 0.6	96 ± 5.3	85 ± 6.2	90.7 ± 1.2	98.7 ± 1.3	88 ± 19	97 ± 1.7
7. <i>A. palmeri</i>	100 ± 0	97.3 ± 1.2	96.3 ± 5.5	82.7 ± 4.6*	98.7 ± 0.6	97 ± 2	82.7 ± 4.6*	93 ± 5.2
8. <i>A. peacockii</i>	100 ± 0	97.7 ± 1.5	99.3 ± 0.6	73 ± 3*	98.3 ± 0.6	98.7 ± 0.6	94.7 ± 4.5	97 ± 1.7
9. <i>A. potatorum</i>	98.3 ± 2.1	98.3 ± 0.6	92 ± 10.6	50 ± 5*	97.7 ± 1.5	99 ± 1	99.3 ± 0.6	93.7 ± 9.2
10. <i>A. victoria-reginae</i>	100 ± 0	96 ± 1.7	97.7 ± 1.5	65 ± 8.5*	98.3 ± 1.2	99.3 ± 0.6	98.7 ± 0.6	97.7 ± 1.5
11. <i>A. salmiana</i>	100 ± 0	99.7 ± 0.6	96.3 ± 5.5	89 ± 9.5*	97 ± 2	99.3 ± 0.6	98 ± 1	97.3 ± 1.2
12. <i>A. titanota</i>	100 ± 0	96.3 ± 1.5	82.7 ± 4.6*	62.7 ± 3.1*	97.7 ± 2.3	98 ± 1.7	97.7 ± 1.2	95 ± 4.6
13. <i>B. goldmanii</i>	99.3 ± 0.6	58.7 ± 12.5*	88.7 ± 2.3	31.7 ± 15.3*	66.3 ± 29.7	97 ± 1.7	78.3 ± 20.2	95 ± 1.7
14. <i>B. recurvata</i>	99.3 ± 0.6	60.7 ± 17.5*	90.7 ± 1.2	34.3 ± 24.9*	38.7 ± 13*	83.3 ± 5.8	71.7 ± 7.6	88.3 ± 4
15. <i>D. acrotriche</i>	98 ± 1.7	71.7 ± 9.8	72 ± 7.2	17.7 ± 6.8*	76.3 ± 20.3	98 ± 1.7	43.3 ± 26.3*	97 ± 1.7
16. <i>D. glaucophyllum</i>	99.7 ± 0.6	78 ± 36.4	79.3 ± 3.1	5 ± 5*	41 ± 21.5*	93 ± 3	66.3 ± 16.5	96 ± 3
17. <i>N. durangensis</i>	98 ± 1.7	47 ± 21.7*	95.7 ± 3.1	16.7 ± 12.6*	30.3 ± 8.4*	90.7 ± 5	36.3 ± 12.3*	66 ± 18.7

18. <i>Y. carnerosana</i>	95.7 ± 3.5	82 ± 13.9	76.7 ± 17.9	16.7 ± 7.7*	91 ± 1.7	89.7 ± 3.5	88.7 ± 2.3	55 ± 19.5*
19. <i>Y. filamentosa</i>	94 ± 1.7	84 ± 10.4	76.7 ± 3.1	35 ± 5*	63.3 ± 15.3	88 ± 7.2	42 ± 13.1*	78.3 ± 3
20. <i>Y. filifera</i>	97 ± 3.4	95 ± 1.7	60 ± 14.6	17.3 ± 6.8*	91 ± 1.7	89.7 ± 1.5	27.3 ± 15*	44.7 ± 12.3*

Media ± Desviación estándar n=9. Prueba Dunnet ( $P \leq 0.05$ ). \* Indica diferencia significativa.  
Mean ± Standard deviation n = 9. Dunnet test ( $P \leq 0.05$ ). \* Indicates significant difference.

En cuanto al efecto de los metales en el desarrollo del sistema radical, esto medido como área del mismo, se tuvieron estos resultados. Las siguientes especies presentaron mayor área radicular en los tratamientos con metales: en Cu *A. bracteosa* y *A. difformis*; en Fe *A. bracteosa*, *A. chiapensis*, *A. difformis* y *N. durangensis*; en Mn *A. obscura*, *A. palmeri*, *D. glaucophyllum* y *N. durangensis*; y en Zn *A. bracteosa*, *A. difformis*, *A. palmeri*, *D. glaucophyllum* y *N. durangensis*. Las especies que no desarrollaron raíz fueron en Cu *A. funkiana*, *A. potatorum*, *A. victoria-reginae* y *B. recurvata*; en Fe *A. peacockii*, *B. recurvata*, *D. glaucophyllum*, *Y. carnerosana* y *Y. filamentosa*; en Mn, *B. recurvata*, *D. acrotriche* y *Y. carnerosana* y en Zn *B. recurvata* (Fig. 2).

