



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO DE RIZOCLONES DE
***Typha domingensis* TOLERANTES A ESTRÉS POR**
EUTROFIZACIÓN

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN ECOLOGÍA Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES

PRESENTA:

M. en C. Guadalupe Hernández Piedra

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. Violeta Ruiz Carrera

VILLAHERMOSA, TABASCO A NOVIEMBRE DE 2024.

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Villahermosa, el día 25 del mes septiembre del año 2024, el que suscribe Guadalupe Hernández Piedra alumna(o) del Programa de Doctorado en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales con número de matrícula 161G14005, adscrito a la División Académica de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la Tesis presentada para la obtención del grado y titulada Cultivo de rizoclonos de *Typha domingensis* tolerantes a estrés por eutrofización dirigida por Dra. Violeta Ruíz Carrera.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Villahermosa, Tabasco a 25 de septiembre 2024.



Guadalupe Hernández Piedra



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



2024
Felipe Carrillo
PUERTO
RECONOCIMIENTO DEL GOBIERNO
RECONOCIMIENTO Y PATRONO
DEL PAÍS
CENTRO DE
MÉXICO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

AGOSTO 26 DE 2024

**C. GUADALUPE HERNÁNDEZ PIEDRA
PAS. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y
MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"CULTIVO DE RIZOCLONES DE *Typha domingensis* TOLERANTES A ESTRÉS POR EUTROFIZACIÓN"**, asesorado por la Dra. Violeta Ruiz Carrera, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Alberto de Jesús Sánchez Martínez, Dra. Erika Escalante Espinosa, Dra. Violeta Ruiz Carrera, Dr. Graciano Calva Calva, Dra. Elda Barbarita Companioni González, Dr. Randy Howard Adams Schroeder y Dra. Carina Shianya Álvarez Villagómez.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**División
Académica
de Ciencias
Biológicas**

Jefatura de Posgrado



**2022 Flores
Magón**
PRECURSOR DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

Villahermosa, Tabasco a 14 de diciembre de 2022

C. GUADALUPE HERNÁNDEZ PIEDRA
EST. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA
Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los documentos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados en el SNP-CONACyT.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones y el reporte de originalidad de su documento de tesis. Con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, la Coordinadora Académica del programa de doctorado, realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y emitió las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: **"Cultivo de rizoclonos de *Thypa domingensis* tolerantes a estrés por eutrofización"**.

OBSERVACIONES:

1. Existe un índice de similitud del 4% de coincidencias, porcentaje muy bajo, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT.
2. El índice de similitud, corresponde con fuentes primarias de citación de internet, y publicaciones de autoría de la estudiante y directores. Por lo que confirma la originalidad de la investigación.
3. Se adjunta, el reporte de revisión de la tesis realizado a través de la herramienta Turnitin iThenticate.



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**División
Académica
de Ciencias
Biológicas**

Jefatura de Posgrado



**2022 Flores
Año de
Magón**
PRECURSOR DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

4. Finalmente, se le solicita a la MCA. Hernández Piedra, integrar en la versión final de tesis, este oficio e informe de originalidad, realizado por el Turnitin iThenticate

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DR. ALLAN KEITH CRUZ RAMÍREZ
JEFATURA DE POSGRADO

UJAT



**DIVISION ACADEMICA
CIENCIAS BIOLOGICAS
JEFATURA DE POSGRADO**

C.C.P. Dra. Violeta Ruiz Carrera. Directora de tesis.

Cultivo de rizoclones de *Thypa domingensis* tolerantes a estrés por eutrofización

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

- 1 ebook.pldworld.com
Internet 36 palabras — < 1%
- 2 Guadalupe Hernández-Piedra, Violeta Ruiz-Carrera, Alberto J Sánchez, Arlette Hernández-Franyutti, Alfonso Azpeitia-Morales. " Morphohistological development of the somatic embryo of ", PeerJ, 2018
Crossref Posted Content 35 palabras — < 1%
- 3 Vilbett Briones-Labarca, Claudia Giovagnoli-Vicuña, Marcelo Chacana-Ojeda. " High pressure extraction increases the antioxidant potential and bio-accessibility of bioactive compounds from discarded blueberries ", CyTA - Journal of Food, 2019
Crossref 33 palabras — < 1%
- 4 "Ecological and Practical Applications for Sustainable Agriculture", Springer Science and Business Media LLC, 2020
Crossref 17 palabras — < 1%
- 5 cyberleninka.org
Internet 16 palabras — < 1%
- 6 Rodrigo Alonso Pérez Ubeda. "Propuesta de inclusión de esfuerzos en el control de un brazo robot para asegurar el cumplimiento de la rugosidad 15 palabras — < 1%

Carta de Cesión de Derechos

Villahermosa, Tabasco a 25 de septiembre 2024.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTORAS en la producción, creación y/o realización de la obra denominada "Cultivo de rizoclones de *Typha domingensis* tolerantes a estrés por eutrofización".

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



M. en C. Guadalupe Hernández Piedra



Dra. Violeta Ruiz Carrera

TESTIGOS



Dr. Alberto de Jesús Sánchez Martínez



Dra. Erika Escalante Espinoza

Dedicatoria

A mis hijos

Rubi Concepción Salvador Hernández

José Abel Salvador Hernández

Jesusmiguel Adonis Salvador Hernández

con todo mi amor, este esfuerzo fue para ellos y por ellos.

Agradecimientos

A Dios

A mis hijos por su comprensión y su motivación.

A mi asesora la Dra. Violeta Ruiz Carrera por creer en mí como científica.

A todos aquellos que de alguna forma me acompañaron, guiaron y motivaron en la realización de este proyecto de vida.

Índice de contenido

1. Índice de tablas	1
2. Índice de figuras	2
3. CAPÍTULO I. Protocolo de tesis	4
1.1. Introducción	5
1.2. Marco teórico	7
1.2.1 Contaminación acuática por enriquecimiento de nutrientes	7
1.2.2 Fitorremediación y humedales artificiales	9
1.2.3 Macrófitas acuáticas emergentes y mecanismos de remoción de nutrientes	12
1.2.4 <i>Typha domingensis</i>	16
1.2.5 Nuevo enfoque biotecnológico en la fitorremediación	18
1.2.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de raíces adventicias	19
1.2.5.2 Hairy roots	22
1.3. Justificación	27
1.4. Pregunta de investigación	28
1.5. Hipótesis	29
1.6. Objetivo general	30
1.6.1 Objetivos específicos	
1.7. Metodología	31
1.8. Referencias	34
4. CAPÍTULO II. Diseño de un rizotrópico experimental <i>in vitro</i> de <i>Typha domingensis</i> con fenotipado de raíces.	45
5. CAPÍTULO III. Dinámica del enraizamiento temporal-espacial de líneas rizogénicas adventicias <i>in vitro</i> de <i>Typha domingensis</i> con auxina/citocinina.	65
6. CAPÍTULO IV. Induction of Hairy Roots on Somatic Embryos of Rhizoclonos from <i>Typha domingensis</i> seedlings.	100
7. CAPÍTULO V. Conclusiones generales	102
8. ANEXOS	104

Índice de tablas

CAPÍTULO II

Cuadro I. Resumen estadístico de los factores experimentales	64
--	----

CAPÍTULO III

Tabla 1. Concentraciones de auxina y citocinina en los tratamientos de inducción de raíces adventicias en plántulas de <i>Typha domingensis</i> . AIA-CIN (EXP 1) y AIA-BAP (EXP 2).	72
Tabla 2. Optimización de inducción de raíces adventicias en germinados y explantes de raíz y base caular de <i>Typha domingensis</i> . Rizotrópico-luz (EXP 3) y Rizotrópico-oscuridad (EXP 4).	73
Tabla S1A. Tiempos de máxima respuesta en AIA-CIN y AIA-BAP.	91
Tabla S1B. Resumen estadístico de las variables de velocidad y superficie de contacto en el EXP 1 AIA-CIN.	92
Tabla S1C. Promedios de velocidad y superficie de contacto del sistema radicular de germinados <i>in vitro</i> de <i>Typha domingensis</i> del EXP 1 AIA-CIN.	93
Tabla S1D. Resumen estadístico de las variables de velocidad y superficie de contacto en el EXP 2 AIA-BAP.	94
Tabla S1E. Promedios de velocidad y superficie de contacto del sistema radicular de germinados <i>in vitro</i> de <i>Typha domingensis</i> del EXP 2 AIA-BAP.	95
Tabla S2A. Resumen estadístico de las variables de velocidad y superficie de contacto en el EXP 3 Luz y EXP 4 Oscuridad.	96
Tabla S2B. Efecto en la velocidad y superficie de contacto del sistema radicular de germinados, raíz y base caular de <i>Typha domingensis</i> en los EXP 3 LUZ y EXP 4 OSCURIDAD.	97

CAPÍTULO ANEXOS

Tabla 1 Composición química general de aguas residuales domésticas según la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996.	106
---	-----

Tabla 2 Niveles de remoción de contaminantes requerido en el tratamiento de agua residual para ser reutilizada o vertida al ambiente.	107
---	-----

Tabla 3 Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
---	--

Índice de figuras

CAPÍTULO I

Figura 1. Procesos y mecanismos en fitorremediación para remoción de contaminantes. Imagen tomada de Kafle <i>et al.</i> 2022.	10
Figura 2. Morfología de <i>Typha domingensis</i> .	18
Figura 3. Transferencia de T-DNA basada en plásmido de <i>Agrobacterium</i> Ri para la transformación genética de plantas. Modificada de Azcón-Bieto & Talón (2005) y Chandra (2012).	25
Figura 4. Visión general del diseño metodológico.	33

CAPÍTULO II

Figura 1. Fenotipos y supervivencia de germinados de <i>Typha domingensis</i> en concentraciones crecientes de Murashige y Skoog en sistema hidropónico.	61
Figura 2. Fenotipos radiculares de germinados de <i>Typha domingensis</i> en rizotrófon <i>in vitro</i> .	62
Figura 3. Comparación del sistema radicular de germinados <i>in vitro</i> de <i>Typha domingensis</i> de los tratamientos H ₂ O/ BIF (Agua purificada/medio bifásico), MS/ BIF (Medio Murashige y Skoog/Medio bifásico), H ₂ O/SS (Agua purificada/medio semisólido) y MS/SS (Murashige y Skoog/medio semisólido).	63

CAPÍTULO III

Figura 1. Resumen gráfico del procedimiento para la inducción de raíces adventicias de <i>Typha domingensis</i> .	71
Figura 2. Dinámica del enraizamiento de germinados de <i>Typha domingensis</i> .	75
Figura 3. Efecto de las concentraciones de auxina y citocinina en tiempos de máxima respuesta sobre la rizogénesis de germinados <i>in vitro</i> de <i>Typha domingensis</i> .	76

Figura 4. Velocidad y densidad del enraizamiento de <i>Typha domingensis</i> del segundo balance de AIA/CIN por explante.	78
Figura 5. Clasificación de líneas rizogénicas de <i>Typha domingensis</i> basada en cuatro variables de calidad del sistema radicular adventicio.	80
Figura S3A. Dendrograma de líneas rizogénicas luz de <i>Typha domingensis</i> basada en cuatro variables de calidad del sistema radicular adventicio.	98
Figura S3B. Dendrograma de líneas rizogénicas oscuridad de <i>Typha domingensis</i> basada en cuatro variables de calidad del sistema radicular adventicio.	98

CAPÍTULO I

PROTOCOLO DE TESIS

1.1 Introducción

Las aguas residuales se generan en todo el mundo por las actividades humanas y su carga general de contaminación aumenta a causa del incremento de fertilizantes agrícolas nitrogenados y fosfatados, residuos industriales, desechos humanos y pecuarios, escorrentía urbana y aguas negras (Selman y Greenhalgh, 2009; Dodds y Whiles, 2010; WWDR, 2019). A pesar de los esfuerzos de políticas públicas y estrategias internacionales, más del 80% de las aguas residuales del mundo, y más del 95% en algunos países menos desarrollados, se liberan al medio ambiente sin tratamiento alguno (WWDR 2019; UNEP 2023). La elevada carga de nutrientes como el nitrógeno (N) y el fósforo (P) en estas aguas residuales genera un problema ambiental conocido como eutrofización el cual afecta la biodiversidad y los ecosistemas acuáticos a nivel mundial (Gilbert 2017).

La fitorremediación es una biotecnología sustentada en los mecanismos fisiológicos de las plantas para reducir, atenuar o degradar contaminantes orgánicos e inorgánicos, con inversión de futuro en la depuración de aguas, por su bajo costo y buena aceptación social (Sharma y Pandey 2014; Ansari *et al.* 2014; Wei *et al.* 2021). La demanda mundial que gira en torno al desarrollo sostenible fomenta que las biotecnologías aplicadas a aguas residuales deban ser innovadoras, diversas, eficaces y rentables para enfrentar el desafío en materia de agua limpia. Por esta razón, la biotecnología con enfoque en el sistema radicular de las plantas acuáticas emergentes locales es estratégica para mejorar la depuración de nutrientes en la cadena de tratamiento de aguas residuales (Kinidi y Salleh 2017; Cruz *et al.* 2018). En el ámbito de la fitorremediación acuática se espera a corto plazo que las innovaciones biotecnológicas de rizogénesis *in vitro* contribuyan a maximizar la limpieza del agua en la cadena de tratamiento de aguas residuales (Rai *et al.* 2020). La rizogénesis *in vitro* es utilizada en diferentes campos como la industria y la biorremediación, ya que las raíces son una atractiva fuente de fitoquímicos y son útiles para diversos estudios fisiológicos (Mehrotra *et al.* 2016; Murthy *et al.* 2016; Khan *et al.* 2018).

La selección de la especie vegetal es el punto de mayor consideración en las estrategias fitocorrectivas de aguas residuales. *Typha domingensis* Pers. (espadaña) es la macrófita acuática emergente ideal por la alta capacidad de adaptación de sus raíces adventicias y entrada de nutrientes minerales, así como su amplia distribución en los trópicos (Marrero-Coto *et al.* 2012; Di Luca *et al.* 2019; Rangel-Peraza *et al.* 2019). El proceso de depuración de aguas contaminadas de alta

eficiencia usando el sistema radicular *T. domingensis* (rizofiltración), consiste en tener raíces con crecimiento rápido y ramificación abundante para remover contaminantes por períodos prolongados evitando los mecanismos translocadores de los solutos iónicos de la raíz al follaje, es decir con funcionamiento aislado, tal como aquellas que se producen en cultivos *in vitro* o por transgénesis (Ansari *et al.* 2014; Yadav *et al.* 2018).

Actualmente, existen algunos protocolos para el género *Typha* que permiten el desarrollo de raíces adventicias *in vitro* (Santos-Díaz y Barrón-Cruz, 2011). Sin embargo, no se han realizado investigaciones sobre raíces aisladas transformadas, en particular de *T. domingensis*. La inducción de la rizogénesis *in vitro*, con o sin variación somaclonal (raíz no transformada) y vía raíces pilosas por ingeniería genética con *Agrobacterium rhizogenes* (raíz transformada) son herramientas de investigación que pueden ser eficaces como tecnología individual o fusionadas (Czakó *et al.* 2005; Santos-Díaz y Barrón-Cruz, 2011).

Teniendo esto en cuenta, el objetivo de la investigación fue generar el óptimo fisiológico de diferentes tipos de rizoclonos *in vitro* de *Typha domingensis* mediante la inducción de rizogénesis adventicia genéticamente transformada y no transformada de la especie. En consecuencia, se evaluó la dinámica de crecimiento y ramificación de raíces adventicias cultivando rizoclonos *in vitro* como germinados *in vitro* frente a dos equilibrios de concentraciones de la auxina rizogénica natural ácido indolacético (IAA) con las citocininas cinetina (CIN) o bencilaminopurina (BAP) en un rizotrón luz. A continuación, se determinó el efecto de las concentraciones óptimas de AIA, CIN y BAP en sistemas radiculares aislados con y sin base caulinar, así como en germinados completos usando dos configuraciones de rizotrón, luz vs oscuridad. Finalmente, se evaluó la agrotransformación en embriones somáticos de la línea embriogénica LE-YCI (Hernández-Piedra *et al.* 2018) para inducir raíces pilosas con tres cepas de *A. rhizogenes*. Se espera que las variantes rizogénicas producidas por cultivo *in vitro* y las agrotransformadas sean una base sólida para continuar en la búsqueda de bioprocesos alternativos para la fitodepuración de aguas residuales.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Contaminación acuática por enriquecimiento de nutrientes

En un contexto global, la problemática de la eutrofización y la disponibilidad de agua dulce para el consumo humano han cobrado relevancia y se han convertido en una necesidad que requiere atención pública urgentemente. Por este motivo, en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible se hace hincapié en la disponibilidad, la gestión sostenible y el saneamiento del agua, principalmente contaminada por aguas residuales de diferentes orígenes (Ansari *et al.* 2014; PNUD, 2021). El agua residual es producto de las actividades humanas y su composición varía en función de su origen: aguas negras, desechos humanos, escorrentía urbana, fertilizantes agrícolas nitrogenados y fosfatados, residuos industriales y pecuarios, entre otros (Selman y Greenhalgh, 2009; Dodds y Whiles, 2010; WWDR 2019). En un planeta bajo presión, se necesitan iniciativas innovadoras y múltiples, que se extiendan mucho más allá de las soluciones de gestión propuestas hasta el momento en materia de seguridad del agua. En consecuencia, resulta imperativo desarrollar conocimientos y soluciones biotecnológicas para estos problemas de bioseguridad (Bogardi *et al.* 2012).

La composición del agua residual incluye contaminantes como sólidos suspendidos, materia orgánica biodegradable, nutrientes, metales pesados, sólidos inorgánicos disueltos y patógenos que causan en las masas de agua receptoras condiciones anaerobias, el crecimiento de vida acuática indeseable y enfermedades (Romero, 2004). El agua residual sin tratar es la principal fuente de contaminación antropogénica de los ecosistemas de agua dulce, que son los reservorios de agua limpia para la humanidad. Las aguas residuales (AR) son aguas gastadas o usadas, por lo cual su composición ha cambiado y suelen mantener materia disuelta o suspendida. Por su origen o fuente, se clasifican en municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios y domésticos (EPA, 2002; Romero, 2004).

En general, se entiende por agua residual doméstica (ARD) aquella proveniente de las viviendas, edificios comerciales o institucionales, y por agua residual municipal (ARM) los residuos líquidos transportados por el alcantarillado de una ciudad o población. Por su parte, por agua residual industrial (ARI) se entiende aquella que proviene de las industrias de manufactura (Romero, 2004; Lozano-Rivas, 2012). Romero (2004) también utiliza los términos «aguas negras» y «aguas

grises». Las aguas negras son las ARD procedentes del inodoro y las aguas grises son las ARD excluyendo las del inodoro. En la Tabla 1 en ANEXOS se presenta una composición química general de las aguas residuales domésticas.

La normativa ambiental en materia de AR en México ha creado un marco normativo que se encarga de regular las descargas de aguas residuales a los cuerpos receptores a través de las siguientes normas, las cuales se describen en la Tabla 1 del Anexo. La Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas o bienes nacionales. La Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en la descarga de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. La Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reutilizan en servicios públicos. La Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2001 que establece las especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes en lodos y biosólidos para su aprovechamiento y disposición final (SEMARNAT 2024).

El tratamiento de AR para mantener la composición y concentración de contaminantes en los límites máximos permisibles marcados por la normativa comprende una serie de operaciones y procesos unitarios. Las operaciones unitarias son los métodos o mecanismos físicos en los que no se producen cambios a nivel químico, mientras que los procesos unitarios involucran reacciones químicas o bioquímicas y cambios a nivel molecular (Lozano-Rivas, 2012). Así, en conjunto, constituyen los llamados tratamientos primarios, secundarios y terciarios. Se proporciona una breve descripción y las variables clave de las operaciones y procesos unitarios en la Tabla 2 en ANEXOS. Las unidades y procesos necesarios para alcanzar un determinado nivel de tratamiento se pueden agrupar en función de consideraciones fundamentales, con independencia del nivel de tratamiento (Metcalf y Eddy, 1991; Crites y Tchobanoglous, 2000; Salas-Rodríguez *et al.* 2007; Englande *et al.* 2015). Los niveles de tratamiento son los niveles de eliminación de contaminantes requeridos en el tratamiento antes de que el agua residual tratada pueda reutilizarse o verse en el medioambiente (Tabla 2 ANEXOS). En las depuradoras convencionales de aguas residuales se distinguen dos líneas de tratamiento: la línea de agua, que incluye los procesos o tratamientos que

permiten reducir los contaminantes presentes en las aguas residuales, y la línea de lodos, donde se tratan la mayor parte de los subproductos que se originan en la línea de agua (Salas-Rodríguez *et al.* 2007). En el pasado, el objetivo básico del tratamiento de las aguas residuales se centraba en la eliminación de sólidos en suspensión, materia orgánica y organismos patógenos. En la actualidad, cada vez se da más importancia a la eliminación de nutrientes, compuestos tóxicos y a la reutilización de los efluentes depurados (ONU-UNWATER 2024).

El agua puede tratarse a cualquier nivel de calidad deseado; sin embargo, a medida que aumenta su pureza, también aumenta el costo de operación (Englande *et al.* 2015). En los países en desarrollo, el costo del tratamiento de las aguas residuales es demasiado elevado y el 90 % de estas ingresan en las vías navegables interiores sin tratamiento (Kumaraswamy *et al.* 2020). Por lo tanto, la causa más importante de la contaminación del agua es la falta de una gestión y un tratamiento adecuados de los residuos humanos, industriales y agrícolas (ONU 2014). Por ejemplo, la disposición final de las aguas residuales (domésticas e industriales) en las grandes urbes no se ha atendido al 100 % y los estándares ambientales de calidad del agua, aunque han mejorado, siguen siendo ineficaces (Jiménez *et al.* 2007; Castañeda y Flores 2013).

1.2.2 Fitorremediación y humedales artificiales

Una ecotecnología especializada en la aplicación de procesos biológicos para la restauración de la calidad del ambiente al retirar o paliar el agente contaminante (Gutiérrez 2006) es la fitorremediación. Esta tecnología consiste en la remoción de sustancias no deseadas a partir del tejido de la planta por cualquier mecanismo, sea biofísico o metabólico, que emplee y facilite el tratamiento del sustrato contaminado. Aunque es un viejo proceso que ocurre de forma natural en los ecosistemas, el enfoque actual mediante un diseño de ingeniería ecológica busca maximizar la capacidad *per se* del proceso de remoción realizado por la vegetación (Fulekar *et al.* 2009; Evans y Furlong 2011; Anand *et al.* 2017).

Los mecanismos de fitorremediación comúnmente se clasifican en acumulación (fitofiltración), complejación (fitoestabilización), hiperacumulación (fitoextracción), volatilización por hojas (fitovolatilización), degradación en plantas (fitotransformación) y degradación por microorganismos de la rizósfera (rizodegradación) (Yadav *et al.* 2018; Grzegórska *et al.* 2020).

Las características de cada mecanismo se explican en la Figura 1 (Mentaberry 2008; Dhir *et al.* 2009; Olguín y Sánchez 2010; Delgadillo-López *et al.* 2011; Kafle *et al.* 2022). La selección de la especie vegetal más adecuada y en consecuencia su mecanismo de remoción dependerá del tipo de contaminante (volumen o toxicidad), biodisponibilidad y propiedades físicas y químicas del suelo o agua, que en conjunto definirá la eficiencia de fitorremediación (Anand *et al.* 2017; Kafle *et al.* 2022).

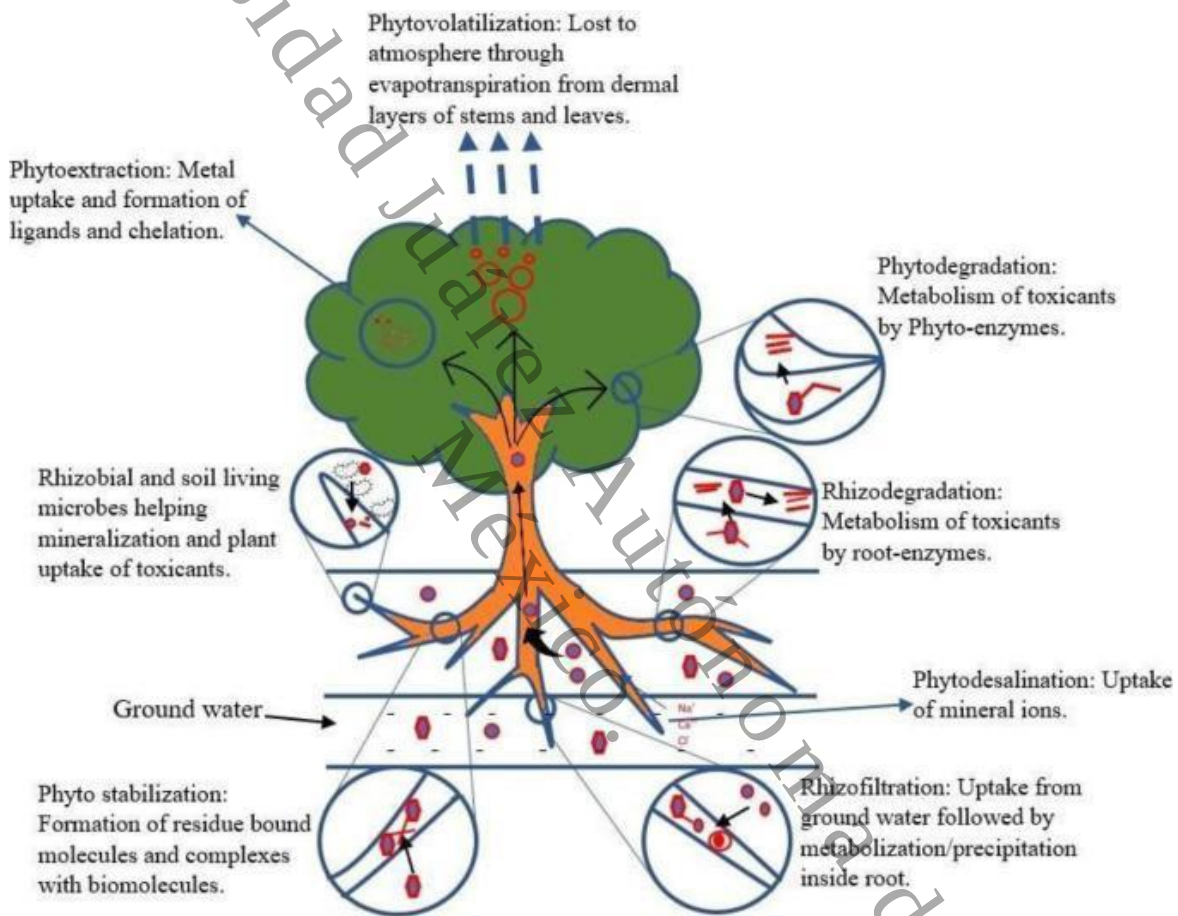


Figura 1. Procesos y mecanismos en fitorremediación para remoción de contaminantes. Imagen tomada de Kafle *et al.* 2022 (<https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100203>).

