



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE
POSGRADO

**“EFECTO DE *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, DE UN
EXTRACTO DE AUXINAS Y DEL ÁCIDO INDOL ACÉTICO
EN LA FITOEXTRACCIÓN DE CADMIO POR *Typha*
latifolia”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

M.C.Q. Gisela Adelina Rolón Cárdenas

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alejandro Hernández Morales

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez

San Luis Potosí, S. L. P., México, Julio de 2022



El programa de Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 00519, en el nivel Consolidado. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: CVU 712240

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, con recursos aprobados por el CONACyT: Programa Presupuestario F003, Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, CB2017-2018 A1-S-40454.



Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, de un extracto de auxinas y del ácido indol acético en la fitoextracción de cadmio por *Typha latifolia* by Gisela Adelina Rolón Cárdenas is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE
POSGRADO



“EFECTO DE *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, DE UN EXTRACTO DE AUXINAS Y DEL ÁCIDO INDOL ACÉTICO EN LA FITOEXTRACCIÓN DE CADMIO POR *Typha latifolia*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

M.C.Q. Gisela Adelina Rolón Cárdenas

SINODALES:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: _____

Dr. Alejandro Hernández Morales: _____

Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez: _____

Dra. Ma. Catalina Alfaro De La Torre: _____

Dr. Fulgencio Alatorre Cobos: _____

San Luis Potosí, S. L. P., México, Julio de 2022

Integrantes del Subcomité de Tesis

Dr. Alejandro Hernández Morales, director de tesis. Adscrito al Posgrado de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas y a la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez, co-directora de tesis. Adscrita a la Secretaría de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Dra. Ruth Elena Soria Guerra, miembro del comité tutorial extendido. Adscrita al Posgrado de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Dra. Ma. Catalina Alfaro De La Torre, asesora de tesis. Adscrita al Posgrado de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Dr. Fulgencio Alatorre Cobos, asesor externo. Adscrito al Colegio de Postgraduados campus Campeche.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada (712240) que me permitió desarrollar mis estudios de doctorado.

A la **Facultad de Ciencias Químicas** por todas las facilidades otorgadas para realizar mi doctorado.

A la **Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca** por todas las facilidades otorgadas para realizar la parte experimental de mi proyecto de doctorado.

Al **Dr. Alejandro Hernández Morales** por ser mi maestro, por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional, su confianza, y consejos a nivel personal y profesional. Gracias.

A la **Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez**, co-directora de este proyecto, por sus sugerencias y observaciones en cada etapa del proyecto.

A la **Dra. Ruth Elena Soria Guerra**, a la **Dra. Catalina Alfaro de la Torre**, al **Dr. Fulgencio Alatorre Cobos** sus atinadas observaciones, correcciones y sugerencias en los artículos y el documento de tesis.

A los laboratorios de **Biotecnología (FEPZH-UASLP)**, **Microbiología (FEPZH-UASLP)** y **Análisis de Alimentos (FEPZH-UASLP)** por facilitar las instalaciones y los equipos para el análisis de muestras.

Al **Laboratorio de elementos traza (FCQ-UASLP)** por brindarme las semillas de *Typha* usadas en este proyecto y su apoyo en el análisis de metales pesados en las muestras.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biotecnología de la FEPZH de la UASLP, por el apoyo que me brindaron en el desarrollo de mi proyecto.

A mis compañeros y amigos del posgrado, en especial a Ana Zapata, Carely Arjona, Jesús Rubio y Brenda Loera por hacer esta etapa más bonita, gracias por las experiencias.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado
a mi mamá y mi papá,
a mis hermanos y hermanas.

Y para todas las personas
que han estado en mi vida durante
esta etapa y que han hecho que
este camino sea menos pesado.

RESUMEN

El cadmio (Cd) es un metal pesado utilizado en diferentes procesos industriales, que ha sido clasificado como un contaminante prioritario debido a su alta toxicidad. La fitoremediación mediada por plantas de *Typha*, se ha propuesto como una alternativa para la eliminación del Cd del ambiente. Previamente se aisló a *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, una bacteria productora de auxinas, que ha mostrado incrementar la tolerancia a Cd en *Arabidopsis thaliana*. Este efecto podría ser consecuencia de las auxinas producidas por la bacteria, por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140, del ácido indol acético (AIA) exógeno y de las auxinas producidas por *P. rhodesiae* GRC140 en el crecimiento y la fitoacumulación de Cd en plantas de *T. latifolia*. Se observó que *P. rhodesiae* GRC140 produce AIA a través de rutas dependientes del L-Triptófano. Al investigar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140, AIA exógeno y del extracto de auxinas en el crecimiento de *T. latifolia*, se encontró que *P. rhodesiae* GRC140 aumenta la longitud del sistema radical, el AIA exógeno favorece la formación de raíces mientras que el extracto de auxinas incrementa el crecimiento de brotes en *T. latifolia*. También se evaluó la fitoacumulación de Cd en plantas de *T. latifolia* crecidas en hidroponía y se encontró que *P. rhodesiae* GRC140 aumenta la translocación de Cd a los brotes mientras que el AIA incrementa la acumulación de Cd en las raíces de las plantas. Estos resultados indican que el crecimiento y la capacidad de fitoextracción de Cd en *T. latifolia* puede favorecerse por *P. rhodesiae* GRC140 y la aplicación exógena de AIA.

Palabras clave: Fitoremediación; metales pesados; hidroponía; BPCV

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a heavy metal used in different industrial processes, which has been classified as a priority pollutant due to its high toxicity. Phytoremediation by *Typha* plants has been proposed as an alternative for removing Cd from the environment. Previously, we isolated *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, an auxin-producing bacterium that increased Cd tolerance in *Arabidopsis thaliana*. This effect could be a consequence of the bacterial auxins, so this work aimed to determine the effect of *P. rhodesiae* GRC140, exogenous indole acetic acid (IAA), and auxins produced by *P. rhodesiae* GRC140 on growth and phytoaccumulation of Cd by *T. latifolia* plants.

The effect of *P. rhodesiae* GRC140, exogenous IAA, and auxin extract on the growth of *T. latifolia* was investigated. The results showed that *P. rhodesiae* GRC140 increases root system length, exogenous AIA favors root formation while, auxin extract increases shoot growth in *T. latifolia*. Cd phytoaccumulation was evaluated in *T. latifolia* plants grown in hydroponics, the analysis of the cadmium accumulation revealed that *P. rhodesiae* GRC140 increases Cd translocation to shoots while AIA increases Cd accumulation in plant roots. These results show that the growth and Cd phytoextraction capacity of *T. latifolia* may be enhanced by *P. rhodesiae* GRC140 and the exogenous application of AIA.

Keywords: Phytoremediation; heavy metals; hydroponic; PGPB

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contaminación con metales pesados	1
1.1.1. Contaminación con cadmio y efecto en organismos.....	2
1.2. La fitorremediación como una técnica para la eliminación de metales pesados	3
1.2.2 Género <i>Typha</i>	3
1.3. Auxinas	7
1.3.1. Auxinas exógenas y su papel en la fitoremediación	8
1.3.2. Bacterias productoras de auxinas y su papel en la fitorremediación	10
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Cepa bacteriana.....	19
5.2. Producción bacteriana de auxinas	19
5.2.1. Condiciones de crecimiento bacteriano para la producción de AIA y monitoreo de la producción de indoles	19
5.2.2. Obtención del extracto de auxinas a partir de los sobrenadantes de cultivo bacteriano	20
5.2.3. Identificación y cuantificación de AIA producidos por <i>P. rhodesiae</i> GRC140	20
5.3. Material vegetal, medios de cultivo y germinación de las semillas.....	20
5.3.1. Colecta del material vegetal y autenticación de la planta.....	20
5.3.2. Desinfección del material vegetal y germinación <i>in vitro</i>	21
5.4. Evaluación del efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140, del AIA y del extracto de auxinas en <i>T. latifolia</i>	22
5.4.1. Tratamientos.....	22
5.4.2. Condiciones de crecimiento.....	22

5.4.3 Análisis del crecimiento vegetal de plantas de <i>T. latifolia</i>	22
5.5. Establecimiento de un cultivo de <i>Typha latifolia</i> en un sistema de hidroponía axénico y su evaluación en el proceso de rizofiltración de cadmio por <i>P. rhodesiae</i> GRC140, auxinas exógenas y por auxinas bacterianas.....	23
5.5.1. Establecimiento del cultivo hidropónico axénico de <i>T. latifolia</i>	23
5.5.2. Efecto del Cd en plantas de <i>T. latifolia</i> crecidas en hidroponía	23
5.5.3. Efecto de <i>P. rhodesiae</i> GRC140, de las auxinas exógenas y del extracto de auxinas en plantas de <i>T. latifolia</i> expuestas a Cd	24
5.5.3.3. Determinación del peso fresco y seco	25
5.5.3.4. Extracción y determinación de clorofila.....	26
5.5.3.5. Fuga de electrolitos.....	26
5.5.3.6. Actividad catalasa y determinación de glutatión total.....	27
5.5.3.7. Digestión ácida de muestras y análisis de Cd	28
5.6. Análisis estadístico.....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1. Producción de AIA por <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 y evaluación del efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, del AIA y del extracto de auxinas en plantas de <i>Typha latifolia</i>	30
6.1.1 Producción de AIA y de auxinas por <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 a partir del L-Trp	30
6.1.2. Autenticación vegetal.....	35
6.1.3. Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 en plantas de <i>Typha latifolia</i>	36
6.1.4. Efecto del AIA exógeno en plantas de <i>Typha latifolia</i>	38
6.1.5. Efecto del extracto de auxinas obtenido del sobrenadante de cultivo de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 en el crecimiento de <i>Typha latifolia</i>	40
6.2. Establecimiento del cultivo en hidroponía de <i>Typha latifolia</i> y su evaluación en el proceso de remoción de Cd por <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, por el AIA y por el extracto de auxinas	42
6.2.1. Cultivo de <i>Typha latifolia</i> bajo condiciones axénicas	42
6.2.2. Modelamiento químico de la biodisponibilidad de Cd en los sistemas de hidroponía sin glucosa.....	44
6.2.3. Efecto tóxico del Cd en <i>Typha latifolia</i>	45
6.2.4. Remoción y acumulación de Cd por plantas de <i>Typha latifolia</i> cultivadas en hidroponía.....	49
6.2.5. Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, del AIA y del extracto de auxinas en plantas de <i>Typha latifolia</i> expuestas a Cd	51
6.2.6. Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, del AIA exógeno y del extracto de auxinas en la remoción y acumulación de Cd por plantas de <i>Typha latifolia</i>	56

7. CONCLUSIONES	60
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
9. PUBLICACIONES.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Concentraciones de cadmio acumulado por <i>Typha</i> spp.	4
Tabla 2	Mecanismos de tolerancia a cadmio en raíces de <i>Typha</i> spp.	6
Tabla 3	Efecto de la aplicación de auxinas exógenas en plantas expuestas a cadmio	9
Tabla 4	Efecto de bacterias productoras de ácido indol acético en plantas expuestas a cadmio	12
Tabla 5	Actividades de promoción de crecimiento vegetal reportadas en diferentes cepas de <i>Pseudomonas rhodesiae</i>	14
Tabla 6	Actividades de promoción de crecimiento vegetal evaluadas en <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140	15
Tabla 7	Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 en plantas expuestas a metales pesados	16
Tabla 8	Análisis por CG-EM de ácido indol acético (AIA) y compuestos intermediarios en la síntesis del AIA producidos por <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 en medio LB y LB con L-Trp	33
Tabla 9	Especiación del cadmio en el medio MS 0.2X a pH 5.7, calculado con Visual MINTEQ versión 3.1	45
Tabla 10	Contenido de cadmio en brotes y raíces de plántulas de <i>Typha latifolia</i> expuestas a diferentes concentraciones de cadmio	49
Tabla 11	Factor de bioconcentración y factor de translocación en plantas de <i>Typha latifolia</i> expuestas a cadmio	57

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Respuesta vegetal a metales pesados	5
Figura 2	Estructuras químicas de auxinas naturales y sintéticas	8
Figura 3	Rutas biosintéticas de producción del ácido indol acético (AIA) a partir del L-Triptófano (L-Trp) en bacterias	10
Figura 4	Cinética de crecimiento y producción de compuestos indólicos por <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140	30
Figura 5	Identificación de AIA en un cultivo de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 por cromatografía en capa fina	32
Figura 6	Concentración de compuestos indólicos (IEt, AIA y AIL) en el extracto obtenido del cultivo de 84 h de <i>P. rhodesiae</i> GRC140 en caldo LB+Trp	34
Figura 7	Amplificación de la región intergénica psbA-trnH usando el ADN genómico de plantas de <i>Typha</i>	35
Figura 8	Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 en <i>Typha latifolia</i>	36
Figura 9	Efecto del ácido indol acético comercial en <i>Typha latifolia</i>	38
Figura 10	Efecto del extracto de auxinas en <i>Typha latifolia</i>	40
Figura 11	Germinación de semillas de <i>Typha latifolia</i>	42
Figura 12	Plantas de <i>Typha latifolia</i> de 60 días de crecimiento en el sistema de hidroponía axénico	44
Figura 13	Efecto del cadmio en el crecimiento de plantas de <i>Typha latifolia</i>	46
Figura 14	Efecto del cadmio en la actividad catalasa y el contenido de glutatión total en <i>Typha latifolia</i>	47

Figura 15	Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140 en el medio de hidroponía y en raíces de <i>Typha latifolia</i> expuestas a cadmio	51
Figura 16	Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en el crecimiento de plantas de <i>Typha latifolia</i> expuestas a cadmio	53
Figura 17	Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en la actividad catalasa y el contenido de glutatión total en <i>Typha latifolia</i> expuestas a cadmio	55
Figura 18	Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en el contenido y la acumulación de cadmio por <i>Typha latifolia</i>	56
Figura 19	Efecto de <i>Pseudomonas rhodesiae</i> GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en la remoción del cadmio del medio de hidroponía por <i>Typha latifolia</i>	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación con metales pesados

La contaminación por metales pesados es un problema que se ha incrementado en los últimos años, se ha estimado que existen alrededor de 5 millones de sitios contaminados con metales pesados y metaloides en el mundo (Liu *et al.*, 2018). Algunos metales pesados como el cobre (Cu), zinc (Zn) y cobalto (Co) son micronutrientes esenciales por lo que son requeridos por los organismos a niveles traza. Sin embargo, algunos otros como el plomo (Pb), mercurio (Hg), arsénico (As) y cadmio (Cd) no cumplen con funciones biológicas conocidas por lo que su presencia en el ambiente representan una seria amenaza para los seres vivos (Wani *et al.*, 2017).

En México, se ha reportado la presencia de niveles elevados de metales pesados tóxicos en diferentes regiones del país debido a un aumento de las actividades mineras, metalúrgicas e industriales (Covarrubias y Peña-Cabriales, 2017). Ochoa-Jiménez *et al.* (2016) indican que en el agua del Río Hondo y la Bahía de Chetumal en Quintana Roo presentaban concentraciones de Pb y Hg, superiores a los límites máximos permisibles establecidos por la legislación mexicana. Por otra parte, Rojas-Mayorquín (2011) encontró niveles elevados de hierro (Fe), manganeso (Mn), silicio (Si), titanio (Ti), Hg y Pb en los sedimentos de la cuenca del río San Pedro en Nayarit, que tienen origen en los vertidos existentes en los municipios de Ruiz y Tuxpan.

En el estado de San Luis Potosí se ha demostrado la presencia de altas concentraciones de Pb, As, Cd, Zn y Cu en el suelo superficial de los municipios de Villa de la Paz y Matehuala, así como en las zonas urbanas y suburbanas de Villa de la Paz (Razo *et al.*, 2004; Téllez-Hernández, 2009). Este incremento está asociado principalmente a las actividades que se desarrollan en los diferentes usos de suelo (urbano, agrícola e industrial) (López-Álvarez 2012).

1.1.1. Contaminación con cadmio y efecto en organismos

El Cd es un elemento que se encuentra en la corteza terrestre a concentraciones entre 0.01 - 1 mg/kg en forma de minerales de sulfuro de cadmio (greenockita y hawleyita), carbonato de cadmio (octavita), óxido de cadmio (monteponita), y asociado a minerales de Zn y Pb (Moiseenko y Gashkina, 2018; Kubier *et al.*, 2019). Sin embargo, su presencia en el ambiente se ha incrementado considerablemente debido a diferentes fuentes antropogénicas, ya que se genera como subproducto al fundir Zn, Cu, Pb, y es utilizado en diferentes procesos industriales (Kubier *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2019).

En años recientes, se ha incrementado el estudio de los niveles de Cd en suelos, ambientes acuáticos y sedimentos debido a que es un contaminante persistente, que tiende a incorporarse a la cadena trófica, y ser tóxico para la mayoría de los organismos a bajas concentraciones (Yuan *et al.*, 2019).

En los seres humanos la exposición crónica a Cd se ha relacionado como causante de hepatotoxicidad (Hyder *et al.*, 2013), enfermedades cardiovasculares (Tellez-Plaza *et al.*, 2013), renales (Orr y Bridges, 2017), respiratorias (Bouley *et al.*, 1977), afectaciones al sistema óseo y nervioso (Lim *et al.*, 2016). Además, el Cd ha sido relacionado como agente causal en el desarrollo de cáncer de pulmón, hígado, próstata, mama y endometrio (Hartwig, 2010; Filipic, 2012).

En las plantas, el Cd disminuye el crecimiento general, produce alteraciones estructurales en hojas, modificaciones en el crecimiento de las raíces primarias e inhibición en la formación de raíces laterales y adventicias debido a diferentes alteraciones bioquímicas (El Rasafi *et al.*, 2020). Por este motivo, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) lo ha clasificado como un contaminante prioritario (Permana y Akbarsyah, 2021).

1.2. La fitorremediación como una técnica para la eliminación de metales pesados

Con la finalidad de disminuir los niveles de metales pesados y metaloides en diferentes sitios contaminados se han desarrollado diferentes métodos físicos y químicos que pueden resultar ineficientes y costosos (Wani *et al.*, 2017). Sin embargo, la fitorremediación es una técnica mediada por plantas y por los microorganismos asociados a ellas, que se utiliza para remover, degradar o inmovilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos de suelos y cuerpos de agua contaminados (Shah y Daverey, 2020).

La eficacia de la fitoremediación depende de factores como la biodisponibilidad y especiación de los metales pesados en el suelo o cuerpo de agua y de las especies vegetales utilizadas para tal propósito (Ali *et al.*, 2013).

De acuerdo a Yan *et al.* (2020), las plantas adecuadas para la fitoremediación deben presentar las siguientes características:

- Alta tasa de crecimiento
- Alta producción de biomasa
- Alta tolerancia a los efectos tóxicos de los metales pesados
- Una buena adaptación a condiciones ambientales
- Una alta capacidad de acumulación de metales

1.2.2 Género *Typha*

El género *Typha* es miembro de la familia de las Typhaceae; este género incluye a 24 especies de plantas perennes, monocotiledóneas, con una estructura vegetativa que sobresale del agua y con un sistema radicular arraigado al sedimento (Curt-Fernández de la Mora, 2005; Alonso-Castro *et al.*, 2009). Son plantas cosmopolitas, pero en América del norte *T. domingensis*, *T. angustifolia* y *T. latifolia* son las especies más comunes (Zhang *et al.*, 2008).

Las plantas pertenecientes a estos géneros son encontrados de manera natural en cuerpos de agua, incluyendo humedales contaminados por xenobióticos tóxicos como pesticidas orgánicos (Moore *et al.*, 2013), hidrocarburos aromáticos policíclicos

(Latif *et al.*, 2013) y metales pesados (Carranza-Álvarez *et al.*, 2008; Klink *et al.*, 2013; Maleva *et al.*, 2019; Minkina *et al.*, 2021). En este sentido, estudios previos han demostrado el potencial de *T. latifolia*, *T. angustifolia*, *T. domingensis* y *T. orientalis* de remover y acumular Cd (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de cadmio acumulado por especies de *Typha*

Especie de <i>Typha</i>	Exposición		Contenido de Cd (mg/Kg PS)		Remoción (%)	Referencia
	Tiempo (d)	Concentración (mg/L)	Raíz	Brotes		
<i>T. angustifolia</i>	25	5	1962.3	39.7	NR	<i>Xu et al.</i> (2011)
		2	1213	377.1	NR	
<i>T. angustifolia</i>	15	4	1637.9	384.9	23	<i>Woraharn et al.</i> (2021)
		8	2977.6	506.5	NR	
		2.8	172.7	64.7	NR	
<i>T. angustifolia</i>	30	5.6	280.7	95.8	NR	<i>Ren et al.</i> (2020)
		11.24	397.3	207.9	NR	
		5	300	10	NR	
<i>T. orientalis</i>	60	10	600	60	NR	<i>Wang et al.</i> (2018)
		15	480	25	NR	
		25	1100	90	NR	
<i>T. latifolia</i>	10	5	1230	250	41	<i>Alonso-Castro et al.</i> (2009)
		7.5	2339	600	38	
		20	185	7.5	55	
<i>T. latifolia</i>	10	40	250	45	48	<i>Leura-Vicencio et al.</i> (2013)
		50	255	40	48	
		80	319	105	42	
<i>T. domingensis</i>	60	1.1	188.6	1.25	NR	<i>de Oliveira et al.</i> (2017)
		5.6	234	21.3	NR	
<i>T. domingensis</i>	90	1.1	192.5	NR	NR	<i>de Oliveira et al.</i> (2022)
		5.6	260	NR	NR	

NR: no reportado; PS: Peso seco

1.2.2.1 Mecanismos de tolerancia a Cd en *Typha* spp.

Las plantas capaces de crecer en ambientes contaminados con Cd sin mostrar signos visibles de fitotoxicidad han desarrollado diferentes mecanismos para minimizar el daño causado por iones metálicos no esenciales (Figura 1) (Zamani-Ahmadmahmoodi *et al.*, 2020).

Uno de los mecanismos vegetales más simples de tolerancia a metales pesados consiste en restringir la absorción de iones metálicos por la planta. Sin embargo, en la mayoría de las plantas tolerantes a metales pesados estos iones ingresan y son acumulados en los tejidos vegetales (Sessitsch *et al.*, 2013). En el interior de la planta los iones metálicos pueden ser dirigidos a vacuolas a través de fitoquelatinas y metalotioneínas (Manara, 2012). También pueden activar enzimas de defensa frente al estrés oxidativo producido por el Cd como la catalasa (CAT) y la enzima superóxido dismutasa (SOD), o sintetizar compuestos antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (GSH), el ascorbato y los flavonoides (Manara, 2012; El Rasafi *et al.*, 2020).