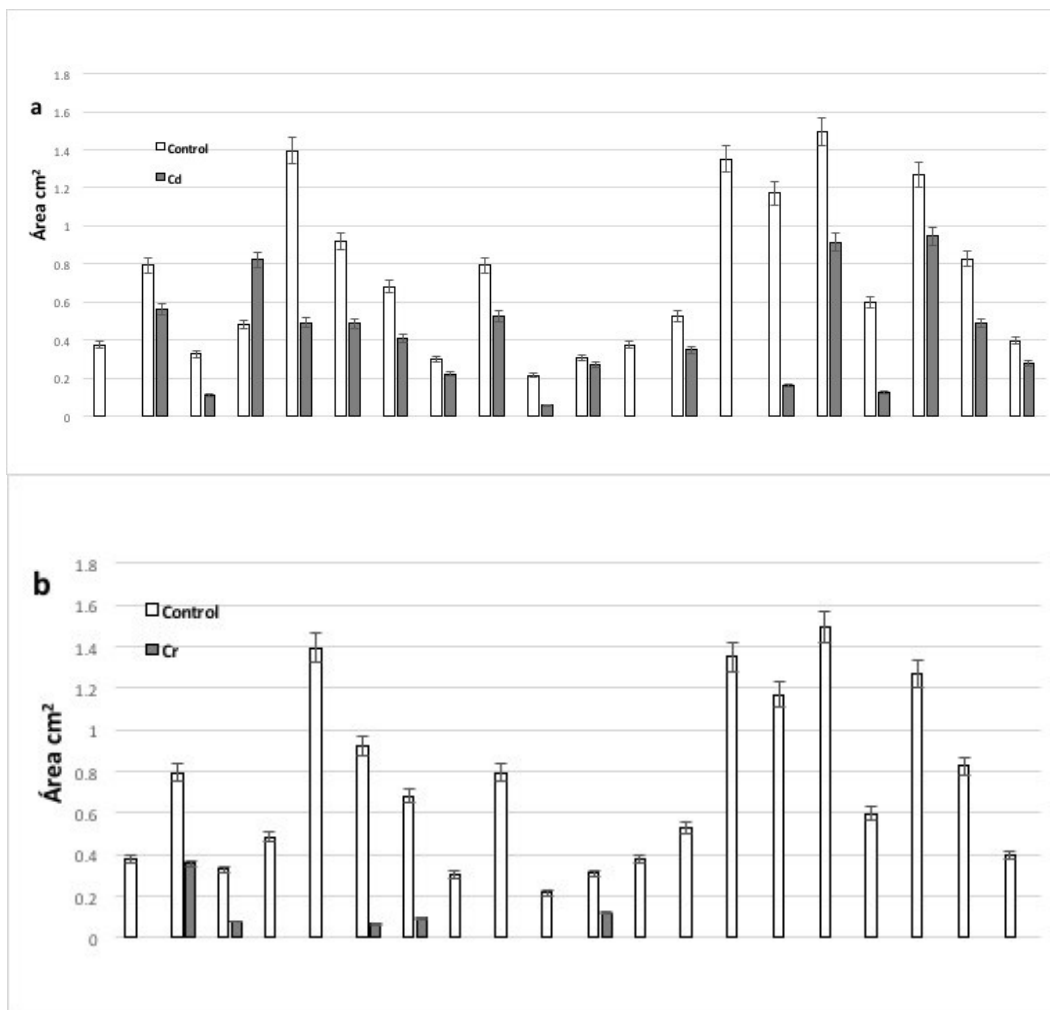




**Fig. 2.** Efecto de los metales en el desarrollo de las raíces de las especies analizadas en los tratamientos con **a) Cu<sup>+2</sup>; b) Fe<sup>+2</sup>; c) Mn<sup>+2</sup>; d) Zn<sup>+2</sup>.**

**Fig. 2.** Effect of metals on root development, measured as an area covered by the radical system, of the species analyzed in the treatments with **a) Cu<sup>+2</sup>; b) Fe<sup>+2</sup>; c) Mn<sup>+2</sup>; d) Zn<sup>+2</sup>.**

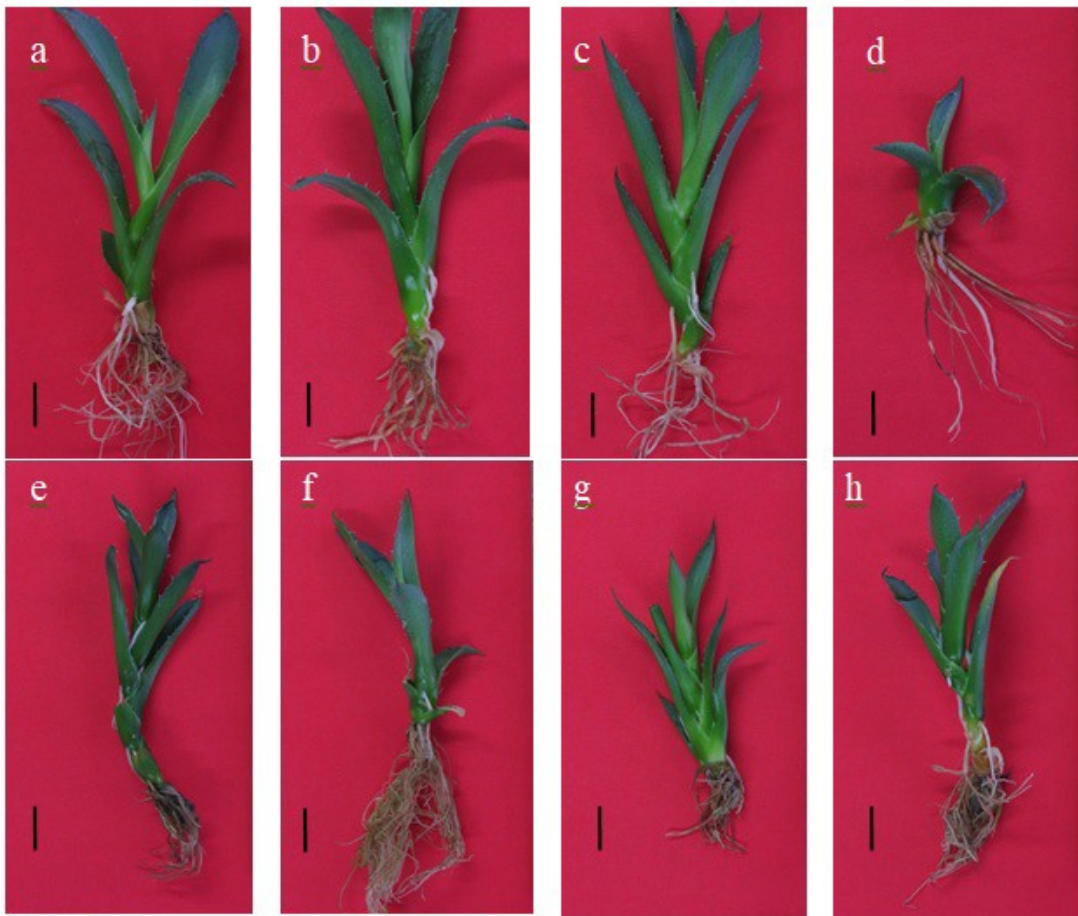
Las especies que presentaron mayor área radicular en el tratamiento con Cd fueron: *A. difformis* y en Pb *A. difformis* y *N. durangensis*. En el tratamiento con cromo solo cinco especies formaron raíz: *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. obscura*, *A. palmeri* y *A. salmiana*. Las especies que no formaron raíz en Cd fueron: *A. bracteosa*, *A. titanota* y *Y. filamentosa* y en el tratamiento con plomo *B. recurvata* y *Y. carnerosana* (Fig. 3).