Los humedales artificiales son ecosistemas diseñados con plantas donde se aprovechan los diversos mecanismos de remoción de contaminantes que estas poseen en una infraestructura física para remover xenobióticos y en la depuración biológica de aguas residuales (Liu *et al.* 2012). Estos se clasifican en humedales de superficie libre de agua (horizontal y vertical) y humedales subsuperficiales (EPA 2024). Ambos tipos de humedales son económicos y proveen más servicios

como el secuestro de carbono, mejora la estética y conserva a la biodiversidad (Liu *et al.* 2012), esta última cualidad es muy importante en los humedales naturales (Evans y Furlong, 2011). Por su diseño los humedales de flujo horizontal mantienen condiciones anóxicas, adecuado para procesos de desnitrificación, mientras que los humedales de flujo vertical mantienen condiciones aerobias, favorables para la nitrificación; una combinación de ambos tipos de humedales, potencializan la remoción de nitrógeno total mejorando la eficiencia de depuración de aguas residuales. Una nueva variante de humedales denominados humedales artificiales de alta tasa utilizan como medio de soporte el plástico, el cual favorece la formación de biofilm, consiguiendo una porosidad de hasta 94 a 96% (Arteaga-Cortez *et al.* 2019).

La vegetación acuática de los humedales artificiales ha sido un factor fundamental para obtener rendimientos óptimos en la depuración de aguas residuales (EPA, 2024). La exploración de varios enfoques para mitigar el enriquecimiento de nutrientes en las aguas superficiales incluye sistemas integrados de islas flotantes de mosaico consistentes en vegetación acuática cerca de las riberas de los ríos, por ejemplo para purificar el agua del río eutrófico en la ciudad de Jiaxing, provincia de Zhejiang se implementó este sistema y obtuvo tasas de remoción promedio de nitrógeno total (TN), $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, fósforo total (TP) y clorofila *a* en la temporada verano-otoño fueron 36.9%, 44.8%, 25.6%, 53.2%, 43.3% y 64.5%, respectivamente (Zhao *et al.* 2012).

Recientemente se da un enfoque completamente sustentable que añade valor agregado a los humedales diseñados que consiste en reusar la biomasa generada como materia prima para producir biocombustibles de manera tal que se genere un ciclo sostenible (Olguín y Sánchez 2010; Hoevers 2011; Liu *et al.* 2012; Anand *et al.* 2017). En la actualidad estos sistemas de tratamiento con macrófitas acuáticas emergentes han recuperado auge, por ejemplo el Simposio Internacional en Control y Dinámica de la Contaminación de Humedales (WETPOL) donde expertos de todo el mundo presentan sus últimas investigaciones y experiencias en el tratamiento de la contaminación por humedales artificiales, para su aplicación a escala completa en los ecosistemas de humedales, incluida la mejora de la calidad del agua, la regulación del clima y el control de inundaciones (Chazaren *et al.* 2015), en sus últimas realizaciones presentaron avances recientes en tópicos selectos como: ecofisiología e invasividad de plantas de humedales; humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales domésticas, industriales y de otro tipo; eliminación de nutrientes

en humedales artificiales en paisajes agrícolas; humedales construidos en clima frío, clima árido y clima cálido; humedales electroquímicos microbianos para tratamientos de aguas residuales; recuperación de fósforo de humedales artificiales; entre otros temas (WETPOL 2023).

1.2.3 Macrófitas acuáticas emergentes y mecanismos de remoción de nutrientes

Las macrófitas acuáticas son productores primarios que proveen hábitat y refugio a la fauna acuática, tienen un rol clave en el ciclo biogeoquímico e influyen directamente en la hidrología y dinámica de los sedimentos en los ecosistemas de agua dulce (Bornette y Puijalon 2011). Por su forma de vida se agrupan en vegetación acuática sumergida (VAS), vegetación acuática flotante (VAF) y vegetación acuática emergente (VAE) ya sea como monocultivos o policultivos (Dhote y Dixit 2009; Evans y Furlong 2011). Las macrófitas acuáticas más utilizadas para la creación de humedales artificiales por ser buenos exponentes del bombeo de oxígeno, al mismo tiempo que presentan microflora rizogénica saludable y zonas aisladas en la raíz para crecimiento bacteriano y su correspondiente proceso depuración de nutrientes como el nitrato, nitrito, amonio y fosfato están representadas principalmente por las familias *Cyperaceae*, *Potamogetonaceae*, *Ranunculaceae*, *Typhaceae*, *Haloragaceae*, *Hydrocharitaceae*, *Najadaceae*, *Juncaceae*, *Pontederiaceae*, *Zosterophyllaceae* y *Lemnaceae* (Prasad 2007; Evans y Furlong 2011; Anand *et al.* 2017).

Las características deseables en la planta para rizofiltración consisten en tener raíces de crecimiento rápido y ramificación abundante, debe poder remover contaminantes por períodos prolongados y no debe ser un translocador eficiente al tallo, algunas candidatas en los procesos de rizofiltración de humedales artificiales son las especies acuáticas *Chara vulgaris*, *Myriophyllum aquaticum*, *M. spicatum*, *Hydrilla verticillata*, *Scirpus validus*, *Typha latifolia*, *Ceratophyllum demersum*, *Potamogeton pectinatus*, *Maranta arundinaceae* y *Lemna sp* (Mentaberry 2008; Anand *et al.* 2017). El mecanismo de rizofiltración radicular largo y fibroso cubierto de pelos radiculares para absorber y transportar los solutos iónicos destaca por su eficacia en el secuestro de metales y el reciclaje de nutrientes de cuerpos de agua contaminados (Yadav *et al.* 2018; Grzegórska *et al.* 2020).

El nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K) son los tres macronutrientes necesarios en las cantidades más altas para el crecimiento de las plantas. La disponibilidad de nitrógeno (N) y/o fósforo (P) puede limitar el crecimiento de los productores primarios en la mayoría de los ecosistemas acuáticos y terrestres del mundo. Sin embargo, los aportes excesivos de N y P antropogénicos afectan los entornos naturales y tienen consecuencias ecológicas y evolutivas de largo alcance, desde especies individuales hasta ecosistemas enteros (Guignard *et al.* 2017). Se distinguen dos vías de incorporación de nutrientes a través de la raíz, la vía simplástica y la vía apoplástica. En la primera los iones son incorporados a través de los pelos radicales u otras células de la epidermis y transportados de célula a célula hasta los elementos conductores del xilema. La vía apoplástica contempla un transporte extracelular de los iones hasta la endodermis donde la banda de Caspari obliga el paso a través de la plasmalema. Una vez en el periciclo los iones pueden seguir la vía extracelular hasta el xilema. El NO_3^- , NH_4^+ , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} y HCO_3^- utilizan transportadores tipo simporte y antiporte para atravesar las membranas, los cuales utilizan energía metabólica indirectamente y fuerza motriz impulsada por H^+ y Na^+ (Azcón-Bieto y Talón 2008).

La absorción de NO_3^- por la planta disminuye a bajas temperaturas, en anaerobiosis y en presencia de inhibidores de la respiración. La mayoría de las plantas muestran dos sistemas de absorción de nitrato, el primero (permeasas) se induce por el mismo ion ($K_m < 100 \mu\text{M}$) y se satura a condiciones externas inferiores a 1mM. El segundo (canales iónicos) opera a concentraciones externas superiores a 1mM y no muestra cinética de saturación (Azcón-Bieto y Talón 2008). El NO_3^- absorbido desde el ambiente externo hacia las raíces es importado por una o más de las cuatro familias de proteínas transportadoras de NO_3^- : Transportador de Nitrato 1 (NRT1) / Transportador de péptidos (PTR), (NPF), NRT2, Canal de cloruro (CLC) y el Canal de Anión de activación lenta (Wang *et al.* 2018; Zhao *et al.* 2018).

Una vez que el NO_3^- se absorbe en las células de la raíz, puede asimilarse o almacenarse en las raíces o transportarse a los brotes. La capacidad de transporte de NO_3^- de la raíz al brote varía entre las especies de plantas y está regulada por las condiciones ambientales (Wang *et al.* 2018). El NO_3^- destinado a ser reducido y asimilado en aminoácidos emplea para ese fin una serie de enzimas que incluyen el nitrato reductasa (NR), la nitrito reductasa (NiR), la glutamina sintasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT); los cuales reducen el nitrato en nitrito por la NR en el citosol celular

y el nitrito se reduce y convierte en amonio por NiR en los plástidos o cloroplastos. Tanto el nitrito como el exceso de amonio son tóxicos para las plantas. Por lo tanto, a nivel celular, estos pasos de asimilación deben estar bien coordinados en respuesta al suministro de nitrógeno y la demanda de nitrógeno, así como al estado del carbono, que proporciona el andamiaje para la síntesis de aminoácidos (Wang *et al.* 2018; Zhao *et al.* 2018).

Después del N, el P es el segundo macronutriente limitante para el crecimiento de la planta (Schatman *et al.* 1998). Los mecanismos de absorción de P no se conocen bien en el caso de las especies acuáticas, pero se sabe que P es absorbido por las células vegetales en forma de fosfato (Pi) usando proteínas transportadoras, como los simportadores $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{H}^+$ en la membrana plasmática. El fosfato se puede translocar de brotes a raíces o de raíces a brotes, como se ha demostrado en estudios de laboratorio (Thiébaud 2008). En condiciones limitantes de fosfato, las plantas mantienen los niveles de fosfato citosólico facilitando la disponibilidad de Pi externo, aumentando su captación, reciclando y consumiendo moléculas no esenciales que contienen fósforo, por otra parte, cuando el Pi es abundante, es decir su tasa de absorción supera la demanda se previene la toxicidad del fosfato al reducir la absorción del suelo, aumentando la salida de Pi y el almacenamiento en las vacuolas (Ajmera *et al.* 2019). El fósforo secretado está parcialmente biodisponible y, por lo tanto, vuelve a formar parte de los procesos de renovación acuáticos, incluso a través de la absorción por biofilms epífitos o macrófitas (Halbedel 2018).

Las plantas acuáticas prefieren diferentes formas de N, además la absorción de este es afectada por la temperatura, pH y composición de los elementos en solución, así como la tasa de crecimiento de las plantas (Ikeda 1991). El contenido total de N en agua está compuesto por nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos y nitrógeno orgánico. El N amoniacal existe en solución acuosa tanto en forma de ion amonio como en forma de amoniaco, dependiendo del pH de la solución de acuerdo con la siguiente reacción de equilibrio: $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$. A pH superiores a 9.3 el equilibrio se desplaza hacia la derecha, por debajo de 9.3 predomina la concentración del ion amonio (Crites y Tchobanoglous 2000). El fósforo se encuentra en soluciones acuosas como ortofosfatos, polifosfatos y fósforo orgánico y al igual que el nitrógeno amoniacal las especies variarán en función del pH (Crites y Tchobanoglous 2000). Por ejemplo, las aguas residuales resultantes de la industria minera muestran un pH aproximado de 3 provocando una mayor disolución de metales

pesados (Sheoran 2006), por el desplazamiento de las reacciones químicas claves en el sistema. Por lo tanto, la geoquímica del sedimento, fisicoquímica del agua y naturaleza del contaminante, definirán la eficiencia de remediación de las plantas acuáticas (Prasad 2007).

En *Potamogeton crispus* la concentración de nutrientes determina la vía de absorción. Es decir, en aguas oligotróficas los nutrientes se absorben por la raíz a partir del sedimento, pero en condiciones eutróficas los brotes son una vía notable para absorber directamente los nutrientes de la columna de agua (Xu *et al.* 2019). En la lemnácea *Landoltia punctata* el N disponible se absorbe tanto por raíz como por su fronda, cuando ambas fuentes de N están disponibles, las plantas prefieren tomar NH_4^+ , pero tomarán NO_3^- si es la única fuente de N (Fang *et al.* 2007). En *Lemna minor* las raíces tienen mayor tasa de absorción para los iones NH_4^+ y NO_3^- a concentraciones externas bajas ($5 \mu\text{M}$ NH_4NO_3) si se compara con la fronda, pero en concentraciones altas de NH_4NO_3 $50 \mu\text{M}$ se reduce la tasa de absorción en la raíz para ambos iones y se compensa por una mayor absorción por parte de las frondas (Cendergree y Madsen 2002).

En *Typha latifolia* la cinética de absorción de NH_4^+ y NO_3^- a pH de 3.5, 5.0, 6.5 o 7.0 mostró que en pH neutro esta especie crece con ambas fuentes de N, pero en los tratamientos donde el ion NH_4^+ es la fuente de N las tasas de crecimiento son mayores. Las máximas tasas de absorción de NH_4^+ son a pH 6.5 y para NO_3^- es a pH 5.0, esta se reduce hasta un 10% cuando el pH es 3.5, generando un estrés nutricional en la planta (Brix *et al.* 2002). Un estudio similar de cinética de absorción de P en la especie *Typha domingensis* y *Cladium mariscus* demostró la capacidad de las especies para ajustar su cinética en función de altas ($500 \mu\text{g P L}^{-1}$) y bajas ($5 \mu\text{g P L}^{-1}$) concentraciones de P en ambientes oxidantes ($8.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) y reductantes ($<0.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). En el caso de *T. domingensis* la longitud radicular aumenta con bajo P y buena aireación. En relación con la cinética de absorción, cuando hay baja concentración de fósforo la presencia del oxígeno afecta la absorción, siendo hasta tres veces superior en un ambiente aireado. No así para *C. mariscus* que en condiciones similares su tasa de absorción es menor si se compara con *T. domingensis* (Brix *et al.* 2010).

Los nutrientes se absorben o fijan en el apoplasto de la raíz y los iones son transportados a corta distancia en el simplasto, como ejemplo, se atribuye al apoplasto de raíz la tolerancia a la toxicidad

por contaminantes inorgánicos (Sattelmacher 2001). En especies emergentes, como *Typha*, además de las raíces adventicias constitutivas se inducen raíces adventicias en respuesta a diversos tipos de presiones ambientales, transiciones de luz y oscuridad o condiciones de oscuridad o luz, y dichas raíces incrementan su capacidad metabólica para tolerar y transformar a los nutrientes al estimular el transporte polar de auxinas y la vía de señalamiento que controla la hiperrizogénesis (Gonin *et al.* 2019).

1.2.4 *Typha domingensis*

La macrófita acuática emergente *Typha domingensis* Pers., es una planta herbácea perenne, presenta un rizoma estolonífero y hojas simples lineares que emergen del agua alcanzando una altura máxima de 2.5 m. La inflorescencia se compone de una espiga masculina sobre la espiga femenina y produce hasta 250 000 flores. Los frutos son secos tipo aquenio de aproximadamente 1.5 mm de largo, el cual contiene una semilla diminuta de endospermo farinoso (Judd *et al.* 2008). El aquenio está cubierto de un folículo persistente denominado perianto que le ayuda a su dispersión (Lot-Helgueras 2004; Novelo y Ramos 2007). Se distribuye en todo el mundo principalmente en humedales, marismas y otros hábitats acuáticos de climas templados y pantropicales, tiene un ciclo de crecimiento anual (Carhuacho León *et al.* 2020). Detalles de su morfología se pueden observar en la Figura 2.

El género *Typha* destaca entre todas las especies por su mayor uso en la construcción de humedales artificiales (Paris *et al.* 2005; Hidalgo *et al.* 2005; Sheoran 2006) mayormente para la remediación de aguas contaminadas por metales pesados. Se utiliza en filtros flotantes verdes uno de los sistemas más innovadores de tratamiento de aguas residuales para biorremediar aguas eutróficas y producir biomasa como materia prima para biocombustibles (Carhuacho León *et al.* 2020). Otros trabajos con enfoque en la remoción de nutrientes son el de Lorenzen *et al.* (2001), Li *et al.* (2009) y Escutia- Lara *et al.* (2010) quienes cuantificaron la respuesta de *Typha domingensis* a diferentes concentraciones de N y P, así como el efecto en la distribución de la especie por el enriquecimiento de sulfatos. Brix *et al.* (2010) cuya hipótesis defiende la alta plasticidad de *T. domingensis* en su mecanismo de absorción de P, comparada con otra emergente *Cladium jamaicense* con la que cohabita. La deficiencia de oxígeno en la cinética de absorción de P en ambas especies mostró que altas concentraciones de P ($500 \mu\text{L}^{-1}$) tienen efecto significativo en la biomasa de la planta completa

y la biomasa de la raíz; en el caso de *Typha* esta condición produjo un decremento en la asignación de biomasa de raíz. Los resultados demuestran la alta tolerancia de la especie ante el incremento de nutrientes. *Typha latifolia* se ha empleado para evaluar la cinética de consumo de N y P, así como de NH_4^+ y NO_3^- , en estudios ecofisiológicos de planta completa usando sistemas automatizados denominados fitonutritron (Lorenzen *et al.* 1998; Brix *et al.* 2002).

Recientemente Sricoth *et al.* (2017) estudió la combinación de *Typha angustifolia* y *Eichhornia crassipes* para la remoción de nutrientes y metales pesados en aguas residuales donde demostró que el sistema radicular extenso de estas plantas mejora la turbidez en siete días y declinó 96.8% el $\text{NH}_3\text{-N}$ y 96.2 % la DBO en 21 días mientras que las máximas tasas de remoción de TKN fue 79.2% en 14 días y para el P fue de 42.9% en siete días. Rangel-Peraza *et al.* (2019) utilizó *Typha domingensis* y *Eichhornia crassipes* en un sistema de humedales con tiempos de retención hidráulica de 2 y 4 días; los resultados registraron eficiencia de eliminación de nutrientes de 99.28% para el nitrógeno total y del 87.78% para el fósforo al final del experimento. La supervivencia y el potencial de nitrificación de *Typha domingensis* flotando artificialmente demostró al final del experimento que el nitrógeno amoniacal no fue detectado, hubo una reducción significativa de nitrito y un aumento significativo del nitrato en los tratamientos con lixiviado de residuos sólidos domésticos (Petry *et al.* 2020). Rigotti *et al.* (2021) estudió en *Typha domingensis* y *Schoenoplectus californicus* la tasa de remoción del nitrógeno total, el nitrato, el fósforo total y el ortofosfato y encontró que la eficiencia de eliminación de *T. domingensis* varió del 4 al 31% para el nitrógeno total y del 8 al 15% para el fósforo total, mientras que *S. californicus*, varió su eficiencia de remoción de 6 a 5% y 2 a 12% para nitrógeno y fósforo totales, respectivamente. Además, el género *Typha* destaca por ser ampliamente utilizada en fitorremediación para la remoción de contaminantes como metales Cr (III) + Ni + Zn en ambiente con variación de nutrientes (Mufarrege *et al.* 2020), y otros relacionados con la calidad del agua como la DBO, nitrógeno total, fósforo, turbidez, pH y sólidos totales. El género *Typha* y particularmente la especie *Typha domingensis* sigue siendo objeto de múltiples investigaciones con diversos propósitos.



Figura 2. Morfología de *Typha domingensis*. De izquierda a derecha superior; planta adulta completa, inflorescencia, plántulas in vitro de 30 días de edad. De izquierda a derecha inferior; Sitio de colecta, microembalse urbano y detalle de aquenios germinando.

1.2.5 Nuevo enfoque biotecnológico en la fitorremediación

Las plantas tienen la capacidad innata de remediación de contaminantes peligrosos en el ambiente, pero la tasa de biorremediación es directamente proporcional a la tasa de crecimiento de la planta y la cantidad total de biorremediación está correlacionada con la biomasa total de la planta, haciendo el proceso muy lento. Por lo tanto, es necesario la identificación de genotipos con un crecimiento rápido (mayor cantidad de biomasa, mayor captación de nutrientes) y mayor poder de acumulación (Shah y Nongkynrih 2007; Fulekar *et al.* 2009). La biotecnología vegetal puede aportar herramientas para lograr una domesticación más rápida y dirigida, por ejemplo, la variación somaclonal espontánea y la inducción de mutaciones *in vitro*, son una fuente de variación de la que se pueden seleccionar características agronómicas de interés para el hombre (Gutiérrez *et al.* 2006).

La modificación genética por métodos distintos a la ingeniería genética incluye hibridación somática, variación somaclonal, mutación inducida y selección celular, en la ingeniería genética destaca los vectores microbianos (*Agrobacterium*), biobalística, electroporación, microinyección y transposones. La variación somaclonal y la selección celular ha sido reemplazada en gran medida por tecnologías recombinantes debido a su mayor precisión, mayores tasas de éxito y menos mutaciones indocumentadas (NRC 2004). En años recientes, la selección *in vitro* de sistemas rizogénicos tolerantes a contaminantes ambientales ha incrementado rápidamente (Santos-Díaz *et al.* 2007; Pérez-Clemente *et al.* 2012; Labra-Cardón *et al.* 2012). La estrategia adquiere ventajas por ofrecer un cultivo indefinido de raíces clonadas que es susceptible de ser manipulado genéticamente mediante métodos de variación somaclonal (raíz somaclonal), transgénesis (raíces pilosas) (Czakó *et al.* 2005) y recientemente por transplastómica (Daniell *et al.* 2002). El proceso de rizogénesis está íntimamente asociado a la división celular y en cultivo de tejidos se utilizan auxinas y citocininas para promover esta respuesta, por lo que se estimula la formación de raíces laterales como en raíces adventicias, la cual puede ocurrir en diferentes tejidos donde existan un grupo de células en activa división (Jordán y Casaretto 2006). Este sistema presenta las ventajas de crecer bajo condiciones de laboratorio, acelerar el crecimiento y la rápida producción para aplicación a gran escala.

1.2.5.1 Cultivo *in vitro* de raíces adventicias

La variación somaclonal en la raíz se atribuye a la inestabilidad genética o epigenética *in vitro* por organogénesis directa usando algunos reguladores de crecimiento principalmente las citocininas, cinetina (CIN) o bencilaminopurina (BAP) o por organogénesis indirecta, con la formación de microcallos preformados a partir de diferentes explantes vegetativos (Leva y Rinaldi 2017; Lakehal y Bellini 2019). La variabilidad somaclonal provoca cambios en la secuencia del ADN, así como amplificación, transposición de genes y alteración cromosómica y en estas modificaciones genéticas se encuentran implicadas las interacciones cruzadas de los fitorreguladores, mismos que proporcionan las señales para el desarrollo de las raíces adventicias (Bednarek y Orłowska 2020). Sin embargo, para inducir raíces adventicias aisladas es necesario discernir las interacciones sinérgicas y antagónicas de las citocininas con la auxina rizogénica clave, el ácido indolacético (AIA).

El cultivo de raíces con fines de remediación ha tomado impulso en los últimos años, destacando las raíces transformadas como herramienta de investigación para evaluar las potencialidades de diferentes especies de plantas para tolerar, acumular y / o eliminar contaminantes ambientales (Agostini *et al.* 2013). Con este enfoque estudios de remoción de metales en cultivos *in vitro* de raíces se realizaron en *Typha latifolia* y *Scirpus americanus* y se halló una eficiencia de remoción del 80 a 90% de plomo (Pb) y cromo (Cr) para ambos cultivos (Santos-Díaz *et al.* 2007; Santos-Díaz y Barrón-Cruz 2011). El modelo de rizoclones se ha utilizado como herramienta de investigación para la detección de las potencialidades de diferentes especies de plantas para tolerar, acumular o eliminar los contaminantes ambientales (Czakó *et al.* 2005); además, para reconocer los mecanismos metabólicos que las raíces han desarrollado para enfrentarlos (Agostini *et al.* 2013). El principio de memoria de la planta es clave en este sentido, y gracias a la metabolómica se ha podido identificar dos mecanismos que pueden explicar la sofisticada maquinaria molecular. El primer mecanismo es producto de la alteración en los niveles de metabolitos de señalización clave o factores de transcripción, el segundo corresponde a una alteración del estado de la cromatina, permitiendo a la planta se pueda aclimatar rápidamente y fortificar su sistema de defensa ante una condición de estrés recurrente (Crisp *et al.* 2016).

La obtención de somaclones de raíces es el resultado de la variación genética heredable y epigenética preexistente en los explantes o inducida durante la fase de cultivo. Esta variación *in vitro* es común en los agregados de células somáticas indiferenciadas o callos (David y Anthony 2010; Bairu *et al.* 2011). A su vez, el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo contribuyen con la inestabilidad genética debido a que afectan la respiración, el control de la división celular y la proliferación selectiva de tipos celulares específicos. Los fitorreguladores ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) o ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4 D), son frecuentemente usados en la inducción de raíces y su mantenimiento organogénico (Cadenas y Agustín 2006; Jordán y Casaretto 2006; Verstraeten *et al.* 2013).

Uno de los mayores retos en el cultivo de raíces con fines comerciales, es trasladar la producción de escala laboratorio a escala industrial (Mehrotra *et al.* 2016; Murthy *et al.* 2016; Khan *et al.* 2018). Al respecto diversos estudios en biorreactores tienen el objetivo de identificar los aspectos

físicos y químicos óptimos de cultivo que se ven reflejado en un incremento en la biomasa radicular. En los últimos años, los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) han sido reconocidos como una tecnología de perspectiva para posibles soluciones en la fitorremediación (Georgiev *et al.* 2014). Con miras a su aplicación inmediata en el tratamiento de aguas residuales de pequeñas poblaciones, es prudente evaluar el escalado de los rizoclonos de *Typha domingensis* como una estrategia complementaria dentro del protocolo de investigación. Independientemente de su origen, la morfología de la raíz (longitud y grosor) y su naturaleza fibrosa (densidad) dificulta el proceso de escalado, este sistema requiere modificaciones de los biorreactores existentes para facilitar la mezcla y la aireación adecuada que puedan superar la tensión de cizallamiento (Murthy *et al.* 2016; Khan *et al.* 2018).