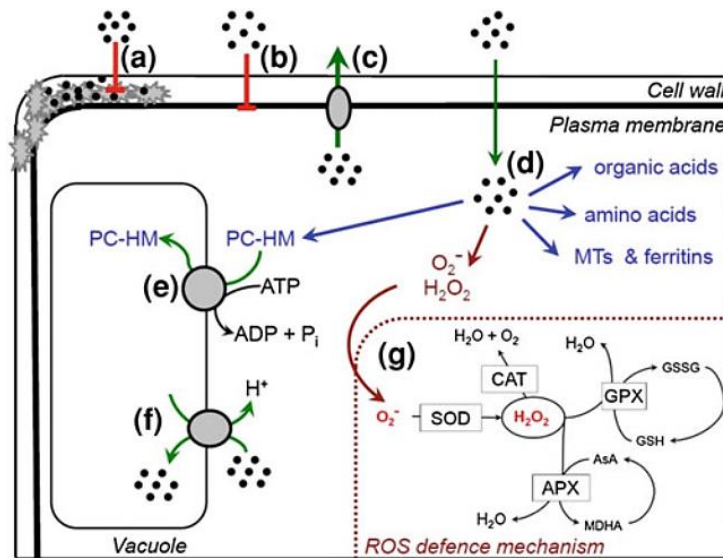


Figura 1. Respuesta vegetal a metales pesados. (a) Unión de metales a la pared celular, (b) reducción del transporte a través de la membrana, (c) sistemas de expulsión, (d) quelación del metal en el citosol por ligandos especializados como aminoácidos, ácidos orgánicos, fitoquelatinas, metalotioneínas, (e) transporte de complejos ligando-metal hacia las vacuolas, (f) secuestro de iones metálicos en vacuolas, (g) inducción de mecanismos de defensa antioxidante. Figura tomada de Manara (2012).

En el caso de las plantas de *Typha* spp. estudios previos han mostrado la presencia de diferentes mecanismos para la detoxificación de Cd (Tabla 2).

Tabla 2. Mecanismos de tolerancia a cadmio en especies de *Typha*

Planta	Mecanismo de tolerancia a Cd	Referencia
<i>T. latifolia</i>	Aumento en los niveles de tioles reducidos y disulfuros, y en la actividad de la enzima GR.	Fediuc y Erdei (2002)
<i>T. latifolia</i>	Aumento de la actividad de O-acetilserina (tiol) liasa, enzima involucrada en la síntesis de cisteína.	Fediuc <i>et al.</i> (2005)
<i>T. latifolia</i>	Cd se inmoviliza en la pared celular (57-67 %) y el Cd soluble se concentra principalmente en las vacuolas.	Tang <i>et al.</i> (2009)
<i>T. angustifolia</i>	Aumento del GSH, GSSG y de la GR. Cd se inmoviliza en la pared celular (89 %) y el Cd intracelular se concentra principalmente en vacuolas (55 %).	Xu <i>et al.</i> (2011)
<i>T. angustifolia</i>	Incremento en la actividad de la SOD y CAT, Cd se inmoviliza en la pared celular. Aumento del contenido de FQ.	Zhao <i>et al.</i> (2016)
<i>T. angustifolia</i>	Aumento del contenido de FQ.	Liu <i>et al.</i> (2016)

GR: Glutación reductasa; GSH: Glutación reducido; GSSG: Glutación oxidado; SOD: Superóxido dismutasa; CAT: Catalasa; FQ: Fitoquelatinas

En las plantas de *Typha* spp. expuestas a Cd, la mayor cantidad de este ion es retenido en la pared celular (Tang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011). Mientras que el Cd intracelular se concentra principalmente en las vacuolas y se quela por compuestos con abundantes grupos tioles como el GSH y las fitoquelatinas (Fediuc y Erdei, 2002; Tang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

1.3. Auxinas

La diferenciación, el crecimiento y el desarrollo de las plantas son controlados por una clase de sustancias químicas que se sintetizan de manera regulada y en bajas concentraciones dentro de ellas, las cuales son llamadas hormonas vegetales o fitohormonas (Lluna-Duval, 2006; Fuentes-Ramirez y Caballero-Mellado, 2006; Khan *et al.*, 2009). Uno de los principales grupos de fitohormonas son las auxinas, las cuales están involucradas en diversos procesos como la respuesta a la luz y la gravedad, la arquitectura general de tallos y raíces, el desarrollo vascular (Woodward y Bartel, 2005), debido a que modula los procesos de división, expansión, maduración y diferenciación celular (Hopkins y Hüner, 2008).

Las auxinas endógenas se sintetizan principalmente en los meristemas y en órganos de crecimiento activo como hojas jóvenes, los coleóptilos, los ápices, las puntas de las raíces, los bulbos apicales y las semillas germinativas (Flasiński y Hąc-Wydro, 2014). El ácido indol acético (AIA) es la auxina más abundante en los tejidos vegetales y su rol en el desarrollo del desarrollo vegetal ha sido bien documentado. Además del AIA, se han descrito otros tres compuestos endógenos de las plantas que tienen funciones de auxinas: el ácido indol butírico (AIB), ácido 4-cloro indol acético (4-CI-AIA) y el ácido fenil acético (AFA) (Figura 2) (Sauer *et al.*, 2013).

Algunos compuestos sintéticos como el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) también han mostrado tener actividades similares a las auxinas endógenas en plantas (Figura 2) (Sauer *et al.*, 2013). Estos compuestos son utilizados por tener mayor estabilidad (2,4-D y ANA), mayor difusión hacia el interior de las células (ANA) o son metabolizados más lentamente (2,4-D) que el AIA (Garay-Arroyo *et al.*, 2014).

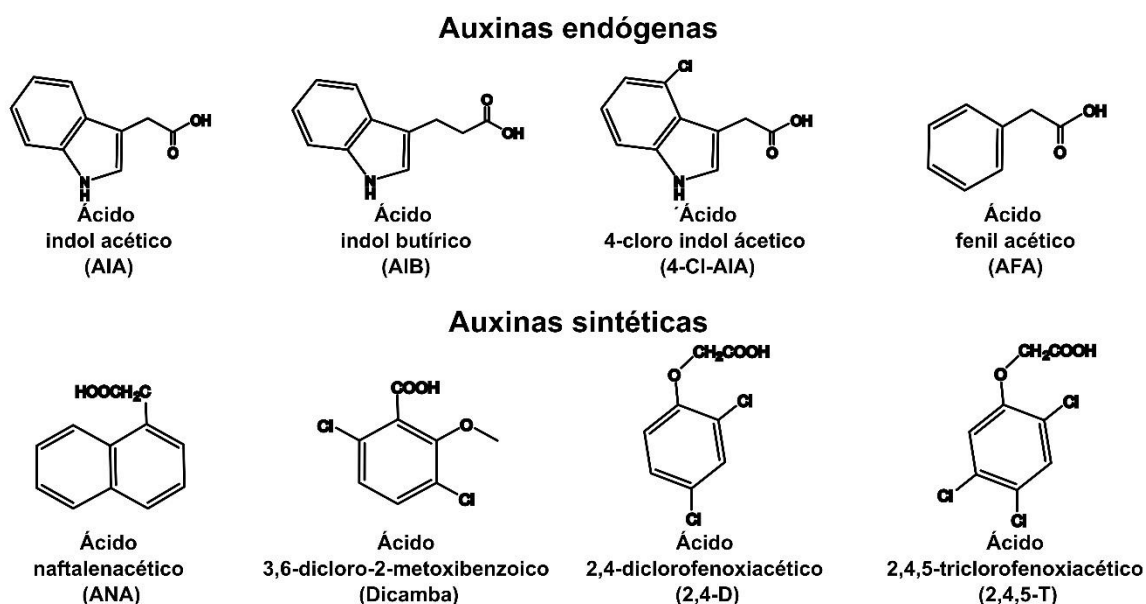


Figura 2. Estructuras químicas de auxinas endógenas y sintéticas. Figura adaptada de Hopkins y Hüner (2008).

1.3.1. Auxinas exógenas y su papel en la fitoremediación

Las auxinas también están involucradas en la regulación de múltiples respuestas de las plantas al estrés biótico y abiótico (Li *et al.*, 2018b). Por lo cual, en años recientes, se ha estudiado el efecto de auxinas exógenas, tanto naturales como sintéticas, en la tolerancia y la fitoacumulación de metales pesados en las plantas (Mathur *et al.*, 2022). Se ha observado que la aplicación de auxinas exógenas en diferentes especies vegetales expuestas a Cd aumenta la biomasa, incrementa la actividad de enzimas antioxidantes disminuyendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y favorece la acumulación de Cd en brotes y raíces (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la aplicación de auxinas exógenas en plantas expuestas a cadmio

Planta	Concentración de Cd	Auxina (Concentración)	Efecto en planta	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.6 mg/L	ANA (0.05 μ M) 7 días	Reduce la clorosis; incrementa el crecimiento de los brotes y la acumulación de Cd en raíces.	Zhu <i>et al.</i> (2013)
<i>Sorghum bicolor</i>	11.2 mg/L	ANA (0.01 μ M) 5 días	Favorece el crecimiento de brotes; incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y reduce los niveles de MDA y O ₂ en raíces.	Zhan <i>et al.</i> (2017)
<i>Camellia sinensis</i>	30 mg/Kg	AIA (10 μ M) 90 días	Incrementa la altura de las plantas; aumenta la actividad de enzimas antioxidantes; reduce los niveles de MDA y el contenido de Cd en raíces y brotes.	Zhang <i>et al.</i> (2020)
<i>Brassica juncea</i>	15 mg/Kg	AIA (2.85 mM) 30 días	Incrementa la biomasa; reduce niveles de MDA y de H ₂ O ₂ ; incrementa la acumulación de Cd en brotes.	Chen <i>et al.</i> (2020)
<i>Solanum nigrum</i>	2 mg/Kg	AIA (57.0 μ M) 30 días	Incrementa la biomasa; incrementa la altura de la planta, la actividad de enzimas antioxidantes; reduce los niveles de MDA. Incrementa el contenido de Cd en raíces y brotes.	Ran <i>et al.</i> (2020)
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	1.41 mg/Kg	AIA (57.0 μ M) 6 días	Incrementa la biomasa; la actividad de la enzima SOD en hojas; reduce los niveles de MDA. Incrementa el contenido de Cd en brotes.	Sun <i>et al.</i> (2019)
<i>Solanum melongena</i>	9.0 mg/Kg	AIA (10.0 μ M) 15 días	Incrementa la biomasa; la actividad de enzimas antioxidantes; disminuye los niveles H ₂ O ₂ , MDA, la fuga de electrolitos y el contenido de Cd en raíces y brotes.	Singh y Prasad (2015)
<i>Stellaria media</i>	0.1 mg/Kg	AIB (369.0 μ M) 30 días	Incrementa la biomasa y la actividad enzimas de antioxidantes.	Lin <i>et al.</i> (2018)
<i>Vigna radiata (L.)</i>	0.6 mg/L	AIB (10.0 μ M) 48 h	Incrementa la biomasa en raíces, la actividad de enzimas antioxidantes y disminuye los niveles de MDA.	Li <i>et al.</i> (2018a)

AIA: ácido indol acético; AIB: ácido indol butírico; ANA: ácido naftalenacético; MDA: malondialdehído; SOD: Superóxido dismutasa

1.3.2. Bacterias productoras de auxinas y su papel en la fitorremediación

Las comunidades microbianas asociadas a las plantas reciben el nombre de microbiota y está compuesta por diferentes microorganismos entre los que se encuentran las bacterias. Dependiendo del tejido donde se localicen, estas comunidades cumplen con funciones específicas a favor de las plantas, y se ha demostrado que pueden alterar la fisiología, favorecer el crecimiento, desarrollar e inducir protección vegetal frente a patógenos potenciales a través de actividades microbianas que promueven el crecimiento, como la síntesis de auxinas (Kong y Glick, 2017; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018).

El AIA es producido de manera endógena por las plantas, sin embargo también puede ser sintetizado por algunas bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Agrobacterium*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Enterobacter* (Costacurta y Vanderleyden, 1995; Sessitsch *et al.*, 2013; Patten *et al.*, 2013). La síntesis de AIA a partir del L-Triptófano (L-Trp) se lleva a cabo través de cinco rutas bioquímicas (Figura 3) (Shah *et al.*, 2021), siendo aquellas mediadas por ácido indol piruvico (AIP) e indol-3-acetamida (IAM) las principales vías biosintéticas en las bacterias (Vega-Celedón *et al.*, 2016).

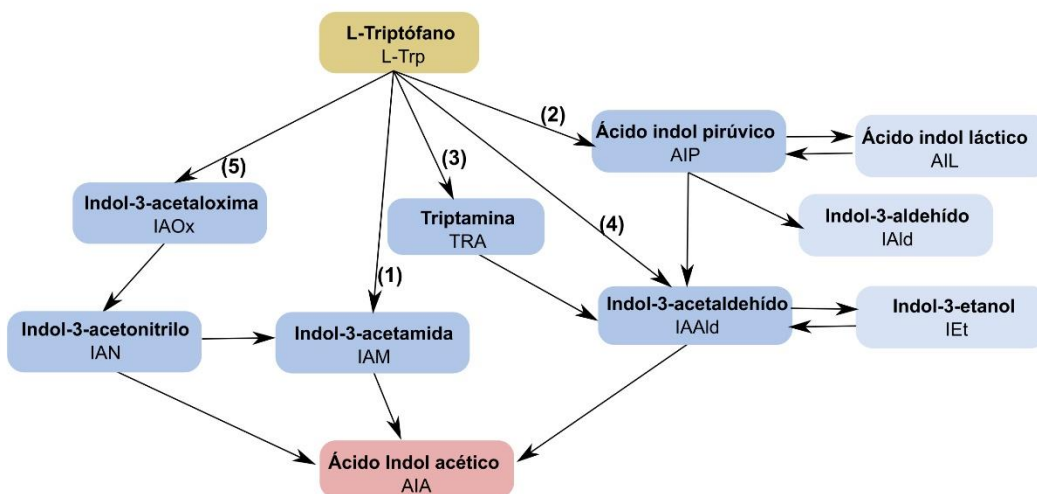


Figura 3. Rutas biosintéticas de producción del ácido indol acético (AIA) a partir del L-Triptófano (L-Trp) en bacterias. (1) Ruta del indol-3-acetamida, (2) Ruta del ácido indol-3-pirúvico, (3) Ruta de la triptamina, (4) Ruta del indol-3-acetaldehído, (5) Ruta del indol 3-acetaloxima. Esquema modificado de Vandeputte *et al.* (2005).

Diversos estudios han mostrado que el AIA producido por las bacterias, tiene los mismos efectos en las plantas que aquel producido de manera endógena y ejerce efectos positivos en el crecimiento vegetal. Baghaee-Ravari y Heidarzadeh (2014) reportaron que la producción de AIA por las cepas *Bacillus subtilis* Whlr-12 y *Bacillus* sp. Whlr-15 estimula la elongación de la raíz del trigo (*Triticum aestivum*). Por otra parte, Bharucha *et al.* (2013) purificaron AIA de un cultivo de *P. putida* UB1 y determinaron el efecto sobre plantas de mostaza (*Brassica nigra*). Ellos, demostraron que el AIA sintetizado por *P. putida* UB1 aumenta significativamente el contenido de clorofila, el número de raíces adventicias y de hojas en plantas de mostaza previamente inoculadas.

Las bacterias productoras de AIA también pueden conferir una ventaja adaptativa de las plantas a la presencia de niveles fitotóxicos de metales pesados (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2018), además pueden contribuir en la fitoacumulación de los iones metálicos (Kong y Glick, 2017).

Se ha observado que bacterias productoras de auxinas de diferentes géneros bacterianos, incrementan la producción de biomasa en las plantas al estimular el crecimiento de brotes y raíces, disminuyen la producción de EROs incrementando la actividad de enzimas antioxidantes y favorecen la fitoacumulación de Cd (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de bacterias productoras de ácido indol acético en plantas expuestas a cadmio

Bacteria (Producción de AIA)	Planta	Concentración de Cd y tiempo de exposición	Efecto de la bacteria en la planta	Referencia
<i>Serratia</i> sp. CP-13rif (27 µg/mL)	<i>Linum usitatissimum</i> L.	10 mg/Kg 70 d	Incrementa la acumulación de biomasa, el crecimiento de brotes y raíces. Disminuye el contenido de Cd en brotes y raíces	Shahid <i>et al.</i> (2019)
<i>Raoultella</i> sp. X13 (8.66 µg/mL)	<i>Brassica chinensis</i> L.	1.5 mg/Kg 55 d	Incrementa la acumulación de biomasa fresca y seca. Disminuye el contenido de Cd en brotes y raíces	Xu <i>et al.</i> (2019)
<i>Sphingomonas</i> sp. GX_15 (7.04 µg/mL)	<i>Brassica napus</i>	50 mg/Kg 49 d	Incrementa la acumulación de biomasa seca, el crecimiento raíces. Aumenta el contenido de Cd en brotes y raíces.	Li <i>et al.</i> (2019)
<i>Kocuria rhizophila</i> 14asp (0.36 µg/mL)	<i>Glycine max</i>	200 mg/Kg 48 d	Incrementa el crecimiento de brotes. Aumenta el contenido de Cd en brotes y raíces.	Hussain <i>et al.</i> (2019)
<i>Serratia marcescens</i> S217 (49.88 µg/mL)	<i>Oryza sativa</i>	250 mg/Kg 20 d	Incrementa el crecimiento de brotes y raíces.	Kotoky <i>et al.</i> (2019)
<i>Sphingomonas</i> sp. SaMR12 (82.99 µg/mL)	<i>Sedum alfredii</i>	11.2 mg/L 6 d	Reduce los niveles de H ₂ O ₂ y MDA. Aumenta el contenido de Cd en brotes.	Pan <i>et al.</i> (2016)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Sasm05 (15-50 µg/mL)	<i>Sedum alfredii</i>	1.1 mg/L 30 d	Incrementa la acumulación de biomasa, promueve la formación de brotes y raíces. Aumenta el contenido de Cd en brotes y raíces.	Chen <i>et al.</i> (2017)
<i>Buttiauxella</i> sp. SaSR13 (22.88 µg/mL)	<i>Sedum alfredii</i>	2.8 mg/L 30 d	Incrementa la acumulación de biomasa, el crecimiento de brotes y raíces. Aumenta el contenido de Cd en brotes y raíces.	Wu <i>et al.</i> (2018)
<i>Pseudomonas veronii</i> E02 (12.66 µg/mL)	<i>Panicum virgatum</i>	2.2 mg/L 10 d	Incrementa la acumulación de biomasa, el crecimiento de tallos. Disminuye el contenido de Cd en brotes.	Begum <i>et al.</i> (2018)

1.3.2.1 *Pseudomonas rhodesiae*

Pseudomonas rhodesiae es un bacilo Gram negativo perteneciente al grupo de *P. fluorescens* (Coroler *et al.*, 1996). Estudios previos han demostrado que *P. rhodesiae* presenta una gran versatilidad metabólica que le permite biodegradar derivados de nitro y clorofenol (Satchanska *et al.*, 2006) y mineralizar compuestos aromáticos policíclicos como carbazoles, bifenilos, antraceno, naftaleno y fenantreno (Yoon *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008). Algunas cepas de esta especie bacteriana también ha demostrado ser resistente al efecto antimicrobiano del α -pineno, por lo que se ha estudiado como biocatalizador en la reacción de conversión a isonovalal (Fontanille *et al.*, 2002) y ácido noválico (Linares *et al.*, 2008; Linares *et al.*, 2009).

Esta especie anteriormente ha sido aislada de cuerpos de agua minerales (Coroler *et al.*, 1996) y de sitios contaminados con compuestos aromáticos (Yoon *et al.*, 2002). Además se ha asociado a la rizósfera de plantas de *Vitis vinífera* (Rolli *et al.*, 2017), *Cnidocolus aconitifolius* (John-Jimtha y Radhakrishnan, 2016) y referida como endófita de hojas de plantas de tomate (Romero *et al.*, 2016) y de raíces de *Typha* sp. y *T. latifolia* (Zhang *et al.*, 2016; Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020; Zapata-Morales *et al.*, 2020).

La asociación de *P. rhodesiae* con diferentes especies vegetales sugiere la presencia de diferentes mecanismos que contribuyen con el crecimiento y desarrollo vegetal, por lo que previamente se ha evaluado su potencial en la promoción de crecimiento vegetal (Tabla 5).

Tabla 5. Actividades de promoción de crecimiento vegetal reportadas en diferentes cepas de *Pseudomonas rhodesiae*

Cepa	Hospedero	Localización	Actividades PCV	Referencia
<i>P. rhodesiae</i> BT2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Endófito de hojas	AIA Sideróforos Solubilización de fosfatos	Romero <i>et al.</i> (2016)
<i>P. rhodesiae</i> aislado 50	<i>Cnidoscopus aconitifolius</i>	Rizósfera	ACC desaminasa AIA Solubilización de fosfatos Fijación de nitrógeno Producción de amonio	John-Jimtha y Radhakrishnan (2016)
<i>P. rhodesiae</i> B07	Vid	Rizósfera	ACC desaminasa AIA Sideróforos Solubilización de fosfatos	Rolli <i>et al.</i> (2017)
<i>P. rhodesiae</i> R3ScM3P1C13	<i>T. latifolia</i>	Rizósfera	ACC desaminasa AIA Sideróforos Solubilización de fosfatos	Zapata-Morales <i>et al.</i> (2020)

AFA: ácido fenil acético; AIA, ác. Indol acético; ACC: amino ciclopropano carboxilato

Romero *et al.* (2016) observaron que *P. rhodesiae* BT2, además de presentar actividades de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*, es capaz de colonizar el interior de hojas y raíces e incrementa significativamente el peso fresco de las raíces de plantas de tomate con respecto a un control no inoculado. Por su parte, John-Jimtha y Radhakrishnan (2016) encontraron que la inoculación de una cepa de *P. rhodesiae* aislada de la rizósfera de *Cnidoscopus aconitifolius* sobre plantas de *P. vulgaris* incrementa hasta dos veces la longitud de la raíz primaria con respecto a plantas no inoculadas, mientras que en plantas de *Bacopa monnieri* aumenta significativamente el número de hojas y raíces, la longitud de raíces y tallos además del peso fresco con respecto a plantas sin bacteria.