**Fig. 3.** Efecto de los metales en el desarrollo de las raíces de las especies analizadas en los tratamientos con **a) Cd<sup>+2</sup>; b) Cr<sup>+2</sup>; c) Pb<sup>+2</sup>.**

**Fig. 3.** Effect of metals on root development, measured as an area covered by the radical system, of the species analyzed in the treatments with **a) Cd<sup>+2</sup>; b) Cr<sup>+2</sup>; c) Pb<sup>+2</sup>.**

La especie *A. palmeri* presentó menor biomasa de la parte aérea en el tratamiento con cromo; se observa una raíz más gruesa y menos abundante en comparación con el control. En el tratamiento con plomo se observa una menor longitud de las raíces en comparación con el resto de las especies (Fig. 4).

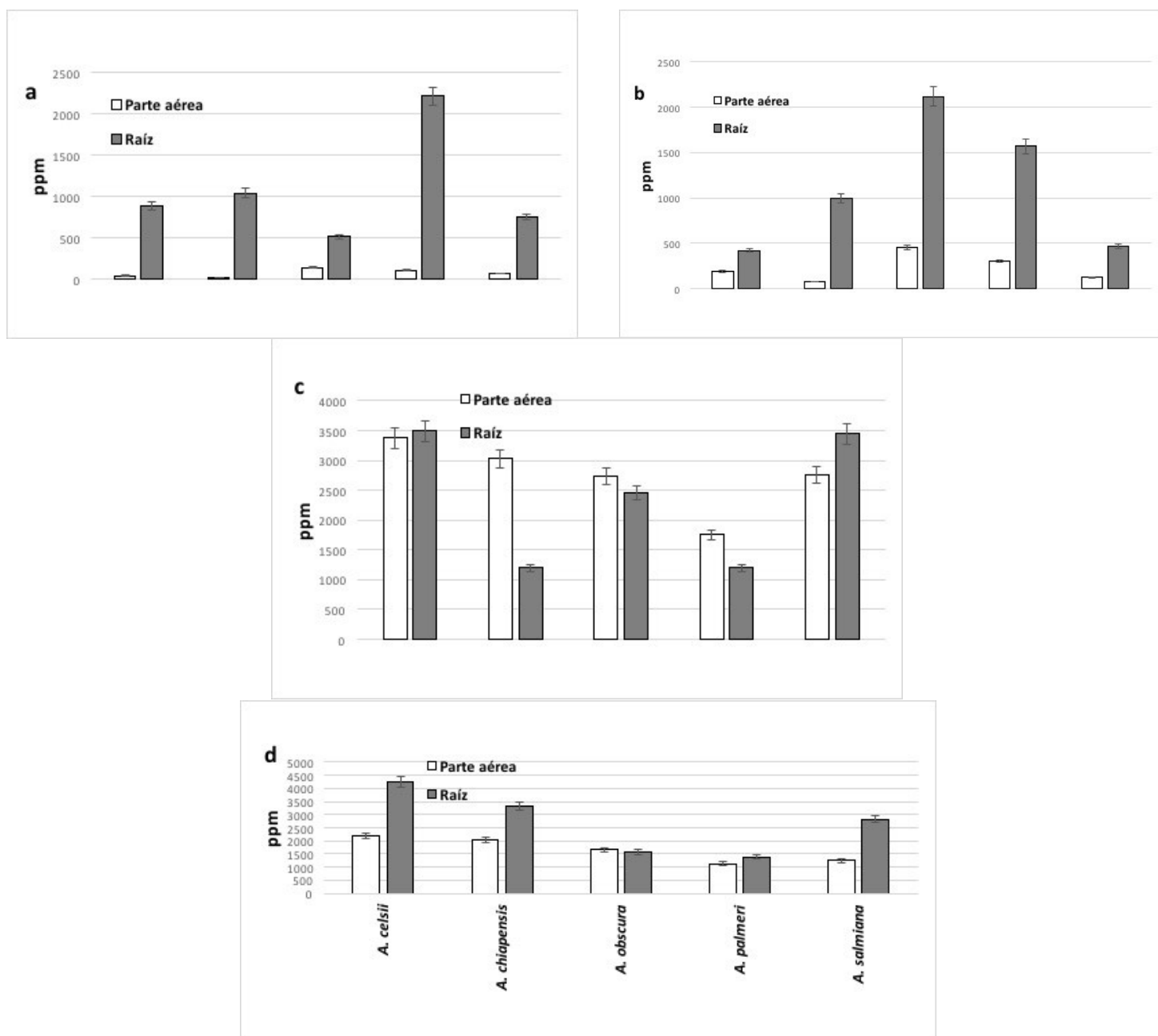


**Fig. 4.** Desarrollo de raíces en la especie *Agave palmeri* en los tratamientos. **a)** Control; **b)** Cd 0.005 mM; **c)** Cu 0.2 mM; **d)** Cr 1 mM; **e)** Fe 1 mM; **f)** Mn 1.6 mM; **g)** Pb 0.4 mM; **h)** Zn 0.48 mM. Escala 1 cm.