Un estudio realizado en raíces pilosas de *Beta vulgaris* con el sistema RITA para la biosíntesis de betalaínas demostró mayor rendimiento del pigmento y una alta producción de biomasa radicular, comparado con otros sistemas de inmersión continua (Mehrotra *et al.* 2016). Las raíces adventicias de *Gynura procumbens* fueron cultivadas en un biorreactor de inmersión temporal, la producción de biomasa incrementó cinco veces el tamaño original (Kusuma *et al.* 2023) la misma especie en otro estudio donde se evaluaron tres métodos de cultivo líquido, mostró una menor producción de biomasa en un SIT, comparado con un biorreactor de burbuja tipo balón (Manuhara *et al.* 2017). De manera similar en un estudio realizado en seis especies de cactáceas el crecimiento de raíces pilosas no mostró diferencias significativas entre el cultivo semisólido y un sistema RITA (Carlin *et al.* 2015).

La implementación de un SIT en el cultivo de rizoclonos tolerantes a la eutrofización de *Typha domingensis* representa todo un reto. Los criterios para la selección de un sistema de cultivo en reactor apropiado y selección de factores claves para su óptimo desempeño deben atender o emular las necesidades de los parámetros de diseño para un tratamiento natural (humedal artificial). La propuesta de implementar la técnica de biorreactor en el cultivo de rizoclonos de *Typha domingensis* resulta atractiva, no solo por el hecho de reducir los costos asociados con la técnica convencional de cultivo *in vitro*, sino porque permite emular ciertos factores intrínsecos al diseño de un tren de tratamiento de aguas residuales. Aunque existen ciertas limitantes a vencer como el conocimiento en ingeniería y una inversión inicial para un equipamiento adecuado en biorreactores,

estas se contrarrestan por el beneficio a largo plazo de la automatización y una evaluación más objetiva de las condiciones de crecimiento idóneas de los rizoclonos de *Typha domingensis* que derivaran en una producción de biomasa radicular suficiente para su aplicación a corto plazo

1.2.5.2 Hairy roots

En contraste, la manipulación genética introduce genes exógenos específicos en un organismo receptor, de la misma especie o género (intragénesis o cisgénesis) o entre especies diferentes (transgénesis), para expresar el cambio genético deseado; en el ámbito ambiental es un proceso recientemente nombrado genoremediación (Blanco y Blanco 2017). La transformación mediada por *A. rhizogenes* consiste en la transferencia, integración y expresión del ADN-T del plásmido inductor de raíces (Ri) silvestre que inserta los genes de auxinas y citocininas en el genoma vegetal, la expresión posterior del fenotipo de raíz pilosa y la comprobación de transformación transitoria o estable en la planta (Christey y Braun 2005; Guo *et al.* 2019). Sin embargo, diferentes cepas rizogénicas de *A. rhizogenes* muestran alta variabilidad en la capacidad para inducir raíces pilosas (Desmet *et al.* 2019). No obstante que son aún desconocidos los mecanismos moleculares que producen grandes cambios genéticos, existen grandes avances en las interpretaciones asociadas a los genes *rol* del marco de lectura del ADN-T de *A. rhizogenes*.

Agrobacterium rhizogenes causa la enfermedad de la "raíz pilosa" o "hairy roots", cuando un plásmido bacteriano Ri (inductor de raíces) integra su ADN de transferencia (ADN-T) en el genoma de la planta (ADN) resultando raíces adventicias de rápido crecimiento e intensamente ramificadas (Dubrovsky y Rost 2003; Dubrovsky y Laskowski 2017). Las raíces "pilosas" genéticamente transformadas se han vuelto cada día más populares entre los investigadores por su rápido crecimiento, medio libre de hormonas y muestran un crecimiento plagiotrópico acelerado acompañado de un aumento de la ramificación, por lo que sirven como marcador visual para la detección y selección sin antibióticos y son genéticamente estables, puesto que se desarrolla a partir de una sola célula transformada (Mehrotra *et al.* 2016; Khan *et al.* 2018; Bahramnejad *et al.* 2019), eclipsando a las raíces adventicias como sistema de cultivo (Murthy *et al.* 2016).

El mecanismo de infección y transformación genética vía *Agrobacterium* consiste en detectar primero compuestos fenólicos (Ej. Acetosiringona) liberados por las heridas en raíces de las

plantas, lo que desencadena la unión de las bacterias a la raíz, fase de reconocimiento. El procesamiento del T-ADN en células de *Agrobacterium* y formación del complejo T, consiste en que la proteína virD1 y virD2 actúan junto con una endonucleasa para cortar el lado derecho del DNA de transferencia, donde se ensamblan las proteínas virD2 y virE2 formando el complejo de transferencia T la cual protege de la bacteria el genoma de la planta huésped. Se produce un canal a través de la membrana plasmática por acción de los genes virB, en el núcleo los poros son activados por señalización nuclear permitiendo la entrada e integración del T-ADN en el genoma de la célula vegetal, detalles del mecanismo en la Figura 3 (Azcón-Bieto y Talón 2008; Chandra 2012).

El ADN-T de *A. rhizogenes* tiene dos secuencias independientes, denominadas bordes T L (izquierda) y T R (derecha). El ADN-T L y el ADN-T R generalmente se transfieren e integran de forma independiente en el genoma de la planta huésped, sin embargo, solo el ADN-T L es esencial (y por lo tanto suficiente) para inducir raíces pilosas. El análisis de secuencia de T L -DNA reveló cuatro marcos de lectura abiertos que son esenciales para la inducción de raíces pilosas (*rolA*, *B*, *C* y *D*). El gen *RolB* parece ser el más importante en la inducción de raíces pilosas, ya que la mutación de pérdida de función en este locus hace que el plásmido pierda virulencia (Yordanova y Georgiev 2017). Los genes bacterianos conocidos como genes vir (virulencia) facilitan la movilización y transferencia de la secuencia de T-DNA basados en un sistema de transducción de señales sensoriales de dos componentes en el que virA sirve como receptor fenólico y virG como receptor de señal (Bahramnejad *et al.* 2019). La transformación mediada por *Agrobacterium* da como resultado menos copias transgénicas y patrones de integración más simples que los métodos directos. Ambos métodos generalmente dan como resultado plantas en las que la integración se produce en un solo locus genético; y aunque pueden estar presentes copias únicas o múltiples del transgén, este locus se segrega y se hereda como un solo alelo dominante, en una proporción mendeliana de 3:1 (Jones 2017).

Las raíces pilosas se han utilizado con éxito como herramientas de investigación para detectar las potencialidades de diferentes especies de plantas para tolerar, acumular y/o eliminar contaminantes ambientales como: PCB, TNT, productos farmacéuticos, tintes textiles, fenólicos, pesados metales y radionúclidos (Agostini *et al.* 2013). La eficacia de las plantas transgénicas en la fitorremediación

de pequeños contaminantes orgánicos sigue dos estrategias principales: (1) la manipulación de la actividad metabólica de la fase I (modificación o activación química) para mejorar las tasas de degradación en la planta, o para impartir una nueva actividad metabólica, y (2) la secreción mejorada de enzimas reactivas de las raíces que conducen a la degradación acelerada de los contaminantes orgánicos *ex planta*. En la planta, los procesos incluyen la absorción y difusión a través de las raíces, el tronco o las hojas, sorción y transformación y/o secuestro a través de la actividad metabólica del árbol. Las técnicas de fitorremediación *ex planta* incluyen plantas genéticamente modificadas para sobreexpresar genes de enzimas extracelulares como lacasas y peroxidasas de plantas o especies de hongos o microbios. Esta última estrategia puede superar las limitaciones de transferencia de masa, ya que los contaminantes no tienen que ser absorbidos por las raíces para verse afectados por la actividad enzimática (James y Strand 2009).

El cultivo de raíces pilosas para la investigación en fitorremediación ofrece ventajas como: independencia del sitio y condiciones climáticas, propagación indefinida y disponibilidad bajo demanda, permite variables experimentales fácilmente controladas, tiempo sustancialmente reducido para realizar estudios y resultados altamente reproducibles, grandes cantidades de biomasa generadas en un entorno controlado, capaz de incorporar grandes cantidades de contaminantes para recuperar metabolitos e intermedios para análisis cuantitativo y estudiar su naturaleza química y secuencia de transformación, fácil manipulación del medio y la disponibilidad de los productos de reacción, lo que requiere menos purificación, capacidad para crecer rápidamente en condiciones libres de microbios proporcionando una gran superficie de contacto entre los contaminantes y las raíces, selección clonal de especies con rasgos de fitorremediación adecuados para la regeneración vegetal, mayor grado de autenticidad que los cultivos de tejidos vegetales indiferenciados con respecto a su comportamiento biológico y propiedades debido a su naturaleza organizada, apto a la transformación genética para mejorar la fitorremediación y capacidad para producir grandes cantidades de exudados que pueden contribuir a desintoxicar o secuestrar contaminantes dañinos (Giri y Narasu 2000; Dubrovsky y Rost 2003; Guillon *et al.* 2006; Doran 2009; Agostini *et al.* 2013; Habibi *et al.* 2017; Dubrovsky y Laskowski 2017).

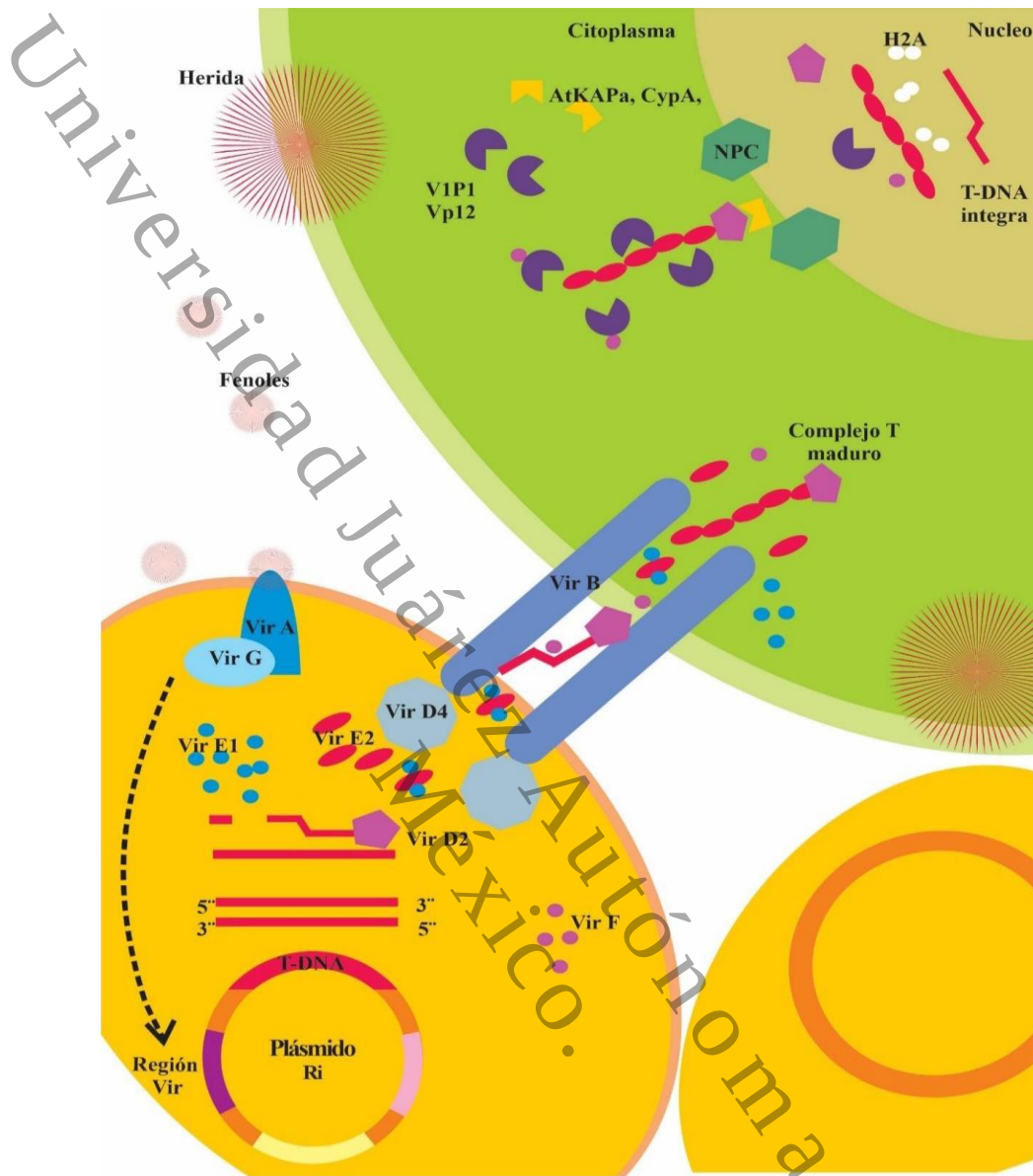


Figura 3. Transferencia de T-DNA basada en plásmido de *Agrobacterium Ri* para la transformación genética de plantas. Modificada de Azcón-Bieto y Talón (2008) y Chandra (2012).

Los cultivos de raíces pilosas son considerados un sistema modelo para investigar procesos de fitorremediación como rizofiltración, fitoestabilización y fitoextracción de contaminantes orgánicos e inorgánicos, debido a su estabilidad bioquímica, genética y fácil mantenimiento (Habibi *et al.* 2017). En la última década se han generado varios informes de raíces pilosas de diferentes especies de plantas acuáticas para el tratamiento de una gran variedad de contaminantes por sus características de crecimiento y capacidad de fitorremediación, por ejemplo, la

transformación de *Trapa natans* con las cepas silvestres 15834, K599 y A4 que produjo raíces pilosas fotosintéticas verdes (Mikhaylova *et al.* 2021), lenteja de agua (Kanchanamala y Bandaranayake 2019), *Scirpus americanus* Pers. (Alfaro Saldaña *et al.* 2016), *Typha latifolia* una monocotiledónea de humedal (Nandakumar *et al.* 2004; Nandakumar *et al.* 2005). El cultivo de cultivos de raíces transformados en biorreactores representa un paso crítico, son extremadamente sensibles a varios factores de estrés que reducen su crecimiento y/o capacidad biosintética (Georgiev *et al.* 2008). Generalmente las raíces pilosas forman redes interconectadas que resisten la transferencia de masa (nutrientes y oxígeno) formando ambientes de cultivo no homogéneos que resultan en el decremento de la tasa de crecimiento (Khan *et al.* 2018). La elección del diseño de biorreactor más adecuado debe ser coherente con las peculiaridades fisiológicas del clon de raíz pilosa en particular (Georgiev *et al.* 2008).

En conclusión, actualmente la capacidad de remediación innata de las especies fitorremediadoras se ve superada ante el incremento en la velocidad y magnitud de la eutrofización. Por lo tanto, es oportuno visualizar estrategias biotecnológicas mediante técnicas transformantes y no transformantes que potencialice las capacidades innatas de remoción de una macrófita nativa en el estado de Tabasco, que ofrezcan ventajas para la selección de individuos tolerantes a estas nuevas condiciones ambientales para garantizar la disponibilidad, gestión sostenible y el saneamiento del agua.

1.3 Justificación

En la actualidad, el desafío más grave al que se enfrenta la calidad del agua de los ecosistemas acuáticos es el aumento de la concentración de nutrientes, que es consecuencia de los vertidos de aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas. Esto provoca un acelerado proceso de eutrofización que afecta a los servicios ecosistémicos derivados de estos y compromete la salud de las personas. En este contexto, la ONU subraya la necesidad de adoptar medidas para reducir considerablemente la contaminación del agua e incrementar su calidad, mejorando significativamente el tratamiento de las aguas residuales.

En los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), particularmente en los objetivos tres y seis, se enfatiza no solo la necesidad de garantizar una vida sana al promover el bienestar de todas las personas de todas las edades, sino también de garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua para asegurar el saneamiento para todas las personas. En otras palabras, se trata de reducir el número de muertes y enfermedades causadas por la contaminación del agua mejorando su calidad, lo que se logra reduciendo la contaminación, eliminando el vertido y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos. El objetivo es reducir a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentar considerablemente el reciclaje y la reutilización seguros a nivel mundial. De esta manera se protegen y restablecen los ecosistemas relacionados con el agua (bosques, montañas, humedales, ríos, acuíferos y lagos).

Por lo consiguiente, resulta imperativo diseñar, generar y promover propuestas factibles desde el punto de vista económico y tecnológico para el tratamiento de las aguas residuales con un enfoque sostenible. Dada la ubicuidad de *Typha domingensis* en la región, su sistema radical adventicio representa un potencial de investigación biotecnológica en los ámbitos ambiental y energético. El panorama es prometedor en el campo de la innovación y el desarrollo tecnológico (I+D) debido a que es factible combinar técnicas de cultivo *in vitro* y mejora genética modernas para generar líneas hiperrizogénicas que conduzcan a nuevos procesos biotecnológicos de fitorremediación más eficientes.

1.4 Pregunta de investigación

La plasticidad del sistema radicular se basa en la coordinación del genoma, que programa el metabolismo, la fisiología, el crecimiento y el desarrollo de la raíz en respuestas a los factores ambientales bióticos y abióticos adyacentes a la rizósfera. Las interferencias de los factores ambientales en condición *in situ* suponen una oportunidad para estudiar el potencial rizogénico de la especie vegetal mediante técnicas de imagen, dirigir el conocimiento y generar nuevas biotecnologías de raíces. Por tanto, la proliferación de rizoclonos *in vitro* mediante la vía inductiva de los fitorreguladores o por la agrotransformación con cepas silvestres de *Agrobacterium rhizogenes* son las herramientas para generar hiperrizogénesis adventicia de *Typha domingensis* en perspectiva hacia la rizofiltración de nutrientes de aguas contaminadas.

Pregunta de investigación general

¿Cuál es el enfoque biotecnológico más eficaz para el cultivo de rizoclonos no transformados o transformados, y qué tipo de explante es más adecuado, germinado, base caulinar, raíz, hoja o embrión somático, para desarrollar un modelo hiperrizogénico de *Typha domingensis*?

Preguntas de investigación específicas

1. ¿Cuáles serán las concentraciones óptimas de AIA-CIN o AIA-BAP que mejoran la rizogénesis *in vitro* de plántulas de *T. domingensis*?
2. ¿La influencia de la condición de luz en el sistema radicular mejora la respuesta de rizogénesis independientemente del tipo de explante??
3. ¿Cuál será el tipo de cultivo *in vitro* adecuado para la infección con *Agrobacterium rhizogenes*? ¿Callos embriogénicos o embriones somáticos?

1.5 Hipótesis

Hipótesis general

En los explantes vegetativos cultivados con fitorreguladores pueden incrementar la rizogénesis adventicia, pero el sistema de embriones somáticos en co-cultivo con cepas de *Agrobacterium rhizogenes* es más favorecido por presentar mayor superficie de contacto.

Hipótesis específicas

Hipótesis 1. Los fitorreguladores del tipo auxina y citocinina son los más comúnmente usados en diversos protocolos para la iniciación y establecimiento de cultivo de raíces adventicias en diferentes explantes entonces bajas concentraciones de AIA-CIN o AIA-BAP mejoran la hiperproducción de raíces adventicias inducida en plántulas in vitro de *T. domingensis*

Hipótesis 2. En la naturaleza las raíces crecen en oscuridad, sin embargo, en la práctica los cultivos de raíces se realizan en luz, por lo que algunas respuestas pueden estar enmascaradas, sobre todo las relacionadas con la adición de fitorreguladores o las que tienen que ver con la absorción de nutrientes. Suponiendo que los tres explantes responden al estímulo hormonal en el sistema radicular se espera que en luz la rizogénesis sea abundante en el explante convencional por la contribución de los fotosintatos translocados a la raíz.

Hipótesis 3. Las plantas monocotiledóneas se han reportado recalcitrantes a la infección por *A. rhizogenes* mediante métodos convencionales. Se requiere de métodos complementarios que mejoren la infección. El uso de líneas germinales o sistemas de embriogénesis somática se ha usado como estrategia para facilitar las transformaciones. Por lo tanto, la presencia de raíces transformadas se obtendrá en una estructura embriogénica de la especie *T. domingensis*.

1.6 Objetivos

Objetivo general

Generar líneas hiperrizogénicas a partir de rizoclonos genéticamente transformadas y no transformadas de la especie *Typha domingensis*.

Objetivos específicos

Objetivo 1. Establecer el cultivo *in vitro* de raíces adventicias con diferentes balances y concentraciones de AUX-CIT (AIA-CIN y AIA- BAP) en sistemas rizotróficos.

Objetivo 2. Establecer las condiciones óptimas para el mayor crecimiento y ramificación de las raíces adventicias de *T. domingensis* probando la mejor dosis de fitorreguladores de experimento previo y condiciones físicas de cultivo como la luz y oscuridad.

Objetivo 3. Inducir raíces pilosas en embriones somáticos de rizoclonos de *T. domingensis* con la cepa K599, LBA9402 y A4 de *Agrobacterium rhizogenes*

1.7 Metodología

Para generar un modelo hiperrizogénico de *T. domingensis* con un sistema radicular adventicio cuya superficie y velocidad de crecimiento favorezca la máxima absorción de nutrientes en exceso, el estudio se dividió en tres etapas experimentales en función de las técnicas de cultivo de raíces (Figura 4). La primera y segunda etapa se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología, en el Centro de Investigación para la Conservación y Aprovechamiento de Recursos Tropicales (CICART) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco y la tercera etapa en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN, Unidad Irapuato (CINVESTAV).

Etapa 1: Diseño de rizotrón y determinación de la dinámica y fenotipos radiculares.

Se diseñó una unidad experimental tipo rizotron en la que se evaluó dinámicas y fenotipos radiculares utilizando análisis de imagen. Con el fin de configurar el rizotrón para germinados de *Typha domingensis*, se evaluaron diferentes diseños del estado nutricional y físico del medio de enraizamiento cercano a la condición de eutrofización ambiental. El medio nutritivo de MS se evaluó en niveles de 0, 12.5, 25, 50 y 100%. Después, un factorial completo aleatorizado 3x2 analizó el efecto del estado físico semisólido, líquido y bifásico (BIF) y la concentración de MS modificada a 10% sin sacarosa y fitorregulador contrastada con agua purificada. Las respuestas fueron la supervivencia y los parámetros de longitud y número de raíces registrados con el método de trazado de imágenes fotográficas.

Etapa 2: Establecimiento *in vitro* de raíces no transformadas de *T. domingensis*.

Esta segunda estrategia evalúa la sinergia de auxinas y citocininas en la organogénesis de raíz, se analizaron en particular las interacciones de diferentes concentraciones de AIA con la CIN y BAP. En un experimento subsecuente se evaluó el efecto de la condición de luz en el sistema radicular independientemente del tipo de explante. Para establecer los cultivos de raíces no transformadas se estudió el efecto de auxinas y citocininas, el efecto de la luz y del tipo de explante. Los rizotrones en régimen de carbono autótrofo y de nutrientes MS1/10, suministraron los germinados para establecer experimentos independientes de luz y oscuridad.

Cada experimento evaluó tres concentraciones (0.0, 0.1 y 1.0 mg L⁻¹) de AIA y CIN en sistemas de raíces aisladas con y sin base caulinar y el germinado completo en diseño de cuadrados latinos. La longitud total de raíces y número de raíces ramificadas fueron registradas cada semana durante un mes sobre imágenes fotográficas con un software procesador de imágenes. Los indicadores de calidad del sistema radicular, estimados con las tasas y densidades de elongación y ramificación (TE, TRAM, DLR, DRAM), fueron clasificados usando la técnica de conglomerados para seleccionar líneas rizogénicas dinámicas.

Etapas 3. Procedimiento para la transformación de las raíces de *T. domingensis*.

En esta etapa se buscó explorar la eficacia del embrión somático por su potencial regenerativo en las estrategias de transformación genética. Para el establecimiento de raíces transformadas vía agrotransformación se realizaron cocultivos de embriones somáticos de *T. domingensis* en diferentes estados de desarrollo con las cepas LBA9402, K599 y R4 de *Agrobacterium rhizogenes*. La rizogénesis se produjo mediante la agro transformación de embriones somáticos en estados de desarrollo oblongos y escutelares utilizando las cepas K599, LBA9402 y A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. La transfección a los embriones se realizó mediante cocultivo de rizoclonos en un medio mineral Murashige y Skoog al 50% (MS 0.5), en la oscuridad, a 28 ± 2 °C durante 72 h. A diferencia de los embriones no transformados que no presentaban ningún tejido radicular, los embriones transformados presentaban raíces pilosas que variaron en número, longitud y densidad dependiendo de la cepa bacteriana, y K599 fue la cepa más eficaz. Después del análisis mediante microscopía óptica, los embriones transformados se recolectaron y transfirieron a medios de cultivo frescos suplementados con 400 mg mL⁻¹ de cefotaxima y 10 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

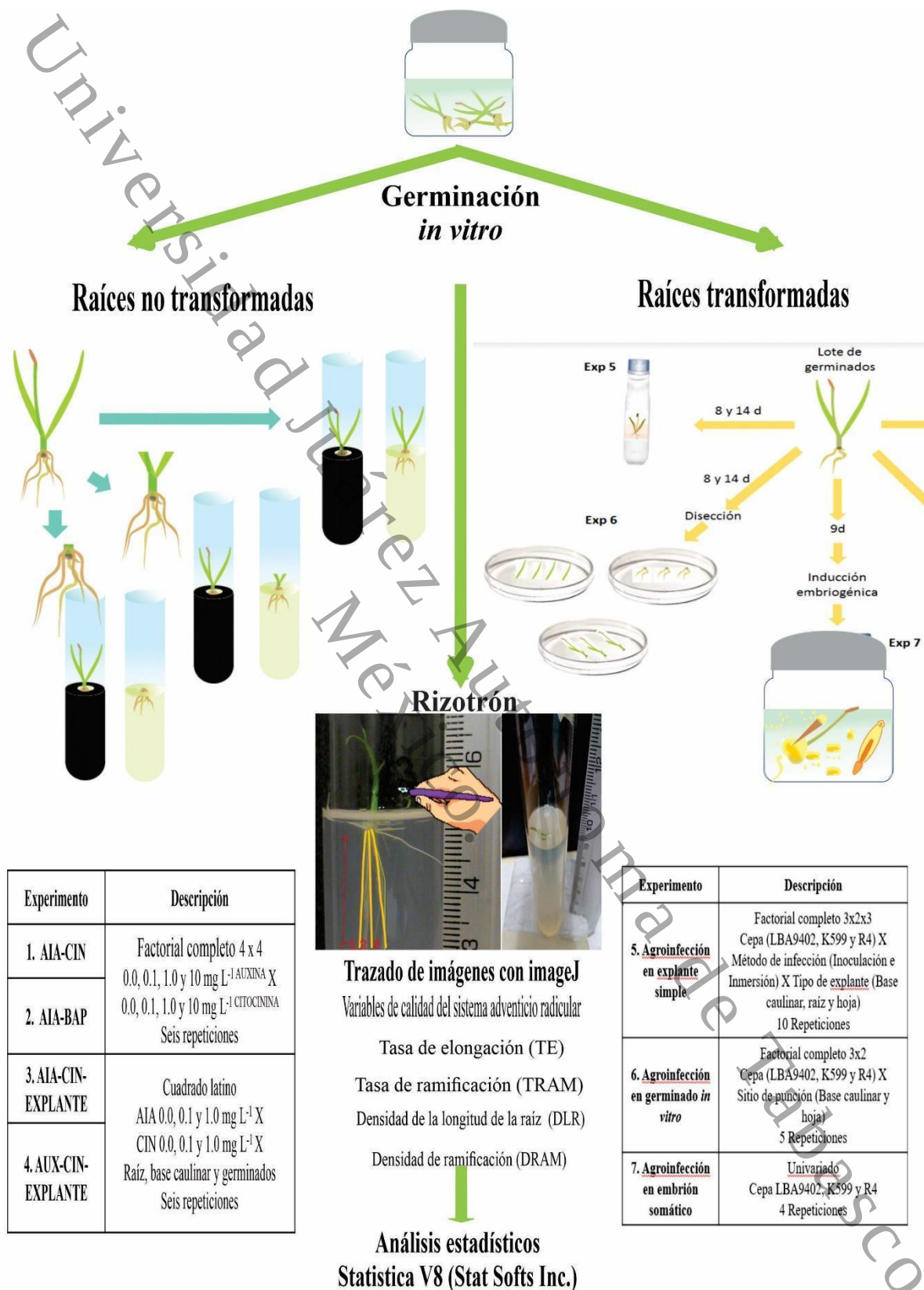


Figura 4. Visión general del diseño metodológico.