1.4.1. *Pseudomonas rhodesiae* GRC140

En un estudio previo se aisló una bacteria endófito tolerante a Cd, a partir de raíces de plantas de *T. latifolia* crecidas en sitios impactados por metales pesados. Este aislado bacteriano fue designado como GRC140 e identificado como *Pseudomonas rhodesiae* por el análisis de la secuencia del gen codificante a 16S ribosomal (Rolón-Cárdenas,

2015; Rolón-Cárdenas, 2017). La caracterización bioquímica de *P. rhodesiae* GRC140 demostró que este aislado presenta diferentes actividades de promoción de crecimiento vegetal (Tabla 6) (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020).

Tabla 6. Actividades de promoción de crecimiento vegetal evaluadas en *Pseudomonas rhodesiae* GRC140.

Cepa	ACC desaminasa		Síntesis auxinas ($\mu\text{g/mL}$)		Sideróforo Pioverdina (mM)	Solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
	Crecimiento en medio mínimo	Gen <i>acdS</i>	AIA	AFA		P soluble ($\mu\text{g/mL}$)
GRC140	+	+	1.31 \pm 0.13	0.81 \pm 0.17	15.3 \pm 0.21	136.2 \pm 11.3

AFA: ácido fenil acético; AIA, ácido indol acético; ACC: amino ciclopropano carboxilato
 Datos obtenido de Rolón-Cárdenas *et al.* (2020).

Se ha observado que *P. rhodesiae* GRC140 incrementa el peso fresco total y la longitud del hipocótilo de las plántulas de *A. thaliana* en comparación con las plantas control. A nivel radicular se observó que *P. rhodesiae* GRC140 incrementa significativamente el número y la densidad de raíces laterales, además del número de pelos radiculares (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020).

En plantas expuestas a metales pesados, se ha demostrado que *P. rhodesiae* GRC140 protege a las plantas del estrés metálico, favorece la remoción de metales y modula procesos de morfogénesis en el tejido radical (Tabla 7) (Moctezuma-Granados, 2017; Ponce-Alonso, 2017; Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020).

Tabla 7. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 en plantas expuestas a metales pesados

Planta	Metal pesado y tiempo de exposición	Efecto de la bacteria	Referencia
<i>T. latifolia</i>	Cd (10 mg/L) 10 d	Incrementa la remoción de Cd del medio y la acumulación de Cd en raíces.	Moctezuma-Granados (2017)
<i>T. latifolia</i>	Pb (50 mg/L) 12 d	Incrementa la remoción de Pb, la longitud foliar y la acumulación de Pb en raíces.	Ponce-Alonso (2017)
<i>A. thaliana</i>	Cd (2.5 mg/L) 10 d	Incrementa el número y densidad de raíces laterales.	Rolón-Cárdenas <i>et al.</i> (2020)

Estos resultados sugieren que *P. rhodesiae* GRC140 ejerce mecanismos que modulan la fisiología de la planta para favorecer la adaptación a las condiciones de estrés, favorecer la remoción y acumulación de metales pesados.

2. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del ambiente con metales pesados es un problema que tiene implicaciones a la salud humana, por lo que en años recientes se ha prestado especial atención a la eliminación de metales tóxicos a través de técnicas de fitorremediación. Las plantas del género *Typha* sp. son de las más utilizadas en el tratamiento de efluentes contaminados, por lo que se ha estudiado ampliamente el efecto de las condiciones fisicoquímicas en la remoción y fitoextracción de metales pesados, sin embargo se ha estudiado poco sobre los factores biológicos implicados en este proceso (Hadad *et al.*, 2010).

En nuestro grupo de trabajo, se aisló *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, una cepa bacteriana endófito de raíces de *T. latifolia*, la cual se demostró que presenta características de promoción de crecimiento vegetal (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020). Estudios previos con *P. rhodesiae* GRC140 mostraron que esta bacteria aumenta significativamente la acumulación de Cd en raíces de estas plantas (Moctezuma-Granados, 2017), también se observó que incrementa significativamente el número de raíces de plántulas de *T. latifolia* en ausencia (Ponce-Alonso, 2017) y presencia de Cd (Netro-Soto, 2018). Estos efectos podrían ser consecuencia de las auxinas producidas por *P. rhodesiae* GRC140 (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020). Actualmente, se ha investigado el papel de la aplicación de auxinas exógenas en la tolerancia y acumulación de Cd de diferentes plantas, sin embargo, se ha observado que el efecto de las auxinas es altamente dependiente de la especie vegetal por lo que es necesario investigar el efecto de las auxinas producidas por la bacteria *P. rhodesiae* GRC140 usando plantas de *Typha* como planta modelo.

La investigación planteada contribuirá a comprender la interacción planta-bacteria en la acumulación de Cd. Asimismo, los resultados de la investigación ayudarán a incrementar la eficacia de la remoción de Cd mediada por *Typha* sp.

3. HIPÓTESIS

Las auxinas sintetizadas por *P. rhodesiae* GRC140 se encuentran involucradas de manera directa en la tolerancia y la fitoacumulación de Cd por *T. latifolia*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del AIA exógeno y de las auxinas producidas por *P. rhodesiae* GRC140 en el crecimiento y la fitoacumulación de Cd en plantas de *T. latifolia*.

4.2. Objetivos específicos

1. Cuantificar la producción de auxinas en cultivos *in vitro* de *P. rhodesiae* GRC140.
2. Evaluar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140, del AIA exógeno y del extracto de auxinas sintetizadas por *P. rhodesiae* en el crecimiento de *T. latifolia*.
3. Evaluar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140, del AIA exógeno y del extracto de auxinas sintetizadas por *P. rhodesiae* en plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd y determinar su contribución en la fitoextracción de Cd.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepa bacteriana

Pseudomonas rhodesiae GRC140 es una bacteria endófitas aislada de las raíces de *Typha latifolia* (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020). La cepa bacteriana se mantuvo a 4 °C en placas de agar Luria Bertani (LB, Lennox, Sigma-Aldrich, EUA).

5.2. Producción bacteriana de auxinas

5.2.1. Condiciones de crecimiento bacteriano para la producción de AIA y monitoreo de la producción de indoles

Para la producción de auxinas, *P. rhodesiae* GRC140 se inoculó en matraces de 500 mL que contenían 200 mL de caldo LB o LB suplementado con L-Triptófano (0.1 %) (L-Trp, Sigma-Aldrich, EUA) ajustado a pH de 7.5. Los matraces se incubaron bajo agitación rotatoria a 150 rpm a 30 ± 1 °C durante 84 h.

Cada 12 h se tomó una muestra del cultivo para determinar la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) y la producción de indoles totales. El contenido de indoles en las muestras de cultivo, obtenidas en los diferentes tiempos, se cuantificó colorimétricamente por espectroscopia UV-VIS utilizando el reactivo de Salkowski. A 500 μ L del sobrenadante del medio de cultivo, se le adicionaron 500 μ L del reactivo de Salkowski preparado de acuerdo a la formulación reportada por Sheng y Xia (2006), la cual consiste en una mezcla de 7.5 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.5 M, 150 mL de H_2SO_4 concentrado y 250 mL de agua destilada. Las muestras se mezclaron en vórtex y se dejaron reposar por una hora en oscuridad. Posterior a la incubación, se determinó la absorbancia de las muestras a 530 nm.

El contenido de compuestos indólicos en cada muestra, se determinó a partir de una curva de calibración de AIA. Como blanco se utilizó caldo LB suplementado con 0.1 % (p/v) de L-Trp al que se le adicionó también el reactivo de Salkowski. El blanco y los estándares fueron preparados e incubados en condiciones similares a las muestras.

5.2.2. Obtención del extracto de auxinas a partir de los sobrenadantes de cultivo bacteriano

Posterior a las 84 h de incubación, se obtuvo el sobrenadante libre de células del medio de cultivo por centrifugación a 4000 rpm durante 30 min. Para la obtención de las auxinas bacterianas, los sobrenadantes se acidificaron a pH a 2.5 con HCl 6 N. Posteriormente, a cada sobrenadante se le adicionó acetato de etilo (Karal, pureza: 99.85 %) (relación 1:1), se homogenizó la muestra y se dejó reposar durante 15 min.

La fase orgánica se transfirió a tubos cónicos de 50 mL, se concentró en rotavapor y se le eliminó el exceso de agua con MgSO₄ anhidro. Los extractos se secaron en estufa a 40 °C y una vez secos, fueron reconstituidos en metanol grado HPLC (Tedia, pureza: > 99. 0%).

5.2.3. Identificación y cuantificación de AIA producidos por *P. rhodesiae* GRC140

La producción de AIA en el extracto se identificó mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando un estándar de AIA y L-Trp en metanol y utilizando como fase móvil hexano: acetato de etilo: isopropanol: ácido acético (40:20:5:1). Las placas fueron visualizadas bajo luz UV de onda corta y reveladas con una mezcla de los reactivos de Van Urk y de Salkowski (1:3, v/v).

Los extractos obtenidos se derivatizaron y se analizaron por cromatografía de gases (CG modelo 7890A; Agilent Technologies, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por impacto electrónico (EMIE modelo 5975; Agilent Technologies, EUA). El AIA y los compuestos relacionados se identificaron con el programa MassHunter Workstation (versión B.06.00, Agilent Technologies) y la base de datos NIST MS Search (versión 2.0) y se cuantificaron con una curva de calibración de AIA (Sigma-Aldrich, EUA) realizada en las mismas condiciones de las muestras.

5.3. Material vegetal, medios de cultivo y germinación de las semillas

5.3.1. Colecta del material vegetal y autenticación de la planta

En este trabajo se utilizaron semillas de inflorescencias maduras de *T. latifolia* donadas por la Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre (FCQ-UASLP). Las semillas fueron

colectadas de plantas de *T. latifolia* cultivadas en el invernadero de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP (San Luis Potosí, SLP, México). Para la autenticación molecular de la planta, se obtuvo el ADN de 100 mg de hojas usando el método CTAB reportado previamente (Porebski *et al.*, 1997). La reacción de PCR se llevó a cabo usando el SuperMix High Fidelity de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Los cebadores psbA 3F (5' GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3') y trnH 3R (5' CGCGCATGGTGGATTACAATCC 3') se usaron para amplificar la región intergénica psbA-trnH, localizada en el genoma del cloroplasto (Liu *et al.*, 2013). Las condiciones de PCR fueron 95 °C por 10 min; 35 ciclos de 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos, México). Las secuencias obtenidas se alinearon en el GeneBank para determinar similitud en la base de datos NCBI.

5.3.2. Desinfección del material vegetal y germinación *in vitro*

Las semillas de *T. latifolia* se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex, Santa Catarina, NL, México) al 50 % (v/v) en agua estéril, suplementada con 0.02 % (v/v) de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EUA), siguiendo el tratamiento descrito por Remy y Duque (2016).

Las semillas desinfectadas se germinaron en frascos con 25 mL de agar Murashige Skoog (MS) 0.2X ajustado a pH 5.7 con buffer 3.5 mM ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES; Sigma-Aldrich, EUA), suplementado con glucosa al 1.0 % (p/v) y 0.8 % (p/v) de agar (Sigma-Aldrich, EUA). Los frascos de cultivo se incubaron durante 15 días a 28 °C bajo un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

5.4. Evaluación del efecto de *P. rhodesiae* GRC140, del AIA y del extracto de auxinas en *T. latifolia*

5.4.1. Tratamientos

Para evaluar el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 sobre el crecimiento de *T. latifolia*, las plántulas se transfirieron a cajas de Petri con agar MS 0.2X. A 3.5 cm de las raíces se inocularon 20 µL de diferentes densidades bacterianas (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 UFC/mL) de *P. rhodesiae* GRC140, ajustadas en NaCl al 0.85 % (p/v). Como control se inocularon 20 µL de solución salina (NaCl 0.85 %) sin inóculo bacteriano.

Para evaluar la respuesta de *T. latifolia* al AIA comercial, se prepararon placas Petri con agar MS 0.2X suplementadas con 1, 10 y 100 µM de AIA (CAS: 6505-45-9, Sigma-Aldrich, EUA). Como control, se utilizaron placas de MS 0.2X sin AIA.

Para evaluar el efecto del extracto obtenido a partir del sobrenadante de cultivo de *P. rhodesiae* GRC140, se prepararon placas Petri con agar MS 0.2X suplementadas con diferentes cantidades del extracto de auxinas (1.15, 2.30, 11.50, 23.0 µg/mL). Como control negativo se utilizaron placas Petri de agar MS 0.2X sin el extracto.

5.4.2. Condiciones de crecimiento

Las placas de los diferentes tratamientos se incubaron en posición vertical durante 15 días, bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

5.4.3 Análisis del crecimiento vegetal de plantas de *T. latifolia*

Al final del tratamiento se determinó el peso fresco (PF), el número y longitud de brotes y raíces. La longitud de brotes y raíces se midieron con una regla graduada. El PF se determinó en una balanza analítica (OHAUS AV114 Adventurer Pro Analytical Balance).

5.5. Establecimiento de un cultivo de *Typha latifolia* en un sistema de hidroponía axénico y su evaluación en el proceso de rizofiltración de cadmio por *P. rhodesiae* GRC140, auxinas exógenas y por auxinas bacterianas

5.5.1. Establecimiento del cultivo hidropónico axénico de *T. latifolia*

Las semillas germinadas (n = 3) se transfirieron a sistemas de hidroponía estériles desarrollados por Alatorre-Cobos *et al.* (2014) que contenían 150 mL de medio líquido MS 0.2X a pH 5.7, regulado con 3.5 mM de buffer MES y enriquecido con 1.0 % (p/v) de glucosa. Las plantas en los sistemas se cultivaron a 28 °C durante 60 días bajo luz fluorescente y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Posterior a la incubación, se analizó la presencia de microorganismos en el medio nutritivo sembrando una alícuota de 20 µL del medio de hidroponía en agar LB. Como control positivo se inoculó la solución de un sistema no estéril. Las placas se incubaron durante 5 días a 30 °C.

5.5.2. Efecto del Cd en plantas de *T. latifolia* crecidas en hidroponía

5.5.2.1. Modelamiento químico de la biodisponibilidad de Cd en el medio de hidroponía

Se analizó la especiación del Cd en el medio líquido MS 0.2X usando el programa Visual MINTEQ (Versión 3.1, KTH, Estocolmo, Suecia). La especiación del Cd se determinó a pH a 5.7, introduciendo al software la concentración iónica de cada uno de los componentes de mezcla basal de sales MS (Catálogo M5524; Sigma-Aldrich, EUA) y el buffer MES. La predicción se realizó con 10, 20 y 40 mg/L de Cd (CdCl₂).

3.5.2.2. Exposición a Cd de plantas de *T. latifolia* crecidas en hidroponía

Para la aclimatación, plantas de *T. latifolia* de 60 días de crecimiento en hidroponía, fueron transferidas a un nuevo sistema de hidroponía que contenía medio MS 0.2X de pH 5.7 sin glucosa, y se mantuvieron en este medio durante 6 días. Después de la incubación, los sistemas (n = 3) con plántulas de tamaño similar de *T. latifolia* se expusieron durante 10 días a medio MS 0.2X de pH 5.7 suplementado con 0, 10, 20 y

40 mg/L de Cd (CdCl_2) (Fermont, Monterrey, México). Los sistemas se incubaron a 28 °C durante 10 días bajo luz fluorescente, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Al final del tratamiento se determinó el peso fresco (PF), el peso seco (PS), el contenido de clorofila, la fuga de electrolitos, el contenido de glutatión (GSH) y la actividad catalasa (CAT). También se determinó el contenido de Cd en los brotes y las raíces de las plántulas y en los medios de hidroponía.

5.5.3. Efecto de *P. rhodesiae* GRC140, de las auxinas exógenas y del extracto de auxinas en plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd

5.5.3.1. Preparación del inóculo bacteriano para el ensayo de interacción planta-bacteria

P. rhodesiae GRC140 se cultivó en medio líquido LB por 16 - 18 h a 30 °C. Después de la incubación, las células bacterianas se colectaron por centrifugación a 4500 rpm por 15 min, se re-suspendieron en 0.01 M de MgSO_4 y el inóculo bacteriano se ajustó a una $\text{DO}_{600} = 1.0$.

5.5.3.2. Inoculación de *P. rhodesiae* GRC140, adición de las auxinas exógenas y el extracto de auxinas a plantas de *Typha latifolia*

El efecto de *P. rhodesiae* GRC140, del AIA y del extracto de auxinas en la fitoextracción de Cd se probó en plantas de *T. latifolia* de 60 días de crecimiento en sistemas de hidroponía, las cuales se transfirieron a una solución MS 0.2x sin glucosa antes del experimento. Se seleccionaron 12 sistemas los cuales se usaron para evaluar cuatro tratamientos:

- Tratamiento 1 (Cd): Los sistemas (n = 3) se adicionaron 1.5 mL de solución de sulfato de magnesio (MgSO_4) 0.01 M.
- Tratamiento 2 (Cd + GRC140): Los sistemas (n = 3) se inocularon con 1.5 mL de una suspensión bacteriana ($\text{DO}_{600} = 1.0$) de *P. rhodesiae* GRC140 en una solución 0.01 M de MgSO_4 .
- Tratamiento 3 (Cd + AIA): Los sistemas (n = 3) se adicionaron con AIA a una concentración final de 1.0 μM .

- Tratamiento 4 (Cd + Extracto de auxinas): Los sistemas (n = 3) se adicionaron con el extracto de auxinas a una concentración final de 1.15 mg/L.

Los 12 sistemas se incubaron durante 6 días, y después de la incubación, la solución de hidroponía de todos los sistemas se reemplazó con medio MS 0.2X de pH 5.7 suplementada a una concentración final de 40 mg/L de Cd (CdCl₂). Se seleccionó esta concentración de Cd al ser la concentración que produjo la mayor reducción de la biomasa de brotes en las plantas de *T. latifolia*. Los sistemas se incubaron durante 10 días bajo luz fluorescente y un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Al final del tratamiento, se determinó el PF, el PS, el contenido de clorofila, la fuga de electrolitos, el contenido de GSH total y la actividad CAT. También se determinó el contenido de Cd en los brotes y las raíces de las plántulas y en los medios de hidroponía.

5.5.3.3. Determinación de densidad bacteriana en el medio de hidroponía y en las raíces de la planta

El número de bacterias viables, determinado como unidades formadoras de colonias (UFC), en las soluciones de hidroponía, se estimó realizando diluciones seriadas siguiendo la metodología de Miles *et al.* (1938). Después de la exposición a Cd, el número de bacterias asociadas a las raíces de las plantas inoculadas y no inoculadas, se determinó de acuerdo con Balsanelli *et al.* (2017). En condiciones de esterilidad, se tomaron las raíces de las plantas (150 mg) con pinzas estériles, se maceraron en 1000 µL de solución salina estéril (NaCl 0.85 %). Los extractos se diluyeron de manera serial y 10 µL de cada dilución se colocaron en agar LB. Las placas de LB se incubaron a 30 °C por 48 h.

5.5.3.3. Determinación del peso fresco y seco

Al final de los tratamientos se separaron los brotes de las raíces y se pesaron ambos tejidos. Posteriormente, ambas muestras se secaron durante 24 h a 70 °C hasta peso constante. Los tejidos frescos y secos se pesaron en una balanza analítica (OHAUS AV114 Adventurer Pro Analytical Balance).

5.5.3.4. Extracción y determinación de clorofila

El contenido de clorofila (Chl) en los brotes de plantas de *T. latifolia* se extrajo de acuerdo a la metodología descrita por Lichtenthaler y Buschmann (2001b) con modificaciones. Se pesaron 100 mg de hojas frescas, se homogenizaron con 5 mL de acetona absoluta en un mortero y se mantuvieron en oscuridad durante 24 h a 4 °C. Se midió la absorbancia de los extractos usando un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 221, Thermo Scientific, EUA) a 644.8 nm ($A_{644.8}$) y 661.6 nm ($A_{661.6}$). La concentración de Chl *a* y Chl *b* se calculó de acuerdo a (Lichtenthaler y Buschmann, 2001a), usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Chl } a = 11.24 A_{661.6} - 2.040 A_{644.8}$$

$$\text{Chl } b = 20.12 A_{644.8} - 4.19 A_{661.6}$$

Los resultados se normalizaron con el PF y se expresaron en mg/g de PF.

5.5.3.5. Fuga de electrolitos

La fuga de electrolitos se determinó usando el método de conductividad eléctrica de acuerdo a la metodología descrita por Umnajkitikorn *et al.* (2021). Las muestras de raíces (100 mg) se colocaron en 10 mL de agua desionizada a 25 °C por 1 h. Se midió la conductividad (ECi) de la solución usando un conductímetro (PC2700 Oakton, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). A continuación, las muestras se incubaron a 20 °C por 24 h, y se midió la conductividad final (ECf) de cada muestra. Para determinar la conductividad total (ECt), las muestras analizadas se calentaron a 120 °C en una autoclave por 15 min y se enfriaron a 25 °C.

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

$$\%EL = \left(\frac{ECf - ECi}{ECt - ECi} \right) \times 100$$

Donde ECi: conductividad eléctrica inicial; ECf: es la conductividad eléctrica final y ECt: conductividad eléctrica total.

5.5.3.6. Actividad catalasa y determinación de glutatión total

Para determinar la actividad CAT y el contenido de GSH, se pesaron 250 mg de tejido vegetal fresco, se pulverizaron con nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 500 μL de buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 adicionado con 5 mM EDTA (Buffer KPE). Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 12000 rpm por 20 min y se usaron para la determinación de la actividad CAT, el contenido de GSH total y el contenido de proteína.

El contenido de proteína total se cuantificó en el sobrenadante de cada muestra usando una curva de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich, EUA) como estándar proteico y el reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA). Las muestras se ajustaron a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total.

La actividad CAT se determinó por espectrofotometría UV-Vis usando la metodología descrita por Aebi (1984). Se preparó una mezcla de reacción (1.025 mL) que contenía 50 mM de buffer de fosfatos pH 7.0, 10 mM de H_2O_2 y 25 μL del extracto de proteína. La reacción se monitoreó a 240 nm durante 3 minutos. Se calculó la actividad de la enzima usando el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unidad de CAT se definió como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 μmol de H_2O_2 por minuto (El-Amier *et al.*, 2019). La actividad CAT se normalizó con el contenido de proteína y expresó en U/mg de proteína.