**Fig. 4.** Root development in *Agave palmeri* in treatments. **a)** Control; **b)** Cd 0.005 mM; **c)** Cu 0.2 mM; **d)** Cr 1 mM; **e)** Fe 1 mM; **f)** Mn 1.6 mM; **g)** Pb 0.4 mM; **h)** Zn 0.48 mM. 1 cm scale.

## Cuantificación de metales pesados

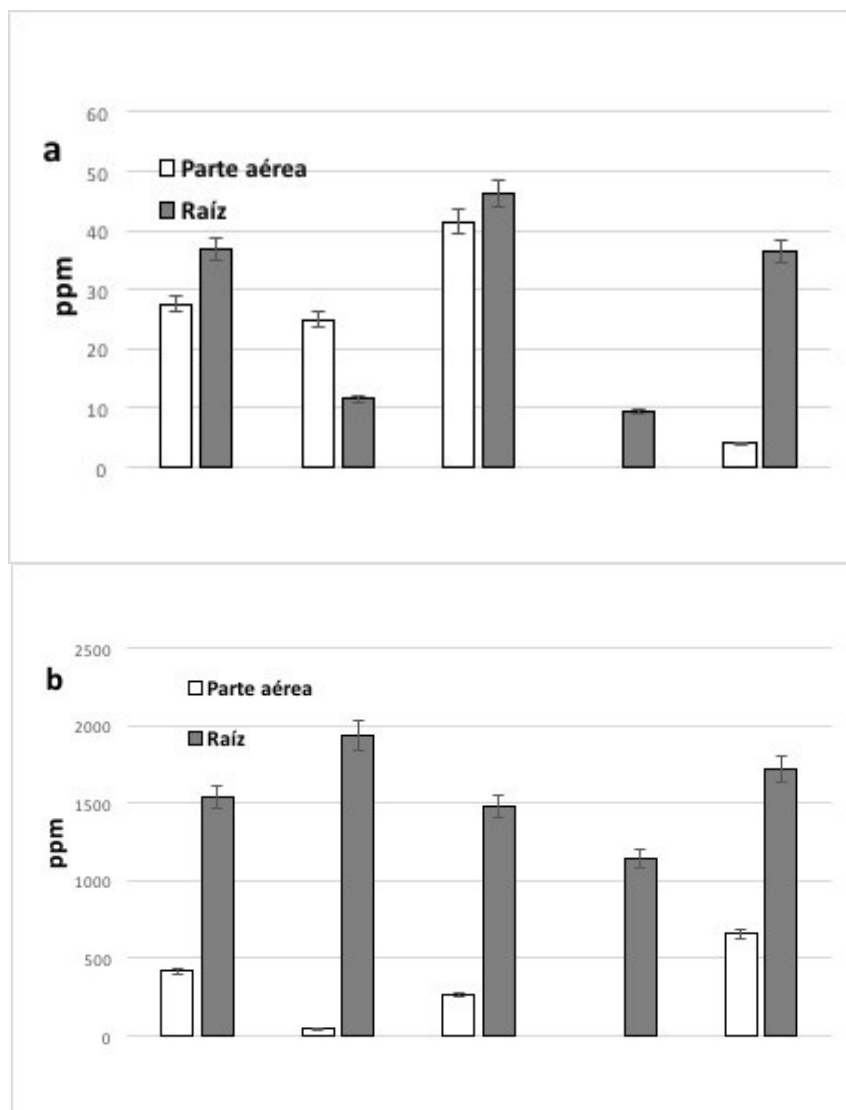
Para estos experimentos se eligieron las especies que sobrevivieron y formaron raíz en todos los tratamientos, que fueron *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. obscura*, *A. palmeri* y *A. salmiana*. En las plantas control no se detectaron los metales. Las especies expuestas a Cu, Cr, Fe, Pb y Zn acumularon el metal principalmente en raíz (Figs. 5 y 6), en tanto que el Mn se acumuló mayormente en la parte aérea de *A. celsii*, *A. obscura* y *A. salmiana*.

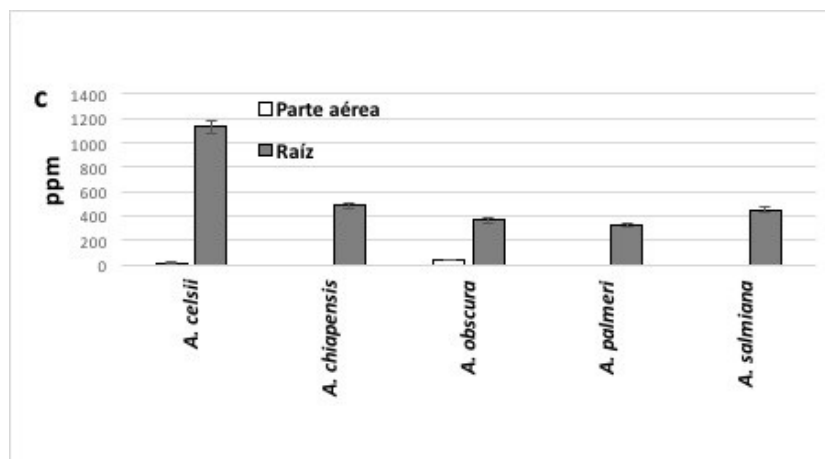


**Fig. 5.** Concentración media ( $\pm$  SD) de: **a)**  $\text{Cu}^{+2}$ ; **b)**  $\text{Fe}^{+2}$ ; **c)**  $\text{Mn}^{+2}$ ; **d)**  $\text{Zn}^{+2}$  en parte aérea y raíz.

**Fig. 5.** Average concentration ( $\pm$  SD) of: **a)**  $\text{Cu}^{+2}$ ; **b)**  $\text{Fe}^{+2}$ ; **c)**  $\text{Mn}^{+2}$ ; **d)**  $\text{Zn}^{+2}$  in aerial part and root.