1.8 Referencias

1. Agostini E, Talano MA, González PS, Oller AL, Medina MI. (2013). Application of hairy roots for phytoremediation: what makes them an interesting tool for this purpose? *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(3):1017-1030.
2. Ajmera I, Hodgman TC, Lu C. (2019). An Integrative Systems Perspective on Plant Phosphate Research. *Genes* 10, 139.
3. Alfaro-Saldaña EF, Pérez-Molphe-Balch E, del Socorro Santos-Díaz M. (2016). Generation of transformed roots of *Scirpus americanus* Pers. and study of their potential to remove Pb^{2+} and Cr^{3+} . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 127(1): 15-24.
4. Anand S, Bharti SK, Dwiwedi N, Barman SC, Kumar N. (2017). Macrophytes for the reclamation of degraded waterbodies with potential for bioenergy production. In: Baudh K, Singh B, Korstad J. (eds) *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants*. Springer, Singapore.
5. Ansari A, Gill S, Khan F, Naeem M. (2014). Phytoremediation Systems for the Recovery of Nutrients from Eutrophic Waters. In: Ansari A, Gill S. (eds) *Eutrophication: Causes, Consequences and Control*. Springer, Dordrecht.
6. Arteaga-Cortez VM, Quevedo-Nolasco A, Valle-Paniagua DH del, Castro-Popoca M, Bravo-Vinaja Á, Ramírez-Zierold, JA. (2019). Estado del arte: una revisión actual a los mecanismos que realizan los humedales artificiales para la remoción de nitrógeno y fósforo. *Tecnología y Ciencias del Agua* 10(5): 319-343.
7. Azcón-Bieto J, Talón M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid, ES: McGraw-Hill Interamericana.
8. Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63(2): 147-173.
9. Bahramnejad B, Naji M, Bose R, Jha S. (2019) A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances* 37(7):1–14.
10. Bednarek PT, Orłowska R. (2020). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 140: 245–257.
11. Blanco A, Blanco G. 2017. The Genetic Information (II). Editor(s): Antonio Blanco, Gustavo Blanco, Medical Biochemistry, Chapter 22, Academic Press, Pages 493-524.

12. Bogardi JJ, Dudgeon D, Lawford R, Flinkerbusch E, Meyn A, Pahl-Wostl C, Vielhauer K, Vörösmarty C. (2012). Water security for a planet under pressure: interconnected challenges of a changing world call for sustainable solutions. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 4(1): 35-43.
13. Bornette G, Puijalon S. (2011). Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. *Aquatic Sciences* 73(1):1-14.
14. Brix H, Dyhr-Jensen K, Lorenzen B. (2002). Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L., growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Journal of Experimental Botany* 53(379): 2441-2450.
15. Brix H, Lorenzen B, Mendelssohn IA, McKee K L, Miao S. (2010). Can differences in phosphorus uptake kinetics explain the distribution of cattail and sawgrass in the Florida Everglades? *BMC plant biology* 10(1): 1.
16. Cadenas AG, Agustín PG. (2006). *Fitohormonas: metabolismo y modo de acción*. Colección Ciencias experimentales (Vol. 8). Publicacions de la Universitat Jaume I. 5.
17. Carhuacho-León FM, Aguado-Cortijo PL, Moratón-Izquierdo MDC, Castellanos-Moncho MT. (2020). Application of the thermal time model for different *Typha domingensis* populations. *BMC Plant Biol* 20(1): 377.
18. Carlin AP, Tafoya F, Solís AGA, Pérez-Molphe-Balch E. (2015). Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 51(3): 332-339.
19. Castañeda-Villanueva AA, Flores-López HE. (2013). Tratamiento de aguas residuales domésticas mediante plantas macrófitas típicas en Los Altos de Jalisco, México. *Paakat: Revista de Tecnología y Sociedad* 3(5).
20. Cedergreen N, Madsen TV. (2002). Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. *New Phytologist* 155(2): 285-292.
21. Chandra S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology letters* 34(3): 407-415.
22. Chazaren F, Gagnon V, Korkusuz EA. (2015). Treatment of pollution in constructed wetlands: from the fundamental mechanisms to the full-scale applications. *Environmental Science and Pollution Research* 22(17):12775-12778.

23. Christey MC, Braun RH. (2005). Production of Hairy Root Cultures and Transgenic Plants by *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation. In: Peña L. (eds) Transgenic Plants: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 286. Humana Press.
24. Czako M, Feng X, He Y, Gollapudi S, Márton L. (2005). *In vitro* propagation of wetland monocots for phytoremediation. In: Mackova M, Dowling DN, Macek T, editors. Phytoremediation and rhizoremediation: Theoretical background. Netherlands: Springer. p. 217- 225.
25. Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz JO, Pogson BJ. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Science advances 2(2): e1501340.
26. Crites R. Technobanoglous G. (2000). *Small and decentralized wastewater management systems*. McGraw-Hill.
27. Cruz H, Luckman P, Seviour T, Verstraete W, Laycock B, Pikaar I. (2018). Rapid removal of ammonium from domestic wastewater using polymer hydrogels. Scientific reports 8(1): 2912.
28. Daniell H, Khan MS, Allison L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. Trends in plant science 7(2): 84-91.
29. Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. Tropical and subtropical agroecosystems 14(2): 597-612.
30. Desmet S, De Keyser E, Van Vaerenbergh J, Baeyen S, Van Huylenbroeck J, Geelen D, Dhooghe E. (2019). Differential efficiency of wild type rhizogenic strains for rol gene transformation of plants. Applied microbiology and biotechnology 103(16): 6657-6672.
31. Di Luca GA, Mufarrege MM, Hadad HR, Maine MA. (2019). Nitrogen and phosphorus removal and *Typha domingensis* tolerance in a floating treatment wetland. Science of The Total Environment 650(1): 233-240.
32. Dodds W, Whiles M. (2010) Freshwater Ecology: Concepts and Environmental Applications of Limnology. 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam.
33. Doran PM. (2009). Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. Biotechnology Bioenergy 103(1):60–76.
34. Dhir B, Sharmila P, Saradhi PP. (2009). Potential of Aquatic Macrophytes for Removing Contaminants from the Environment. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 39(9):754–781.

35. Dhote S, Dixit S. (2009). Water quality improvement through macrophytes, a review. *Environmental Monitoring and Assessment* 152(1-4):149-153.
36. Dubrovsky JG, Laskowski M. (2017). Lateral Root Initiation, Editor(s): Brian Thomas, Brian G Murray, Denis J Murphy, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, Academic Press, Pages 256-264.
37. Dubrovsky JG, Rost TL. (2003). Root development, Lateral Root Initiation. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* 1101-1107.
38. Englande Jr AJ, Krenkel P, Shamas J. (2015). Wastewater Treatment & Water Reclamation. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.
39. EPA (2024). U.S. Environmental Protection Agency. En: <https://www.epa.gov>
40. Escutia-Lara Y, Barrera EDL, Martínez-de la Cruz Y, Lindig-Cisneros R. (2010). Respuesta a la adición de nitrógeno y fósforo en el crecimiento de *Typha domingensis* y *Schoenoplectus americanus*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (87): 83-87.
41. Evans GM, Furlong JC. (2011). Environmental biotechnology: theory and application. Wiley-Blackwell. Singapur.
42. Fang YY, Babourina O, Rengel Z, Yang X E, Pu PM. (2007). Spatial distribution of ammonium and nitrate fluxes along roots of wetland plants. *Plant Science* 173(2): 240-246.
43. Fulekar MH, Singh A, Bhaduri AM. (2009). Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals. *African Journal of Biotechnology* 8(4).
44. Georgiev MI. (2014) Chapter 1 Design of Bioreactors for Plant Cell and Organ Cultures K.-Y. Paek et al. (eds.), *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*.
45. Georgiev M, Georgiev V, Weber J, Bley T, Ilieva M, Pavlov A. (2008). Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformations: A powerful tool for the production of metabolites. In: *Genetically Modified Plants*, (T. Wolf and J. Koch edits.); Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, pp. 99-126.
46. Giri A, Narasu ML. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18(1):1-22.
47. Gilbert PM. (2017). Eutrophication, harmful algae and biodiversity - Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. *Marine Pollution Bulletin* 124(2):591-606.
48. Gonin M, Bergougnoux V, Nguyen TD, Gantet P, Champion A. (2019). What Makes Adventitious Roots? *Plants* MDPI 8(7): 240.

49. Grzegórska A, Rybarczyk P, Rogala A, Zabrocki D. (2020). Phytoremediation—from Environment Cleaning to Energy Generation—Current Status and Future Perspectives. *Energies* 13(11): 2905.
50. Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P. (2006). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends in biotechnology* 24(9): 403-409.
51. Guignard MS, Leitch AR, Acquisti C, Eizaguirre C, Elser JJ, Hessen DO, Jeyasingh PD, Neiman M, Richardson AE, Soltis PS, Soltis DE, Stevens CJ, Trimmer M, Weider LJ, Woodward G y Leitch IJ. (2017) Impacts of Nitrogen and Phosphorus: From Genomes to Natural Ecosystems and Agriculture. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5:70.
52. Guo M, Ye J, Gao D, Xu N, Yang J. (2019). Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology Advances* 37(1): 259-270.
53. Gutiérrez LG. 2006. Perspectivas de la biotecnología en las ecotecnologías. *Scientia et Technica* 3(32).
54. Habibi P, De Sa MF, G Makhzoum A, Malik S, da Silva ALL, Hefferon K, Soccol CR. (2017). Bioengineering Hairy Roots: Phytoremediation, Secondary Metabolism, Molecular Pharming, Plant-Plant Interactions and Biofuels. In *Sustainable Agriculture Reviews* (pp. 213-251). Springer International Publishing.
55. Hakeem KR, Ahmad A, Iqbal M, Gucel S, Ozturk M. (2011). Nitrogen-efficient rice cultivars can reduce nitrate pollution. *Environmental Science and Pollution Research* 18(7): 1184-1193.
56. Halbedel S. (2018). Secretion of Phosphorus by Aquatic Plants Has an Impact on Their Phosphorus Uptake Budget. The Concept of Phosphorus Recycling. *Frontier in Environmental. Science* 6:23.
57. Hernández-Piedra G, Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ, Hernández-Franyutti A, Azpeitia-Morales A. (2018). Morpho-histological development of the somatic embryos of *Typha domingensis*. *PeerJ*. 23;6:e5952.
58. Hidalgo JC, Junod JM, Sandoval ME. (2005). Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas. *Theoría*. 14 (3): 209-222.
59. Hoevers R. (2011). Aquatic biofuels for local development. FACT Foundation.
60. Ikeda H. (1991). Utilization of nitrogen by vegetable crops. *Japan Agricultural Research Quarterly* 25:117–124.

61. James CA, Strand SE. (2009). Phytoremediation of small organic contaminants using transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 20(282): 37-24.
62. Jiménez BEC. (2007). Información y calidad del agua en México. *Trayectorias: revista de ciencias sociales de la Universidad Nacional de Nuevo León* 24: 45-56.
63. Jones HD. (2017). Transformation and Transgene Expression. Editor(s): Brian Thomas, Brian G Murray, Denis J Murphy. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, Academic Press, Pages 248-254.
64. Jordán M, Casaretto J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En: *Fisiología Vegetal*. FA Squeo, L. Cardemil. La Serena, Chile. Ediciones Universidad de La Serena. Cap. 15.
65. Judd LA, Jackson BE, Fonteno WC. (2015). Advancements in root growth measurement technologies and observation capabilities for container-grown plants. *Plants* 4(3): 369-392.
66. Kanchanamala RWMK, Bandaranayake PGG. (2019). An efficient and rapid *Rhizobium rhizogenes* root transformation protocol for *Lemna minor*. *Plant Biotechnology Reports* 13: 625–633.
67. Kinidi L, Salleh S. (2017). Phytoremediation of Nitrogen as Green Chemistry for Wastewater Treatment System. *International Journal of Chemical Engineering* 12:1961205.
68. Kafle A, Timilsina A, Gautam A, Adhikari K, Bhattarai A, Aryal N. (2022). Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents”. *Environmental Advances* 8:100203.
69. Kumaraswamy TR, Javeed S, Javaid M, Naika K. (2020). Impact of Pollution on Quality of Freshwater Ecosystems. In *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation*. Springer, Singapore. pp. 69-81.
70. Kusuma DY, Kristanti AN, Manuhara YSW. (2023). A novel pilot bioreactor for scaling up biomass and bioactive compounds on *Gynura procumbens* adventitious root culture. *Indonesian Journal of Biotechnology* 28(2): 66-76.
71. Labra-Cardón D, Guerrero-Zúñiga LA, Rodríguez-Tovar AV, Montes-Villafán S, Pérez-Jiménez S, Rodríguez-Dorantes A. (2012). Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista internacional de contaminación ambiental* 28(1): 7-16.

72. Lakehal A, Bellini C. (2019). Control of adventitious root formation: Insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum* 165(1):90-100.
73. Leva A, Rinaldi LMR. (2017). Somaclonal Variation. Editor(s): Brian Thomas, Brian G Murray, Denis J Murphy. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, Academic Press, Pages 468-473.
74. Li S, Mendelssohn IA, Chen H, Orem WH. (2009). Does sulphate enrichment promote the expansion of *Typha domingensis* (cattail) in the Florida Everglades? *Freshwater Biology* 54(9): 1909-1923.
75. Liu D, Wu X, Chang J, Gu B, Min Y, Ge Y, Wu J. (2012). Constructed wetlands as biofuel production systems. *Nature Climate Change* 2(3):190-194.
76. Lorenzen B, Brix H, Mendelssohn IA, McKee KL, Miao SL. (2001). Growth, biomass allocation and nutrient use efficiency in *Cladium jamaicense* and *Typha domingensis* as affected by phosphorus and oxygen availability. *Aquatic botany* 70(2): 117-133.
77. Lorenzen B, Brix H, Schierup HH, Madsen TV. (1998). Design and performance of the Phyto-Nutri-Tron: a system for controlling the root and shoot environment for whole-plant ecophysiological studies. *Environmental and experimental botany* 39(2): 141-157.
78. Lot-Helgueras A. (2004). Flora and vegetation of freshwater wetlands in the coastal zone of the Gulf of Mexico. En: Caso M., Pisanty I. y Ezcurra E. Eds. *Environmental Analysis of the Gulf of Mexico*, pp. 314–339. SEMARNAT – Instituto Nacional de Ecología – Instituto de Ecología, A.C. – Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies – Texas A & M University, México D.F.
79. Lozano-Rivas WA. (2012). Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales.
80. Manuhara YS, W Kusuma DY, Sari RLK, Kristanti AN. (2017). Biomass production of *Gynura procumbens* adventitious roots in different type of liquid culture. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education* 9(3): 523-529.
81. Marrero-Coto, Jeannette, Amores-Sánchez, Isis, Coto-Pérez, Orquídea. (2012). Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 46(3): 52-61.
82. Mehrotra S, Mishra S, Srivastava V. (2016). Bioreactor Technology for Hairy Roots Cultivation. In: Pavlov, A., Bley, T. (eds) *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham.

83. Mentaberry A. (2008). Fitorremediación. Curso de Agrobiotecnología, Departamento de fisiología, biología molecular y celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
84. Metcalf E. (1991). Wastewater Engineering, Treatment, Disposal, Reuse. Third Edition.
85. Mikhaylova EV, Artyukhin A, Musin K, Panfilova M, Gumerova G, Kuluev B. (2021). The first report on the induction of hairy roots in *Trapa natans*, a unique aquatic plant with photosynthesizing roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 144: 485–490.
86. Murthy HN, Dandin VS, Paek KY. (2016). Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *Phytochemical Reviews* 15: 129–145.
87. Nandakumar R, Chen L, Rogers SM. (2004). Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia*. *Plant cell, tissue and organ culture* 79(1): 31-38.
88. Nandakumar R, Chen L, Rogers SMD. (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L. (Broadleaf cattail). *Plant Cell Reports* 23:744–750.
89. National Research Council (NRC) (2004). Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods on Human Health. Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects. Washington (DC): National Academies Press (US); 2, Methods and Mechanisms for Genetic Manipulation of Plants, Animals, and Microorganisms.
90. Novelo A, Ramos L. (2005). Vegetación acuática. *Biodiversidad del estado de Tabasco*, 11-144.
91. Olguín EJ, Sánchez-Galván G. (2010). Aquatic phytoremediation: novel insights in tropical and subtropical regions. *Pure and Applied Chemistry* 82(1): 27-38.
92. ONU (2014). Un Objetivo Global para el Agua Post-2015: Síntesis de las Principales Conclusiones y Recomendaciones de ONU-Agua.
93. ONU-UNWATER (2024). Avances en el tratamiento de aguas residuales: actualización de 2024.
94. Paris C, Hadad H, Maine MA, Suñe N. (2005). Eficiencia de dos macrófitas flotantes libres en la absorción de metales pesados. *Limnetica* 24(3-4): 237-244
95. Pérez-Clemente RM, Vives V, Zandalinas SI, López-Climent, MF, Muñoz V, Gómez-Cadenas A. (2012). Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *BioMed research international* 2013: 654120 10.

96. Petry CT, Costa DT, Droste A. (2020). Eliminación del nitrógeno amoniacal del lixiviado de vertedero municipal con *Typha domingensis* (Typhaceae) en flotación/Removal of ammoniacal nitrogen from municipal landfill leachate with floating *Typha domingensis* (Typhaceae). Acta Biológica Colombiana 25(1).
97. PNUD. 2021. Objetivo 6. Agua limpia y Saneamiento. En Objetivos de Desarrollo Sostenible, en: <https://www.undp.org/content/undp/es/home/sustainable-development-goals.html>
98. Prasad MNV. (2007). Aquatic plants for phytotechnology. In: Singh, S.N., Tripathi, R.D. (Eds.), Environmental Bioremediation Technologies. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 259-274.
99. Rangel-Peraza JG, Mendivil-García K, Cedillo-Herrera CIG, Rochín-Medina JJ, Rodríguez-Mata AE, Bustos-Terrones YA. (2019). Optimization of organic matter degradation kinetics and nutrient removal on artificial wetlands using *Eichhornia crassipes* and *Typha domingensis*. Environmental Technology 40(5): 633-641.
100. Rai PK, Kim KH, Lee SS, Lee JH. (2020). Molecular mechanisms in phytoremediation of environmental contaminants and prospects of engineered transgenic plants/microbes. Science of the Total Environment 705:135858.
101. Rigotti JA, Paqualini JP, Rodríguez LR. (2021). Root growth and nutrient removal of *Typha domingensis* and *Schoenoplectus californicus* over the period of plant establishment in a constructed floating wetland. Environmental Science and Pollution Research 28: 8927–8935.
102. Romero J. (2004). Tratamiento de Aguas Residuales (3ª ed.). Bogotá: Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería.
103. Salas-Rodríguez JJ, Pidre-Bocardo JR, Cuenca-Fernández I. (2007). Manual de tecnologías no convencionales para la depuración de aguas residuales. Centro de las nuevas tecnologías del agua (CENTA).
104. Santos-Díaz MDS, Barrón-Cruz MDC, Alfaro de la Torre MC. (2007). Induction of *in vitro* roots cultures of *Typha latifolia* and *Scirpus americanus* and study of their capacity to remove heavy metals. Electronic Journal of Biotechnology 10(3): 417-424.
105. Santos-Díaz MS, Barrón-Cruz MC. (2011). Lead, Chromium and Manganese Removal by *in vitro* Root Cultures of Two Aquatic Macrophytes Species: *Typha Latifolia* L. and *Scirpus Americanus* Pers., International Journal of Phytoremediation 13(6): 538-551.
106. Sattelmacher B. (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. New Phytologist 149(2): 167-192.

107. SEMARNAT (2024). Prontuario Normas Oficiales Mexicanas (Actualizado al 30 de marzo 2021). En: <https://www.semarnat.gob.mx/gobmx/biblioteca/nmx.html>
108. Selman M, Greenhalgh S, Branosky E, Jones C, Guiling J. (2009). Water quality trading programs: An international overview. World Resources Institute Issue Brief 1(1):1-15.
109. Shah K, Nongkynrih JM. (2007). Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biología Plantarum* 51: 618–634.
110. Sricoth T, Meeinkuirt W, Pichtel J, Taeprayoon P, Saengwilai P. (2018). Synergistic phytoremediation of wastewater by two aquatic plants (*Typha angustifolia* and *Eichhornia crassipes*) and potential as biomass fuel. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 5344-5358.
111. Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology* 116 (2): 447–453.
112. Sharma P, Pandey S. (2014). Status of phytoremediation in world scenarios. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation* 2(4): 178-191.
113. Sheoran AS. (2006). A laboratory treatment study of acid mine water of wetlands with emergent macrophyte (*Typha angustata*). *Global J Biotech & Biochem* 14(1): 209-222.
114. Thiébaud G. (2008). Phosphorus and aquatic plants. In: White PJ, Hammond JP (eds) *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. Plant Ecophysiology. Vol 7. Springer, Dordrecht.
115. Torres JDG, Vargas JSM, Aguirre RRP, Huaranga MAC. (2015). Evaluación de la eficiencia en el tratamiento de aguas residuales para riego mediante Humedales Artificiales de flujo libre superficial (FLS) con las especies *Cyperus Papyrus* y *Phragmites Australis*, en Carapongo-Lurigancho. *Revista de Investigación Ciencia, Tecnología y Desarrollo* 1(2).
116. UNEP (2023). Wastewater - Turning Problem to Solution. Report. En: <https://www.unep.org/resources/report/wastewater-turning-problem-solution>
117. Verstraeten I, Beeckman T, Geelen D. (2013). Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis. In *Plant Organogenesis*, Human Press. pp. 159-175.
118. Wang YY, Cheng Y, Chen K, Tsay Y. (2018). Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. *Annual Review Plant Biology* 69:85–122.

119. Wei Z, Van Le Q, Peng W, Yang Y, Yang H, Gu H, Lam SS, Sonne C. (2021). A review on phytoremediation of contaminants in air, water and soil. *Journal of hazardous materials* 5;403:123658.
120. WETPOL (2023) <https://wetpol.org/> 10th International Symposium. On Wetland Pollutant Dynamics and Control. 10 – 14 September 2023 | Bruges, Belgium
121. WWAP (Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de la UNESCO). (2019). Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2019: No dejar a nadie atrás. París, UNESCO, en: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000367304>
122. Xu X, Zhou Y, Han R, Song K, Zhou X, Wang G, Wang Q. (2019). Eutrophication triggers the shift of nutrient absorption pathway of submerged macrophytes: Implications for the phytoremediation of eutrophic waters. *Journal of environmental management* 239:376-384.
123. Yadav KK, Gupta N, Kumar K, Reece LM, Singh N, Rezaei S, Khan SA. (2018). Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: a review on application and future prospects. *Ecological Engineering* 120:274-298.
124. Yang Y, Shen Q. (2020). Phytoremediation of cadmium-contaminated wetland soil with *Typha latifolia* L. and the underlying mechanisms involved in the heavy-metal uptake and removal. *Environmental Science and Pollution Research Int.* 27(5):4905-4916.
125. Yordanova ZP, Georgiev MI. (2017). Cell Factories. Editor(s): Brian Thomas, Brian G Murray, Denis J Murphy. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, Academic Press, Pages 72-76.
126. Zaid A, Hughes HG, Porceddu E, Nicholas F. (2004). Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
127. Zhao L, Liu F, Crawford NM, Wang Y. (2018). Molecular Regulation of Nitrate Responses in Plants. *International Journal of Molecular Science*. 13;19(7):2039
128. Zhao F, Xi S, Yang X, Yang W, Li J, Gu B, He Z. (2012). Purifying eutrophic river waters with integrated floating island systems. *Ecological Engineering* 40:53-60.