El contenido de glutatión se determinó usando el método de reciclaje enzimático reportado por Rahman *et al.* (2006) con modificaciones. El extracto de proteína se desproteinizó adicionando un volumen de la mezcla de ácido sulfosalicílico (10 %) y Tritón X-100 (0.1%) preparado en buffer KPE. A continuación, se preparó una mezcla de reacción (0.980 mL) que contenía 100 mM de buffer KPE, 0.05 mM de NADPH, 0.1 mM de DTNB, 50 U/mL de glutatión reductasa (GR) y 100 μL del extracto desproteinizado. La mezcla de reacción se incubó durante 10 min en oscuridad y después de la incubación, la absorbancia de la muestra se leyó a 412 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis. La concentración de GSH se determinó usando una curva de calibración con concentraciones crecientes de GSH (Sigma-Aldrich, EUA). El

contenido de GSH en cada muestra se normalizó con el contenido total de proteína y se expresó en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

5.5.3.7. Digestión ácida de muestras y análisis de Cd

Después de la exposición a Cd, las soluciones de hidroponía de los diferentes tratamientos se removieron y se acidificaron hasta pH 2.0 con HNO_3 concentrado (Sigma-Aldrich, EUA; pureza: > 99.999 %). Las raíces de las plantas se lavaron con EDTA 0.1 M durante 15 min para eliminar el metal adsorbido, y se separaron los brotes de las raíces. Ambos tejidos se secaron durante 24 h a 70 °C. Las raíces de las plantas (0.025 g) fueron digeridas con HNO_3 y H_2O_2 al 30 %, de acuerdo a la metodología descrita por Rodríguez-Hernández *et al.* (2015). Mientras que los brotes (0.100 g), fueron digeridos con una mezcla de HCl (Sigma-Aldrich, EUA; pureza: > 99.999 %) y HNO_3 (3:1 v/v), de acuerdo a Carranza-Álvarez *et al.* (2008) con modificaciones. Todas las muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire-acetileno (Varian SpectrAA 220FS, Mulgrave, Australia) a una longitud de onda de 228.8 nm. La concentración de Cd en las muestras se estimó usando una curva de calibración de 0.05 a 1.50 mg/L de Cd. La concentración de Cd en las muestras vegetales se normalizó con el PS y se expresó en $\mu\text{g}/\text{mg}$ PS. El Cd también se cuantificó en el medio de hidroponía inicial y final. A partir de los datos obtenidos en la cuantificación de Cd, se calculó el porcentaje (%) de remoción, el factor de translocación (FT) y de bioconcentración (FBC).

El porcentaje de remoción de Cd se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ Remoción} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

Donde C_i es la concentración de Cd (mg/L) en el medio inicial, C_f es la concentración de Cd (mg/L) residual en el medio de hidroponía después de los tratamientos.

El factor de translocación (TF) se calculó dividiendo la concentración de Cd ($\mu\text{g}/\text{g}$ PS) en brotes entre la concentración de Cd ($\mu\text{g}/\text{g}$ PS) en la raíz (Ren *et al.*, 2020). El factor de bioconcentración (BCF) se calculó dividiendo el Cd de la raíz ($\mu\text{g}/\text{g}$ PS)

entre el Cd presente en la solución (mg/L) al finalizar el tratamiento (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020).

5.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPad Prism (Versión 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias estadísticas en la producción de compuestos indólicos, el contenido de clorofila, la fuga de electrolitos, el factor de translocación (FT), el factor de bioconcentración (FBC), el contenido y la acumulación de Cd se determinaron por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba post hoc de Dunnett o Tukey.

También se empleó una ANOVA de dos vías con una prueba post hoc de Bonferroni para determinar las diferencias estadísticas en el contenido de glutatión total, la actividad catalasa, el peso seco y peso fresco entre brotes y raíces.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Producción de AIA por *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 y evaluación del efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del AIA y del extracto de auxinas en plantas de *Typha latifolia*

6.1.1 Producción de AIA y de auxinas por *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 a partir del L-Trp

El AIA es un metabolito producido por algunas bacterias asociadas a las plantas a partir del L-Trp presente en los exudados de la raíz (Baliyan *et al.*, 2021). Por lo cual, la síntesis *in vitro* de AIA por las bacterias es altamente dependiente de la presencia L-Trp en el medio de crecimiento. Para comprobar el efecto del L-Trp en la producción bacteriana de AIA, se determinó el contenido de compuestos indólicos producidos por *P. rhodesiae* GRC140 en caldo LB (Figura 4a) y caldo LB suplementado con L-Trp al 0.1 % (Figura 4b).

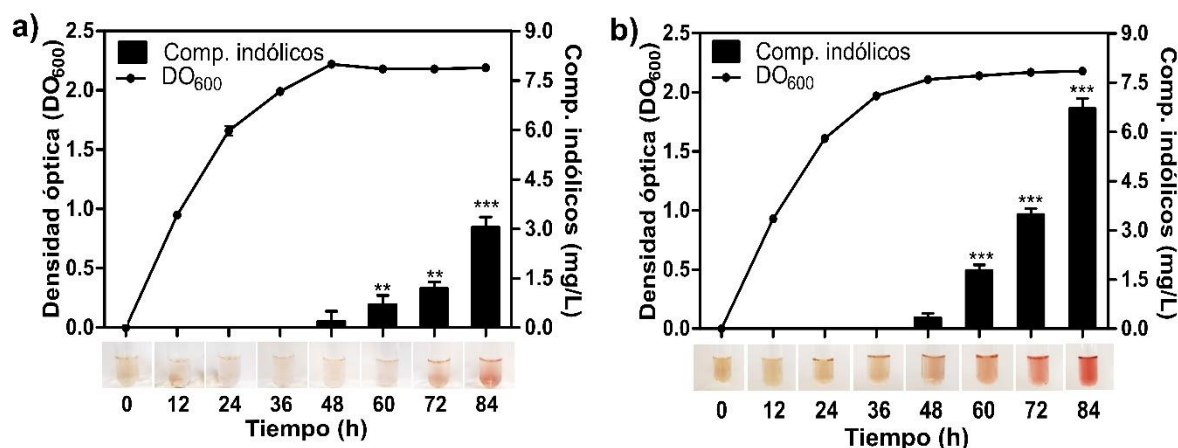


Figura 4. Cinética de crecimiento y producción de compuestos indólicos por *Pseudomonas rhodesiae* GRC140. *P. rhodesiae* GRC140 se cultivaron por 84 h en medio LB (a) y LB suplementado con L-Triptófano (b). El crecimiento se determinó midiendo la DO₆₀₀ y la producción de AIA se determinó usando la reacción de Salkowski. Los valores representan la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las cero horas (**p < 0.01; ***p < 0.001; Prueba de Dunnett).

Se observó que la adición de L-Trp al medio de cultivo no afecta el crecimiento bacteriano, sin embargo, incrementa considerablemente la producción de compuestos indólicos (Figura 4). En medio LB sin L-Trp, *P. rhodesiae* GRC140 produce un máximo de 3.0 mg/L de derivados indólicos (Figura 4a), mientras que en medio LB suplementado con L-Trp, la bacteria incrementa la producción de compuestos indólicos en más del doble (6.5 mg/L) (Figura 4b) al mismo tiempo de incubación que el control. Estos resultados son similares a lo observado en *Ignatzschineria* sp. CG20001 (Park *et al.*, 2021) y *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Imada *et al.*, 2017). En estas dos especies de bacterias la producción de compuestos indólicos es totalmente dependiente de L-Trp exógeno.

El tiempo de incubación también ha sido referido como un factor que influye en la producción *in vitro* de AIA por las bacterias (Apine y Jadhav, 2011). En este estudio se observó que la producción de compuestos indólicos por *P. rhodesiae* GRC140 inicia a partir de las 24 h y se mantiene en incremento hasta las 84 h en medio LB con L-Trp (Figura 4b). De manera similar, estudios previos han mostrado que en medios de cultivo suplementados con L-Trp los compuestos indólicos se producen sólo durante la fase estacionaria de crecimiento celular. Por ejemplo, *P. fluorescens* A5 comienza la producción de AIA a partir de las 48 h de crecimiento en medio LB (Ait Bessai *et al.*, 2022). Por otro lado, *Enterobacter* sp. P-36 produce auxinas indólicas después de las 24 h de incubación en medio peptona vegetal-extracto de levadura, una versión modificada del LB (Luziatelli *et al.*, 2021). Este comportamiento puede ser atribuido a que durante esta fase de crecimiento hay una baja disponibilidad de fuentes de nitrógeno, lo que conlleva al uso del L-Trp por la bacteria y la activación de las rutas biosintéticas de AIA (Patten *et al.*, 2013; Duca y Glick, 2020).

Se ha reportado que la reacción de Salkowski es una reacción colorimétrica no específica para AIA y puede reaccionar con todos los compuestos indólicos incluyendo intermediarios en la síntesis del AIA y conjugados de AIA (Ali *et al.*, 2009; Kuźniar *et al.*, 2021). Por lo que para comprobar la presencia de compuestos indólicos, incluyendo AIA, en los sobrenadantes de cultivo de 84 h de *P. rhodesiae* GRC140, se

realizaron extracciones con acetato de etilo y analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) (Figura 5).

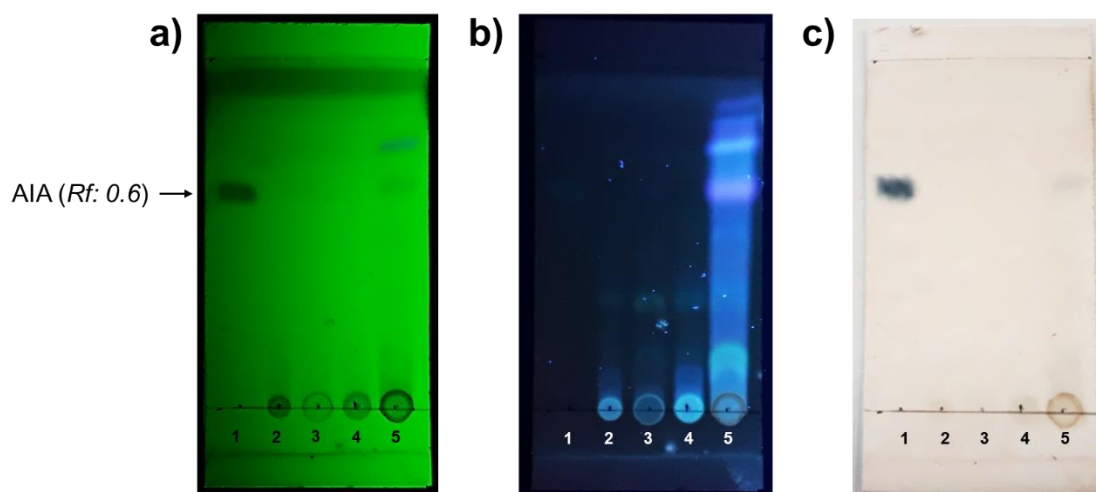


Figura 5. Identificación de AIA en un cultivo de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 por cromatografía en capa fina. Los extractos se analizaron usando luz UV de onda larga (a), luz UV de onda corta (b) y el reactivo de van Urk-Salkowski (c). Línea 1) Estándar de AIA, Línea 2) Extracto de medio LB no inoculado, Línea 3) Extracto de cultivo de GRC140 en LB, Línea 4) Extracto de medio LB +Trp no inoculado, Línea 5) Extracto de cultivo de GRC140 en LB +Trp. En cada línea se colocaron volúmenes iguales de cada uno de los extractos.

En el análisis por CCF, se observó que el AIA presenta un factor de retención (FR) de 0.6 en el sistema de solventes utilizado [Hexano: acetato de etilo: isopropanol: ácido acético glacial (40: 20: 5: 1, v/v)]. El FR permitió confirmar la presencia de AIA en el extracto de cultivo de *P. rhodesiae* GRC140 crecido en medio LB + L-Trp (Figura 5a, c), y concuerda con lo previamente evaluado mediante colorimetría (Figura 4).

Con la finalidad de identificar y cuantificar los compuestos producidos por *P. rhodesiae* GRC140 en los cultivos, los extractos se analizaron también por CG-EM (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis por CG-EM de ácido indol acético (AIA) y compuestos intermediarios en la síntesis del AIA producidos por *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 en medio LB y LB con L-Trp

Compuesto	Tiempo de retención (minuto)	Medio	
		LB (mg/L)	LB + Trp (mg/L)
Indol-3-etanol (IEt)	37.25	ND	0.22 ± 0.05
Ácido indol acético (AIA)	38.51	ND	1.38 ± 0.48
Ácido indol láctico (AIL)	41.33	ND	1.59 ± 0.92

ND: no detectado

Los valores representan la media ± DE.

Como se muestra en la Tabla 8, en ausencia del L-Trp no se identificó el AIA o compuestos intermediarios en el extracto, lo cual indica que *P. rhodesiae* GRC140 no es capaz de sintetizarlos en ausencia del L-Trp. Mientras que en presencia del L-Trp, *P. rhodesiae* GRC140 produce AIA a una concentración de 1.38 ± 0.48 mg/L. Estos resultados también sugieren que *P. rhodesiae* GRC140 produce AIA siguiendo rutas dependientes del L-Trp.

Una vez analizada la producción de compuestos indólicos por *P. rhodesiae* GRC140 en los sobrenadantes de cultivo, se calculó la concentración de cada compuesto en el extracto seco. Como se muestra en la Figura 6, por cada gramo de extracto seco hay 1.7 ± 0.63 mg de IEt, 11 ± 4.0 mg de AIA y 10 ± 8.7 mg de AIL. Estos resultados muestran que *P. rhodesiae* GRC140 produce AIA y el AIL a partir del L-Trp a niveles similares a las 84 h de incubación.

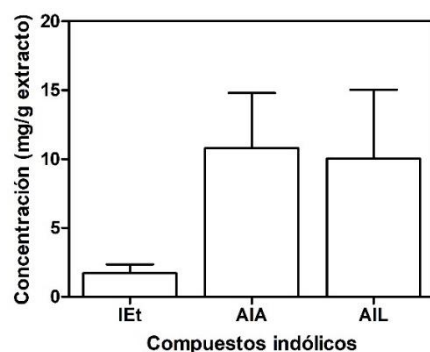


Figura 6. Concentración de compuestos indólicos (IET, AIA y AIL) en el extracto obtenido del cultivo de 84 h de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 en caldo LB+Trp. Los valores representan la media \pm DE.

Existen cinco rutas que las bacterias pueden emplear para la biosíntesis de AIA usando el L-Trp como precursor (Duca y Glick, 2020). La presencia del indol-3-etanol (IET) y ácido indol láctico (AIL) en los sobrenadantes de cultivo de *P. rhodesiae* GRC140 (Tabla 8) sugiere que la síntesis de AIA en esta bacteria se realiza principalmente a través de las rutas del ácido indol pirúvico y del indol-3-acetaldehído. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar la vías de síntesis de AIA en *P. rhodesiae* GRC140. Duca *et al.* (2018) observaron de manera similar la presencia de AIL en un cultivo de *Pseudomonas* sp. UW4. Mientras que Lin *et al.* (2015), identificaron el AIL, IET y Indol-3-acetamida (IAM) en cultivos de *P. putida*. Estos resultados soportan la idea de que la producción de AIA a través de ruta dependiente de L-Trp pudiera estar conservada en el género *Pseudomonas*.

6.1.2. Autenticación vegetal

Para autenticar la planta se analizó la región intergénica *psbA-trnH*, un marcador ubicado en el genoma de los cloroplastos y útil en taxonomía molecular y relaciones filogenéticas vegetales (Liu *et al.*, 2013). Por PCR se amplificó un producto de aproximadamente 700 pares de bases (pb) (Figura 7). La secuenciación del amplicón (Número de acceso del GenBank MZ905385) mostró una alta similitud (99.73 %) con la secuencia de la región intergénica de *T. latifolia* disponible en la base de datos del NCBI.

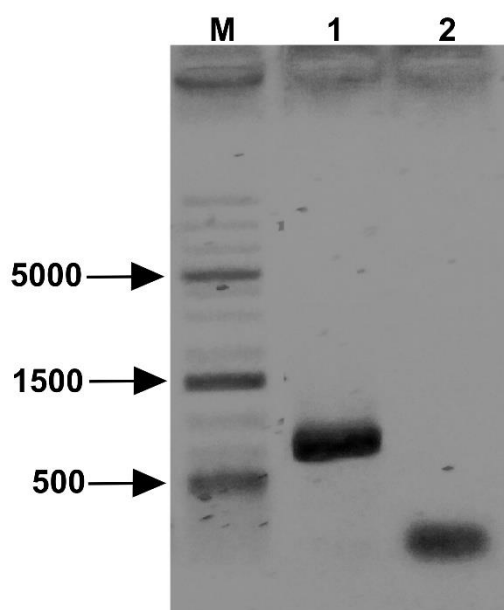


Figura 7. Amplificación de la región intergénica *psbA-trnH* usando el ADN genómico de plantas de *Typha*. El gel de electroforesis se visualizó bajo luz UV. Línea M) Marcador de peso molecular 1 kb Plus Thermo Fisher Scientific, Línea 1) Producto de PCR usando el ADN genómico de *Typha*, Línea 2) Control negativo.

6.1.3. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 en plantas de *Typha latifolia*

Estudios previos, han mostrado que diferentes especies de *Pseudomonas* pueden favorecer el desarrollo vegetal al modificar la arquitectura radical de las plantas (Backer *et al.*, 2018). Ortiz-Castro *et al.* (2020) y Gu *et al.* (2020) encontraron que *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. mediterranea* estimulan la formación de raíces laterales en *A. thaliana*. De manera similar, se observó en un estudio previo que *P. rhodesiae* GRC140 incrementa la densidad de raíces laterales en *A. thaliana* (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2020). Por lo cual en este trabajo se estudió el efecto de *P. rhodesiae* GRC140 en plantas de *T. latifolia*, una especie comúnmente utilizada en fitorremediación (Figura 8).

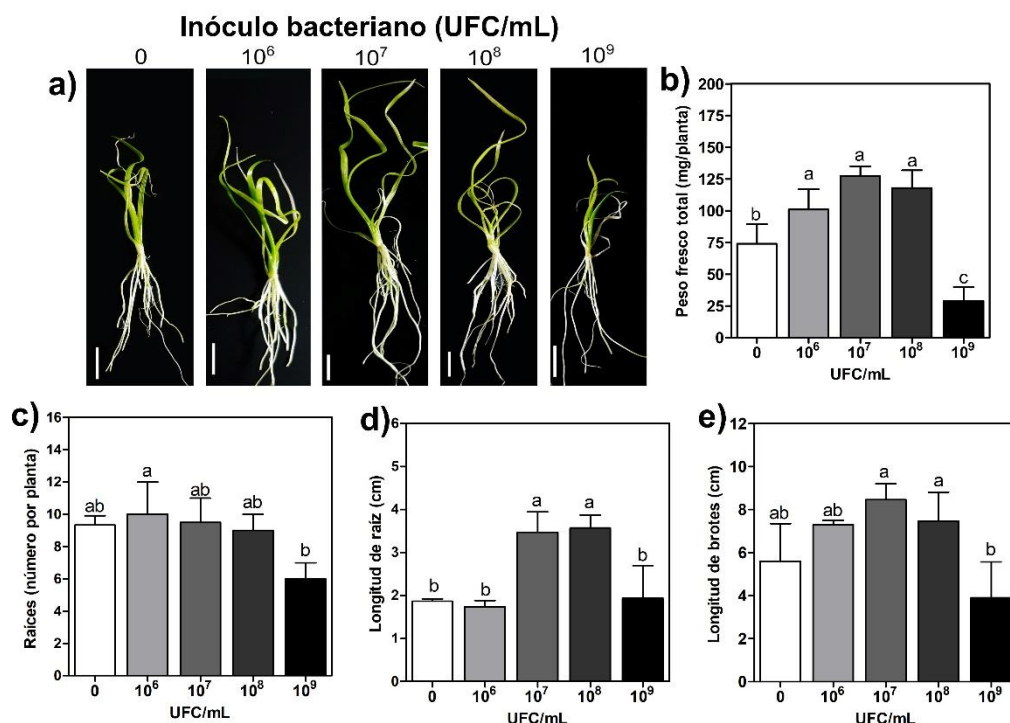


Figura 8. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 en *Typha latifolia*. Plantas de *T. latifolia* de 15 días de crecimiento se expusieron durante 15 días a diferentes densidades bacterianas de *P. rhodesiae* GRC140 (a). Posterior al tratamiento se analizó el peso fresco total (b); el número de raíces (c); longitud de raíces (d) y la longitud de brotes (e). Los valores representan la media \pm DE. Letras diferentes representan medias estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, Prueba de Tukey). Barra de escala: 1.0 cm.

A los 15 días de interacción entre la bacteria y el sistema radical de *T. latifolia*, se observó que las densidades de 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/mL de *P. rhodesiae* GRC140 favorecen el incremento de biomasa fresca pero no modifican la longitud de los brotes de las plantas de *T. latifolia* (Figura 8a, b, e). Resultados similares fueron reportados por Yasmin *et al.* (2020), quien encontró que *P. pseudoalcaligenes* (10^6 UFC/mL) aumenta el peso fresco de plantas de *Glycine max* L. crecidas en hidroponía.

El sistema radical es responsable del anclaje de la planta al sustrato y de la absorción de agua y sustancias minerales, por lo cual tiene un papel central en la salud y la productividad vegetal (Khan *et al.*, 2016). En este estudio, se observó que *P. rhodesiae* GRC140 a densidades de 10^7 y 10^8 UFC/mL incrementa la longitud del sistema radical de *T. latifolia* (Figura 8d), pero no tienen un efecto significativo en el número de raíces por planta (Figura 8c). Se ha reportado que las bacterias productoras de AIA tienen efecto en el sistema radicular al proveer de una fuente de auxinas exógenas para la planta (Ali *et al.*, 2009). Lo cual podría indicar que *P. rhodesiae* GRC140 produce auxinas difusibles en el medio de cultivo que modifican el sistema radical de *T. latifolia*.