En el caso del Cd, algunas especies como *A. celsii* y *A. obscura* acumularon el metal tanto en raíz como en la parte aérea. *A. chiapensis* acumuló más metal en las hojas y *A. obscura* más en las raíces. La especie *A. palmeri* acumuló Cd, Cr y Pb en las raíces por lo que podría tener un uso potencial en restauración de sitios contaminados por estos metales.





**Fig. 6.** Concentración media ( $\pm$  SD) de: **a)** Cd<sup>+2</sup>; **b)** Cr<sup>+2</sup>; **c)** Pb<sup>+2</sup> en parte aérea y raíz.

**Fig. 6.** Average concentration ( $\pm$  SD) of: **a)** Cd<sup>+2</sup>; **b)** Cr<sup>+2</sup>; **c)** Pb<sup>+2</sup> in aerial part and root.

Para determinar la eficiencia de acumulación se calcularon los valores de TF y BAC. Los valores de TF fueron muy bajos para las cinco especies en el tratamiento con cobre y hierro. Por otro lado, los BAC fueron mayores oscilando entre 2.17 y 11.7, las especies evaluadas con estos metales correspondieron a fitoestabilizadoras. Para el metal manganeso *A. chiapensis*, *A. obscura* y *A. palmeri* presentaron valores de TF mayores a 1 se clasificaron como hiperacumuladoras y *A. celsii* como indicadora. En zinc, *A. obscura* se clasificó como hiperacumuladora y el resto como fitoestabilizadoras (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Media del Factor de Translocación (TF) y Factor de Bioacumulación (BAC) para Cu, Fe, Mn y Zn, en cinco especies clasificadas como: Fitoestabilizadora (F); Hiperacumuladora (H); o Indicadora(I).

**Table 2.** Mean Translocation Factor (TF) and Bioaccumulation Factor (BAC) for Cu, Fe, Mn and Zn, in five species classified as: Phytostabilizer (F); Bioaccumulator (B); or indicator (I).

Especie / Metal	Cu			Fe			Mn			Zn		
	TF	BAC	C	TF	BAC	C	TF	BAC	C	TF	BAC	C
<i>A. celsii</i>	0.04	3.31	F	0.45	3.47	F	0.97	38.78	I	0.51	70.52	F
<i>A. chiapensis</i>	0.02	1.55	F	0.07	1.35	F	2.53	34.81	H	0.62	66.44	F
<i>A. obscura</i>	0.27	11.73	F	0.21	8.22	F	1.11	31.55	H	1.06	53.57	H
<i>A. palmeri</i>	0.05	8.97	F	0.19	5.54	F	1.47	20.13	H	0.82	36.66	F
<i>A. salmiana</i>	0.08	5.13	F	0.25	2.17	F	0.80	31.60	F	0.44	40.03	F



En Cd la especie *A. chiapensis* fue hiperacumuladora, *A. palmeri* exclusora y *A. celsii*, *A. obscura* y *A. salmiana* fitoestabilizadoras. En cromo, *A. chiapensis* y *A. palmeri* exclusoras. En plomo los valores de TF y BAC fueron muy bajos, las cinco especies se clasificaron como exclusoras (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Media del Factor de Translocación (TF) y Factor de Bioacumulación (BAC) para Cd, Cr y Pb, en cinco especies clasificadas como: Fitoestabilizadora (F); Hiperacumuladora (H); o Exclusura (E).

**Table 3.** Mean of Translocation Factor (TF) and Bioaccumulation Factor (BAC) for Cd, Cr and Pb, in five species classified as: Phytostabilizer (F); Bioaccumulator (B); or Excluser (E).

Especie / Metal	Cd			Cr			Pb		
	TF	BAC	C	TF	BAC	C	TF	BAC	C
<i>A. celsii</i>	0.75	55.3	F	0.27	4.04	F	0.01	0.19	E
<i>A. chiapensis</i>	2.15	49.86	H	0.02	0.42	E	0	0	E
<i>A. obscura</i>	0.89	82.78	F	0.18	2.55	F	0.10	0.44	E
<i>A. palmeri</i>	0	0	E	0	0	E	0	0	E
<i>A. salmiana</i>	0.11	8	F	0.38	6.40	F	0	0	E

Las especies hiperacumuladoras en Mn, Zn y Cd se pueden usar para remediar zonas contaminadas. Las especies *A. celsii*, *A. obscura*, *A. palmeri* y *A. salmiana* clasificadas como fitoestabilizadoras y exclusoras se pueden usar para la restauración. Las especies evaluadas se pueden usar para diferentes fines, debido a su capacidad de absorber metales en diferentes niveles.

## Discusión

Los sistemas de propagación *in vitro* han mostrado su eficiencia en varias especies de la familia Asparagaceae. En este trabajo, se utilizaron protocolos previamente desarrollados para especies de *Agave* (Domínguez *et al.*, 2008), *Yucca* (López-Ramírez *et al.*, 2018) y *Beaucarnea*, *Dasylyrion* y *Nolina* (Reyes-Silva *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en cuanto a la eficiencia

de estos sistemas fueron similares a lo reportado en los trabajos mencionados. Se partió de tejidos ya establecidos *in vitro* y conservados en un banco de germoplasma, por lo que no fue necesaria la colecta de material vegetal en campo ni el establecimiento *in vitro* del mismo.