CAPÍTULO II

**Diseño de un rizotrópico experimental *in vitro* de
Typha domingensis con fenotipado de raíces**

Nombre del artículo: Diseño de un rizotrópico experimental *in vitro* de *Typha domingensis* con fenotipado de raíces

Autores: Hernández-Piedra G.^{(1)*}, Ruiz-Carrera V.^{(2)*} Sánchez AJ.⁽²⁾

Resumen: Para cuantificar el crecimiento del sistema radicular de plantas acuáticas emergentes cultivadas *in vitro*, es esencial diseñar un rizotrópico con fenotipo radicular preciso y no destructivo. Con este objetivo, se evaluó la influencia del estado físico del medio de cultivo y la concentración de nutrientes en las características de enraizamiento de las plántulas de *Typha domingensis*. En un experimento previo en sistemas hidropónicos *ex vitro* se examinaron los efectos de distintas concentraciones de nutrientes, 0 a 100% (Murashige y Skoog) sobre el enraizamiento. Las concentraciones de 0% y 12.5% dieron lugar a un mayor desarrollo de las raíces, como se observó mediante microscopía óptica y estereoscópica. Particularmente, los individuos de estos grupos mostraron raíces más largas y una mayor proliferación radicular. El experimento central involucró el cruzamiento de los estados semisólido, líquido y bifásico con nutrientes 10% Murashige y Skoog(1962). Como tratamiento testigo se utilizaron plántulas implementadas en un soporte sin medio de cultivo (soporte agua) durante los 30 días del cultivo *in vitro*. Las imágenes de raíces se analizaron con un software procesador de imágenes. En estado líquido el fenotipo radicular desordenado no fue funcional para este análisis. Por otro lado, los estados bifásico y semisólido con MS mostraron un número significativamente mayor de raíces en comparación con los controles respectivos. El medio de cultivo bifásico fue óptimo para simular las condiciones ambientales y mejorar la adquisición de imágenes de enraizamiento de *Typha*.

Palabras clave: Sistema radicular; macrófita emergente; fitorremediación;

⁽¹⁾ Posgrado en Ciencias en Ecología y Manejo de Ecosistemas Tropicales. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México, guadalupe.hernandezp@ujat.mx.

⁽²⁾ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Centro de Investigación para el Aprovechamiento y Manejo de Recursos Tropicales. Laboratorio de Biotecnología, Centro, Villahermosa, Tabasco, México, violeta@ujat.mx.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas radiculares (SR) de las plantas acuáticas emergentes desempeñan funciones vitales a través de una serie de mecanismos, entre los que se incluyen la absorción, fijación, almacenamiento y síntesis de diversos compuestos orgánicos (Steffens y Rasmussen 2016). Por su potencial genético y las condiciones ambientales que las rodean influyen en varios mecanismos bioquímicos que determinan el crecimiento y la extensión de sus raíces adventicias y les confieren un sistema radicular eficiente para metabolizar estos compuestos (Steffens y Rasmussen 2016; Motte *et al.* 2019). La capacidad natural de remoción de las plantas emergentes más una alta productividad de biomasa las hace atractivas para desarrollar tecnologías de fitorremediación de contaminantes, como la rizofiltración o rizodegradación (Kafle *et al.* 2022; Dhir 2020; Dhir 2017) y mejorar los tratamientos de aguas residuales y la recuperación de los recursos hídricos de ecosistemas perturbados (Wei *et al.* 2021; Grzegórska *et al.* 2020). Dicha capacidad la convierte en candidata idónea, sin embargo, la eficiencia de fitorremediación varía entre especies, y entre poblaciones de la misma especie. Actualmente diversas investigaciones se enfocan en mejorar la capacidad natural de la raíz, usando técnicas de producción de hairy roots y raíces adventicias que buscan producir fenotipos radiculares potencialmente más eficientes por una mayor superficie de contacto o por mecanismos metabólicos mejorados (Gunarathne *et al.* 2019; Rai *et al.* 2020).

La arquitectura y dinámica del SR es objeto de estudio en la actualidad para un mejor entendimiento y modelado de los procesos ecosistémicos (McCormack *et al.* 2017). Para observar de forma más conveniente el desarrollo dinámico de las raíces en condiciones similares a las que se encuentran en el campo se han utilizado matrices de crecimiento tipo platos de agar, hidroponía, papel filtro y el rizotrón (Krzyzaniak *et al.* 2021; Ma *et al.* 2019). El último, es un método de evaluación radicular no destructivo que consiste en analizar el fenotipo con mediciones directas, instantáneas y repetidas

del SR en el entorno natural o controlado (Mohamed *et al.* 2017; Rose y Lobet 2019). El método de rizotrópico ha mejorado con el tiempo apoyado de imágenes digitales que modelan la arquitectura y dinámica de crecimiento de la raíz en espacio y tiempo (York y Lobet 2017; Mohamed *et al.* 2017). En la actualidad existen diseños como “rhizoponics”, un rizotrópico hidropónico para el estudio de plantas maduras en *Arabidopsis thaliana* (Mathieu *et al.* 2015) y el “microphenotron” miniaturizado robótico para el estudio de germinados de la misma especie (Burrell *et al.* 2017). El avance tecnológico de esta técnica permite detectar raíces cada vez más finas hasta de 0.1 mm de diámetro o escaneos más económicos y de mejor calidad con la ayuda de aplicaciones en dispositivos móviles (Mohamed *et al.* 2017).

El empleo de rizotrones para evaluar el efecto de un contaminante sobre el SR y mejorar así el entendimiento de los mecanismos de fitorremediación ha cobrado auge, ejemplo de esto son Tognacchini *et al.* (2020) quien utilizó rizotrones enriquecidos con níquel para evaluar su efecto sobre *Noccaea caerulea* y *Stellaria media*. En un estudio similar He *et al.* (2020) evaluaron el efecto de suelos contaminados con petróleo sobre cultivos de *Zea mays* L. Con este mismo dispositivo Zamani y Hajabbasi (2018) estudiaron *Oryza sativa* una acumuladora de arsénico y más recientemente Mészáros *et al.* (2022) utilizaron un sistema rizotrópico *in vitro* para evaluar la contaminación plástica de mascarillas quirúrgicas sobre el desarrollo temprano de plántulas de *Brassica napus* L. Con la finalidad de configurar una unidad experimental tipo rizotrópico para germinados *in vitro* de *Typha domingensis* se evaluó la condición física y nutricional del medio de cultivo libre de fitoreguladores. La caracterización del fenotipo de raíz eficiente servirá de base para un mayor desarrollo del método biotecnológico de hiperrizogénesis de *T. domingensis* enfocado a la rizofiltración o rizodegradación de contaminantes en sistemas acuáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las infrutescencias maduras de *Typha domingensis* se colectaron en la ciudad de Villahermosa, Tabasco (17°59' N y 92°57' W) situada en la base de la Cuenca de los ríos Grijalva-Usumacinta. La extracción de la semilla consistió en humedecer con 250 ml de agua de garrafón los aquenios cubiertos de perianto dehiscente durante 5 a 10 minutos en una bolsa plástica resellable de 26.8 cm x 27.3 cm. Transcurrido el tiempo se agregaron 500 ml más de agua, suficiente para generar movimiento por agitación y en consecuencia desprendimiento de la semilla. La semilla precipitó al fondo permitiendo separar el sobrenadante (agua más perianto) por simple decantación. Es importante colocar inmediatamente las semillas en un desecador de sílica gel por 24 horas para retirar la humedad, transcurrido el tiempo se almacenó en un frasco ámbar. Las semillas sin perianto se desinfectaron y germinaron de acuerdo con Hernández-Piedra *et al.* (2018).

Preparación de medios y condiciones de cultivo. El medio de cultivo para todas las evaluaciones fue MS (Murashige y Skoog 1962) sin suplementos como sacarosa o fitorreguladores. La concentración de agar-agar fue de 4% en la fase semisólida. La esterilización del medio se estableció a 121 °C y 104 kPa durante 25 min (Sterilizer SM300, Yamato scientific, Japan). Los cultivos se incubaron en un área controlada a 28±2 °C y fotoperiodo 16:8 horas luz:oscuridad durante la germinación aséptica y en el experimento hidropónico y con rizotrófon. Se suministró luz con intensidad de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Quantum light meter, Spectrum Technologies, Inc) de lámparas de luz blanca (Phillips, E.U.A). En ambos experimentos se tomaron en cuenta las condiciones de cultivo de los valores fisicoquímicos (contenido de nitrógeno (N), fósforo (P), condiciones de pH, luz y oxígeno disuelto) reportados en ambientes naturales y medios nutritivos donde crecen poblaciones del género *Typha* (Bansal *et al.* 2019; Santos-Díaz y Barrón-Cruz 2012; Brix *et al.*

2010; Li *et al.* 2010; Santos-Díaz *et al.* 2007; Rodríguez-Rodríguez, 2002; Brix *et al.* 2002; Lorenzen *et al.* 2001).

Experimento 1. Evaluación en sistema hidropónico. En cultivo hidropónico se analizó el efecto de la concentración de los nutrientes de MS en el crecimiento radicular de germinados *in vitro* de *T. domingensis*. El diseño fue unifactorial de cinco niveles nutrientes: 0, 12.5, 25, 50 y 100% (n total = 24). El sistema hidropónico se realizó en contenedores plásticos con un litro de solución nutritiva. Los germinados asépticos se colocaron individualizados en placas de unicel de 24 pocillos y se usó como soporte guata. El recambio de medio se realizó cada siete días, durante un mes. Las mediciones de longitud total de la raíz (LR) y número de raíces (NR) de cada SR se registró sobre un papel milimétrico con ayuda del microscopio estereoscópico.

Experimento 2. Configuración óptima del rizotrópico. El efecto del estado físico y la concentración de nutrientes en el SR de los germinados se evaluó en un factorial 3x2 al azar, donde las variables independientes fueron el estado físico y la concentración de nutrientes del medio de cultivo MS. Las categorías del estado físico incluyeron el estado semisólido (SS con agar), estado líquido (LIQ sin agar) y ambos estados (BIF bifásico) y las de concentración de nutrientes fueron MS10% y agua purificada (H₂O). La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo (25 x 200 mm) con 20 ml de medio nutritivo en el cual se colocaron 10±5 semillas asépticas de *Typha domingensis* en régimen autótrofo. El experimento permaneció 30 días en condiciones controladas. Al final, se registró la LR y NR usando el método de trazado de imágenes fotográficas (Kodak EasyShare C143) propuesto por Lobet y Draye (2013). Las imágenes digitalizadas de raíz se analizaron mediante un software procesador de imágenes (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors (K-S d) y la prueba de homogeneidad de varianza de Cochran C para determinar el procedimiento estadístico más apropiado. Para los datos hidropónicos se aplicó el ANOVA de una vía o el ANOVA factorial con pruebas post hoc de LSD Fisher entre variables, mientras que para analizar los datos del rizotrón se empleó la prueba de Kruskal-Wallis por factores. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa informático Statistica V8 (Stat Soft Inc.) con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sistema hidropónico. El porcentaje de supervivencia de los germinados (>90%) fue mayor en la concentración MS de 0 y 12.5%, aunque estadísticamente fueron similares a las concentraciones de 25% y 100% que tuvieron menos del 70% de supervivencia (Fig. 1C). El tratamiento con máxima supervivencia presentó germinados con un sistema foliar muy desarrollado y sistema radicular de aspecto sano y abundante hasta el día 30 (Fig. 1D). Los tratamientos con MS al 0 y 12.5% presentaron raíces más largas y mayor proliferación radicular similares entre sí y significativamente diferente de los demás tratamientos (Fig. 1A y B). En este estudio los germinados de *T. domingensis* en el tratamiento con un cuarto de la fuerza iónica MS, presentaron los SR con el mayor NR y LR que se destaca por tener concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- que se considera eutróficas e hipereutróficas. Al respecto, está documentado que el género *Typhaceae* y sus especies más representativas como *T. latifolia* y *T. domingensis* toleran condiciones altas de nutrientes lo que les permite crecer abundantemente en hábitats o sistemas de naturaleza eutrófica e hipereutrófica (Lorenzen *et al.* 2001; Brix *et al.* 2002; Steinbachová-Vojtíšková *et al.* 2006; Santos-Díaz *et al.* 2007; Brix *et al.* 2010; Li *et al.* 2010; Santos-Díaz y Barrón-Cruz 2012; Rodríguez-Rodríguez 2002; Bansal *et al.* 2019). En *T. latifolia* un mayor crecimiento radicular se

obtuvo en ambiente oxigenado con concentración media y alta de fósforo (Brix *et al.* 2010). De manera similar, *T. angustifolia* obtuvo mayor producción de biomasa radicular en condición eutrófica (Steinbachová-Vojtíšková *et al.* 2006). Autores como Lorenzen *et al.* (2001), Brix *et al.* (2002), Steinbachová-Vojtíšková *et al.* (2006), Brix *et al.* (2010) y Li *et al.* (2010) señalan que el género *Typha* muestra suficiente evidencia de ser autosuficiente para transportar y asimilar concentraciones altas de N y P que le permite un desarrollo óptimo.

Sistema rizotrófico *in vitro*. Los sistemas radiculares presentaron diferencias significativas de número de raíces y longitud total de la raíz entre los tratamientos (Cuadro I y Fig. 2). La concentración de nutrientes fue muy significativa en NR y significativa en LR. En cambio, el estado físico del medio solo fue significativo en LR ($p < 0.05$). Los fenotipos radiculares en el estado físico líquido formaron madejas de germinados, lo que impidió realizar mediciones del desarrollo radicular por análisis de imagen (Fig. 3, E y F). Quedaron descartados los tratamientos H₂O/LIQ y MS10%/LIQ. En tanto que, los tratamientos bifásicos (Fig. 3 A, B) y semisólidos (Fig. 3 C, D) mostraron sistemas radiculares bien desarrollados y con tropismo convencional. Los tratamientos MS/BIF y MS/SS exhibieron el doble del número de raíces comparadas con los tratamientos H₂O/BIF y H₂O/SS, pero sin presentar diferencias significativas (Fig. 2 y Cuadro I). Las raíces más largas se visualizaron en los tratamientos H₂O/BIF y H₂O/SS y MS/ BIF conforme a la figura 2 ($p > 0.05$). Aunque las interacciones de las fuentes de variación no fueron significativas. El medio nutritivo mostró efectos en el NR y la LR (Cuadro I). El tratamiento MS10% duplicó el NR respecto a los que solo presentaron H₂O, y en H₂O la LR fue superada 1.3 veces. Mientras que el estado físico del medio de cultivo afectó de forma significativa solo a la LR, siendo la configuración bifásica 1.3 veces superior. El diseño del rizotrófico cuantificó exitosamente las respuestas de NR y LR y definió las condiciones óptimas del crecimiento del SR de *T. domingensis*. Del mismo modo,

Gao *et al.* (2017) determinó el crecimiento de las raíces de plántulas de colza y trigo *in situ* con un método de rizotrópico para observar más convenientemente el desarrollo dinámico de las raíces en condiciones similares a las que se encuentran en el campo. Otros protocolos *in vitro* han sido efectivos para analizar la dinámica de SR ya que el uso de recipientes transparentes y sustrato de gel para medir las raíces de las plantas es efectivo al capturar imágenes *in situ* de la arquitectura de raíces, destacando especies como el arroz y maíz (Topp *et al.* 2021; Lyster-Pascuzzi *et al.* 2012).

Sin embargo, se argumenta que el sustrato transparente del rizotrópico difiere de la matriz real del suelo al favorecer la disponibilidad de luz en la raíz. Un estudio en condiciones de terreno natural vs rizotrópico vs soluciones nutritivas en *Oryza sativa L.* reveló contrastes en la LR y densidad de pelos radiculares, pero los pelos radiculares de las plantas de terreno natural y del rizotrópico compartieron el mismo patrón arquitectónico, fueron cortas y muy densas, pero más largas y menos abundantes por el efecto de la solución nutritiva (Nestler *et al.* 2016). Otro caso reveló que las plantas cultivadas en phytigel (sustituto de agar) redujeron la LR y densidad de la raíz lateral en comparación con las cultivadas en suelo (Judd *et al.* 2015). En cambio, *Handroanthus chrysotrichus* favoreció por igual la formación de raíces *in vitro* en ausencia y presencia de agar (Rabaiolli *et al.* 2017).

Una característica visual sobresaliente en los tratamientos que contuvieron MS10% fue la marcada coloración verde de las hojas y del SR con pelos radiculares (Fig. 2 y 3). En los tratamientos MS/BIF, MS/SS y MS/LIQ el SR de *Typha domingensis* se expresó una pigmentación verde y ausencia de pelos radiculares. Mientras que los tratamientos H₂O/BIF, H₂O /SS) y H₂O /LIQ presentaron una coloración blanca y pelos radiculares convencionales (Fig. 2 y 3). El rasgo fenotípico atípico de raíz verde se denominó raíz fotosintética y se consideró un indicador de

asimilación de nutrientes en los tratamientos que se presentaron, ya que este órgano puede tener un potencial biosintético por la entrada de la luz en el rizotróon (Flores *et al.* 1993). El color de la raíz como indicador de viabilidad no es obvio, a pesar de estar en una ventana transparente. Para este estudio la raíz siempre se observó blanca o verde, y en ambos casos se consideró viable siempre y cuando hubiera desarrollo foliar. Para Germon *et al.* (2016) una raíz se considera viva cuando tiene un color crema o muerta cuando se ha vuelto negra y sin crecimiento entre dos o más sesiones sucesivas hasta el término del experimento.

CONCLUSIONES

El rizotróon *in vitro* de *Typha domingensis* en configuración bifásica con 10% de MS impulsó el crecimiento de las raíces en condiciones ambientales experimentales en las que esta macrófita emergente se desarrolla de forma natural. El fenotipo del sistema radicular expresado en función de la longitud y número de raíces fue demostrado claramente con el trazado de imágenes. Además, se imita el ambiente donde el crecimiento radicular es óptimo. Los sistemas rizotrónicos con una configuración física y nutricional libre de fitorreguladores que representa un punto de partida para futuros experimentos de rizorremediación acuática de xenobióticos.

REFERENCIAS

1. Bansal S., Lishawa S.C., Newman S., Tangen B.A., Wilcox D., Albert D., Windham-Myers L. (2019). *Typha* (cattail) invasion in North American wetlands: biology, regional problems, impacts, ecosystem services, and management. *Wetlands* 39 (4), 645-684. <https://doi.org/10.1007/s13157-019-01174-7>

2. Brix H., Dyhr-Jensen K., Lorenzen B. (2002). Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L., growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Journal of Experimental Botany* 53 (379), 2441-2450. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf106>
3. Brix H., Lorenzen B., Mendelssohn I.A., McKee K.L., Miao S. (2010). Can differences in phosphorus uptake kinetics explain the distribution of cattail and sawgrass in the Florida Everglades? *BMC plant biology* 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-23>
4. Burrell T., Fozard S., Holroyd G.H., et al. (2017). The Microphenotron: a robotic miniaturized plant phenotyping platform with diverse applications in chemical biology. *Plant Methods* 13(10). <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0158-6>
5. Dhir B. (2017). Bioremediation Technologies for the Removal of Pollutants. In: Advances in Environmental Biotechnology. (Kumar, R., Sharma, A., Ahluwalia, S., Eds). Springer, Singapore, pp 69-91. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4041-2_5
6. Dhir B. (2020) Green technologies for the removal of agrochemicals by aquatic plants. In Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation. (Majeti Narasimha Vara Prasad Ed). Butterworth-Heinemann, pp 569-591. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00021-0>
7. Flores H. E., Dai Y. R., Cuello J. L., Maldonado-Mendoza I. E., Loyola-Vargas, V. M. (1993). Green roots: Photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiology* 101(2), 363-371. <https://doi.org/10.1104/pp.101.2.363>
8. Gao S. J., Cao W. D., Thorup-Kristensen K. (2017). Comparison of the root morphology of oilseed rape and winter wheat during the seedling period using a rhizotron tube method. *Acta Prataculturae Sinica* 26 (4), 134-142. <https://doi.org/10.11686/cyxb2016208>
9. Germon A., Cardinael R., Prieto I., Mao Z., Kim J., Stokes A., Dupraz C., Laclau J.P., Jourdan C. (2016). Unexpected phenology and lifespan of shallow and deep fine roots of

- walnut trees grown in a silvoarable Mediterranean agroforestry system. *Plant Soil* 401, 409–26. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2753-5>
10. Gunarathne V., Mayakaduwa S., Ashiq A., Weerakoon S.R., Biswas J.K., Vithanage M. (2019) Transgenic plants: benefits, applications, and potential risks in phytoremediation. In *Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids*, (Majeti Narasimha Vara Prasad, Ed.) Academic Press, Elsevier, pp. 89-102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814389-6.00005-5>
11. Grzegórska A., Rybarczyk P., Rogala A., Zabrocki D. (2020) Phytoremediation—From Environment Cleaning to Energy Generation—Current Status and Future Perspectives. *Energies* 13, 2905. <https://doi.org/10.3390/en13112905>
12. He S., Wang X., Wu X., Yin Y., Ma L.Q. (2020). Using rice as a remediating plant to deplete bioavailable arsenic from paddy soils. *Environment International* 141, 105799. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105799>
13. Hernández-Piedra G., Ruiz-Carrera V., Sánchez A.J., Hernández-Franyutti A., Azpeitia-Morales A. (2018) Morpho-histological development of the somatic embryos of *Typha domingensis*. *PeerJ* 6:e5952. <https://doi.org/10.7717/peerj.5952>

14. Judd L.A., Jackson B.E., Fonteno W.C. (2015). Advancements in Root Growth Measurement Technologies and Observation Capabilities for Container-Grown Plants. *Plants* 4(3), 369-392. <https://doi.org/10.3390/plants4030369>
15. Kafle A., Timilsina A., Gautam A., Adhikari K., Bhattarai A., Aryal N. (2022). Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. *Environmental Advances* 8. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100203>
16. Krzyzaniak Y., Cointault F., Loupiac C., et al. (2021) Phenotyping of Grapevine Root System Architecture by 2D or 3D Imaging: Advantages and Limits of Three Cultivation Methods. *Frontiers in Plant Science* 12:638688. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.638688>
17. Li S., Lissner J., Mendelssohn I.A., Brix H., Lorenzen B., McKee K.L., Miao S. (2010) Nutrient and growth responses of cattail (*Typha domingensis*) to redox intensity and phosphate availability. *Annals of Botany* 105(1),175-84. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp213>
18. Lyer-Pascuzzi A.S., Zurek P., Benfey P.N. (2012). High-throughput, non-invasive imaging of root systems. *Methods in Molecular Biology* 959, 177. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-221-6_11
19. Lobet G. y Draye X. (2013) Novel scanning procedure enabling the vectorization of entire rhizotron-grown root systems. *Plant Methods* 4:9(1),1. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-1>
20. Lorenzen B., Brix H., Mendelssohn I. A., McKee K. L., Miao S. L. (2001) Growth, biomass allocation and nutrient use efficiency in *Cladium jamaicense* and *Typha domingensis* as affected by phosphorus and oxygen availability. *Aquatic botany* 70(2),117-133. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00155-3)

21. Ma L., Shi Y., Siemianowski O., Yuan B., Egner T.K., Mirnezami S.V., Lind K.R., Ganapathysubramanian B., Venditti V., Cademartiri L. (2019) Hydrogel-based transparent soils for root phenotyping *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(22),11063-11068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820334116>
22. Mathieu L., Lobet G., Tocquin P., Périlleux C. (2015) Rhizoponics: a novel hydroponic rhizotron for root system analyses on mature *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant methods*, 11(1),1-8. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0046-x>
23. McCormack M.L., Guo D., Iversen C.M., Chen W., Eissenstat D.M., Fernandez C.W., Li L., Ma C., Ma Z., Poorter H., Reich P.B., Zadworny M., Zanne A. (2017) Building a better foundation: improving root-trait measurements to understand and model plant and ecosystem processes. *New Phytologist* 215, 27-37. <https://doi.org/10.1111/nph.14459>
24. Mészáros E., Bodor A., Szierer A., Kovács E., Perei K., Tölgyesi C., Bátori Z., Feigl G., (2022) Indirect effects of COVID-19 on the environment: How plastic contamination from disposable surgical masks affect early development of plants. *Journal of Hazardous Materials* 436. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129255>
25. Mohamed A., Monnier Y., Mao Z. et al. (2017). An evaluation of inexpensive methods for root image acquisition when using rhizotrons. *Plant Methods* 13,11. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0160-z>
26. Motte H., Vanneste S., Beeckman T. (2019) Molecular and Environmental Regulation of Root Development. *Annual Review of Plant Biology*. 29,70:465-488. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100423>
27. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15,473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

28. Nestler J., Keyes S.D., Wissuwa M. (2016) Root hair formation in rice (*Oryza sativa* L.) differs between root types and is altered in artificial growth conditions. *Journal of Experimental Botany* 67(12), 3699-708. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw115>
29. Rabaiolli, S. M. dos S., Reiniger, L. R. S., Stefanel, C. M., Silva, K. B. da., Paim, A. F., Ziegler, A. C. da F. (2017) Agar does not affect in vitro rhizogenesis and ex vitro acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. *CERNE* 23(2),185-192. <https://doi.org/10.1590/01047760201723022289>
30. Rai P.K., Kim K.H., Lee S.S., Lee J.H. (2020) Molecular mechanisms in phytoremediation of environmental contaminants and prospects of engineered transgenic plants/microbes. *Science of The Total Environment* 705. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135858>
31. Rose L., Lobet G. (2019). Accuracy of image analysis tools for functional root traits: A comment in Delory et al. (2017). *Methods in Ecology and Evolution* FORUM 10(5),702-711. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13156>
32. Rodríguez-Rodríguez E. (2002) Las lagunas continentales de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco, México. 264 pp
33. Santos-Díaz M.D.S., Barrón-Cruz M.D.C., Alfaro de la Torre M.C. (2007) Induction of *in vitro* roots cultures of *Typha latifolia* and *Scirpus americanus* and study of their capacity to remove heavy metals. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(3), 417-424. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582007000300009>
34. Santos-Díaz M.S., Barrón-Cruz M.C. (2011). Lead, Chromium and Manganese Removal by in Vitro Root Cultures of Two Aquatic Macrophytes Species: *Typha Latifolia* L. and *Scirpus Americanus* Pers. *International Journal of Phytoremediation* 13(6): 538-551. DOI: [10.1080/15226511003671379](https://doi.org/10.1080/15226511003671379)