Las bacterias productoras de AIA también pueden producir un efecto inhibitorio en el crecimiento vegetal en función de la dosis empleada. En este estudio se observó que altas concentraciones de inóculo de *P. rhodesiae* GRC140 (10^9 UFC/mL) reducen de manera significativa el peso fresco total de *T. latifolia* (Figura 8a, b). El efecto inhibitorio en el crecimiento vegetal de *T. latifolia* podría ser consecuencia de los altos niveles de AIA en el medio secretado por la bacteria a altas densidades (Barazani y Friedman, 1999; Sirrenberg *et al.*, 2007).

6.1.4. Efecto del AIA exógeno en plantas de *Typha latifolia*

Las auxinas, como el AIA, son fitohormonas que favorecen el crecimiento y desarrollo vegetal (Keswani *et al.*, 2020). Por lo cual, en este estudio, se evaluó la respuesta de *T. latifolia* al AIA exógeno (Figura 9).

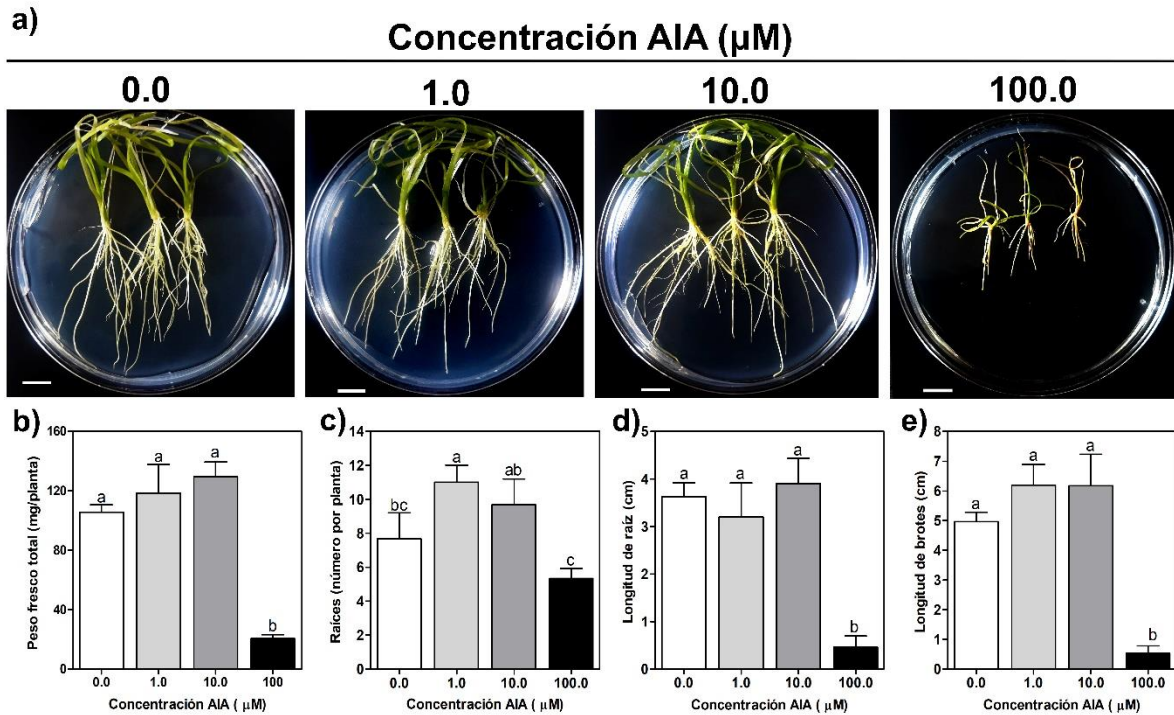


Figura 9. Efecto del ácido indol acético comercial en *Typha latifolia*. Plantas de *T. latifolia* de 15 días de crecimiento se expusieron durante 15 días a diferentes concentraciones de AIA (a). Posterior al tratamiento se analizó el peso fresco total (b); el número de raíces (c); la longitud de raíz (d) y la longitud de brotes (d). Los valores representan la media \pm DE. Letras diferentes representan medias estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, Prueba de Tukey). Barra de escala: 1.0 cm.

Después de 15 días de incubación con AIA exógeno, no se observaron cambios significativos en el peso fresco total, la longitud de raíz y la longitud de brotes en las plantas de *T. latifolia* expuestas a 1.0 y 10.0 μM de AIA (Figura 9a, b, d, e). Sin embargo, 1.0 μM del AIA exógeno produce un incremento del 40 % en el número de raíces en comparación con las plantas control (Figura 9c). Estos resultados indican que el AIA exógeno modifican el sistema radical de plantas de *T. latifolia* crecidas *in*

vitro. Estudios previos han observado efectos similares en diferentes especies vegetales crecidas *in vitro*. Knee y Hangarter (1996) reportaron que el AIA induce el crecimiento de la raíz primaria en *A. thaliana*. Por otro lado, Chhun *et al.* (2003) y Abu-Zahra *et al.* (2012) observaron que el ácido naftalen acético (ANA) y el ácido indol butírico (AIB) incrementan el número de raíces en *Parthenocissus quinquefolia* y *Oryza sativa* L., respectivamente. El incremento en el número de raíces de la planta es consecuencia a un incremento en la división celular del periciclo, un tejido vascular localizado en la parte central de la raíz, en respuesta a las auxinas exógenas (Liu *et al.*, 2002).

Por otro lado, el efecto benéfico de las auxinas es dependiente de la concentración de auxina en el medio de cultivo. En este trabajo se encontró que a concentraciones superiores a 10.0 μM de AIA se inhibe el crecimiento general de *T. latifolia* (Figura 9a). Estos resultados son similares a lo reportado por De Klerk *et al.* (1997), quienes observaron que altos niveles de AIA, ANA y AIB inhiben la elongación del sistema radicular y reduce el número de raíces de plántulas de manzana 'Jork 9'. Este efecto podría ser consecuencia de una elevada producción de etileno en la planta, inducida por las altas concentraciones de auxinas en el medio (Chen y Kao, 2012).

6.1.5. Efecto del extracto de auxinas obtenido del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 en el crecimiento de *Typha latifolia*

Se evaluó el efecto del extracto obtenido a partir del sobrenadante del cultivo de *P. rhodesiae* GRC140 (Figura 10). Para los ensayos con plantas, se prepararon placas de agar MS 0.2X suplementadas con diferentes cantidades de extracto (1.15, 2.30, 11.50, 23.0 $\mu\text{g/mL}$). Como control negativo se utilizaron placas sin la adición del extracto. Plántulas de *T. latifolia* de 15 días después de germinación (DDG) se colocaron sobre las placas y se incubaron durante 15 días bajo un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

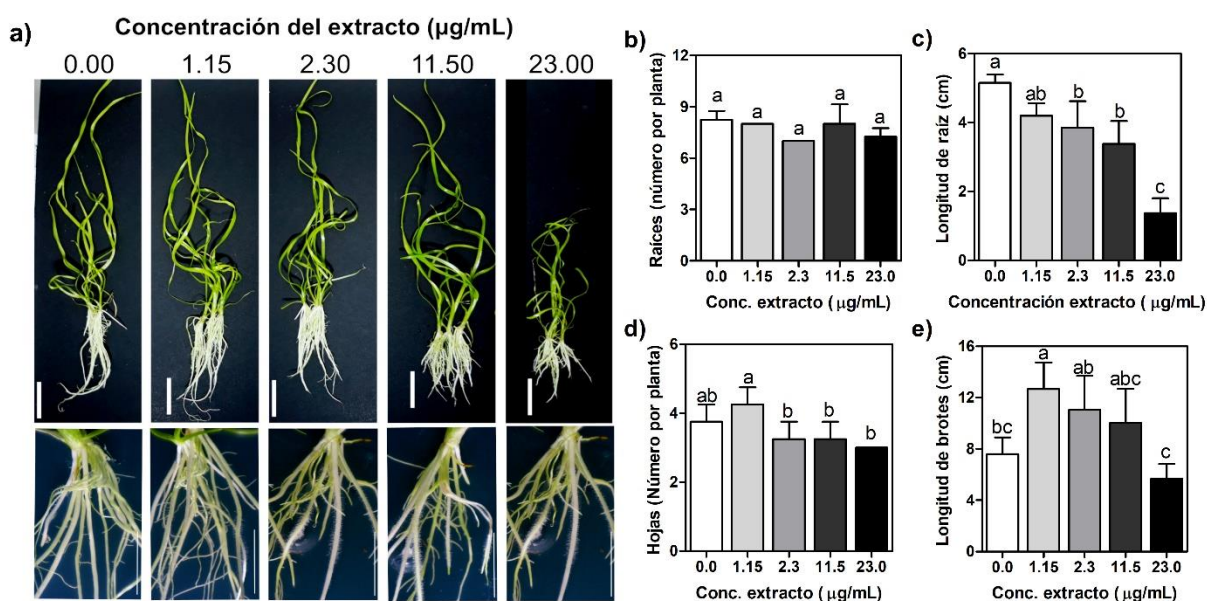


Figura 10. Efecto del extracto de auxinas en *Typha latifolia*. Plantas de *T. latifolia* de 15 días de crecimiento se expusieron durante 15 días a diferentes concentraciones del extracto de auxinas (a). Posterior al tratamiento se analizó el número de raíces (b); la longitud de raíces (c); el número de hojas (d) y la longitud de los brotes (e). Los valores representan la media \pm DE. Letras diferentes representan medias estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, Prueba de Tukey). Barra de escala: 1.0 cm.

En este estudio se encontró que el extracto obtenido de un cultivo de *P. rhodesiae* GRC140 no tiene un efecto significativo en la emergencia de hojas ni de raíces (Figura 10b, d). Sin embargo, se observó que el extracto de auxinas tiene un

efecto dosis-dependiente significativo sobre la longitud de la raíz y de los brotes de *T. latifolia* (Figura 10 a, c, e). Como se muestra en la Figura 10c la longitud de la raíz disminuye de manera dependiente de la concentración de extracto que se adiciona al medio, mientras que la longitud de los brotes aumenta significativamente con 1.15 µg/mL del extracto (Figura 10e). Efectos similares se han observado en plantas de *A. thaliana* Col-0 y *Triticum aestivum* tratadas con extractos de sobrenadantes de cultivo del hongo *Pisolithus tinctorius* y la bacteria *Nocardioides* sp., respectivamente (Meena *et al.*, 2020; Castillo-Esparza *et al.*, 2021). En *A. thaliana* Col-0 el extracto inhibe el crecimiento de la raíz primaria (Castillo-Esparza *et al.*, 2021), mientras que en *T. aestivum*, el extracto incrementa la longitud de los brotes y raíces (Meena *et al.*, 2020). Los efectos producidos por el extracto pueden ser atribuidos al efecto sinérgico del AIA, el IET y el AIL, metabolitos encontrados en el extracto (Tabla 8) y que han mostrado ser auxinas activas en *A. thaliana* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014).

Por otro lado, estudios previos han demostrado que algunas bacterias, además de auxinas, producen otra clase de metabolitos en medio LB que pueden modificar la estructura de la raíz (Ali *et al.*, 2009). Ortiz-Castro *et al.* (2020) encontraron que *P. putida* y *P. fluorescens* producen ciclodipéptidos en caldo LB. Estos compuestos muestran una actividad similar a auxinas y favorecen la formación de raíces laterales en *A. thaliana* (Ortiz-Castro *et al.*, 2011). Sin embargo, estos compuestos no fueron considerados en este estudio.

6.2. Establecimiento del cultivo en hidroponía de *Typha latifolia* y su evaluación en el proceso de remoción de Cd por *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, por el AIA y por el extracto de auxinas

6.2.1. Cultivo de *Typha latifolia* bajo condiciones axénicas

Para estudiar el efecto del cocultivo con *P. rhodesiae* GRC140, del extracto de auxina y del AIA sobre plantas de *T. latifolia*, fue necesario desarrollar un cultivo que permitiera obtener plantas axénicas con un buen desarrollo vegetal. En estudios previos se han obtenido plantas estériles de *T. latifolia* por micropropagación *in vitro* usando como explantes inflorescencias maduras (Estime *et al.*, 2002; Czako *et al.*, 2005), secciones de hojas (Estime *et al.*, 2002) y semillas germinadas (Rogers *et al.*, 1998; Rogers, 2003). En este trabajo se propuso el establecimiento de un cultivo axénico en hidroponía de *T. latifolia* a partir de semillas germinadas.

La germinación de las semillas fue el primer paso para establecer el cultivo de *T. latifolia*, por lo cual se evaluó la germinación de semillas desinfectadas de *T. latifolia* en agar-agua y agar MS 0.2X (Figura 11).

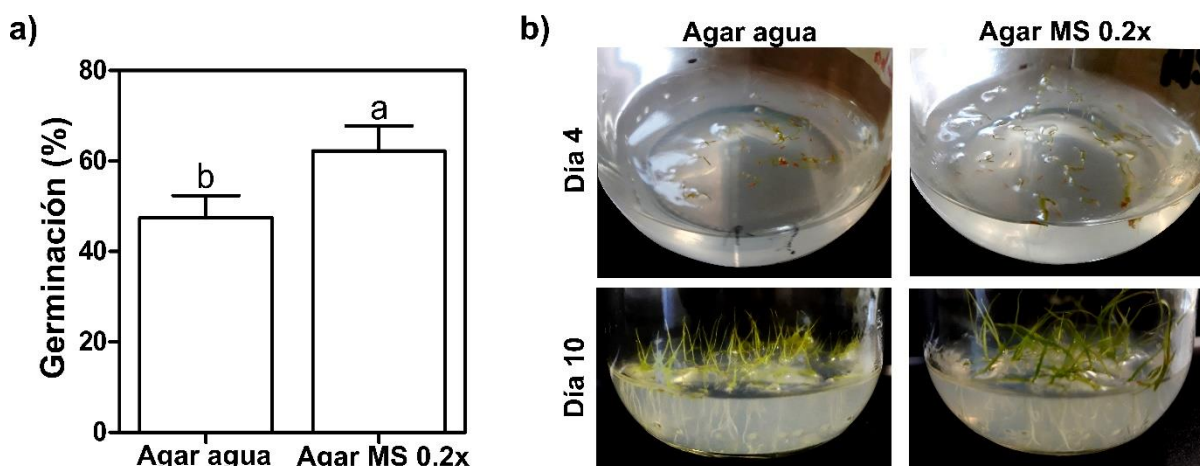


Figura 11. Germinación de semillas de *Typha latifolia*. (a) Porcentaje de germinación de semillas de *T. latifolia* en diferentes medios; (b) Semillas de *T. latifolia* germinadas en agar agua y agar MS 0.2X posterior a los 4 y 10 días de incubación. Los valores representan la media \pm DE. Letras diferentes representan medias estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, Prueba de Tukey).

Los resultados mostraron que en condiciones *in vitro*, la germinación de las semillas es dependiente de la composición del medio usado. A los 4 días de incubación, se encontró un 60 % de germinación en medio MS 0.2X, mientras que en agar-agua sólo se obtuvo un 45 % (Figura 11a). Después de los 10 días de incubación, en el medio MS 0.2X se obtuvieron también plantas de *T. latifolia* con un mayor crecimiento en comparación con las plantas crecidas en agar-agua (Figura 11b). Las plántulas de *T. latifolia* fueron transferidas a un sistema de hidroponía desarrollado por Alatorre-Cobos *et al.* (2014). Este sistema consiste en un sistema axénico en un contenedor de polipropileno y una malla de polietileno de alta densidad. Para el crecimiento de *T. latifolia* se utilizó el medio MS 0.2X suplementado con glucosa como fuente de carbono (Horn *et al.*, 2021). Las plantas se mantuvieron creciendo sin aireación durante 60 días, usando el medio inicial (MS 0.2X con glucosa).

A los 10 días de incubación, las plantas de *T. latifolia* mostraron el desarrollo de brotes y raíces en los sistemas de hidroponía, mientras que a los 60 días se observaron plantas con un evidente desarrollo de brotes y raíces, sin signos visibles de estrés (Figura 12a). Después de la incubación, tampoco se observó el desarrollo de microorganismos contaminantes en los sistemas o el medio de crecimiento (Figura 12b). Lo que nos indica que los sistemas de hidroponía y las plantas de *T. latifolia* se mantienen en condiciones axénicas durante la etapa de crecimiento. En contraste con estudios previos usados para obtener plantas axénicas de *T. latifolia* (Rogers *et al.*, 1998; Estime *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2019), el cultivo en hidroponía aquí usado no requiere fitohormonas para la diferenciación vegetal, reduce el tiempo para obtener cultivos axénicos, y permite realizar investigaciones con plantas de *T. latifolia* en condiciones de nutrición controlada (Doran, 2009).

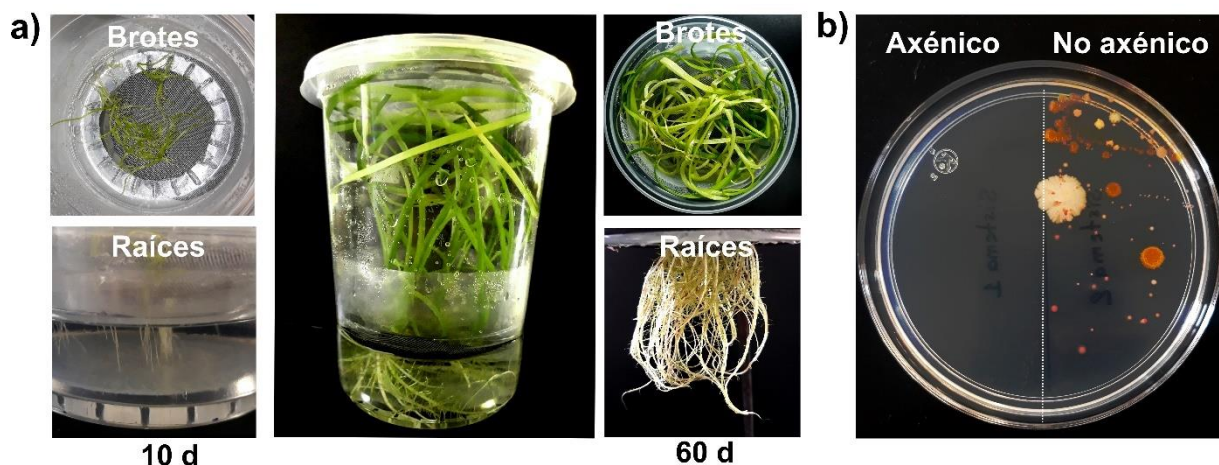


Figura 12. Plantas de *Typha latifolia* de 60 días de crecimiento en el sistema de hidroponía axénico. (a) Vista lateral y superior de brotes y raíces de plantas de 10 y 60 días de crecimiento en medio MS 0.2X pH 5.7 suplementado con 1.0 % de glucosa. (b) Comprobación de las condiciones axénicas de la solución nutritiva después de 60 días de cultivo de las plántulas de *T. latifolia*.

6.2.2. Modelamiento químico de la biodisponibilidad de Cd en los sistemas de hidroponía sin glucosa

La toxicidad de los metales pesados para las plantas está muy relacionada con su biodisponibilidad en la solución de hidroponía, y está influenciada por diversos factores como el pH, el contenido de materia orgánica, la presencia de ligandos y la especiación química de los iones en el medio (Shahid *et al.*, 2017). El medio MS ha sido utilizado anteriormente para evaluar la remoción de Pb, Cr y Mn por raíces de *T. latifolia* cultivadas *in vitro* (Santos-Díaz y Barrón-Cruz, 2011), sin embargo, en este trabajo se usó el medio líquido MS diluido (0.2X) sin glucosa para asegurar la biodisponibilidad del Cd en la solución de hidroponía. El análisis de predicción por modelamiento químico usando el programa Visual MINTEQ mostró que todo el CdCl₂ suplementado al medio de cultivo se encuentra disponible en forma de diferentes especies y no hay precipitación de Cd en el medio (Tabla 9).

Tabla 9. Especiación del cadmio en el medio MS 0.2X a pH 5.7, calculado con Visual MINTEQ versión 3.1

Especies (%)	Concentración de Cd (mg/L)		
	10	20	40
Cd ²⁺	66.70	75.86	79.70
CdCl ⁺	5.60	7.11	9.03
CdCl ₂ (aq)	0.03	0.04	0.06
CdSO ₄ (aq)	1.90	2.17	2.21
CdNH ₃ ²⁺	0.03	0.03	0.03
CdNO ₃ ⁺	1.06	1.20	1.25
CdHPO ₄ (aq)	1.42	1.60	1.64
CdEDTA ²⁻	23.14	11.94	6.06
CdHEDTA ⁻	0.07	0.04	0.02
% Disuelto	100	100	100
% Precipitado	0	0	0

aq: aquocomplejos

De acuerdo con nuestro análisis, la forma iónica Cd²⁺ es la especie predominante en el medio MS 0.2X a pH 5.7, la cual se encuentra disponible en un 66, 75 y 79 % cuando se adicionan al medio 10, 20 y 40 mg/L de Cd, respectivamente (Tabla 9). Estos niveles de disponibilidad son menores que los observados en la solución Hoagland (pH 6.0), donde el Cd²⁺ se mantiene disponible entre 80-81 % cuando el medio contiene 5-100 µM CdCl₂ (0.9-18.3 mg/L) (Piotto *et al.*, 2018).

6.2.3. Efecto tóxico del Cd en *Typha latifolia*

Para evaluar el efecto del Cd en plantas de *T. latifolia* crecidas en hidroponía, plantas de 60 días de crecimiento se expusieron a 10, 20 y 40 mg/L de Cd durante 10 días. Posterior a la exposición a Cd, se observó que las concentraciones de Cd evaluadas no mostraron un efecto significativo sobre el fenotipo o en el contenido de clorofila total de las plantas de *T. latifolia* (Figura 13a, d). Estos resultados concuerdan con los reportado por Woraharn *et al.* (2021), quienes no observaron signos de toxicidad en plantas de *T. angustifolia* expuestas a Cd durante 15 días. Sin embargo, se observó una reducción en la biomasa de los brotes en una manera dependiente de la dosis (Figura 13b, c). Esta reducción en el peso de los brotes podría ser consecuencia de la

disminución del área superficial de las hojas causado por el Cd, similar a lo observado en hojas de *Triticum aestivium* (Agami y Mohamed, 2013).