Los metales analizados en este estudio pueden ser divididos en dos categorías. Cu, Fe, Mn y Zn que son considerados micronutrientes, ya que tienen un papel en la bioquímica de la planta. Ésta cuenta con mecanismos para tomarlos del suelo y sólo son tóxicos cuando se encuentran en concentraciones muy elevadas. Estos metales forman parte del medio de cultivo usado en este trabajo. Por otro lado, Cd, Cr y Pb no son micronutrientes y no son necesarios para la planta. Su presencia en el suelo suele ser tóxica, aun en bajas concentraciones. En este estudio el metal que resultó más tóxico para las especies analizadas fue el Cr. Este metal disminuye la actividad enzimática, produce daños a nivel membrana, clorosis, y daño a nivel de la raíz (Beltrán y Gómez, 2015). Los metales en tejidos vegetales ocasionan trastornos histológicos, inhiben el crecimiento y afectan la fotosíntesis, incluso en concentraciones subletales (Ouyang *et al.*, 2012; Peláez *et al.*, 2014). La raíz es el órgano principal que retiene metales pesados debido a la adsorción y a la quelación mediante fitoquelatinas y compartimientos vacuolares (Du *et al.*, 2018). El Cr entra en las raíces por reducción y complejación con exudados de la raíz que mejoran la solubilidad y la movilidad a través del xilema, su acumulación es principalmente en raíces y muy baja en brotes (Singh *et al.*, 2016). Las plantas inmovilizan los metales en las raíces lo que reduce la biodisponibilidad del metal a entrar en la cadena alimenticia. *D. maritima* L., es una especie que pertenece a la familia *Asparagaceae* y tiene uso potencial en fitoextracción de Cd, Cu, Cr y Zn (Fait *et al.*, 2018). Existen plantas que son tolerantes y se pueden desarrollar ante la presencia de Cr. Ramana *et al.* (2016) estudiaron *A. americana* ante la presencia de Cr en suelo y concluyeron que él metal se acumuló principalmente en las raíces, lo que demuestra su potencial de fitoestabilizar al contaminante. La especie *Paspalum conjugatum* acumuló uniformemente al cromo en todas sus partes (raíz, tallo, hojas, flores), *Echinochloa colona*, *Cyperus odoratus* y *Digitaria sanguinalis* fueron acumuladoras de Cd, Cu, Cr y Zn (Mendieta y Taisigüe, 2014).

La concentración de los metales en la parte aérea y raíz fue significativamente diferente entre las especies evaluadas. La habilidad de translocar el metal desde las raíces a la parte aérea se evalúa por el TF. El BAC se define como la relación del contenido del metal en la parte aérea y medio de cultivo con el metal. Valores muy bajos de TF y BAC quieren decir que el

mecanismo de la planta es de exclusión (Fu *et al.*, 2019). Las plantas que son resistentes a la sequía pueden tolerar contaminantes como los metales pesados, dependiendo del grado y de la absorción del metal en parte aérea o raíz, las plantas se pueden clasificar en hiperacumuladoras, fitoestabilizadoras, exclusoras o indicadoras, es importante identificar especies que estabilicen los metales pesados en la raíz, evitando así, su exposición a la cadena alimenticia, en este caso serían las fitoestabilizadoras (Nirola *et al.*, 2016). Cuando las plantas tienen mecanismos que controlan la translocación del metal desde la raíz hasta la parte aérea acumulándolo a una concentración similar a la expuesta, se considera indicadora (Srivastava *et al.*, 2016). Generalmente metales como Cd, Cr y Pb se acumulan fundamentalmente en raíces y metales como Cu, Fe, Mn y Zn en la parte aérea de las plantas (Fernández *et al.*, 2018). El cadmio fue estudiado en *Agave lechuguilla* y los resultados arrojaron que reduce las células del parénquima, causa estrés oxidativo, interfiere en la vascularización, daños funcionales, senescencia celular y clorosis. El Cd ingresa a las plantas a través de una vía simplástica y llega al xilema (Méndez-Hurtado *et al.*, 2013).

El cultivo *in vitro* es una herramienta fundamental para entender las relaciones planta-contaminante ya que puede predecir la respuesta de las plantas al medioambiente y también sirve para desarrollar protocolos para plantas con elevada capacidad de fitorremediación (Couselo *et al.*, 2010; Morales-Rubio *et al.*, 2016). El conocimiento y análisis de las plantas ante la presencia de metales pesados sirve para elegir aquellas plantas que acumulan el metal en la parte de la raíz y que tengan alta biomasa para tener mayor impacto en la restauración de suelos contaminados. Existen diferentes tipos de modelos de restauración, dependiendo del agente, el tipo y el nivel de degradación (Navarro *et al.*, 2017).

Los sistemas de propagación *in vitro* son eficientes para conocer la respuesta de las especies vegetales ante los factores ambientales adversos, debido a que es más fácil realizar y controlar las pruebas de los bioensayos *in vitro*, a través de esta herramienta fue posible conocer la respuesta de las plantas ante los metales. Las especies *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. obscura*, *A. palmeri* y *A. salmiana* se desarrollaron en presencia de Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Pb y Zn; estas especies tolerantes a los metales, pertenecen al género *Agave*, debido a esta característica se recomienda su uso para la restauración de áreas contaminadas con metales pesados y con poca disponibilidad de agua. Las plantas poseen diversos mecanismos celulares, lo cual permite

aumentar la tolerancia ante los metales pesados. Identificar la capacidad de las plantas para transferir metales servirá para elaborar guías de fitoremediación y restauración.

### **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a LPA. Al Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Aguascalientes por el apoyo financiero otorgado para la realización del proyecto (FOMIX AGS-2015-02-01-267656). A Martha E. Pérez, Isaac Reyes, Laura Yamamoto F. y D. Paloma Martínez B. por el apoyo técnico brindado.