35. Santos-Díaz M.D.S., Barrón-Cruz M.D.C. (2012). Removing heavy metals by in vitro cultures. *Plant Cell Culture Protocols* 877:265-270. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_20
36. Steffens B., Rasmussen A. (2016). The Physiology of Adventitious Roots. *Plant Physiol* 170(2):603-17. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>
37. Steinbachová-Vojtíšková L., Tylová E., Soukup A., Novická H., Votrubová O., Lipavská H., Čížková H. (2006). Influence of nutrient supply on growth, carbohydrate, and nitrogen metabolic relations in *Typha angustifolia*. *Environmental and Experimental Botany* 57: 246-257. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.003>
38. Tognacchini A., Salinitro M., Puschenreiter M. *et al.* (2020) Root foraging and avoidance in hyperaccumulator and excluder plants: a rhizotron experiment. *Plant Soil* 450: 287–302. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04488-2>
39. Topp C.N., Iyer-Pascuzzi A.S., Anderson J.T., Lee C.R., Zurek P.R., Synomonva O., Zheng Y., Bucksh A., Mileyko Y., Galkovskyi T., Moore B.T., Harer J., Edelsbrunner H., Mitchell-Olds T., Weitz J.S., Benfey P.N. (2013). 3D phenotyping and quantitative trait locus mapping identify core regions of the rice genome controlling root architecture. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(18):1 695-704. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304354110>
40. Wei Z, Van Le Q, Peng W, Yang Y, Yang H, Gu H, Lam SS, Sonne C. 2021. A review on phytoremediation of contaminants in air, water and soil. *J Hazard Mater* 5(403),123658. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123658>
41. York L., Lobet G. (2017). Phenomics of root system architecture: Measuring and analyzing root phenes. *The Plant Cell*, 29:9. <https://doi.org/10.1105/tpc.117.tt0917>

42. Zamani J., Hajabbasi M. (2018). Introduce of Rhizotron for assessment of the effects of soil treatments on growth and distribution of plant roots. Journal of Agricultural Engineering, 41(3):17-28. <https://doi.org/10.22055/agen.2019.23842.1389>

FIGURAS Y CUADROS

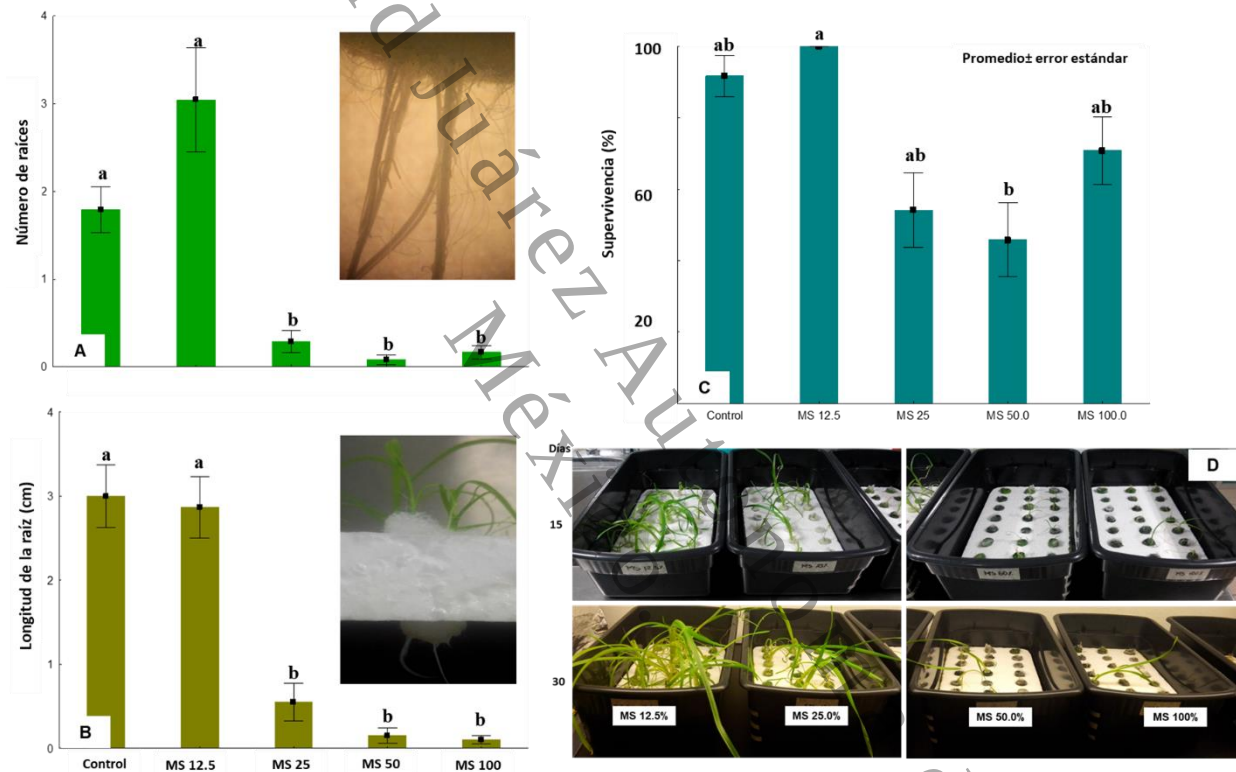


Figura 1. Fenotipos y supervivencia de germinados de *Typha domingensis* en concentraciones crecientes de MS en sistema hidropónico. En A y B promedios de número de raíces y longitud de la raíz, respectivamente. En C el porcentaje de supervivencia y en D los sistemas hidropónicos de los germinados de *T. domingensis* a los 15 y 30 días de cultivo. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas entre promedios a $p < 0.05$.

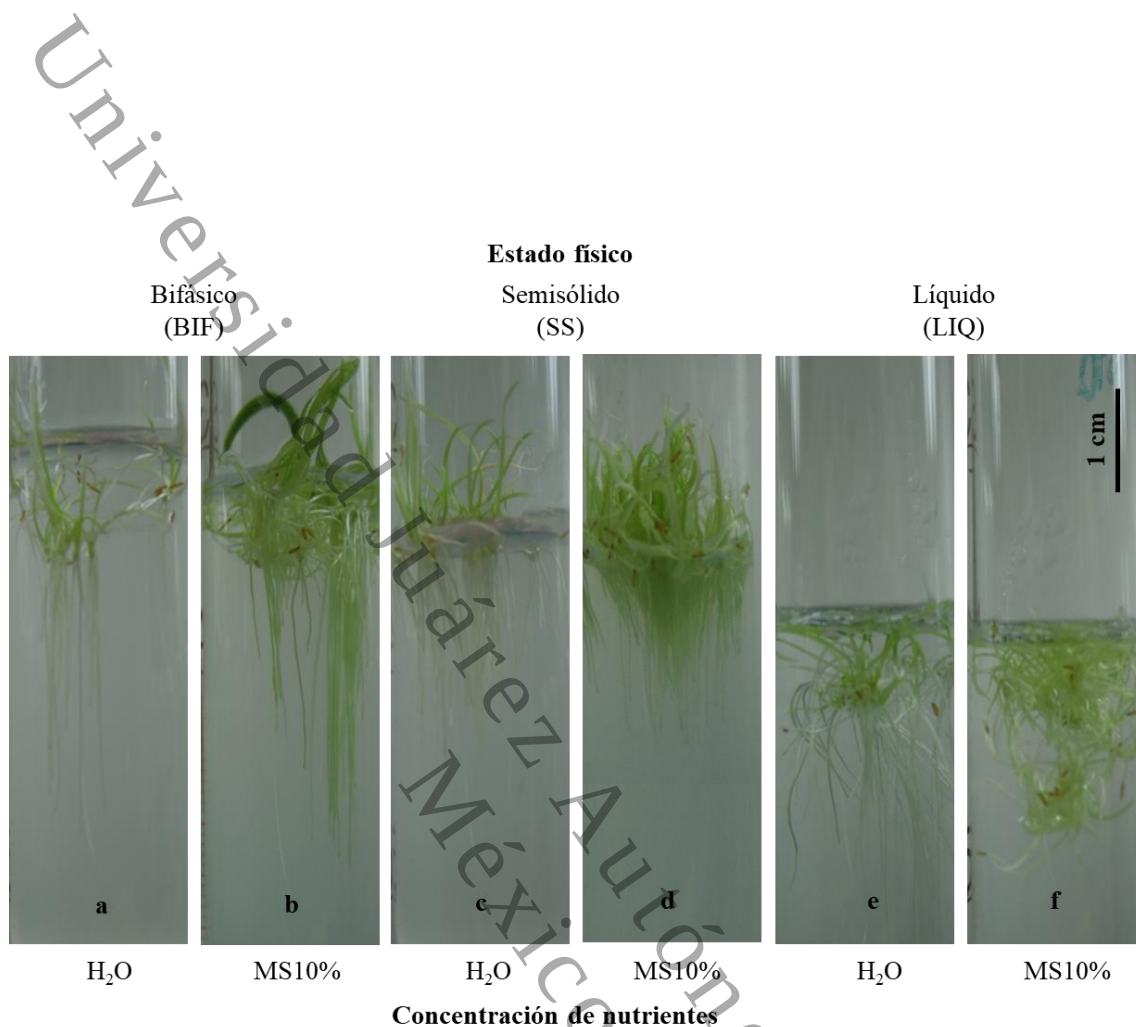


Figura 2. Fenotipos radiculares de germinados de *Typha domingensis* en rizotrófon *in vitro*. En a) los tratamientos H₂O/ BIF (Agua purificada/medio bifásico), en b) MS/ BIF (Medio Murashige y Skoog/Medio bifásico), en c) H₂O/SS (Agua purificada/medio semisólido), en d) MS/SS (Murashige y Skoog/medio semisólido), en e) H₂O/LIQ (Agua purificada/medio líquido), y en f) MS/LIQ ((Murashige y Skoog/medio líquido).

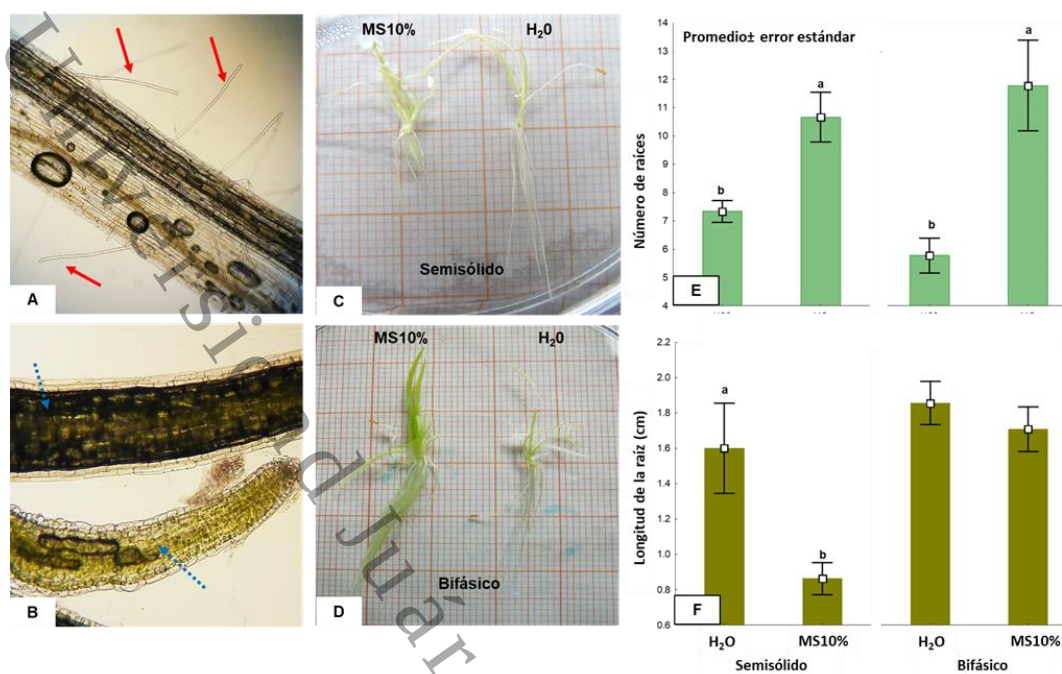


Figura 3. Comparación del sistema radicular de germinados *in vitro* de *Typha domingensis* de los tratamientos H₂O/ BIF (Agua purificada/medio bifásico), MS/ BIF (Medio Murashige y Skoog/Medio bifásico), H₂O/SS (Agua purificada/medio semisólido) y MS/SS (Murashige y Skoog/medio semisólido). En A y B detalle de la raíz adventicia de los germinados *in vitro* de *Typha domingensis*. Las flechas rojas señalan los pelos radicales y las azules la presencia de cloroplastos. En C y D se muestra la escala milimétrica de los germinados por tratamiento. En E y F promedios de número de raíces y longitud de la raíz, respectivamente. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas entre promedios a $p < 0.05$

Cuadro I. Resumen estadístico de los factores experimentales

Var	Fuente de variación	MS/BIF	MS/SS	H ₂ O/BIF	H ₂ O/SS	SC	CM	F	P
NR	CNUT*ESTF	12	11	7	6	5.3333	5.3333	1.8344	0.21
LR	CNUT*ESTF	1.7	0.8	1.8	1.6	0.2601	0.26009	3.3498	0.1
		MS		H₂O					
NR	CNUT	11.2		6.5		65.333	65.3333	22.4713	0.00**
LR	CNUT	1.28		1.72		0.5877	0.58766	7.5687	0.02*
		BIF		SOL					
NR	ESTF	9		8.7		0.1481	0.1481	0.051	0.82
LR	ESTF	1.78		1.23		0.9075	0.9075	11.688	0.00**

p<0.01** (muy significativo); p<0.05* (significativo). NR=Número de raíz, LR=Longitud de la raíz, CNUT=Concentración de nutrientes, ESTF= Estado físico.

CAPÍTULO

III

Dinámica del enraizamiento temporal-espacial de
líneas rizogénicas adventicias *in vitro* de *Typha*
domingensis con auxina/citocinina

Nombre del artículo: Dinámica del enraizamiento temporal-espacial de líneas rizogénicas adventicias *in vitro* de *Typha domingensis* con auxina/citocinina

Autores: Guadalupe Hernández-Piedra¹, Violeta Ruiz-Carrera², Alberto J. Sánchez², Graciano Calva-Calva³

Resumen

La dinámica temporal y espacial del enraizamiento de *Typha domingensis* es el mecanismo para enfrentar situaciones de estrés ambiental, por lo tanto, la generación de líneas rizogénicas adventicias aisladas en rizotrones *in vitro* promete mejorar la tecnología de depuración de nutrientes durante el tratamiento de aguas residuales. Con la finalidad de comparar la dinámica de líneas rizogénicas adventicias con y sin base meristemática, se evaluaron balances de concentración amplios y reducidos de la auxina específica AIA en cooperatividad con las citocininas CIN o BAP, bajo la influencia de luz u oscuridad.

Los rizotrones funcionaron en diferentes experimentos con medio nutritivo MS diluido en régimen de autotrofia durante un mes. Con indicadores dinámicos de enraizamiento en términos de velocidad y densidad de elongación, ramificación o velocidad de crecimiento relativa del sistema radicular se calcularon con mediciones alométricas semanales de longitud y número de raíces para discriminar las líneas rizogénicas más dinámicas. Primero se evaluaron balances de AIA:CIN y AIA:BAP (0-10 mgL⁻¹) sobre la raíz del germinado completo e iluminado, mostrando BAP mayor la desaceleración de la velocidad de elongación y ramificación y la velocidad relativa. En cambio, con CIN declinaron lentamente las velocidades e incrementaron las densidades dando registros máximos en ausencia de fitorreguladores siendo similar en la mínima concentración de AIA y CIN. Para comparar las dinámicas de los sistemas radiculares, aislados con y sin base meristemática vs germinado completo, se diseñaron experimentos con rizotrones de luz y oscuridad usando el rango óptimo de AIA:CIN (0-1.0 mgL⁻¹). La raíz totalmente aislada fue inactiva, pero con la base meristemática incrementó tanto la velocidad como la densidad de elongación y ramificación radicular con sólo 0.1 mgL⁻¹ de CIN de forma parecida al germinado sin fitorreguladores en luz.

Finalmente, entre los indicadores de elongación y ramificación óptimos se agruparon seis líneas rizogénicas adventicias de germinado y raíz con meristemo basal procedentes de ambiente de luz y oscuridad, lo que vislumbra diferentes dinámicas para una amplia gama de aplicaciones ambientales e innovadoras.

Palabras claves: *Typhaceae*, cultivo *in vitro*, dinámica radicular, rizotron.

¹Programa de Doctorado en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México

²Diagnóstico y Manejo de Humedales Tropicales, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México

³Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, México.

Introducción

El sistema radicular adventicio (SRA) de plantas acuáticas emergentes enfocado a la generación de líneas de raíces aisladas con mayor capacidad de fitofiltración de sustancias tóxicas o excesos de nutrientes representa una opción de la biotecnología *in vitro* escalable a los procesos de tratamiento de aguas residuales y en las acciones de gestión de recursos hídricos y el acceso al suministro de agua y otros servicios de saneamiento (Ryder 2017; Dalla Vecchia et al. 2020).

La fitofiltración comprende a las técnicas de rizofiltración, caulofiltración y blastofiltración, nombradas así en referencia al uso de raíces y brotes aislados de las plantas y germinados que persigue explorar el potencial de remediación para la contaminación por nutrientes, metales pesados y metaloides (Yadav et al. 2018; Grzegórska et al. 2020, Yan et al. 2020). En particular, la rizofiltración enfocada al exceso de los nutrientes contribuye en la reducción de iones amonio, nitrato, nitrito y ortofosfatos del sedimento y evita la indeseable proliferación algal de las aguas residuales y eutrofizadas (Wurtsbaugh et al. 2019). Igualmente, impide que ocurran algunas reacciones toxicológicas para el hombre y especies acuáticas, siendo ejemplo de esto la destoxificación de N-nitrosaminas carcinogénicas y mutagénicas acumuladas en los sedimentos (Ward et al. 2018; Vocciante et al. 2018). A su vez, la rizofiltración es compatible con otras formas de fitorremediación aplicadas a la extracción, estabilización y volatilización de pesticidas, hidrocarburos poliaromáticos, desechos radioactivos y explosivos y contaminantes emergentes (Hegazy et al. 2011; Dhir 2017; Ezaz et al. 2020, Rout et al. 2021).

La fitorremediación vislumbra un enorme potencial de aplicaciones tecnológicas creadas por cultivo *in vitro* al ofrecer nuevos métodos de selección y producción de sistemas biológicos con capacidades de crecimiento mejoradas para el tratamiento de aguas contaminadas (Santos-Díaz y Barrón-Cruz 2011). Aunado con lo anterior, diversas actividades de fitorremediación prefieren a las especies de la familia *hipe* por presentar un SRA con alta tasa de crecimiento y mayor absorción de multibioelementos (Escutia-Lara et al. 2010, Brix et al. 2010; Hegazy et al. 2011, Sricoth et al. 2018; Di Luca et al. 2019, Bansal et al. 2019).

y en particular, *Typha domingensis* (Pers.) es la herbácea acuática emergente que representa a la comunidad natural en las zonas inundables de México (Mexicano et al. 2013).

La tecnología *in vitro* orientada al crecimiento indefinido de raíces aisladas ofrece grandes expectativas ecosustentables para la remoción de contaminantes comparada con el uso de plantas completas en humedales artificiales, incluso las mejoradas genéticamente que atraen más la atención (Doran et al. 2009). Adicionalmente, en los sistemas de raíces *in vitro* se promueve la diferenciación de raíces e incrementa la variabilidad genética usando los reguladores de crecimiento sintéticos de auxinas (AUX) y citocininas (CIT) y favorece las evaluaciones experimentales del SRA en tiempo real sin interferencias ambientales bióticas y abióticas (Sato et al. 2017) que son complicadas a mayor escala (Bellini et al. 2014; Steffens y Rasmussen 2016), lo que es idóneo para modelar la dinámica de crecimiento en tiempo y espacio de las líneas *in vitro* del SRA de la especie seleccionada. Para ello, los sistemas rizotrónicos son herramientas emergentes (Hussner 2010; Judd et al. 2015; Kalogiros et al. 2016).

Las nuevas tendencias en el cultivo de células / tejidos/órganos *in vitro*, incluso de plantas herbáceas acuáticas transformadas, utilizan variantes de cultivo como sistemas modelos para evaluar los procesos físicos, bioquímicos y fisiológicos involucrados en la absorción de nutrientes o contaminantes. Algunos ejemplos en especies sumergidas son el cultivo de rametes jóvenes y punta de estolones de *Eleocharis acicularis* (Sato et al. 2017), meristemos apicales de *Cymodocea nodosa* (García-Jiménez et al. 2006) y bases caulinares de *Vallisneria americana* (Ruiz-Carrera y Sánchez 2008). En especies emergentes se cultivaron raíces aisladas de *Typha latifolia* L. y *Scirpus americanus* para inducir la rizogénesis prolongada con diferentes tipos de auxinas, destacando el ácido indolacético (IAA) en concentración 2.0 mg L⁻¹ (Santos-Díaz y Barrón-Cruz 2011; Santos-Díaz et al. 2007).

Aunque se ha demostrado ampliamente que el crecimiento de RA es detonado por AUX, especialmente AIA, en planta completa, estaca de raíces, mutantes y plantas transgénicas que sobreproducen AIA, se desconocen muchos aspectos relacionados con la dinámica rizogénica en el cultivo indefinido de raíces adventicias estimuladas con balances de AUX y

CIT comunes como cinetina (CIN) y bencilaminopurina (BAP), incluso sobre sus efectos antagónicos en luz y oscuridad (Gonin et al. 2019). Recientemente se reveló que la longitud y actividad del sistema radicular de *Pteris vittata* incrementó con el balance AIA/CIN (Wu et al. 2018), también la proliferación de raíces adventicias de *Oryza sativa* con balances de AIA y estrigolactonas (Sun et al. 2015). Adicionalmente las características de rizogénesis continua se han expresado en ausencia de fitorreguladores como en las raíces transformadas de *Lotus corniculatus*. En particular, el protocolo de *E. acicularis* hizo posible producir raíces aisladas en crecimiento continuo y nódulos transformados en luz y oscuridad (Sato et al. 2017), aunque el crecimiento direccional de las raíces en una trayectoria de crecimiento óptima es regulado diferencialmente por luz o nutrientes (Singh et al. 2015).

En paralelo, varios estudios *in vitro* sobre la arquitectura de la raíz y el desarrollo de RA imputaron a la luz fuerte influencia en la regulación de los efectos sinérgicos o antagonistas de AUX y CIT, así como en el incremento de la entrada de nutrientes (Silva-Navas et al. 2015; Gonin et al. 2019). Estudios moleculares acumulan más evidencias sobre la percepción de auxinas en la superficie celular de las raíces por contribución decisiva del AIA en la respuesta pleiotrópica de la maquinaria hormonal y en la participación de la red de señalización MAPK que funciona en conjunto con la auxina y la citocinina durante varias etapas del desarrollo de la raíz (Singh et al. 2015).

Actualmente, los estudios de crecimiento de raíces se realizan a nivel de plantas en estados estáticos de desarrollo. Sin embargo, el SRA funciona dinámicamente para enfrentar el estrés con ahorro de energía, en lo cual se considera tanto la geometría como las fuerzas que subyacen a los cambios cinemáticos en dimensiones tiempo-espacio (Arsova et al. 2020). Por lo tanto, se necesitan metodologías alternativas que conduzcan hacia la interpretación de la variabilidad dinámica de las raíces. Adicionalmente, las variables dinámicas se pueden estudiar mejor utilizando rizotrones y minirrizotrones (Postma et al. 2014). En esta investigación se compararon las dinámicas de velocidad y densidad del SRA del germinado y explantes de raíces aislada, con y sin base caulinar, de *Typha domingensis*, cultivados en rizotrones *in vitro* para inducir máxima rizogénesis con influencia del IAA y la cooperatividad de dos CIT en condiciones de luz y oscuridad. Bajo la premisa que la base

caulinar de *Typha* es un centro de actividad meristemática (Hernández-Piedra et. al 2018) y auxínica, se sometió como hipótesis que en la raíz aislada con base caulinar dichas dinámicas incrementan en ausencia de luz y en autotrofia de AIA con baja concentración de CIT. Los objetivos particulares fueron a) analizar la dinámica espacio-temporal del SRA previamente inducido en la planta completa con diferentes balances AIA:BAP y AIA:CIN para descartar rangos de inhibición, b) comparar con las dinámicas del germinado completo vs raíz aislada con y sin base caulinar con el mejor rango de fitorreguladores en ambientes de luz y oscuridad y c) seleccionar línea rizogénicas dinámicas por su utilidad en bioprocesos de rizofiltración específicos dando énfasis a los sistemas de raíces adventicias aisladas para la fitorremediación de nutrientes de aguas residuales y otros contaminantes.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se usaron explantes y raíces de plántulas obtenidas por germinación de aquenios, los cuales se obtuvieron de infrutescencias colectadas de plantas silvestres de *T. domingensis* que crecen de manera natural en un humedal urbano de la Zona Metropolitana de Villahermosa (17° 59' 9.91 N y 17° 57' 48.98 O) que se encuentra ubicado en la cuenca del río Grijalva. Además, se colectaron plantas completas que se depositaron en el Herbario-UJAT (registro No. 35227) para su identificación taxonómica. Los aquenios sin perianto permanecieron conservados en un desecador por seis meses.

Germinación de aquenios y cultivos en rizotrón

Se formaron lotes de 8 unidades de cultivo conteniendo cada uno de 15 a 20 aquenios y se sembraron para su germinación *in vitro* utilizando el procedimiento descrito previamente en Hernández-Piedra et al. (2018), después de 15 días de cultivo en frascos de cultivo de 125 ml con 20 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) a un décimo de su fuerza iónica (1/10 MS), sin adición de azúcares y con agar-agar (4% p/v) en condiciones asépticas. Se tomaron lotes de aquenios germinados y se transfirieron a los rizotrones (N=96 individuos, un individuo por rizotrón) constituidos por un tubo de ensayo (25 x 200 mm) con 25 ml de medio de cultivo. En MS gelificado y sobre el que previamente al sembrado del germinado se deposita una capa de 1 mm de agua destilada estéril (Figura 1).