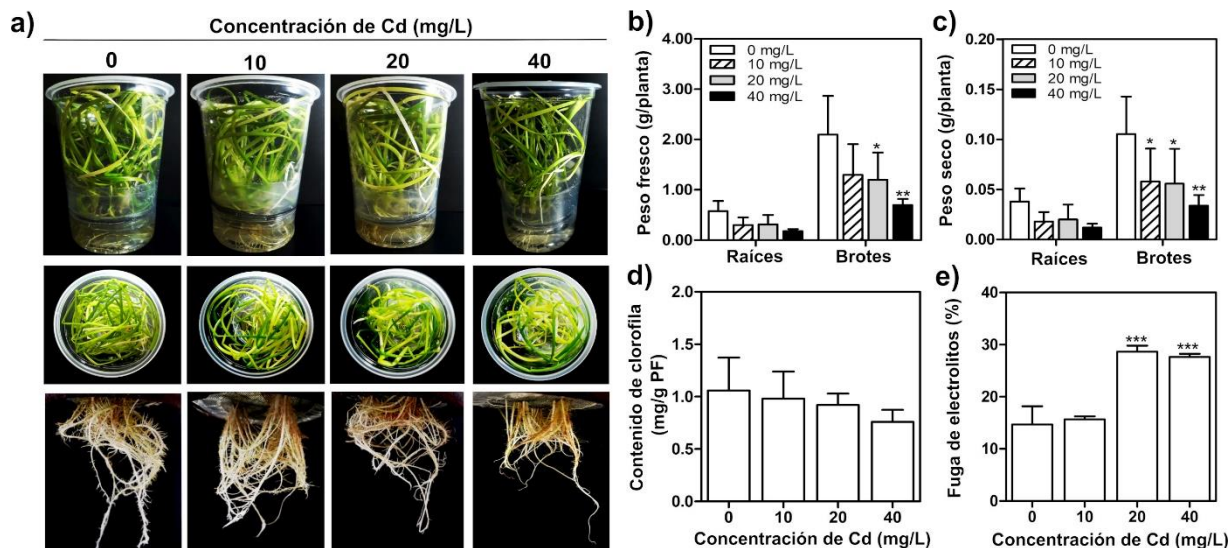


Figura 13. Efecto del cadmio en el crecimiento de plantas de *Typha latifolia*. Plántulas de *T. latifolia* de 60 días de crecimiento fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cd. Después de 10 días de incubación, se evaluó el aspecto de las plántulas considerando el fenotipo de brotes y raíces (a), se monitoreó el crecimiento considerando el peso fresco (b) y seco (c). Se evaluó el efecto del Cd en el contenido de clorofila (d) y en la fuga de electrolitos de las raíces (e). Los valores representan la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control (0 mg/L) y los tratamientos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Prueba de Bonferroni; *** $p < 0.001$; Prueba de Dunnett).

La fuga de electrolitos es un parámetro que mide el daño en un tejido vegetal expuesto a cualquier tipo de estrés, y se ha asociado a la salida de iones potasio (K^+) de las células (Takashima *et al.*, 2020). En el presente estudio, se encontró un incremento significativo en la fuga de electrolitos de las raíces de plantas expuestas a 20 y 40 mg/L de Cd (Figura 13e). Estudios previos han reportado que la fuga de electrolitos es inducida por una elevada producción de EROs (Demidchik, 2018). En *T. angustifolia*, la exposición a Cd incrementa la producción de superóxido en una manera dependiente de la concentración (Ren *et al.*, 2020). Las EROs producidas en las

plantas durante el estrés, activan canales iónicos de membrana que favorecen la salida del K^+ intracelular, estimulando enzimas hídricas intracelulares que conducen a la muerte celular programada (Demidchik *et al.*, 2014; Demidchik, 2018). A pesar de que los niveles de EROs no fueron determinados en este estudio, los resultados sugieren que la fuga de electrolitos en *T. latifolia* es inducida por las EROs generados en las plantas expuestas a 20 y 40 mg/L de Cd.

Los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, son inducidos en las plantas para mantener el balance de EROs (Liu y Yang, 2020). En este estudio, se evaluó la defensa antioxidante de *T. latifolia* expuesta a Cd, cuantificando la actividad catalasa (CAT) y el contenido de glutatión (GSH) total (Figura 14).

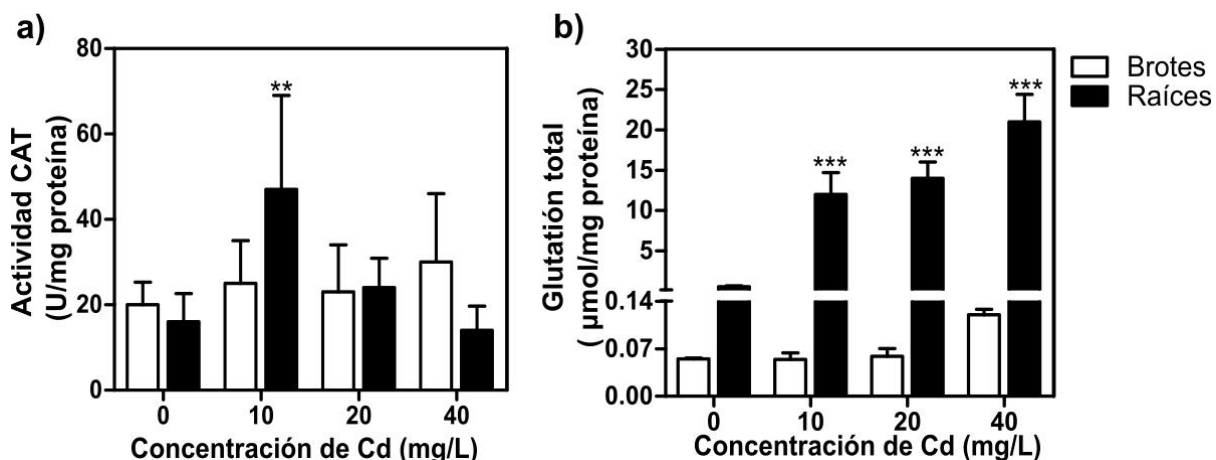


Figura 14. Efecto del cadmio en la actividad catalasa y el contenido de glutatión total en *Typha latifolia*. Plántulas de *T. latifolia* de 60 días de crecimiento fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cd. Después de 10 días de incubación, se evaluó la actividad de la enzima catalasa (CAT) (a) y de los niveles de glutatión (b) en brotes y raíces. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control (0 mg/L) y los tratamientos (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Prueba Bonferroni).

La CAT es una de las principales enzimas antioxidantes que reduce el daño oxidativo al disminuir los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) intracelulares (Liu y Yang, 2020). En este estudio se observó que la actividad CAT incrementa al doble en plantas de *T. latifolia* expuestas a 10 mg/L de Cd, pero no se modifica su actividad en plantas expuestas a 20 y 40 mg/L de Cd (Figura 14a). Resultados similares fueron

observados en plantas de *Sassafras tzumu* y *T. aestivum* expuestas a Cd (Zhao *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). El incremento de la actividad CAT a bajas concentraciones (10 mg/L) puede ser atribuido a un incremento en la producción de EROs inducido por el estrés por Cd, similar a lo observado en *T. aestivum* (Zhang *et al.*, 2021). Por otro lado, una baja actividad CAT a altas concentraciones de Cd podría ser el resultado de la interacción de los iones Cd con aminoácidos del centro activo de la CAT, inhibiendo la unión de la enzima al H₂O₂ por impedimento estérico (Wang *et al.*, 2015). Estos resultados muestran que bajos niveles de Cd inducen la actividad CAT, mientras que altos niveles de Cd inhibe la actividad CAT en plantas de *T. latifolia*.

El glutatión (GSH) es un compuesto antioxidante que regula los niveles de H₂O₂ a través del sistema ascorbato-glutatión en las plantas (Li *et al.*, 2021). El GSH también inactiva iones metálicos intracelulares a través de la formación de complejos y es un precursor de las fitoquelatinas (PC), péptidos ricos en ácido glutámico y cisteína especializados en la quelación de metales pesados (Li *et al.*, 2021). En este estudio se observó que el estrés por Cd induce la síntesis de GSH total únicamente en las raíces de *T. latifolia*. En plantas expuestas a 10, 20 y 40 mg/L de Cd, el contenido de Cd total en raíces incrementa 21, 24 y 36 veces con respecto a las plantas no expuestas (Figura 14b). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente en *T. angustifolia*, donde se observó que el Cd incrementa la síntesis de GSH y PC como mecanismos de detoxificación del Cd intracelular (Xu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que la acumulación de GSH puede estar asociado con la tolerancia a Cd en plantas de *T. latifolia*.

6.2.4. Remoción y acumulación de Cd por plantas de *Typha latifolia* cultivadas en hidroponía

La acumulación de Cd en brotes y raíces en *T. latifolia* se determinó después de 10 días de exposición a Cd. En ambos órganos los niveles de Cd se incrementan en una manera dependiente de la dosis empleada en el medio de cultivo. El contenido de Cd en las raíces se encontró entre 2970 y 3520 mg/Kg PS, mientras que en brotes se encontró entre 406 y 739 mg/Kg PS (Tabla 10). Estos resultados muestran que la concentración de Cd en las raíces de *T. latifolia* fue entre 4.7 y 7.3 veces mayor que en los brotes, sugiriendo una baja eficiencia en la translocación de Cd. Los niveles de Cd en raíces de *T. latifolia* son mayores a los reportados en plantas de *T. latifolia* (1230-2339 mg/Kg) (Alonso-Castro *et al.*, 2009), *T. angustifolia* (1213-2977 mg/Kg) (Woraharn *et al.*, 2021), y *T. orientalis* (300-1100 mg/Kg) (Wang *et al.*, 2018) donde se usaron otras condiciones de cultivo (Tabla 1).

Tabla 10. Contenido de cadmio en brotes y raíces de plántulas de *Typha latifolia* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio

Concentración Cd (mg/L)	Contenido Cd ($\mu\text{g/g}$ PS)		FBC	FT	Remoción de Cd (%)
	Brotes	Raíces			
0	ND	ND	ND	ND	ND
10	406 \pm 59 ^b	2970 \pm 65 ^c	509 \pm 96 ^a	0.18 \pm 0.04 ^a	37 \pm 3.8 ^a
20	668 \pm 73 ^a	3275 \pm 15 ^b	340 \pm 38 ^b	0.24 \pm 0.01 ^a	43 \pm 6.3 ^a
40	739 \pm 24 ^a	3520 \pm 105 ^a	126 \pm 16 ^c	0.23 \pm 0.03 ^a	22 \pm 5.3 ^b

ND: no detectado; FBC: Factor de Bioconcentración; FT: Factor de translocación; PS: Peso seco.

Los valores representan la media \pm DE. Letras diferentes representan medias estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, Prueba de Tukey).

Los factores de bioconcentración (BCF) y de translocación (TF) son dos indicadores que se utilizan para evaluar la capacidad de una planta de acumular metales (Sidhu *et al.*, 2018). El BCF relaciona la cantidad de Cd en las raíces de la planta y la concentración de Cd del medio, mientras que el FT indica la capacidad de la planta de movilizar el Cd desde las raíces hacia los brotes (Ran *et al.*, 2020). En este estudio se obtuvieron valores de BCF >1.0 y FT < 1.0 para las plantas de *T. latifolia* expuestas a las diferentes concentraciones de Cd (Tabla 10). Estos resultados indican que las

plantas de *T. latifolia* toman el Cd del medio de hidroponía acumulándolo en sus raíces y no lo translocan hacia sus brotes. Valores similares de BCF y FT fueron reportados en plantas de *T. angustifolia* (Ren *et al.*, 2020; Woraharn *et al.*, 2021) y *T. orientalis* (Wang *et al.*, 2018). Una baja eficiencia en la traslocación de Cd por las plantas de *Typha* puede ser debido a la banda de Caspary, un tejido presente en las raíces de algunas plantas que evita la movilización del Cd hacia los tejidos vasculares y por lo tanto disminuye la acumulación de Cd en brotes (Xu *et al.*, 2011).

Los niveles de Cd en la solución de hidroponía también se determinaron. Se observó que, a los 10 días de exposición, las plántulas de *T. latifolia* remueven el 37, 43 y 22 % del Cd de la solución de hidroponía cuando se expusieron a 10, 20 y 40 mg/L de Cd, respectivamente (Tabla 10). Los resultados muestran que la mayor eficiencia de remoción de Cd ocurre a bajas concentraciones (10 y 20 mg/L Cd). De manera similar, Alonso-Castro *et al.* (2009) reportaron que plantas jóvenes de *T. latifolia* remueve el 41 y 38 % del Cd de la solución cuando se exponen a 5 y 7.5 mg/L de Cd, respectivamente.

6.2.5. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del AIA y del extracto de auxinas en plantas de *Typha latifolia* expuestas a Cd

Diferentes estudios han mostrado que las bacterias tolerantes a metales pesados y promotoras de crecimiento vegetal juegan un papel muy importante en el proceso de fitoextracción (Sharma, 2021). Se ha sugerido que estas bacterias pueden disminuir en las plantas el estrés causado por los metales pesados y contribuir al desarrollo vegetal a través de la producción de auxinas bacterianas (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2022; Mathur *et al.*, 2022). Por lo que en este estudio se evaluó el efecto de *P. rhodesiae* GRC140, del extracto de auxinas obtenido de un cultivo de la bacteria y del AIA exógeno en la remoción de Cd por plantas de *T. latifolia*.

La colonización de la raíz es un factor clave en la interacción planta-microorganismo y depende de múltiples factores para que se lleva a cabo (Zhang *et al.*, 2014). Por tal razón, en este estudio se evaluó la densidad bacteriana en el medio de hidroponía y la colonización de las raíces de *T. latifolia* posterior a la inoculación con *P. rhodesiae* GRC140 (Figura 15).

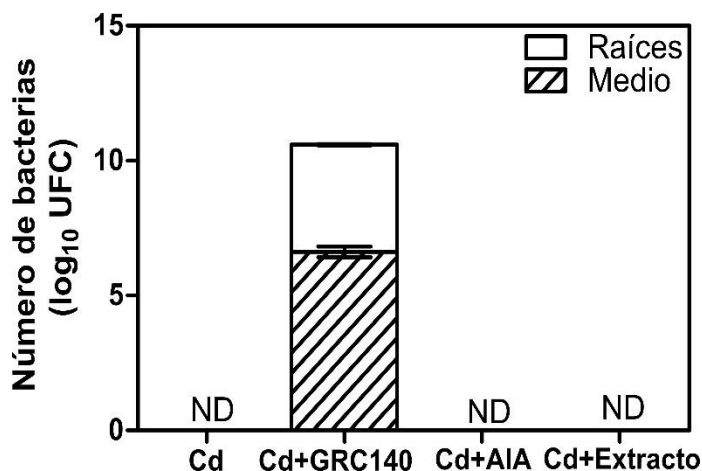


Figura 15. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 en el medio de hidroponía y en raíces de *Typha latifolia* expuestas a cadmio. Los sistemas fueron inoculados con suspensión bacteriana ($DO_{600} = 1.0$) de *P. rhodesiae* GRC140, 16 días post-inoculación (dpi) se determinó el número de bacterias en el medio de hidroponía y las raíces. Los valores representan la media \pm DE. ND: No detectado.

Se observó que, a los 16 días post-inoculación (dpi), el número de *P. rhodesiae* GRC140 en la solución de hidroponía fue de $\log_{10} 6.6 \pm 0.2$, mientras que en las raíces de *T. latifolia* fue de $\log_{10} 3.9 \pm 0.02$ (Figura 15). Durante la determinación no se observaron morfotipos diferentes a *P. rhodesiae* GRC140. Estos resultados muestran que *P. rhodesiae* GRC140 se mantiene viable en la solución de hidroponía y puede colonizar la raíz de *T. latifolia* en presencia de 40 mg/L de Cd (Figura 15). Estos resultados son similares a lo reportado por Wu *et al.* (2020), quienes observaron que *P. fluorescens* coloniza las raíces de *Sedum alfredii* expuestas a 25 μM (5.9 mg/L) de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

Para evaluar si los tratamientos incrementaban la tolerancia y acumulación de Cd en las plantas de *T. latifolia*, plantas de 60 días de crecimiento se trataron con *P. rhodesiae* GRC140, con AIA o con el extracto de auxinas durante 6 días y posteriormente se expusieron durante 10 días a Cd (40 mg/L). Como control se usaron plantas expuestas a Cd sin el pre-tratamiento (Figura 16).

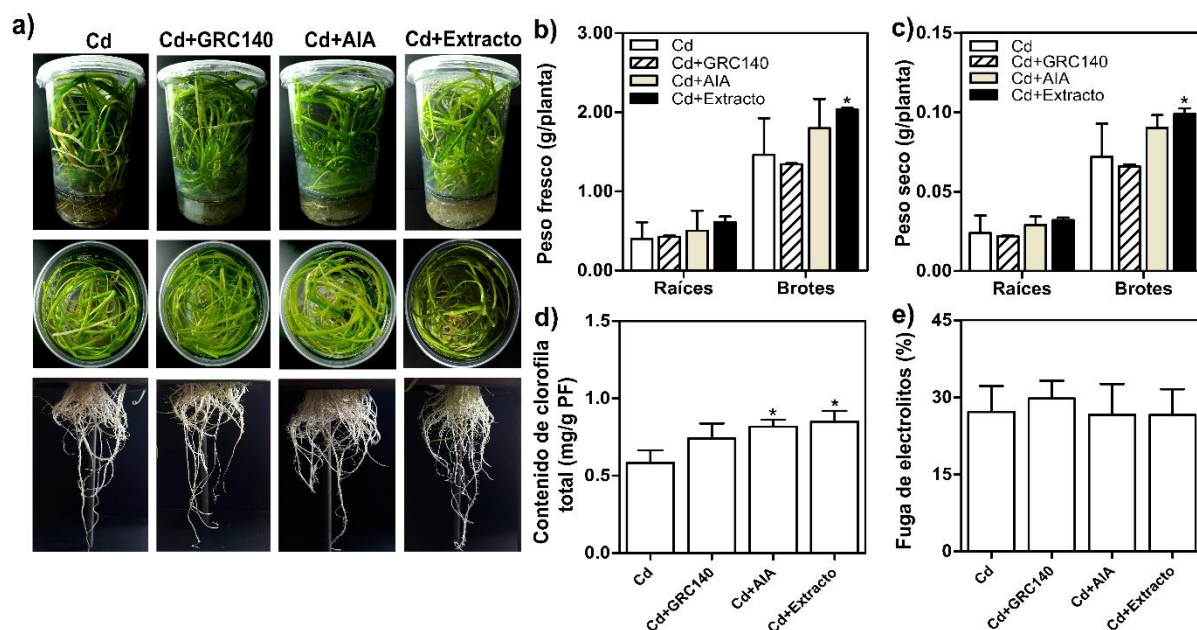


Figura 16. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en el crecimiento de plantas de *Typha latifolia* expuestas a cadmio. Plántulas de *T. latifolia* de 60 días de crecimiento fueron tratadas con la bacteria, el AIA o el extracto de auxinas durante 6 días, y posteriormente fueron expuestas a 40 mg/L Cd. Después de 10 días de incubación, se evaluó el aspecto de las plántulas considerando el fenotipo de brotes y raíces (a), se monitoreó el crecimiento considerando el peso fresco (b) y seco (c). Se evaluó el efecto del Cd en el contenido de clorofila (d) y en la fuga de electrolitos de las raíces (e). Los valores representan la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control (Cd) y los tratamientos (* $p < 0.05$; Prueba de Bonferroni y Prueba de Dunnett).

Después de la exposición a Cd, las plantas de *T. latifolia* de los tratamientos y el control mostraron un fenotipo similar (Figura 16a). No se detectaron cambios significativos en el peso fresco, peso seco y la fuga de electrolitos en los tratamientos

Cd+GRCA140 y Cd+AIA, con respecto al control (Cd). Sin embargo, se observó que el extracto de auxinas (Cd+Extracto) aumentó el peso fresco y seco de brotes (Figura 16b, c). Este resultado concuerda con lo observado anteriormente en el sistema de placa (Figura 10c) y con lo reportado por Meena *et al.* (2020), quienes encontraron que el extracto de auxinas de la actinobacteria *Nocardioides* sp. aumenta la longitud de los brotes de *T. aestivium* expuestas a condiciones de estrés salino.

También se observó que el AIA exógeno y el extracto de auxinas incrementaron el contenido de clorofila total en plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd (Figura 16d). Este resultado es similar a lo observado por Zhou *et al.* (2020), quienes observaron que la aplicación exógena de AIA aumenta el contenido de clorofila total en plantas de *Cinnamomum camphora* tratadas con 30 mg/Kg de Cd. Esto puede ser debido a que las auxinas tienen un efecto protector sobre la clorofila *a* en las plantas expuestas a Cd. En *Chlorella vulgaris*, las auxinas AIA, AIB, APA y ANA evitan la degradación de la clorofila *a* por efecto del Cd (Piotrowska-Niczyporuk *et al.*, 2012). Mientras que en *Solanum lycopersicum*, el AIA retarda la degradación de la clorofila *a* al disminuir la expresión de las enzimas clorofilasas, enzimas involucrada en el catabolismo de la clorofila (Su *et al.*, 2015).

Se ha reportado que las auxinas y las bacterias productoras de auxinas pueden proteger a las plantas del estrés oxidativo causado por el Cd, incrementando la actividad de enzimas antioxidantes y la síntesis de moléculas antioxidantes (Rolón-Cárdenas *et al.*, 2022). Por lo cual, se determinó el efecto de *P. rhodesiae* GRC140, del AIA exógeno y del extracto de auxinas en la actividad CAT y el contenido de GSH en plantas de *T. latifolia* expuestas a Cd (Figura 17). Plantas inoculadas con *P. rhodesiae* GRC140 no mostraron diferencias en la actividad CAT y en el contenido de GSH en brotes y raíces de *T. latifolia* con respecto a las plantas control (Cd) (Figure 17a, b). Efectos similares se observaron en las plantas de *T. latifolia* tratadas con AIA y con el extracto de auxinas (Figure 17a, b). Estos resultados muestran que nuestras condiciones experimentales, *P. rhodesiae* GRC140, el AIA exógeno, y el extracto de auxinas no interfieren con el estado antioxidante de *T. latifolia* expuestas a Cd.