### **Referencias**

- Alipur H., Zare M. y Shojaeir S. (2016). Assessing the degradation of vegetation of arid zones using FAO-UNIP model (Case study: Kashan zone). *Model Earth Systems Environment*. 2:195.  
<https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs40808-016-0258-8.pdf>
- Ashrafzadeh, S. y Leung D. M. W. (2015). In Vitro breeding of heavy metal-resistant plants: A review. *Horticulture, Environment and Biotechnology*. 56(2):131-136. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs13580-015-0128-8.pdf>
- Ayari, F., Hamdi, H., Jedidi, N., Gharbi, N. y Kossai, R. (2010). Heavy metal distribution in soil and plant in municipal solid waste compost amended plots. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 7(3): 465-472.  
<http://www.bioline.org.br/pdf?st10046>
- Baker, A.J.M. y Brooks, R.R. (1989). Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements: A Review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- Beltrán, M. E. y Gómez A. M. (2015). Metales pesados (Cd, Cr y Hg): Su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. *Revista I3+*. 2(2):82-112.  
<http://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/reiv3/article/download/113/111/>
- Bran, D. y Gaitán, J. (2012). La verdadera riqueza de las zonas secas. *Actualidad en I+D. RIA*. 30(3):218-224. <http://www.redalyc.org/html/864/86425838008/index.html>
- Chang, K. J., Gonzales, M. J., Ponce O., Ramírez L., León, V., Torres, A., Corpus, M. y Loayza-Muro, R. (2018). Accumulation of heavy metals in native Andean plants: potential tools

- for soil phytoremediation in Ancash (Peru). *Environmental Science and Pollution Research*. 25:33957–33966. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs11356-018-3325-z.pdf>
- Couselo J. L., Corredoira E., Vieitez, A. M. y Ballester, A. (2010). Aplicación del cutilvo in vitro de tejidos vegetales en estudios de fitorremediación. *Revista Real Academia Galega de Ciencias*. 21:77-87. <https://www.ragc.gal/sites/default/files/revistas/articulos/pdf/cultivoinvitro.pdf>
- Di Lonardo S., Capuana M., Arnetoli, M., Gabrielli, R. y Gonnelli, C. (2011). Exploring the metal phytoremediation potential of three *Populus alba* L. clones using an in vitro screening. *Environmental Science and Pollution Research*. 18:82-90. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs11356-010-0354-7.pdf>
- Domínguez-Rosales, M.S., González-Jiménez, M.L., Rosales-Gómez, C., Quiñones-Valles, C., Delgadillo-Díaz de León, S., Mireles-Ordaz, S.J., Pérez Molphe Balch, E. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*. 41:53-62. DOI: <http://www.redalyc.org/pdf/674/67404109.pdf>
- Du Fan, Yang Zhaoguang, Liu Peng y Wang Lin. (2018). Accumulation, translocation, and assessment of heavy metals in the soil-rice systems near a mine-impacted region. *Environmental Science and Pollution Research*. 25:32221-32230. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs11356-018-3184-7.pdf>
- Eguiarte Luis E., Aguirre-Planter Erika, Aguirre Xitlali, Colín Ricardo, González Andrea, Rocha Martha, Scheinvar Enrique, Trejo Laura y Souza Valeria. (2013) From isozymes to genomics: Population genetics and conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review*. 79:483-506. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs12229-013-9123-x.pdf>
- Encina-Domínguez Juan A., Meave, Jorge A., y Zárata-Lupercio A. (2013). Structure and woody species diversity of the *Dasyliroton cedrosanum* (Nolinaceae) Rosette scrub of central and southern Coahuila State, Mexico. *Botanical Sciences*. 91(3):335-347. <http://www.scielo.org.mx/pdf/bs/v91n3/v91n3a8.pdf>
- Fait Sofia, Fakhi Said, ElMzibri Mohammed, Malek Omar A., Rachdi Bouchra, Faiz Zineb, Fograch Hassan, Badri Wadia, Smouni Abdelaziz y Fahr Mouna. (2018). Behavior of as,

cd, co, cr, cu, pb, ni, and zn at the soil/plant interface around an uncontrolled landfill (casablanca, morocco). *Remediation Journal*, 28(4):65-72. 10.1002/rem.21577.

Fernández M. Roció, Albornoz Carolina B., Larsen Karen y Najle Roberto. (2018). Bioaccumulation of heavy metals in *Limnobium laevigatum* and *Ludwigia peploides*: their phytoremediation potential in water contaminated with heavy metals. *Environmental Earth Sciences*. 77:404. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs12665-018-7566-4.pdf>

Fu Shuai, Wei Chaoyang, Xiao Yuan, Li Lanhai y Wu Daishe. (2019). Heavy metals uptake and transport by native wild plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environmental Earth Sciences*. 78:103. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0895398808600495?via%3Dihub>

García, A. J., Cházaro, M. J., Nieto, J., Sánchez, L. F., Tapia, E., Gómez, J. F., Tamayo, M., Naráez, J. A., Rodríguez, B., Palomino, G. A., Martínez, L., Martínez, J. C., Quiñones, E. E., Rincón, G., Beltran, M. J., Quí, J. A., Guzmán, R., Mercado, Y., Ragazzi, J. A., Calderón, M. y A. Gutiérrez. 2017. Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. Capítulo 1. *Agave. Agared. México*. [https://www.researchgate.net/profile/Rafael\\_GuzmanMendoza/publication/319549654\\_Los\\_Agaves/links/59b2c56a458515a5b48d258a/Los-Agaves.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rafael_GuzmanMendoza/publication/319549654_Los_Agaves/links/59b2c56a458515a5b48d258a/Los-Agaves.pdf)

Gatti, E. (2008). Micropropagation of *Ailanthus altissima* and in vitro heavy metal tolerance. *Biologia Plantarum*. 52(1): 146-148. <https://core.ac.uk/download/pdf/37830292.pdf>

Hu Zhigang, Wang Chensheng, Li Keqing y Zhu Xinyou. (2018). Distribution characteristics and pollution assessment of soil heavy metals over a typical nonferrous metal mine area in Chifeng, Inner Mongolia, China. *Environmental Earth Sciences*. 77(638):1-10. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs12665-018-7771-1.pdf>

López-Ramírez Y., Palomeque-Carlín A., Chávez Ortiz L.I., de la Rosa-Carrillo M.L., Pérez-Molphe-Balch E. (2018). Micropropagation of *Yucca* Species. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) *Plant Cell Culture Protocols*, Fourth edition. *Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY. pp.