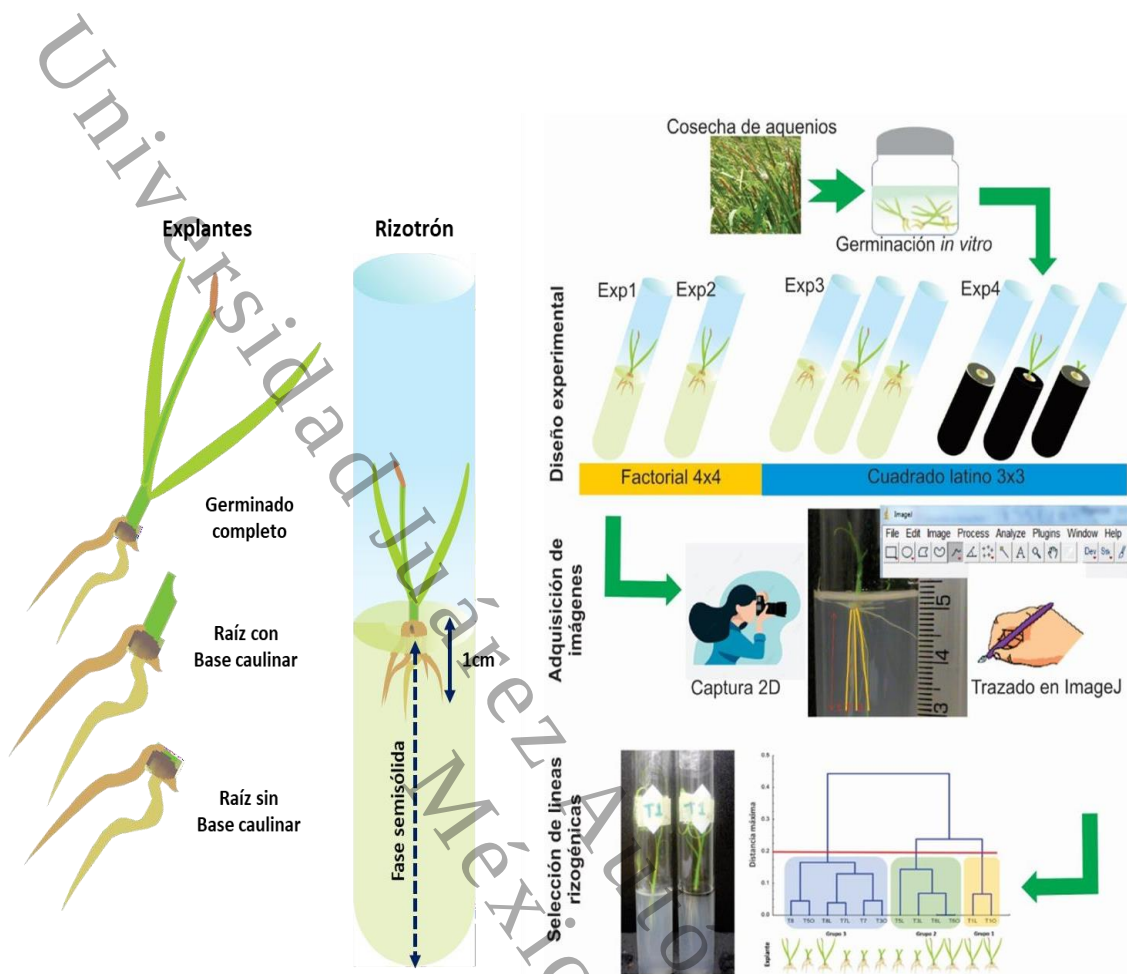


Figura 1. Resumen gráfico del procedimiento para la inducción de raíces adventicias de *Typha domingensis*.

Cultivos de raíces en rizotrón

Los germinados uniformes en tamaño y desarrollo (dos hojas en roseta, raíz seminal y una raíz adventicia) fueron seleccionados visualmente. Para obtener la raíz con y sin la base caular se separaron estos tejidos con un bisturí a partir de los achenios germinados. Los achenios germinados completos y las raíces aisladas se colocaron en los rizotrones en posición vertical, con el SRA sumergido aproximadamente 1 cm debajo de la fase semisólida (Figura 1). Los cultivos en fotoperiodo luz/oscuridad de 16/8 horas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con iluminación de $90 \pm 2 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Quantum light meter, Spectrum Technologies, Inc) usando lámparas de luz fría (Philips, E.U.A.). Los cultivos en obscuridad (R-OSC) se aislaron de la luz cubriendo el set experimental en el exterior con cartulina negra

de 185 g/m² y en el interior capa de agua fue cubierto por un aro de etileno-vinil-acetato color negro.

Efecto de la luz y del balance auxina/citocinina sobre la rizogénesis

Se utilizó un diseño factorial en el cual se probaron diferentes concentraciones de AIA (0, 0.1, 1.0 y 10 ppm) y de CIN o BAP (0, 0.1, 1.0 y 10 mgL⁻¹) y dos de luz (fotoperiodo y oscuridad). Cuatro experimentos de inducción rizogénica se diseñaron para evaluar los balances de AUX/ CIT con AIA y CIN o BAP y diferentes explantes de RA establecidos en R-LUZ y R-OSC, durante un mes de cultivo.

Rizogénesis AUX:CIT. Para determinar el rango de mínima inhibición de fitorreguladores sobre la RA se evaluó el balance de AIA/CIN (EXP 1) y AIA/BAP (EXP 2) en concentraciones de 0, 0.1, 1.0 y 10 mgL⁻¹ usando un diseño factorial completo aleatorizado de 16 tratamientos (n= 6). Ambos experimentos se realizaron simultáneamente en R-LUZ con un germinado completo (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de auxina y citocinina en los tratamientos de inducción de raíces adventicias en plántulas de *Typha domingensis*. AIA-CIN (Experimento 1) y AIA-BAP (Experimento 2).

	(mg/L)	
Tratamiento	Auxina	Citocinina
T1 /control	0	0
T2	0	0.1
T3	0	1
T4	0	10
T5	0.1	0
T6	0.1	0.1
T7	0.1	1
T8	0.1	10
T9	1	0
T10	1	0.1
T11	1	1
T12	1	10
T13	10	0
T14	10	0.1
T15	10	1
T16	10	10

Abreviaturas: AIA= Ácido indolacético, CIN= Cinetina y BAP= Bencilaminopurina.

Rizogénesis LUZ/OSCURIDAD. En el rango óptimo del mejor balance de fitorreguladores del experimento anterior para estimular la rizogénesis adventicia en explantes de germinado completo y raíz escindida con y sin base caulinar en experimentos simultáneos e independientes de luz y oscuridad (R-LUZ, Experimento 3) y (R-OSC, Experimento 4). Se usó el diseño de cuadrados latinos (3 x 3) para la concentración de AUX (factor 1) y CIT (factor 2) y tipo de explante (factor de bloqueo). Cada set experimental fue de nueve tratamientos (n=6) y por cada tipo de R se cultivó un explante del segundo lote de germinación (Tabla 2).

Tabla 2. Optimización de inducción de raíces adventicias en germinados y explantes de raíz y base caulinar de *Typha domingensis*. Rizotrón-luz (Experimento 3) y Rizotrón-oscuridad (Experimento 4).

Tratamiento	(mg/L)		Explante
	CIN	AIA	
T1	0	0	Plántula
T2	0	0.1	Raíz
T3	0	1	Base caulinar
T4	0.1	0	Raíz
T5	0.1	0.1	Base caulinar
T6	0.1	1	Plántula
T7	1	0	Base caulinar
T8	1	0.1	Plántula
T9	1	1	Raíz

Abreviaturas: CIN= Cinetina y AIA= Ácido indolacético

Análisis de imágenes y datos

En este estudio, los fenotipos del SRA se describieron con imágenes en el rizotrón según los caracteres morfológicos y la terminología propuestos para el género *Typha* por Tillich (2007) y otros relacionados con la rizogénesis adventicia de especies emergentes (Bellini et al. 2014; Steffens & Rasmussen 2016). La captura de imágenes se realizó cada semana (Figura 1) y ahí se midieron la longitud total (LR) y número de raíces (NR) usando el método de trazado de imágenes fotográficas (Kodak EasyShare C143) propuesto por Lobet & Draye (2013) y el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A partir de las mediciones alométricas se

calcularon las tasas de elongación (TE), ramificación (TRAM) y crecimiento relativo (TCR) y las densidades de longitud total de raíces (DLR) y ramificación (DRAM) (Hussner 2010; Judd et al. 2015; Kalogiros et al. 2016). Las curvas dinámicas del enraizamiento del sistema rizotrófico en función de cada balance de fitorreguladores describieron los cambios de velocidad y densidad semanal y sirvieron para caracterizar el tiempo óptimo de los fenotipos dinámicos.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa Statistica V8 (Stat Soft Inc.). Con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Cochran C se obtuvieron los estadígrafos de media, desviación estándar, valor máximo y mínimo, pruebas de bondad de ajuste a la distribución normal. Los análisis múltiples y univariados (MANOVA, ANOVA y Kruskal–Wallis) para datos independientes y las pruebas de Fisher-LSD o Medianas se establecieron a $p < 0.05$.

El método de conglomeración del vecino más lejano, distancia euclidiana agrupó los parámetros de máxima velocidad y densidad del EXP 3 y EXP4 por matriz de tratamientos del R-LUZ y R-OSC y de la suma R-LUZ+R-OSC. El criterio de asignación del número de grupos se realizó con el método de amalgamación de Schedule.

Resultados

Dinámica del enraizamiento con balances AIA/CIN y AIA/BAP

Las concentraciones de fitorreguladores en los balances AIA/CIN y AIA/BAP causaron variación significativa ($p < 0.01$ a 0.05) durante el enraizamiento del germinado completo marcando efectos significativos sobre las variables LR y NR ($p < 0.01$ a 0.05) y en la TE, TRAM, TCR, DLR y DRAM (Figura 1, 2, 3 y Tablas S1A-E). Invariablemente, todos los registros fueron altos sin AUX y CIT (Tabla S1B). Los efectos inhibitorios severos de los fitorreguladores se manifestaron en 10 mg L^{-1} , más por el incremento de la concentración de CIN y BAP que por AIA.

Las curvas dinámicas de los dos balances de fitorreguladores mostraron aceleración con tendencias invertidas entre velocidad y densidad, particularmente con AIA/CIN (Figura 2). Con AIA/CIN, ambos balances desaceleraron la TE, TRAM y TCR y la tendencia negativa

fue continua y equiparables los promedios desde de la primera semana. El descenso lento de la TE y TCR de AIA/CIN fue opuesto a la rapidez del AIA/BAP. Indistintamente al tipo de balance, las TCR máximas se redujeron tres veces y las de TE y TRAM a la mitad. En oposición, la DRAM y DLR del balance AIA:CIN mostró aceleración positiva con dos cambios ascendentes que duplicaron los promedios iniciales a partir de la tercera semana. Mientras que con AIA/BAP ambas densidades resultaron significativamente similares (Figura 2, Tabla S1A).

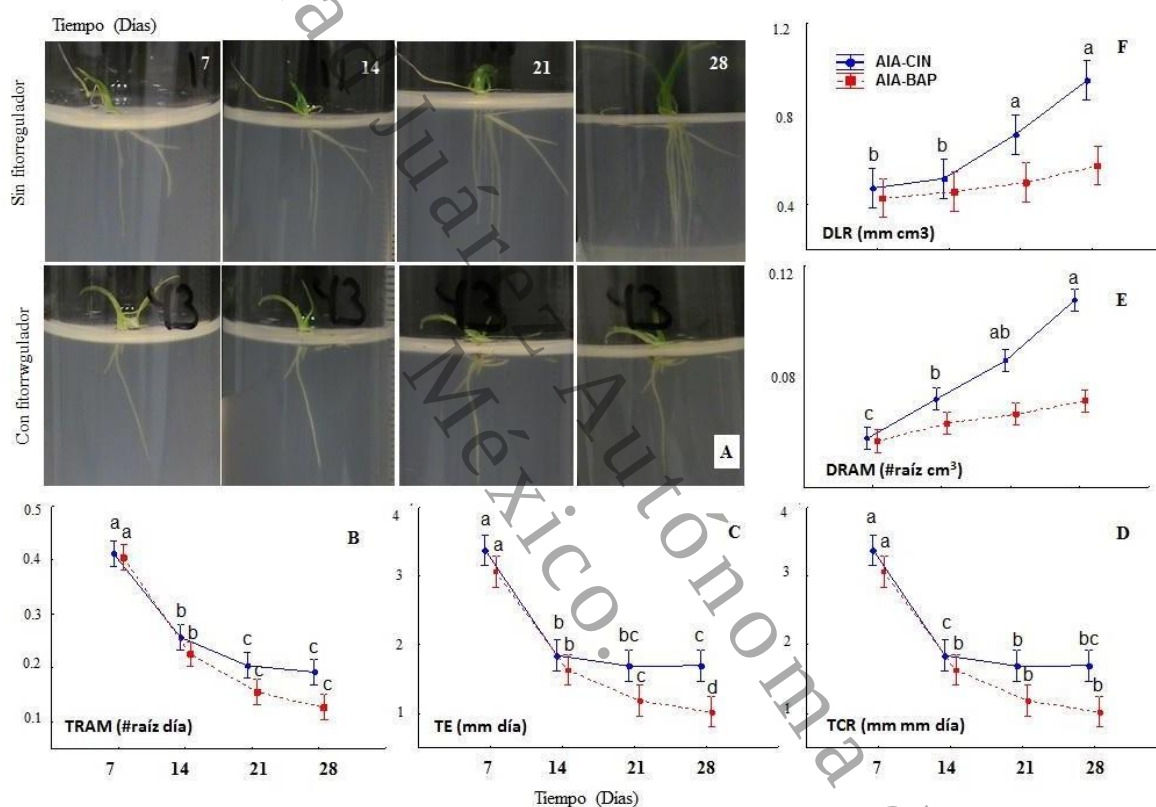


Figura 2. Dinámica del enraizamiento de germinados de *Typha domingensis*. A) Fenotipos radiculares contrastantes en R-LUZ del balance AIA/CIN sin fitorregulador (imágenes de línea superior) y con 10 mg/L CIN (imágenes de línea inferior) en los cuatro intervalos de tiempo. Curvas dinámicas del balance AIA-CIN (líneas azules=---) y AIA/BAP (líneas rojas=---) sobre la TRAM, tasa de ramificación (B), TE, tasa de elongación (C), TCR, tasa de crecimiento (D) DRAM, densidad de ramificación (E) y DLR, densidad de la longitud de la raíz (F).

Conforme a las máximas repuestas dinámicas de la TE, TRAM y TCR (7 d) y la DLR y DRAM (28 días), compartieron promedios la TE, DLR y DRAM en ausencia de fitorreguladores y de 0.1 mgL⁻¹ de CIN, y TE y TRAM con 0.1 mgL⁻¹ BAP. Los promedios bajos se asignaron a la mayoría de las variables en concentración media y alta de CIN o BAP y con AIA solo en la última concentración (Tabla S1B). En cambio, la DLR y DRAM fue baja desde 0.1 mgL⁻¹ de BAP. En términos cuantitativos las variables de elongación presentaron 10 veces mayor magnitud que las de ramificación (Figura 3, Tabla S1C).

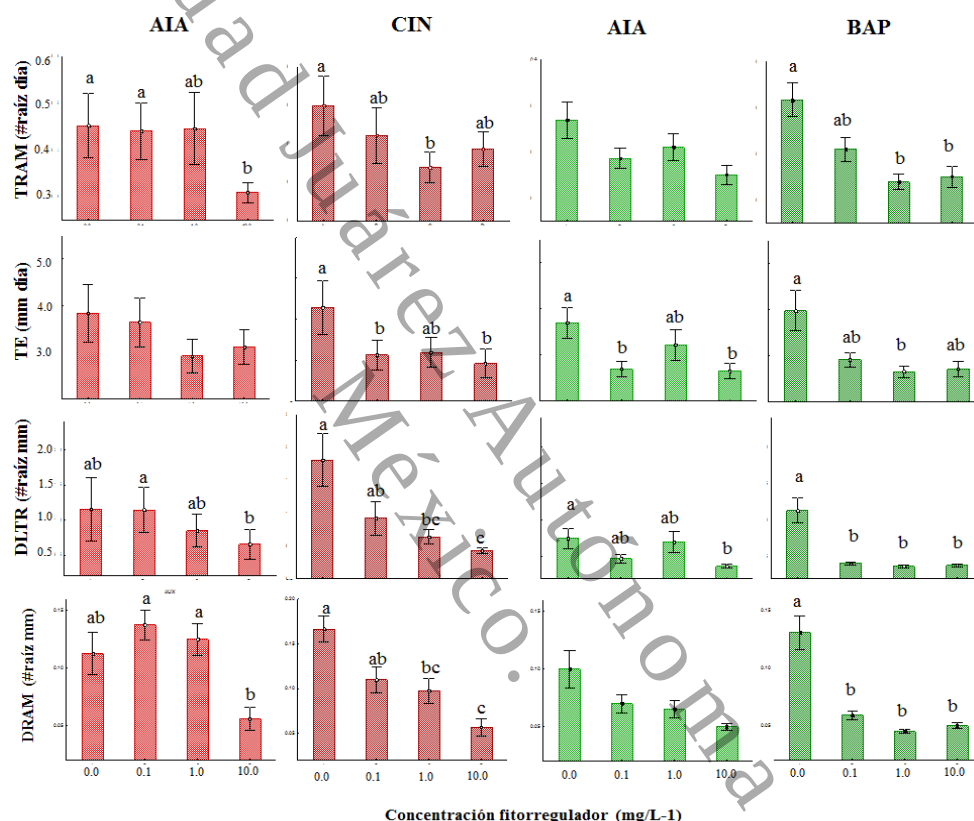


Figura 3. Efecto de las concentraciones de auxina y citocinina en tiempos de máxima respuesta sobre la rizogénesis de germinados *in vitro* de *Typha domingensis*. En la primera fila de gráficos la tasa de ramificación (TRAM), segunda fila la tasa de elongación (TE), tercera fila densidad de ramificación (DRAM) y cuarta fila densidad de la longitud de la raíz (DLR). La columna uno y dos de izquierda a derecha corresponden al experimento AIA-CIN, la segunda y tercera columna al experimento AIA-BAP. Literales diferentes indican medias que difieren significativamente ($p < 0.05$).

En referencia a los tratamientos de los balances AIA/CIN y AIA/BAP, se afectaron de forma significativa los promedios de LR y NR, TE, TRAM, TCR, DRAM y DLR ((Tablas S1B, S1D). La LR, NR, DLR fue homogénea en 10 tratamientos hasta concentraciones de 1 mg L^{-1} de CIN, balanceada o no con AIA, comparados con los grupos de la TRAM, TE y TCR que comprendió a dos o tres tratamientos hasta el límite de 0.1 mg L^{-1} de CIN. La homogeneidad de promedios fue similar con BAP, ya que la NR, LR, DRAM y DLR registraron a 10 u 11 tratamientos que incluyeron concentraciones hasta de 10 mg L^{-1} , en tanto que la TRAM solo fue parecida entre el testigo y el tratamiento con 0.1 de BAP (Tablas S1C y S1E). Por lo tanto, comparado con los promedios de LR y NR y algunos de densidad del SRA, sobresalieron los de velocidad porque se redujeron sensiblemente los grupos estadísticos. Por el menor efecto inhibitorio en términos de velocidad y densidad del SRA del germinado destacaron los tratamientos del balance AIA/CIN en rangos de concentración de 0 a 1.0 mg L^{-1} .

Crecimiento del SRA aislado en luz y oscuridad vs germinado

En luz, la concentración de AIA y el tipo del explante afectaron a la DRAM, TRAM, TE y DLR del SRA (Tabla S2A y Figura 4). La concentración de AIA modificó estas dinámicas de crecimiento del germinado (Tabla S2A y Figura 4), sin efectos de la CIN mostrando resultados similares a los obtenidos en el rango anterior de AIA/CIN (Tabla S2A y B).

Las raíces sin base caulinar del R-LUZ y R-OSC no presentaron cambios significativos durante el tiempo de cultivo, aparentemente fue infuncional (Figura 4). En reciprocidad, la raíz del germinado completo y el sistema raíz-base caulinar activaron diferencialmente el crecimiento por efecto del AIA en luz, pero fueron similares en oscuridad (Tabla S2B). En luz el germinado completo superó a la raíz-base caulinar en las cuatro variables dinámicas (Tabla S2B) y entre las concentraciones de AIA fueron equivalentes la TE, TRAM, DLR y DRAM en 0 y 0.1 mg L^{-1} de AIA y registraron los promedios más bajos con 1 mg L^{-1} de AIA (Figura 4).

Los efectos sinérgicos del AIA y la CIN sobre el crecimiento de la raíz se visualizan en las curvas bidimensionales construidas con los tratamientos de cada explante (Figura 3). En la raíz-base caulinar hubo mayor estimulación en la velocidad y densidad de ramificación con

0.01 mgL⁻¹ de AIA y CIN combinadas y cercano el tratamiento de 0.01 mgL⁻¹ de CIN, y fueron mejor inducido en luz que oscuridad. El germinado destacó con altos promedios en todos los parámetros en luz y oscuridad.

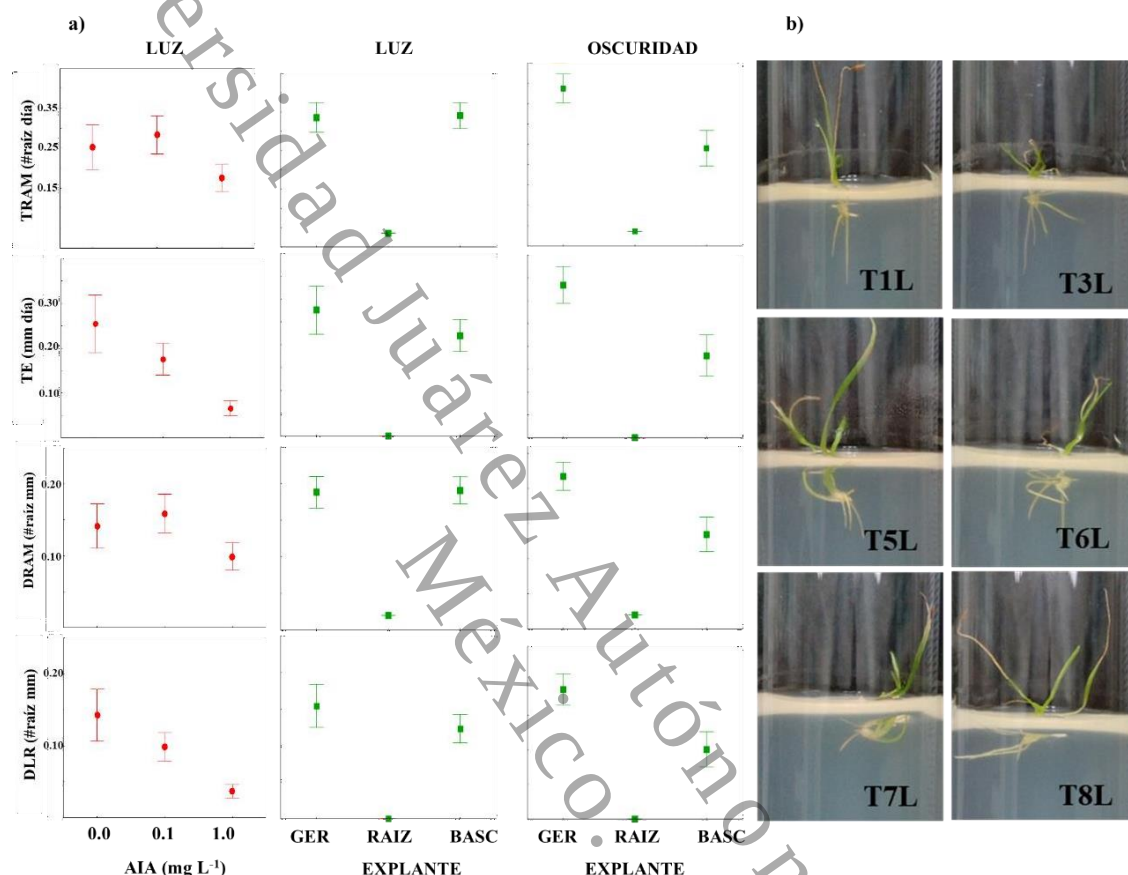


Figura 4. Velocidad y densidad del enraizamiento de *Typha domingensis* del segundo balance de AIA/CIN por explante. A) Efectos principales en luz y oscuridad B) Gráficas que destacan la tendencia de la CIN balanceada con AIA en la DRAM (izquierda) y TRAM (derecha) del sistema de raíz con base caulinar en condición de luz. Simbología; AIA= Ácido Indolacético, GER=germinado, BASC=base caulinar, TRAM=tasa de ramificación, TE= tasa de elongación, DRAM=densidad de ramificación y DLR, densidad de la longitud.

Selección de líneas rizogénicas

Las líneas rizogénicas adventicias (LRA) más dinámicas se seleccionaron de un número limitado de condiciones de cultivo en función de la velocidad y densidad del crecimiento radicular (Figura 5). De los conglomerados de R-LUZ, R-OSC y R-LUZ+R-OSC. Se

distinguieron seis LRA por presentar fenotipos radiculares más sobresalientes de longitud y ramificación, o alguna de las dos (Figura 5). Entre estas destaca el SRA con el explante caulinar que compitió con el SRA del germinado en las cuatro variables de calidad estimadas. En R-LUZ se hallaron tres grupos (Figura S3A) a un nivel de 0.15; el grupo uno incluyó una sola línea rizogénica (T1L) explante completo sin fitorregulador, que presentó el fenotipo con mayor TE y DLR. Mientras que en el grupo dos el fenotipo mayor fue TRAM y DRAM con tres LRA (T3L, T6L y T5L) las cuales contienen la dosis más baja de AIA. El grupo tres con dos LRA (T7L y T8L) se distinguió por la dosis alta de AIA. Por otra parte, en el R-OSC al mismo nivel de 0.15 mostró cuatro grupos (Figura S3B). El primer grupo incluyó la LRA, T1O sin fitorregulador con los promedios más altos de elongación y el segundo grupo la LRA T6O con dosis combinada de AIA/CIN con los mejores promedios de ramificación, ambas líneas tienen como explante un germinado completo. El tercer grupo integró dos líneas rizogénicas caracterizada por explantes de base caulinar y la presencia de un solo fitorregulador dosis alta de AIA (T7O) o CIN (T3O). El cuarto grupo incluyó las LRA con dosis combinadas de fitorreguladores, y se caracterizó por los promedios más bajos de las variables de calidad del sistema radicular.