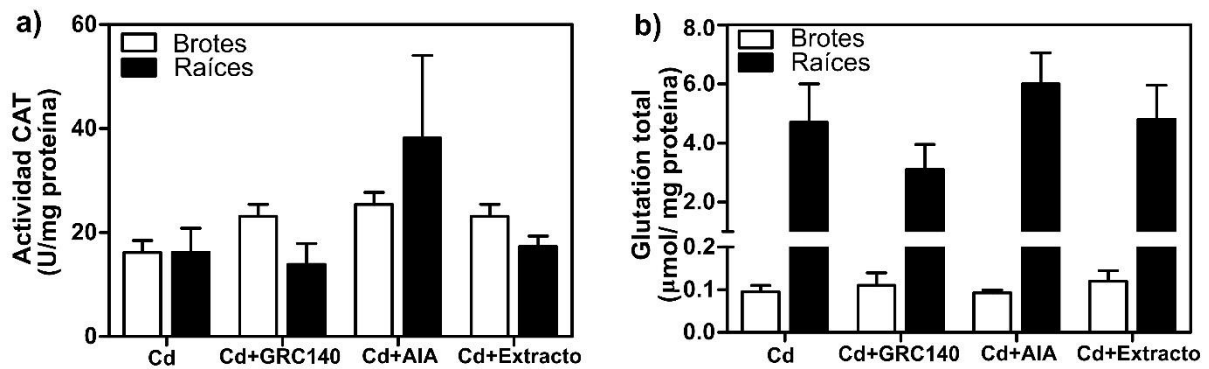


Figura 17. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en la actividad catalasa y el contenido de glutatión total en *Typha latifolia* expuestas a cadmio. Plántulas de *T. latifolia* de 60 días de crecimiento fueron tratadas con la bacteria, con el AIA o con el extracto de auxina durante 6 días, posteriormente fueron expuestas a 40 mg/L de Cd por 10 días. Después de la exposición a Cd, se evaluó la actividad de la enzima catalasa (CAT) (a) y de los niveles de glutatión (b) en brotes y raíces. Los valores representan la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control (Cd) y los tratamientos (Prueba Bonferroni).

6.2.6. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del AIA exógeno y del extracto de auxinas en la remoción y acumulación de Cd por plantas de *Typha latifolia*

Para determinar si *P. rhodesiae* GRC140, el AIA o el extracto de auxinas favorecían la acumulación de Cd, las plántulas de *T. latifolia* se expusieron a medios con 40 mg/L de Cd durante 10 días y posterior a la incubación se cuantificó el contenido de Cd en las plantas de *T. latifolia* por EAA (Figura 18).

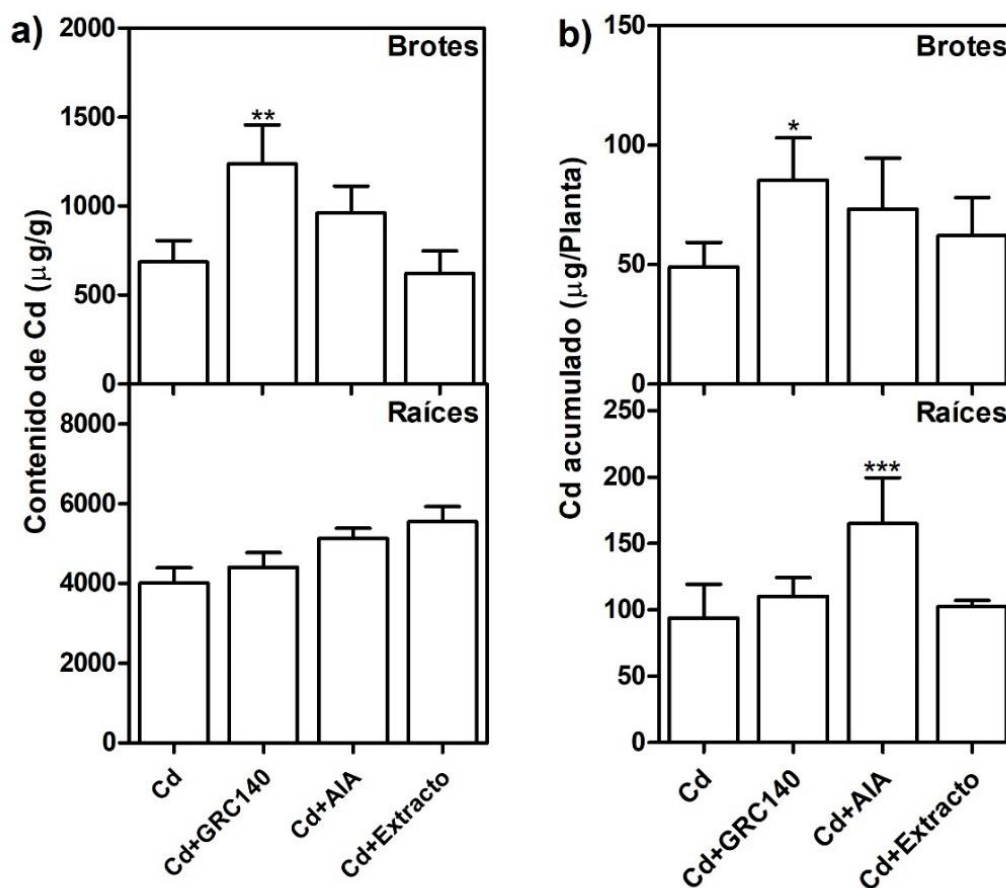


Figura 18. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en el contenido y la acumulación de cadmio por *Typha latifolia*. Los tejidos de las plantas expuestas a Cd se digirieron y se analizaron por EAA para determinar (a) el contenido de Cd, y (b) la acumulación de Cd en los tejidos de las plantas. Los valores representan la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control (Cd) y los tratamientos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Prueba de Dunnett).

Como se muestra en la Figura 18, se observó que la inoculación con *P. rhodesiae* GRC140 incrementa dos veces el contenido y la acumulación de Cd en brotes en comparación con el tratamiento control (Cd), pero no tiene un efecto significativo en el contenido o acumulación de Cd en raíces (Figura 18a, b). También se observó que *P. rhodesiae* GRC140 incrementó el valor de FT (Tabla 11). Estos resultados indican que *P. rhodesiae* GRC140 incrementa la translocación de Cd en las plantas de *T. latifolia*. Un efecto similar se ha observado en plantas de *Miscanthus floridulus* Lab y *Sedum alfredii* inoculadas con *Lelliottia jeotgali* y *Sphingomonas*, respectivamente (Pan *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021). Un incremento en la translocación de Cd por *P. rhodesiae* GRC140 puede ser atribuido a un incremento en la expresión de genes de transportadores de Cd, similar a lo que se ha observado en *S. alfredii* (Pan *et al.*, 2017). En esta planta, *Sphingomonas* incrementa la expresión de los genes NRAMP1 e IRT1, dos genes que codifican para transportadores de metales, los cuales se han visto involucrados en la translocación de Cd en *Oryza sativa* (Lee y An, 2009; Takahashi *et al.*, 2011). Sin embargo, son necesarios más estudios para entender cómo *P. rhodesiae* GRC140 incrementa la translocación de Cd desde las raíces a los brotes en plantas de *T. latifolia*.

Tabla 11. Factor de bioconcentración y factor de translocación en plantas de *Typha latifolia* expuestas a Cd

Tratamiento	FBC	FT
Cd	166 ± 47 ^b	0.15 ± 0.023 ^c
Cd+ GRC140	186 ± 27 ^b	0.26 ± 0.035 ^a
Cd+ AIA	248 ± 43 ^a	0.17 ± 0.029 ^{bc}
Cd+ Extracto	130 ± 7.7 ^b	0.22 ± 0.034 ^{ab}

FBC: Factor de Bioconcentración; FT: Factor de translocación.

Los valores representan la media ± DE. Letras diferentes representan medias estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, Prueba de Tukey).

Por otro lado, se observó que la aplicación exógena de AIA aumenta el contenido de Cd y la acumulación de Cd en la raíz de *T. latifolia* (Figura 18a, b), e incrementa el valor del factor de bioconcentración de Cd (Tabla 11). Estos resultados son similares a los observados en *A. thaliana* (Zhu *et al.*, 2013) y *Solanum nigrum*

(Zulfiqar *et al.*, 2019) y sugieren que la aplicación de AIA aumenta la inmovilización de Cd en las raíces. Este efecto podría deberse a una mayor fijación de Cd en la pared celular de la raíz por el AIA, al aumentar el contenido de componentes de la pared celular (Zhu *et al.*, 2013).

Después de 10 días de incubación, se observó que los niveles de Cd en la solución de hidroponía disminuyen significativamente en todos los tratamientos ($p < 0.05$) (Figura 19a). El porcentaje de Cd removido del medio por las plantas incrementa con la aplicación de AIA y la inoculación de *P. rhodesiae* GRC140 en un 22 % y 8 %, respectivamente (Figura 19b). Similar a nuestros resultados, se ha observado que la inoculación de microorganismos resistentes a Cd aumentan en un 10 % la remoción de Cd^{2+} por *Phragmites australis* en humedales construidos (Yu *et al.*, 2020). Sin embargo, el extracto de auxinas no contribuye con un incremento significativo en la remoción de Cd del medio por la planta (Figura 19b).

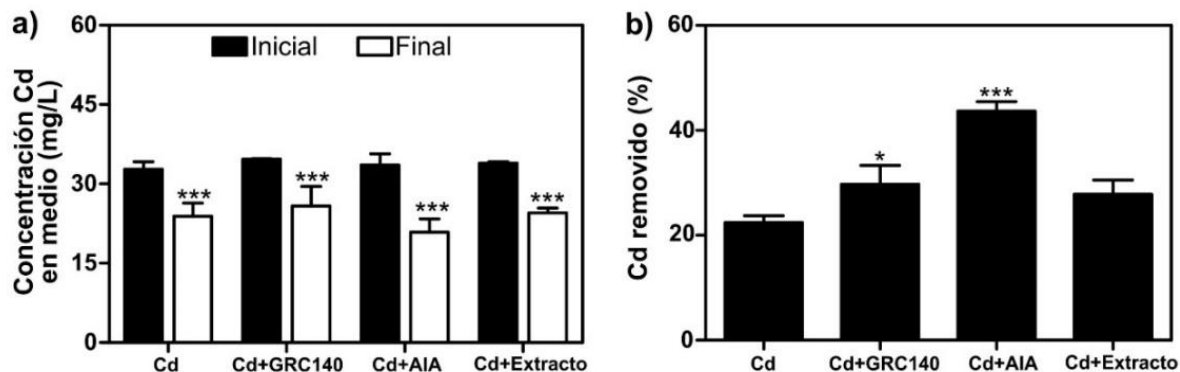


Figura 19. Efecto de *Pseudomonas rhodesiae* GRC140, del ácido indol acético y del extracto de auxinas en la remoción del cadmio del medio de hidroponía por *Typha latifolia*. (a) Concentración de Cd en el medio de hidroponía antes y después del tratamiento; (b) Porcentaje de Cd removido por *T. latifolia* después de 10 días de exposición a Cd. Los valores representan la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Un aumento en la eliminación de Cd por AIA y la adición de *P. rhodesiae* GRC140 es consistente con un aumento en la acumulación de Cd por plantas de *T. latifolia* tratadas con AIA y *P. rhodesiae* GRC140. En el tratamiento con *P. rhodesiae* GRC140, las células bacterianas en los sistemas hidropónicos también pueden contribuir a la remoción de Cd; sin embargo, esta posibilidad no se analizó en este estudio.

7. CONCLUSIONES

- En *P. rhodesiae* GRC140, la producción de compuestos indólicos se presenta en la fase estacionaria de crecimiento celular.
- *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 produce AIA a una concentración de 1.38 ± 0.48 mg/L través de rutas dependientes del L-Trp.
- En el sistema de placa, *P. rhodesiae* GRC140 incrementa la longitud del sistema radicular, el AIA exógeno favorece la formación de raíces mientras que el extracto de auxinas favorece el crecimiento de brotes en *T. latifolia*.
- La síntesis de GSH en raíces responde a la concentración de Cd en el sistema y parece estar asociado con la tolerancia a Cd en plantas de *T. latifolia*.
- En las plantas expuestas a Cd, *P. rhodesiae* GRC140 y el AIA aumentan significativamente la remoción de Cd del medio por las plantas de *T. latifolia*.
- *P. rhodesiae* incrementa la acumulación y el contenido de Cd en los brotes, mientras que el AIA aumenta la acumulación de Cd en raíces.
- El AIA aumenta el FBC, mientras que *P. rhodesiae* GRC140 y el extracto de auxinas incrementan el FT.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Zahra, T. R., Hasan, M. K. y Hasan, H. S. 2012. Effect of different auxin concentration on virginia creeper (*Parthenocissus quinquefolia*) rooting. *World Applied Sciences Journal*, 16, 7-10.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Agami, R. A. y Mohamed, G. F. 2013. Exogenous treatment with indole-3-acetic acid and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, 164-171.
- Ait Bessai, S., Bensidhoum, L. y Nabti, E.-H. 2022. Optimization of IAA production by telluric bacteria isolated from northern Algeria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 41, 102319.
- Alatorre-Cobos, F., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., *et al.* 2014. An improved, low-cost, hydroponic system for growing Arabidopsis and other plant species under aseptic conditions. *BMC Plant Biology*, 14, 69.
- Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K. y Hasnain, S. 2009. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 542-547.
- Ali, H., Khan, E. y Sajad, M. A. 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 869-881.
- Alonso-Castro, A. J., Carranza-Álvarez, C., Alfaro-De La Torre, M. C., *et al.* 2009. Removal and accumulation of cadmium and lead by *Typha latifolia* exposed to single and mixed metal solutions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, 688-696.
- Apine, O. A. y Jadhav, J. P. 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1235-1244.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., *et al.* 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9.

- Baghaee-Ravari, S. y Heidarzadeh, N. 2014. Isolation and characterization of rhizosphere auxin producing Bacilli and evaluation of their potency on wheat growth improvement. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60, 895-905.
- Baliyan, N., Dhiman, S., Dheeman, S., *et al.* 2021. Optimization of indole-3-acetic acid using response surface methodology and its effect on vegetative growth of chickpea. *Rhizosphere*, 17, 100321.
- Balsanelli, E., De Oliveira Pedrosa, F. y De Souza, E. M. 2017. Quantification of grass colonization by associative bacteria. *Current Protocols in Plant Biology*, 2, 108-123.
- Barazani, O. y Friedman, J. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, 25, 2397-2406.
- Begum, N., Afzal, S., Zhao, H., *et al.* 2018. Shoot endophytic plant growth-promoting bacteria reduce cadmium toxicity and enhance switchgrass (*Panicum virgatum* L.) biomass. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 170.
- Bharucha, U., Patel, K. y Trivedi, U. B. 2013. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, 2, 215-221.
- Bouley, G., Dubreuil, A., Despaux, N. y Boudene, C. 1977. Toxic effects of cadmium microparticles on the respiratory system: An experimental study on rats and mice. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 3, 116-121.
- Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., Alfaro-De La Torre, M. C. y García-De La Cruz, R. F. 2008. Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México. *Water, Air, & Soil Pollution*, 188, 297-309.
- Castillo-Esparza, J. F., Bandala, V. M., Ramos, A., *et al.* 2021. *Pisolithus tinctorius* extract affects the root system architecture through compound production with auxin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *Rhizosphere*, 19, 100397.
- Chen, B., Luo, S., Wu, Y., *et al.* 2017. The effects of the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the plant growth and cadmium uptake of *Sedum alfredii* Hance. *Frontiers in Microbiology*, 8.

- Chen, L., Long, C., Wang, D. y Yang, J. 2020. Phytoremediation of cadmium (Cd) and uranium (U) contaminated soils by *Brassica juncea* L. enhanced with exogenous application of plant growth regulators. *Chemosphere*, 242, 125112.
- Chen, Y. H. y Kao, C. H. 2012. Calcium is involved in nitric oxide- and auxin-induced lateral root formation in rice. *Protoplasma*, 249, 187-195.
- Chhun, T., Taketa, S., Tsurumi, S. y Ichii, M. 2003. The effects of auxin on lateral root initiation and root gravitropism in a lateral rootless mutant Lrt1 of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, 39, 161-170.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R. y López-Bucio, J. 2014. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 503-514.
- Coroler, L., Elomari, M., Hoste, B., et al. 1996. *Pseudomonas rhodesiae* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 600-607.
- Costacurta, A. y Vanderleyden, J. 1995. Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 21, 1-18.
- Covarrubias, S. A. y Peña-Cabriales, J. J. 2017. Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33, 7-21.
- Curt-Fernández De La Mora, M. D. 2005. Macrofitas de interés en fitodepuración. *Manual de Fitodepuración, Filtro de macrófitas en flotación*. Madrid: EDITA.
- Czakó, M., Feng, X., He, Y., et al. 2005. Genetic modification of wetland grasses for phytoremediation *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60, 285-291.
- De Klerk, G.-J., Brugge, J. T. y Marinova, S. 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 39-44.

- De Oliveira, J., Pereira, M., Duarte, V., *et al.* 2017. Cadmium tolerance of *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae) as related to growth and leaf morphophysiology. *Brazilian Journal of Biology*, 78, 509-516.
- De Oliveira, J. P. V., Pereira, M. P., Duarte, V. P., *et al.* 2022. Root anatomy, growth, and development of *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae) and their relationship with cadmium absorption, accumulation, and tolerance. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 19878-19889.
- Demidchik, V. 2018. ROS-Activated ion channels in plants: biophysical characteristics, physiological functions and molecular nature. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1263.
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., *et al.* 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1259-1270.
- Doran, P. M. 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations. *Biotechnology & Bioengineering*, 103, 60-76.
- Duca, D. R. y Glick, B. R. 2020. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8607-8619.
- Duca, D. R., Rose, D. R. y Glick, B. R. 2018. Indole acetic acid overproduction transformants of the rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111, 1645-1660.
- El-Amier, Y., Elhindi, K., El-Hendawy, S., *et al.* 2019. Antioxidant system and biomolecules alteration in *Pisum sativum* under heavy metal stress and possible alleviation by 5-aminolevulinic acid. *Molecules*, 24, 4194.
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., *et al.* 2020. Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-52.
- Estime, L., O'shea, M. y Borst, M. 2002. Suspension culture and plant regeneration of *Typha latifolia*. *Hort Science*, 37, 406-408.

- Fediuc, E. y Erdei, L. 2002. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. *Journal of Plant Physiology*, 159, 265-271.
- Fediuc, E., Lips, S. H. y Erdei, L. 2005. O-acetylserine (thiol) lyase activity in *Phragmites* and *Typha* plants under cadmium and NaCl stress conditions and the involvement of ABA in the stress response. *Journal of Plant Physiology*, 162, 865-872.
- Filipic, M. 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research*, 733, 69-77.
- Flasiński, M. y Hąc-Wydro, K. 2014. Natural vs synthetic auxin: Studies on the interactions between plant hormones and biological membrane lipids. *Environmental Research*, 133, 123-134.
- Fontanille, P., Le Flèche, A. y Larroche, C. 2002. *Pseudomonas rhodesiae* PF1: A new and efficient biocatalyst for production of isonovalal from α -pinene oxide. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20, 413-421.
- Fuentes-Ramirez, L. E. y Caballero-Mellado, J. 2006. Bacterial Biofertilizers. In: Siddiqui, Z. A. (ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Garay-Arroyo, A., De La Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., et al. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de educación bioquímica*, 33, 13-22.
- Gu, Y., Wang, J., Xia, Z. y Wei, H.-L. 2020. Characterization of a versatile plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas mediterranea* Strain S58. *Microorganisms*, 8, 334.
- Hadad, H. R., Mufarrege, M. M., Pincioli, M., et al. 2010. Morphological response of *Typha domingensis* to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 666-675.
- Hartwig, A. 2010. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *BioMetals*, 23, 951-960.

- Hopkins, W. G. y Hüner, N. P. A. 2008. *Introduction to Plant Physiology*, NJ, John Wiley and Sons, Inc.
- Horn, E., Kemmler, Y., Kreis, W. y Munkert, J. 2021. Cardenolide and glucosinolate accumulation in shoot cultures of *Erysimum crepidifolium* Rchb. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 427-434.
- Hussain, A., Amna, Kamran, M. A., et al. 2019. Individual and combinatorial application of *Kocuria rhizophila* and citric acid on phytoextraction of multi-metal contaminated soils by *Glycine max* L. *Environmental and Experimental Botany*, 159, 23-33.
- Hyder, O., Chung, M., Cosgrove, D., et al. 2013. Cadmium exposure and liver disease among US adults. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 17, 1265-1273.
- Imada, E. L., Rolla Dos Santos, A. a. D. P., Oliveira, A. L. M. D., et al. 2017. Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Research in Microbiology*, 168, 283-292.
- John-Jimtha, C. y Radhakrishnan, E. K. 2016. Multipotent plant probiotic rhizobacteria from western ghats and its effect on quantitative enhancement of medicinal natural product biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*.
- Keswani, C., Singh, S. P., Cueto, L., et al. 2020. Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8549-8565.
- Khan, A., Hossain, M. T., Park, H. C., et al. 2016. Development of root system architecture of *Arabidopsis thaliana* in response to colonization by *Martelella endophytica* YC6887 depends on auxin signaling. *Plant Soil*, 405, 81-96.
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., et al. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 1, 48-58.
- Kim, S.-I., Kukor, J. J., Oh, K.-H. y Kahng, H.-Y. 2006. Evaluating the genetic diversity of dioxygenases for initial catabolism of aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas rhodesiae* KK1. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 71-78.