Lu, Y., Li, X., He, M., Zeng, F., & Li, X. (2017). Accumulation of heavy metals in native plants growing on mining-influenced sites in Jinchang: a typical industrial city (China). *Environmental Earth Sciences*, 76:446. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12665-017-6779-2>

- Magallán-Hernández, F., Maruri-Aguilar, B., Sánchez-Martínez, E., Hernández Sandoval, L., Luna-Zúñiga, J. y Robledo-Mejía M. (2014). Consideraciones taxonómicas de *Yucca queretaroensis*, Piña (Agavaceae), una especie endémica del semidesierto Queretano-Hidalguense. *Acta Botánica Mexicana*. 108:51-66.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-71512014000300004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512014000300004)
- Méndez-Hurtado, A., Rangel-Méndez, R., Yáñez-Espinosa, L. y Flores, J. (2013). *Tolerance to cadmium of agave lechuguilla (agavaceae) seeds and seedlings from sites contaminated with heavy metals*. *The Scientific World Journal*. 1-11. 167834-167834.  
doi:10.1155/2013/167834
- Mendieta Bras, C. y Taisigüe, K. (2014). Acumulación y traslocación de metales, metaloides y no metales en plantas nativas de la zona minera de Chontales: Implicaciones para el potencial de fito-remediación. *Austrina partnership programme in higher education and research for developmen*. 1-12.  
[https://biorem.univie.ac.at/fileadmin/user\\_upload/p\\_biorem/education/research/methods/Accumulation-and-Translocation-metals-in-native-plants\\_Extended-abstract.pdf](https://biorem.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/p_biorem/education/research/methods/Accumulation-and-Translocation-metals-in-native-plants_Extended-abstract.pdf)
- Memon, A.R., Aktoprakligil, D., Özdemir, A., & Vertii, A. (2001). Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants. *Turkish Journal of Botany* 25:111-121.
- Morales-Rubio María E., Espinosa-Leal Claudia A. y Garza-Padrón Ruth A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *OmniaScience*. 351-410.  
<https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/download/97/410/824-1?inline=1>
- Murashige Toshio y Skoog Folke. (1962). A revised medium for rapid growth an bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.  
[http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu\\_audu\\_kulturas\\_MAG/literatura/03\\_Murashige%20Skoog1962.pdf](http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf)
- Navarro José A., Goberna, Marta González, Gonzalo Castillo, Víctor M. y Verdú Miguel. (2017). Restauración ecológica en ambientes semiáridos recuperar las interacciones biológicas y las funciones ecosistémicas. CSIC. España. 159 pp.  
[https://www.uv.es/cide/Documentos/RESTAURACION\\_ECOLOGICA.%20Libro.pdf](https://www.uv.es/cide/Documentos/RESTAURACION_ECOLOGICA.%20Libro.pdf)
- Nirola Ramkrishna, Megharaj Mallavarapu, Beecham Simon, Aryal Rupak, Thavamani Palanisami, Vankateswarlu Kadiyala y Saint Christopher. (2016). Remediaton of

- metalliferous mines, revegetation challenges and emerging prospects in semi-arid and arid conditions. *Environmental Science and Pollution Research*. 23:20131-20150.  
<https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs11356-016-7372-z.pdf>
- Ouyang HuiLing, Kong XiangZhen, He Wei, Qin Ning, He QiShuang, Wang Yan, Wang Rong y Xu Fuli. (2012). Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Environmental Chemistry. Chinese Science Bulletin*. 57(25):3363-3370. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs11434-012-5366-x.pdf>
- Peláez Manuel, Casierra-Posada Fanor y Torres Gerardo A. (2014). Tóxicidad de cadmio y plomo en pasto tanner *Brachiaria arrecta*. *Revista de Ciencias Agrícolas*. 31(2):3-13.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcia/v31n2/v31n2a01.pdf>
- Perveen, S. y Anis, M. (2012). In vitro morphogenic response and metal accumulation in *Albizia lebeck* L. cultures grown under metal stress. *European Journal Forest Research* 131:669-681. <http://dx.doi.org/10.1007/s10342-011-0540-2>
- Ramana Sivakoti, Srivastava Sanjay, Biswas, Ashis K., Kumar Ajay, Singh Amar B., Singh Das rath y Rajput Poonam S. (2016). Assessment of century plant (agave americana) for remediation of chromium contaminated soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(4), 1159-1165. [10.1007/s40011-015-0685-8](https://doi.org/10.1007/s40011-015-0685-8)
- Reyes-Silva, A.I., Morales-Muñoz, C.F., Pérez-Reyes, M.E., Pérez-Molphe-Balch, E. (2013). Propagación in vitro de nolináceas mexicanas. *Investigación y Ciencia* 58:12-20.
- Singh A., Prasad S. M. y Singh R. P. (2016). *Plant Responses to Xenobiotics*. Springer. 362.  
<https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/book/10.1007/978-981-10-2860-1>
- Solanki, R. y Dhankhar R. (2011). Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. *Biologia. Section Botany*. 66(2): 195-204.  
<https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.2478%2Fs11756-011-0005-6.pdf>
- Srivastava, N. (2016). Phytoremediation. Chapter 13. Role of phytochelatins in phytoremediation of heavy metals contaminated soils. Springer International Publishing Switzerland. 393-419 pp. [https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-40148-5\\_13.pdf](https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-40148-5_13.pdf)



- Sruthi Palliyath, Shackira Abdul M. y Puthur Jos T. (2017). Heavy metal detoxification mechanisms in halophytes: an overview. *Wetlands Ecology and Management*. 25:129-148. <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2Fs11273-016-9513-z.pdf>
- Tosić, S., Alagić, S., Dimitrijević, M., Pavlović, A., & Nujkić, M. (2016). Plant parts of the apple tree (*Malus spp.*) as possible indicators of heavy metal pollution. *Ambio*. 45:501-512. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0742-9>
- Wiszniewska A., Hanus-Fajerska E., Muszyńska E. y Smoleń S. (2017). Comparative assessment of response to cadmium in heavy metal-tolerant shrubs cultured in vitro. *Water Air and Soil Pollution*. 228: 304. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3488-0>