- Klink, A., Macioł, A., Wisłocka, M. y Krawczyk, J. 2013. Metal accumulation and distribution in the organs of *Typha latifolia* L. (cattail) and their potential use in bioindication. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 43, 164-168.
- Knee, E. M. y Hangarter, R. P. 1996. Differential IAA dose response relations of the axr1 and axr2 mutants of *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 98, 320-324.
- Kong, Z. y Glick, B. R. 2017. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *In: Poole, R. K. (ed.) Advances in Microbial Physiology*. Academic Press.
- Kotoky, R., Nath, S., Kumar Maheshwari, D. y Pandey, P. J. E. S. 2019. Cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* S217 associated with the growth promotion of rice plant. *Environmental Sustainability*, 2, 135-144.
- Kubier, A., Wilkin, R. T. y Pichler, T. 2019. Cadmium in soils and groundwater: A review. *Applied Geochemistry*, 108, 104388.
- Kuźniar, A., Włodarczyk, K., Sadok, I., *et al.* 2021. A Comprehensive analysis using colorimetry, liquid chromatography-tandem mass spectrometry and bioassays for the assessment of indole related compounds produced by endophytes of selected wheat cultivars. *Molecules*, 26, 1394.
- Latif, A.-K. S., Ajmi, R. N., Zeki, H. F. J. J. O. E. S. y B, E. 2013. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in marsh, plants and sediments in Iraq. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 2.
- Lee, S. y An, G. 2009. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant, Cell & Environment*, 32, 408-416.
- Leura-Vicencio, A., Alonso-Castro, A. J., Carranza-Álvarez, C., *et al.* 2013. Removal and accumulation of As, Cd and Cr by *Typha latifolia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90, 650-653.
- Li, G.-Z., Chen, S.-J., Li, N.-Y., *et al.* 2021. Exogenous glutathione alleviates cadmium toxicity in wheat by influencing the absorption and translocation of cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107, 320–326.

- Li, S.-W., Zeng, X.-Y., Leng, Y., *et al.* 2018a. Indole-3-butyric acid mediates antioxidative defense systems to promote adventitious rooting in mung bean seedlings under cadmium and drought stresses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 332-341.
- Li, X., Yan, Z., Gu, D., *et al.* 2019. Characterization of cadmium-resistant rhizobacteria and their promotion effects on *Brassica napus* growth and cadmium uptake. *Journal of Basic Microbiology*, 59, 579-590.
- Li, Z., Zhang, X., Zhao, Y., *et al.* 2018b. Enhancing auxin accumulation in maize root tips improves root growth and dwarfs plant height. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 86-99.
- Lichtenthaler, H. K. y Buschmann, C. 2001a. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, F4.3.1-F4.3.8.
- Lichtenthaler, H. K. y Buschmann, C. 2001b. Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, F4.2.1-F4.2.6.
- Lim, H.-S., Lee, H.-H., Kim, T.-H. y Lee, B.-R. 2016. Relationship between heavy metal exposure and bone mineral density in Korean adult. *Journal of Bone Metabolism*, 23, 223-231.
- Lin, G.-H., Chang, C. Y. y Lin, H.-R. 2015. Systematic profiling of indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteria using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 988, 53-58.
- Lin, L., Ma, Q., Wang, J., *et al.* 2018. Effects of indole-3-butyric acid (IBA) on growth and cadmium accumulation in the accumulator plant *Stellaria media*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37, 733-737.
- Linares, D., Fontanille, P. y Larroche, C. 2009. Exploration of α -pinene degradation pathway of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Application to novalic acid production in a bioreactor. *Food Research International*, 42, 461-469.

- Linares, D., Martinez, D., Fontanille, P. y Larroche, C. 2008. Production of trans-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoic acid by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Bioresource Technology*, 99, 4590-4596.
- Liu, B., Yang, Y., Xie, L., et al. 2013. *Beilschmiedia turbinata*: A newly recognized but dying species of lauraceae from tropical asia based on morphological and molecular data. *PLOS ONE*, 8, e67636.
- Liu, C., Zhu, J., Liu, Z., et al. 2002. Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Growth Regulation*, 38, 37-43.
- Liu, H., Hao, N., Jia, Y., et al. 2019. The ethylene receptor regulates *Typha angustifolia* leaf aerenchyma morphogenesis and cell fate. *Planta*, 250, 381-390.
- Liu, L., Li, W., Song, W. y Guo, M. 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of The Total Environment*, 633, 206-219.
- Liu, S., Liu, H., Chen, R., et al. 2021. Role of two plant growth-promoting bacteria in remediating cadmium-contaminated soil combined with *Miscanthus floridulus* (Lab.). *Plants*, 10, 912.
- Liu, S. y Yang, R. 2020. Regulations of reactive oxygen species in plants abiotic stress: an integrated overview. In: Tripathi, D. K., Pratap Singh, V., Chauhan, D. K., et al. (eds.) *Plant Life Under Changing Environment*. Academic Press.
- Liu, Y., Chen, J., Lu, S., et al. 2016. Increased lead and cadmium tolerance of *Typha angustifolia* from Huaihe River is associated with enhanced phytochelatin synthesis and improved antioxidative capacity. *Environmental Technology*, 37, 2743-2749.
- Lluna-Duval, R. 2006. Hormonas vegetales para el crecimiento y desarrollo de la planta. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola*, 196, 22-27.
- López-Álvarez, B. 2012. *Cambios de uso de suelo y su impacto en el sistema acuífero del Valle de San Luis Potosí, aplicando modelación numérica* Doctorado, IPICYT.

- Luziatelli, F., Melini, F., Bonini, P., *et al.* 2021. Production of indole auxins by *Enterobacter* sp. strain P-36 under submerged conditions. *Fermentation* 7, 138.
- Maleva, M., Borisova, G., Shiryayev, G., *et al.* Adaptive potential of *Typha latifolia* L. under extreme technogenic pollution. AIP Conference Proceedings, 2019. AIP Publishing LLC, 030013.
- Manara, A. 2012. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. *In: Furini, A. (ed.) Plants and Heavy Metals*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Mathur, P., Tripathi, D. K., Baluška, F. y Mukherjee, S. 2022. Auxin-mediated molecular mechanisms of heavy metal and metalloid stress regulation in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 196, 104796.
- Meena, K. K., Bitla, U. M., Sorty, A. M., *et al.* 2020. Mitigation of salinity stress in wheat seedlings due to the application of phytohormone-rich culture filtrate extract of methylotrophic actinobacterium *Nocardioides* sp. NIMMe6. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Miles, A. A., Misra, S. S. y Irwin, J. O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38, 732-749.
- Minkina, T. M., Fedorenko, G. M., Nevidomskaya, D. G., *et al.* 2021. Adaptive potential of *Typha laxmannii* Lepech to a heavy metal contaminated site. *Plant and Soil*, 465, 273-287.
- Moctezuma-Granados, C. E. 2017. *Evaluación de Pseudomonas endófitas de la raíz de Typha latifolia en la fitoextracción de Cd (II)*. Maestría, UASLP.
- Moiseenko, T. I. y Gashkina, N. A. 2018. Biogeochemistry of Cadmium: Anthropogenic Dispersion, Bioaccumulation, and Ecotoxicity. *Geochemistry International*, 56, 798-811.
- Moore, M. T., Tyler, H. L. y Locke, M. A. 2013. Aqueous pesticide mitigation efficiency of *Typha latifolia* (L.), *Leersia oryzoides* (L.) Sw., and *Sparganium americanum* Nutt. *Chemosphere*, 92, 1307-1313.
- Netro-Soto, S. K. 2018. *Evaluación de la interacción bacterias endófitas -Typha latifolia (Espadaña) en la remoción de Cd (II) en solución* Máster, UASLP.

- Ochoa-Jiménez, C. F., González-Bucio, J. L. y Carrión-Jimenez, J. M. 2016. Metales pesados (Cd, Cr, Pb, Hg) en *Rhizophora mangle* en Río y bahía de Chetumal. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 3, 263-271.
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Rocha-Granados, M. D. C., Glick, B. R. y Santoyo, G. 2018. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*, 208, 25-31.
- Orr, S. y Bridges, C. 2017. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1039.
- Ortiz-Castro, R., Campos-García, J. y López-Bucio, J. 2020. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence arabidopsis root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 254-265.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., et al. 2011. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 7253-7258.
- Pan, F., Luo, S., Shen, J., et al. 2017. The effects of endophytic bacterium SaMR12 on *Sedum alfredii* Hance metal ion uptake and the expression of three transporter family genes after cadmium exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 9350-9360.
- Pan, F., Meng, Q., Wang, Q., et al. 2016. Endophytic bacterium *Sphingomonas* SaMR12 promotes cadmium accumulation by increasing glutathione biosynthesis in *Sedum alfredii* Hance. *Chemosphere*, 154, 358-366.
- Park, S., Kim, A. L., Hong, Y.-K., et al. 2021. A highly efficient auxin-producing bacterial strain and its effect on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 179.
- Patten, C. L., Blakney, A. J. C. y Coulson, T. J. D. 2013. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39, 395-415.

- Permana, R. y Akbarsyah, N. 2021. Phytoplankton susceptibility towards toxic heavy metal cadmium: mechanism and its recent updates. *World News of Natural Sciences*, 38, 83-97.
- Phillips, L. A., Germida, J. J., Farrell, R. E. y Greer, C. W. 2008. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 3054-3064.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E. y Godlewska-Żyłkiewicz, B. 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 52-65.
- Piotto, F. A., Carvalho, M. E. A., Souza, L. A., et al. 2018. Estimating tomato tolerance to heavy metal toxicity: cadmium as study case. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 27535-27544.
- Ponce-Alonso, J. 2017. *Efecto de Pseudomonas sp. sobre la fitoextracción de Pb (II) por Typha latifolia (Espadaña)* Licenciatura, UASLP.
- Porebski, S., Bailey, L. G. y Baum, B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15, 8-15.
- Rahman, I., Kode, A. y Biswas, S. K. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1, 3159-3165.
- Ran, J., Zheng, W., Wang, H., et al. 2020. Indole-3-acetic acid promotes cadmium (Cd) accumulation in a Cd hyperaccumulator and a non-hyperaccumulator by different physiological responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110213.
- Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., et al. 2004. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution*, 152, 129-152.
- Remy, E. y Duque, P. 2016. Assessing tolerance to heavy-metal stress in *Arabidopsis thaliana* seedlings. In: Duque, P. (ed.) *Environmental Responses in Plants: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.

- Ren, M., Qin, Z., Li, X., *et al.* 2020. Selenite antagonizes the phytotoxicity of Cd in the cattail *Typha angustifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 109959.
- Rodríguez-Hernández, M. C., Bonifas, I., Alfaro-De La Torre, M. C., *et al.* 2015. Increased accumulation of cadmium and lead under Ca and Fe deficiency in *Typha latifolia*: A study of two pore channel (TPC1) gene responses. *Environmental and Experimental Botany*, 115, 38-48.
- Rogers, S. D., Beech, J. y Sarma, K. S. 1998. Shoot regeneration and plant acclimatization of the wetland monocot Cattail (*Typha latifolia*). *Plant Cell Reports*, 18, 71-75.
- Rogers, S. M. D. 2003. Tissue culture and wetland establishment of the freshwater monocots *Carex*, *Juncus*, *Scirpus*, and *Typha*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 1-5.
- Rojas-Mayorquín, C. M. 2011. *Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de una hidroeléctrica (P.H. Las Cruces) en Nayarit, México*. Licenciatura, Universidad de Guadalajara.
- Rolli, E., Marasco, R., Saderi, S., *et al.* 2017. Root-associated bacteria promote grapevine growth: from the laboratory to the field. *Plant and Soil*, 410, 369-382.
- Rolón-Cárdenas, G. A. 2015. *Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la raíz de Typha latifolia tolerantes a cadmio* Licenciatura, UASLP.
- Rolón-Cárdenas, G. A. 2017. *Caracterización bioquímica y molecular de bacterias endófitas de Typha latifolia tolerantes a Cd*. Maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Rolón-Cárdenas, G. A., Arvizu-Gómez, J. L., Pacheco-Aguilar, J. R., *et al.* 2020. Cadmium-tolerant endophytic *Pseudomonas rhodesiae* strains isolated from *Typha latifolia* modify the root architecture of *Arabidopsis thaliana* Col-0 in presence and absence of Cd. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 349-361.
- Rolón-Cárdenas, G. A., Arvizu-Gómez, J. L., Soria-Guerra, R. E., *et al.* 2022. The role of auxins and auxin-producing bacteria in the tolerance and accumulation of cadmium by plants. *Environmental Geochemistry and Health*.

- Romero, F. M., Marina, M. y Pieckenstain, F. L. 2016. Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in Microbiology*, 167, 222-233.
- Santos-Díaz, M. D. S. y Barrón-Cruz, M. D. C. 2011. Lead, chromium and manganese removal by *in vitro* root cultures of two aquatic macrophytes species: *Typha Latifolia* L. and *Scirpus Americanus* Pers. *International Journal of Phytoremediation*, 13, 538-551.
- Satchanska, G., Topalova, Y., Ivanov, I. y Golovinsky, E. 2006. Xenobiotic biotransformation potential of *Pseudomonas rhodesiae* KCM-R5 and *Bacillus subtilis* KCM-RG5, tolerant to heavy metals and phenol derivatives. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20, 97-102.
- Sauer, M., Robert, S. y Kleine-Vehn, J. 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2565-2577.
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., *et al.* 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 60, 182-194.
- Shah, A., Mathur, Y. y Hazra, Amrita b. 2021. Double agent indole-3-acetic acid: mechanistic analysis of indole-3-acetaldehyde dehydrogenase AldA that synthesizes IAA, an auxin that aids bacterial virulence. *Bioscience Reports*, 41.
- Shah, V. y Daverey, A. 2020. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100774.
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., *et al.* 2017. Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. *In: De Voogt, P. & Gunther, F. A. (eds.) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 241*. Cham: Springer International Publishing.
- Shahid, M., Javed, M. T., Masood, S., *et al.* 2019. *Serratia* sp. CP-13 augments the growth of cadmium (Cd)-stressed *Linum usitatissimum* L. by limited Cd uptake,

- enhanced nutrient acquisition and antioxidative potential. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 1708-1721.
- Sharma, P. 2021. Efficiency of bacteria and bacterial assisted phytoremediation of heavy metals: An update. *Bioresource Technology*, 328, 124835.
- Sheng, X.-F. y Xia, J.-J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*, 64, 1036-1042.
- Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Singh, H. P., *et al.* 2018. Phytoremediation of lead by a wild, non-edible Pb accumulator *Coronopus didymus* (L.) Brassicaceae. *International Journal of Phytoremediation*, 20, 483-489.
- Singh, S. y Prasad, S. M. J. P. G. R. 2015. IAA alleviates Cd toxicity on growth, photosynthesis and oxidative damages in eggplant seedlings. *Plant Growth Regulation*, 77, 87-98.
- Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., *et al.* 2007. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum*, 131, 581-589.
- Su, L., Diretto, G., Purgatto, E., *et al.* 2015. Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. *BMC Plant Biology*, 15, 114.
- Sun, S., Zhou, X., Cui, X., *et al.* 2019. Exogenous plant growth regulators improved phytoextraction efficiency by *Amaranthus hypochondriacus* L. in cadmium contaminated soil. *Plant Growth Regulation*.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Nakanishi, H. y Nishizawa, N. K. 2011. Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice. *Plant signaling & behavior*, 6, 1813-1816.
- Takashima, K., Ahmad Nor, A. S. B., Ando, S., *et al.* 2020. Evaluation of plant stress due to plasma-generated reactive oxygen and nitrogen species using electrolyte leakage. *Japanese Journal of Applied Physics*, 60, 010504.
- Tang, C., Zhang, R., Wen, S. y Li, K. Detoxification mechanism of plant to Cd: subcellular distribution and forms of Cd in *Typha latifolia* L. 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 11-13 June 2009 2009. 1-4.

- Téllez-Hernández, J. I. 2009. *Estabilización por fosfato de Plomo y Cadmio contenidos en suelos de Villa De La Paz-Matehuala, S.L.P.* Maestría, UASLP.
- Tellez-Plaza, M., Guallar, E., Howard, B. V., *et al.* 2013. Cadmium exposure and incident cardiovascular disease. *Epidemiology*, 24, 421-429.
- Umnajkitikorn, K., Fukudome, M., Uchiumi, T. y Teaumroong, N. 2021. Elevated nitrogen priming induced oxinitro-responses and water deficit tolerance in rice. *Plants* 10, 381.
- Vandeputte, O., Öden, S., Mol, A., *et al.* 2005. Biosynthesis of Auxin by the Gram-Positive Phytopathogen *Rhodococcus fascians* Is Controlled by Compounds Specific to Infected Plant Tissues. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1169-1177.
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M. y Seeger, M. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
- Wang, J., Zhang, H., Zhang, T., *et al.* 2015. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 59-67.
- Wang, Y., Lv, N., Mao, X., *et al.* 2018. Cadmium tolerance and accumulation characteristics of wetland emergent plants under hydroponic conditions. *RSC Advances*, 8, 33383-33390.
- Wani, R. A., Ganai, B. A., Shah, M. A. y Uqab, B. J. J. B. B. 2017. Heavy metal uptake potential of aquatic plants through phytoremediation technique- a review. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 8, 2.
- Woodward, A. W. y Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95, 707-735.
- Woraharn, S., Meeinkuirt, W., Phusantisampan, T. y Chayapan, P. 2021. Rhizofiltration of cadmium and zinc in hydroponic systems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232, 204.
- Wu, K., Luo, J., Li, J., *et al.* 2018. Endophytic bacterium *Buttiauxella* sp. SaSR13 improves plant growth and cadmium accumulation of hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 21844-21854.

- Wu, Y., Ma, L., Liu, Q., *et al.* 2020. The plant-growth promoting bacteria promote cadmium uptake by inducing a hormonal crosstalk and lateral root formation in a hyperaccumulator plant *Sedum alfredii*. *Journal of Hazardous Materials*, 395, 122661.
- Xu, S., Xing, Y., Liu, S., *et al.* 2019. Role of novel bacterial *Raoultella* sp. strain X13 in plant growth promotion and cadmium bioremediation in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3887-3897.
- Xu, W., Shi, W., Yan, F., *et al.* 2011. Mechanisms of cadmium detoxification in cattail (*Typha angustifolia* L.). *Aquatic Botany*, 94, 37-43.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., *et al.* 2020. Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Yasmin, H., Naeem, S., Bakhtawar, M., *et al.* 2020. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress. *PLOS ONE*, 15, e0231348.
- Yoon, B.-J., Lee, D.-H., Kang, Y.-S., *et al.* 2002. Evaluation of carbazole degradation by *Pseudomonas rhodesiae* strain KK1 isolated from soil contaminated with coal tar *Journal of Basic Microbiology*, 42, 434–443.
- Yu, G., Wang, G., Li, J., *et al.* 2020. Enhanced Cd²⁺ and Zn²⁺ removal from heavy metal wastewater in constructed wetlands with resistant microorganisms. *Bioresource Technology*, 316, 123898.
- Yuan, Z., Luo, T., Liu, X., *et al.* 2019. Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution. *Science of The Total Environment*, 676, 87-96.
- Zamani-Ahmadmamdoodi, R., Gharahi, N., Martin, J. a. R., *et al.* 2020. Cd and Pb bioaccumulation in Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*) in relation to the role of metal contents in wetland sediments. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 518.
- Zapata-Morales, A. L., Alfaro-De La Torre, M. C., Hernández-Morales, A. y García-De La Cruz, R. F. 2020. Isolation of cultivable bacteria associated with the root of

Typha latifolia in a constructed wetland for the removal of diclofenac or naproxen. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231, 423.

- Zhan, Y.-H., Zhang, C.-H., Zheng, Q.-X., *et al.* 2017. Cadmium stress inhibits the growth of primary roots by interfering auxin homeostasis in *Sorghum bicolor* seedlings. *Journal of Plant Biology*, 60, 593-603.
- Zhang, C., He, Q., Wang, M., *et al.* 2020. Exogenous indole acetic acid alleviates Cd toxicity in tea (*Camellia sinensis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110090.
- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., *et al.* 2014. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374, 689-700.
- Zhang, R., Zhang, Q., Huang, X. y Guo, X. 2016. Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha* and the relationship of water quality factors in reclaimed water replenishment constructed wetland. *China Environmental Science* 36, 875-886.
- Zhang, T., Xiao, J., Zhao, Y., *et al.* 2021. Comparative physiological and transcriptomic analyses reveal ascorbate and glutathione coregulation of cadmium toxicity resistance in wheat genotypes. *BMC Plant Biology*, 21, 459.
- Zhang, X. H., Tapia, M., Webb, J. B., *et al.* 2008. Molecular signatures of two cattail species, *Typha domingensis* and *Typha latifolia* (Typhaceae), in South Florida. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 368-76.
- Zhao, H., Guan, J., Liang, Q., *et al.* 2021. Effects of cadmium stress on growth and physiological characteristics of sassafras seedlings. *Scientific Reports*, 11, 9913.
- Zhao, H., Jin, Q., Wang, Y., *et al.* 2016. Effects of nitric oxide on alleviating cadmium stress in *Typha angustifolia*. *Plant Growth Regulation*, 78, 243-251.
- Zhou, J., Cheng, K., Huang, G., *et al.* 2020. Effects of exogenous 3-indoleacetic acid and cadmium stress on the physiological and biochemical characteristics of *Cinnamomum camphora*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 109998.
- Zhu, X. F., Wang, Z. W., Dong, F., *et al.* 2013. Exogenous auxin alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by stimulating synthesis of hemicellulose 1 and

increasing the cadmium fixation capacity of root cell walls. *Journal of Hazardous Materials*, 263, 398-403.

Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., *et al.* 2019. Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of Environmental Management* 250, 109557.

9. PUBLICACIONES

Rolón-Cárdenas, G.A., Arvizu-Gómez, J.L.; Hernández-Morales, A. *Pseudomonas rhodesiae* una bacteria benéfica para la planta *Typha latifolia*. *Revista Universitarios Potosinos* **2021**. ISSN-1870-1698, 18 (259): 28-33

Rolón-Cárdenas, G.A., Arvizu-Gómez, J.L.; Pacheco-Aguilar, J.R.; Soria-Guerra, R.E.; Alatorre-Cobos, F.; Hernández-Morales, A. The role of auxins and auxin-producing bacteria in the tolerance and accumulation of cadmium by plants. *Environmental Geochemistry and Health* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01179-4>

Rolón-Cárdenas, G.A.; Martínez-Martínez, J.G.; Arvizu-Gómez, J.L.; Soria-Guerra, R.E.; Alfaro-De la Torre, M.C.; Alatorre-Cobos, F.; Rubio-Santiago, J.; González-Balderas, R.d.M.; Carranza-Álvarez, C.; Macías-Pérez, J.R.; Aldaba-Muruato, L.R.; Hernández-Morales, A. Enhanced Cd-Accumulation in *Typha latifolia* by Interaction with *Pseudomonas rhodesiae* GRC140 under Axenic Hydroponic Conditions. *Plants* **2022**, *11*, 1447. <https://doi.org/10.3390/plants11111447>