El patrón de agrupamiento por la fusión de las dos matrices previas (R-LUZ+R-OSC) ubicó a tres grupos resultantes en nivel de 0.2. El grupo uno incluyó dos líneas rizogénicas, T1L y T1O de germinados sin fitorregulador. El grupo dos incluyó las líneas rizogénicas T6O y T6L germinados con combinaciones bajas de AIA y altas de CIN, las de raíz con base caulinar fueron T3L con dosis alta de CIN y T5L con dosis baja de AIA y CIN. En el tercer grupo incluyeron los tratamientos T3O de raíz con bases caulinares con dosis altas de CIN o AIA en T7O, T7L, T8L, T5O y T8O respectivamente. El grupo uno incluyó líneas rizogénicas que expresaron el fenotipo con mayor TE y DLR. Mientras que en el grupo dos fueron fenotipos que expresaron mayor TRAM y DRAM. En total se distinguieron las líneas T1O, T6O, T1L, T3L, T5L y T6L más dinámicas y fueron seleccionadas por presentar los fenotipos radiculares más veloces y densos, pero destacaron los fenotipos de las líneas T6O y T1O con mayor velocidad y densidad, la primera corresponde a ramificación y la segunda a elongación del germinado completo; los segundos mejores fenotipos radiculares del mismo explante se

encontraron en las líneas T1L y T6L. Cabe destacar las líneas rizogénicas T3L, T5L y T5O que presentaron las segundas mejores tasas de DRAM y TRAM en base caular.

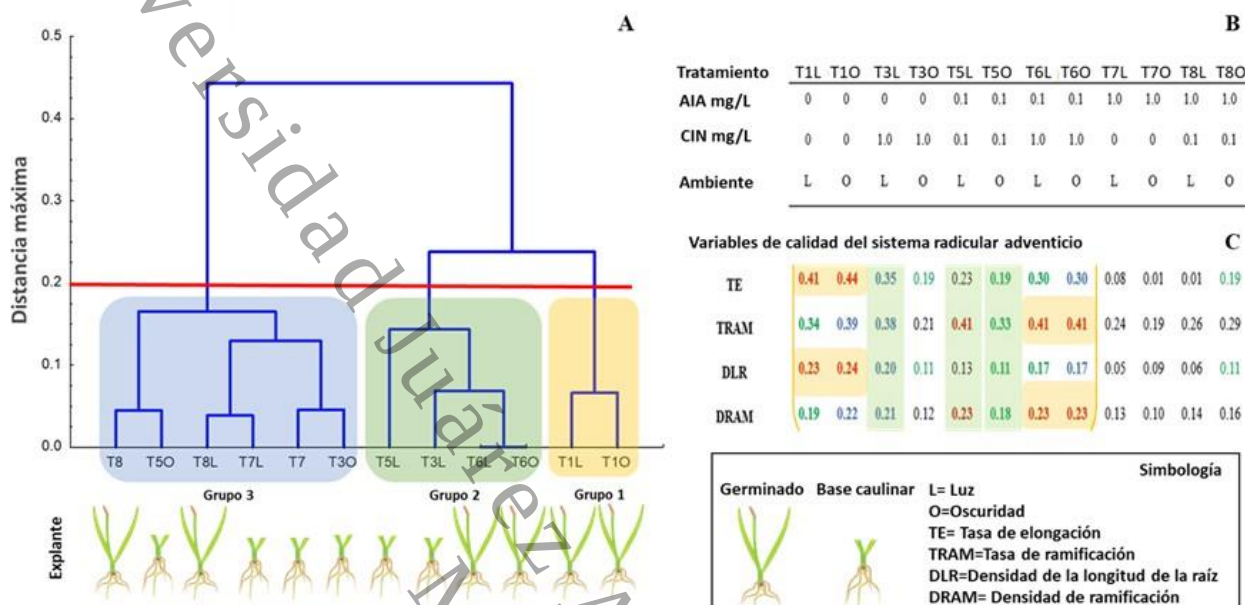


Figura 5. Clasificación de líneas rizogénicas de *Typha domingensis* basada en cuatro variables de calidad del sistema radicular adventicio. A) Dendrograma de doce líneas rizogénicas, B) Identidad por tratamiento, C) Matriz de valores de calidad (promedios): alto (rojo), medio (azul) y bajos (verde). AIA=Ácido indolacético, CIN=Cinetina.

Discusión

En los rizotrones *in vitro* se definieron las condiciones de inducción *in vitro* desencadenantes de diferentes líneas de raíces adventicias dinámicas de *Typha domingensis*. El cultivo de raíces aisladas se logró en conexión con la base caular, y como se esperaba de raíces del germinado entero. La permanencia de la base caular proporcionó al SRA la biosíntesis y distribución de auxina endógena que garantizó su actividad (Druegue et al. 2016).

Lo inesperado fue la inactividad de las raíces aisladas sin conexión alguna, incluso con AIA, lo cual contrastó con el crecimiento de las raíces *in vitro* de *Typha latifolia* (Santos-Díaz et al. 2007, Santos-Díaz y Barrón-Cruz 2011). Las diferencias son diversas, ellos usaron segmentos de raíz en estado maduro cultivados en medio líquido con sales MS 40% más

concentradas y con sacarosa, la mitad de la irradiancia y tiempo menos prolongado. En estas condiciones de cultivo reportaron adelgazamiento de la pared celular de las raíces aisladas que inhabilitó la capacidad de absorción de metales. Con base en esto, se infiere que las raíces en aislamiento total fueron más susceptibles que a aquellas que presentaron base caulinar a causa del agotamiento de las sales y minerales endógenos a pesar del biofilm inicial colocado en el sistema rizotónico. Así mismo, en condición de raíz aislada el aerénquima de *T. domingensis* se desconectó para transportar el O₂ a larga distancia, ya que la red de espacios lagunares es continua en dirección de hojas a raíces y se forma durante el desarrollo normal de la planta, aunque los espacios lagunares también se forman en respuesta al estrés, particularmente por hipoxia (Smith 2007). Otras diferencias ocurren en las respuestas rizogénicas aún entre las mismas especies por homeostasis de auxinas específicas de tejidos y señales recalcitrante y no recalcitrante del enraizamiento (Druege et al. 2016).

En los explantes de raíz y germinados el proceso autorregulador del crecimiento de la RA se alteró por los efectos promotores o inhibidores de los fitorreguladores adicionados. En el orden de los bioensayos, la raíz en planta completa dio las primeras pistas sobre el innecesario estímulo exógeno de los fitorreguladores con base en todas las mejores dinámicas del primer acercamiento con balances AA/CIN y AIA/BAP. La respuesta inhibitoria directa del AIA fue contrastante respecto a varias especies *Typhaceae* que han incrementado la biomasa con mayor concentración de AIA (Santos-Díaz y Barrón-Cruz 2011; Santos-Díaz et al. 2007). Respecto a la eficiencia cooperativa de fitorreguladores en los dos balances fue notorio el poco involucramiento de las citocinas en altas concentraciones como estimulantes rizogénicos, inclusive causaron fuerte inhibición en el orden de magnitud AIA > CIN > BAP. En especial fue marcada la mayor desaceleración de la velocidad y densidad de elongación y ramificación y la velocidad relativa en AIA/BAP comparada con AIA/CIN. Adicionalmente, en AIA/CIN fue específica en el acelerado incremento de las densidades de ramificación y elongación como se demuestra en la tendencia gráfica (ver, Figura 3). En consecuencia, para guiar la selección efectiva de las líneas rizogénicas los criterios aplicados para continuar con la optimización del sistema de raíces adventicias aisladas fueron los efectos positivos acelerados obtenidos en el explante completo con el mejor balance de AIA con CIN en menor rango de concentración. Con esta decisión se hizo más notable la

precisión de las respuestas de velocidad y densidad en función de la cantidad de fitorregulador y menos en las variables alométricas de ramificación y elongación comúnmente utilizadas en diferentes estudios.

De acuerdo con el objetivo, las diferencias esperadas a menores concentraciones de AIA y CIN se evidenciaron en presencia de luz en los dos explantes que tuvieron bases caulinares integradas, ya que el crecimiento de raíces totalmente aisladas como se mencionó antes fue inoperante. En luz la velocidad y densidad de ramificación del sistema raíz-base caular superó a aquellas del germinado, en cambio la velocidad y densidad de elongación favorecieron más al germinado, aunque en oscuridad los germinados destacaron con todas las variables en completa independencia de auxina. Con base en estos parámetros se puede afirmar que la contribución de la CIN mejoró las velocidades y densidades de ramificación de los explantes. Estas interpretaciones de crecimiento son compatibles con las teorías que indican la injerencia de las citocininas en la red de regulación exógena de RA y son las primeras citadas para *Typha* desde la perspectiva de la función dinámica. En la planta emergente *Oryza sativa*. Las citocininas se han implicado en la regulación de muchos aspectos del desarrollo, incluida la regulación del crecimiento de la raíz, la arquitectura de la raíz y el desarrollo vascular, mientras que la auxina promueve el desarrollo de la raíz e induce la diferenciación vascular. Tanto la auxina como las citocininas regulan el gravitropismo de la raíz.

Los crecimientos óptimos de las raíces aisladas con base caular y del germinado fueron descritos por el efecto directo del AIA y marginalmente por CIN en condiciones de luz, sin ser diferentes ambos efectos en oscuridad. En función de los tratamientos el sinergismo AIA/CIN mostró ser efectivo solo con 1.0 de CIN, con AIA/CIN en concentraciones equivalentes de 0.1 mg L^{-1} y más sensible a luz que oscuridad, siendo notable en la distinción de las respuestas de velocidad y densidad en función de la cantidad de fitorregulador y menos en las variables alométricas primarias de ramificación y elongación para la selección efectiva de las líneas rizogénicas. Es evidente que el menor rango de concentración la CIN en condiciones de iluminación contribuyó en revelar más la dinámica de la radiación espacial ramificante de la raíz aislada, como lo fue en la elongación del germinado. Desde el enfoque

de la absorción de los nutrientes, las dos óptimos de velocidad y densidad de ramificación de las raíces aisladas con base caulinar se encuentran ligadas a una eficiente superficie de contacto que será útil para las tecnologías innovadoras de remediación en los sistemas de tratamiento aguas residuales a cielo abierto.

Varios aspectos sobre crecimiento de raíces adventicias soportan los resultados generados en los rizotrones *in vitro* (Vandenbrink et al 2014): 1) la conservación de la gravedad que produce efectos importantes sobre las células meristemáticas que son las células totipotentes indiferenciadas y altamente proliferantes que sostienen el desarrollo de las plantas, 2) la función del transporte de auxina en gravitropismo, 3) el reciente conocimiento de la acción rizogénica de auxina en interacción estrecha y compleja con citocinina y con otras hormonas como las estrigolactonas en la regulación del crecimiento gravitrópico, 4) las evidencias que demuestran requerimientos de luz para desencadenar el gravitropismo en las plantas, 5) la menor dependencia al suministro de AIA exógeno en la redistribución de la auxina desde la base caulinar en dirección al ápice de la raíz, donde se añade a un fondo de auxina sintetizada localmente y forma un centro de auxina máxima, y la última 6) que direcciona el perfeccionamiento de los esquemas de cultivo de raíces sin inhibición mutua de los fitorreguladores de citocina.

El entorno experimental de los rizoclones *in vitro* con la raíz unida a la base caulinar proporcionó líneas rizogénicas dinámicas con indicadores de velocidad y densidad antagónicos y sinérgicos (Hussner 2010; Kalogiros et al. 2016; Judd et al. 2015; Silva-Navas 2015; Shi et al. 2018) que son promisorias para diferentes finalidades. Entre los grupos con la arquitectura de raíz aislada unida a base caulinar se distinguieron T5L y T3L, mejores en la TRAM y DRAM; adicionalmente la eficiencia en TE y DLR de los germinados incluyeron a T1L T1O T6L y T6O. En prospectiva cada tipo de línea rizogénica de raíces adventicias aisladas dinámicas de *Typha* representa una vía de proliferación para diferentes procesos tecnológicos de rizofiltración de agua aplicados a la depuración de nutrientes, metales y metaloides, xenobióticos y contaminantes emergentes. También pueden sustituir o ser complementarios en los procesos de potabilización del agua como la electrodiálisis, destilación, intercambio iónico, ósmosis inversa y la biodesnitrificación, dado sus costos

elevados (Henry *et al.* 2013; Bhatia & Goyal 2014; Mohsenipour *et al.* 2014), ser útiles en los procesos de oxidación avanzada aplicados a microcontaminantes emergentes (Rodríguez-Narvaez *et al.* 2017) y aplicarse a bioprocesos industriales innovadores ya que las herbáceas acuáticas son candidatas para producir bioproductos basados en plantas de alto valor que se usan en las tecnologías de biorefinación (Rodríguez-Dominguez *et al.* 2022). En investigación básica las líneas aisladas de *Typha* pueden retroalimentar el desarrollo de modelos de especies emergentes y el interés particular en profundizar sobre la plasticidad dinámica de la raíz adventicia frente al estrés ambiental (Silva-Navas 2015; Shi *et al.* 2018; Ge *et al.* 2019).

Conclusión

Las RA de *T. domingensis* generadas de germinados y de raíces aisladas con bases caulinares mostraron mayor dinámica de enraizamiento bajo la influencia de luz. Particularmente en las raíces aisladas unidas a la base caular, se activaron los procesos dinámicos que demostraron beneficios en la velocidad y densidad de ramificación con la contribución de la CIN, indistintamente al efecto de luz y oscuridad. No se descarta que el efecto del BAP y otras citocininas en concentraciones más reducidas mejoren las respuestas dinámicas de enraizamiento. De las seis líneas seleccionadas las que presentan raíces aisladas con bases caulinares, tienen un gran potencial para escalar a biorreactores por su menor complejidad metabólica y arquitectónica. Esta técnica es ideal para minimizar el estrés, ahorrar energía y mantener la entrada de agua y nutrientes durante la depuración del exceso de nutrientes y otros contaminantes en las aguas residuales. La próxima generación de tecnologías asociadas al tratamiento de aguas residuales tienen el reto de reducir las emisiones de carbono y disminuir el uso de procesos físicos y químicos de remoción de nitrógeno. Por lo que las RA como complemento en los procesos unitarios de tipo secundario o terciario de las aguas residuales contribuye a alcanzar el reto al intensificar el proceso y recuperación de los recursos para una mayor calidad del efluente. El siguiente paso es establecer un cultivo de RA y evaluar la eficiencia de remoción que permita comparar su poder depurativo versus el cultivo de plantas convencionales versus cultivo de hairy roots.

REFERENCIAS

- Adu M, Asare O, Asare-Bediako PA, Amenorpe E, Ackah G, Afutu FK, Yawson DO. 2018. Characterising shoot and root system trait variability and contribution to genotypic variability in juvenile cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. *Heliyon* 4(6), e00665. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00665>
- Arsova B, Foster KJ, Shelden MC, Bramley H, Watt M. 2020. Dynamics in plant roots and shoots minimize stress, save energy and maintain water and nutrient uptake. *New Phytol* 225(3):1111-1119. doi: 10.1111/nph.15955.
- Bansal S, Lishawa SC, Newman S. et al. 2019. *Typha* (Cattail) Invasion in North American Wetlands: Biology, Regional Problems, Impacts, Ecosystem Services, and Management. *Wetlands* 39: 645–684. <https://doi.org/10.1007/s13157-019-01174-7>
- Bellini C, Pacurar D, Perrone I. 2014. [Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences](#). *Annual Review of Plant Biology* 65(1): 639-666. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035645>
- Bhatia M, Goyal D. 2014. Analyzing remediation potential of wastewater through wetland plants: a review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33(1): 9-27. <https://doi.org/10.1002/ep.11822>
- Brix H, Dyhr-Jensen K, Lorenzen B. 2002. Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L. growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Journal of Experimental Botany* 53(379): 2441-2450. DOI: 10.1093/jxb/erf106
- Brix H, Lorenzen B, Mendelssohn IA, McKee KL, Miao S. 2010. Can differences in phosphorus uptake kinetics explain the distribution of cattail and sawgrass in the Florida Everglades? *BMC plant biology* 10(1): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-23>
- Dalla Vecchia A, Villa P, Bolpagni R. 2020. Functional traits in macrophyte studies: Current trends and future research agenda. *Aquatic Botany* 167, 103290. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2020.103290>
- Di Luca GA, Mufarrege MM, Hadad HR, Maine MA. 2019. Nitrogen and phosphorus removal and *Typha domingensis* tolerance in a floating treatment wetland. *Science of The Total Environment*. 650 (1): 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.042>

- Dhir B. 2017. Bioremediation Technologies for the Removal of Pollutants. In: Kumar, R., Sharma, A., Ahluwalia, S. (eds) *Advances in Environmental Biotechnology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4041-2_5
- Doran PM. 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnology and Bioengineering*. 103(1):60-76. <https://doi.org/10.1002/bit.22280>
- Druege U, Franken P, Hajirezaei MR. 2016. Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Frontiers in Plant Science* 7:381. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00381>
- Escutia-Lara Y, Barrera EDL, Martínez-de la Cruz Y, Lindig-Cisneros R. 2010. Respuesta a la adición de nitrógeno y fósforo en el crecimiento de *Typha domingensis* y *Schoenoplectus americanus*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (87):83-87. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57715868007>
- Ezaz Z, Azhar R, Rana A, et al. 2020. Current Trends of Phytoremediation in Wetlands: Mechanisms and Applications. In: Hasanuzzaman M. (eds) *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_28
- Figuerola-Bustos V, Palta J, Chen Y, Siddique K. 2018. Characterization of Root and Shoot Traits in Wheat Cultivars with Putative Differences in Root System Size. *Agronomy* 8(7):109. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy8070109>
- Gallei M, Luschnig C, Friml J. (2020). Auxin signaling in growth: Schrödinger's cat out of the bag. *Current Opinion in Plant Biology*, 53:43-49.
- García-Jiménez P, Navarro EP, Santana CH, et al. 2006. Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth in vitro of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquatic Botany*, 84(1):79-84. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2005.07.006>.
- Gonin M, Bergougnoux V, Nguyen TD, Gantet P, Champion A. 2019. What Makes Adventitious Roots? *Plants* (Basel, Switzerland), 8(7): 240. <https://doi.org/10.3390/plants8070240>
- Grzegórska A, Rybarczyk P, Rogala A, Zabrocki D. 2020. Phytoremediation—from Environment Cleaning to Energy Generation—Current Status and Future Perspectives. *Energies*, 13(11), 2905.

- Hegazy AK, Abdel-Ghani NT, El-Chaghabby GA. 2011. Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*. Int. J. Environ. Sci. Technol. 8:639–648 <https://doi.org/10.1007/BF03326249>
- Hernández-Piedra G, Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ, Hernández-Franyutti A, Azpeitia-Morales A. 2018. Morpho-histological development of the somatic embryos of *Typha domingensis*. PeerJ 6:e5952 <https://doi.org/10.7717/peerj.5952>
- Hussner A, Meyer C, Busch J. 2009. The influence of water level and nutrient availability on growth and root system development of *Myriophyllum aquaticum*. Weed Research, 49(1): 73-80.
- Jiang, W., Zhou, S., Huang, H, et al. 2020. MERISTEM ACTIVITYLESS (MAL) is involved in root development through maintenance of meristem size in rice. Plant Mol Biol <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01053-4>
- Judd LA, Jackson BE, Fonteno WC. 2015. Advancements in root growth measurement technologies and observation capabilities for container-grown plants. Plants, 4(3), 369-392.
- Kalogiros DI, Adu MO, White PJ, Broadley MR, Draye X, Ptashnyk M, ... & Dupuy LX. 2016. Analysis of root growth from a phenotyping data set using a density-based model. *Journal of experimental botany*, 67(4):1045-1058.
- Krzyzaniak Y, Cointault F, Loupiac C, Bernaud E, Ott F, Salon C, Laybros A, Han S, Héloir MC, Adrian M, Trouvelot S. 2021. *In situ* Phenotyping of Grapevine Root System Architecture by 2D or 3D Imaging: Advantages and Limits of Three Cultivation Methods. Front Plant Sci. 29;12:638688. doi: 10.3389/fpls.2021.638688.
- Mexicano L, Nagler PL, Zamora-Arroyo F, Glenn EP. 2013. Vegetation dynamics in response to water inflow rates and fire in a brackish *Typha domingensis* Pers. marsh in the delta of the Colorado River, Mexico, Ecological Engineering. 59:167-175. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.06.046>
- Mohsenipour M, Shahid S, Ebrahimi, K. 2014. Removal techniques of nitrate from water. *Asian Journal of Chemistry*, 26(23):7881.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Li SW. 2021 Molecular Bases for the Regulation of Adventitious Root Generation in Plants. *Front Plant Sci.*12:614072. Doi: 10.3389/fpls.2021.614072.

Postma JA, Schurr U, Fiorani F. 2014. Dynamic root growth and architecture responses to limiting nutrient availability: linking physiological models and experimentation. *Biotechnol Adv.* 32(1):53-65. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.019.

Li S, Mendelssohn IA, Chen H, Orem WH. (2009). Does sulphate enrichment promote the expansion of *Typha domingensis* (cattail) in the Florida Everglades? *Freshwater Biology*, 54(9): 1909-1923.

Rodriguez-Dominguez, M. A., Bonefeld, B. E., Ambye-Jensen, M., Brix, H., & Arias, C. A. 2022. The use of treatment wetlands plants for protein and cellulose valorization in biorefinery platform. *Science of the Total Environment*, 810, 152376.

Rodríguez-Narváez OM, Peralta-Hernandez JM, Goonetilleke A, Bandala ER. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323: 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>

Rout PR, Zhang, TC, Bhunia P, Surampalli RY. 2021. Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 753, 141990.

Ryder, G. 2017. Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos, 2017: Aguas residuales: el recurso no explotado. Programa Mundial de la UNESCO de Evaluación de los Recursos Hídricos . 202 pp. ISBN: 978-92-3-300058-2

Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ. 2008. Development of a model for in vitro culture of *Vallisneria americana* Michx. *Universidad y ciencia*, 24(3), 205-218.

Sato Y Goto S, Teraoka S, Takagaki K, Takehara A, Sano S, Sakakibara M. 2017. Establishment of an Aseptic Culture System and Analysis of the Effective Growth Conditions for *Eleocharis acicularis* Ramets for Use in Phytoremediation. *Environments*, 4(2): 40. Doi:10.3390/environments4020040

Steffens B, Rasmussen A. 2016. The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2):603-617.

Santos-Díaz MDS, Barrón-Cruz MDC, Alfaro de la Torre MC. 2007. Induction of *in vitro* roots cultures of *Typha latifolia* and *Scirpus americanus* and study of their capacity to remove heavy metals. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3): 417-424.

- Santos-Díaz MS, Barrón-Cruz MC. 2011. Lead, Chromium and Manganese Removal by in Vitro Root Cultures of Two Aquatic Macrophytes Species: *Typha Latifolia* L. and *Scirpus Americanus* Pers., International Journal of Phytoremediation, 13(6): 538-551.
- Sricoth T, Meeinkuirt W, Pichtel J, Taeprayoon P, Saengwilai P. 2018. Synergistic phytoremediation of wastewater by two aquatic plants (*Typha angustifolia* and *Eichhornia crassipes*) and potential as biomass fuel. Environ Sci Pollut Res Int. 25(6):5344-5358. doi: 10.1007/s11356-017-0813-5..
- Singh P, Mohanta TK, Sinha AK. 2015. Unraveling the intricate nexus of molecular mechanisms governing rice root development: OsMPK3/6 and auxin-cytokinin interplay. PLOS ONE 10:e0123620
- Silva-Navas J, Moreno-Risueno MA, Manzano C, Pallero-Baena M, Navarro Neila S, Tellez-Robledo B, Garcia-Mina J, Baigorri R, Gallego J, del Pozo JC. 2015. D-Root, a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. The Plant Journal 84: 244–255. doi:10.1111/tpj.12998
- Smith F. A. 2007. Plant roots: Growth, activity and interaction with soils. *Annals of Botany*, 100(1), 151–152. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm099>
- Tillich HJ. 2007. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (monocotyledons). *Annals of botany*, 100(7): 1413–1429. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm238>
- Sun H, Tao J, Hou M, et al. 2015. A strigolactone signal is required for adventitious root formation in rice. *Annals of Botany*, 5(7):1155–1162. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv052>
- Kumar V, Satyanarayana KV, Itty SS, Indu EP, Giridhar P, Chandrashekar A, Ravishankar GA. 2006. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. Plant Cell Rep 25:214–222.
- Kumar A, Simmi PS, Giridhar P. 2018. Cell wall remodelling involving galactomannan de-branching influence *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Coffea canephora* somatic embryos. Plant Cell Tiss Organ Cult. 134: 369-382. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1428-3>
- Lobet G, Draye X, Périlleux C. 2013. An online database for plant image analysis software tools. Plant Methods. 9(1):38. [https://doi: 10.1186/1746-4811-9-38](https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-38)

- Vandenbrink JP, Kiss JZ, Herranz R and Medina FJ. 2014. Light and gravity signals synergize in modulating plant development. *Front. Plant Sci.* 5:563. [doi: 10.3389/fpls.2014.00563](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00563)
- Voccianti M, Alessandra De Folly D, Finocchi A, et al. 2018. Adsorption of ammonium on clinoptilolite in presence of competing cations: Investigation on groundwater remediation. *Journal of Cleaner Production.* 198: 480-487.
- Ward MH, Jones RR, Brender JD, et al. 2018. Drinking Water Nitrate and Human Health: An Updated Review. *International journal of environmental research and public health*, 15(7):1557. [https://doi:10.3390/ijerph15071557](https://doi.org/10.3390/ijerph15071557)
- Wang YY, Cheng Y, Chen K, Tsay Y. 2018. Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69:85–122.
- Wu D, Wang H, Wang H, Wang Z, Cai W. 2018. Effects of the combined application of indole acetic acid and kinetin on the arsenic extraction efficiency of soil after planting *Pteris vittata*. *Journal of Agro-Environment Science.* 37(8):1705-1715.
- Wurtsbaugh W, A Paerl HW, Dodds WK. 2019. Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 6(5): e1373.
- Yadav KK, Gupta N, Kumar et al. 2018. Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: a review on application and future prospects. *Ecol. Eng.* 120: 274-298.
- Yan A, Wang Y, Tan SN, et al. 2020. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11:359.
- Yang Y, Shen Q. 2020. Phytoremediation of cadmium-contaminated wetland soil with *Typha latifolia* L. and the underlying mechanisms involved in the heavy-metal uptake and removal. *Environ Sci Pollut Res Int.* 27(5):4905-4916. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.74749>

Suplemento 1. Tablas resumen de pruebas estadísticas y promedios

Tabla S1A. Tiempos de máxima respuesta en AIA-CIN y AIA-BAP.

Variable dependiente	SEMANA						Parámetros estadísticos	
	Nr	HV	1	2	3	4	H	P
AIA-CIN							N=384	
TE	0.01	0	3.37±0.13 ^a	1.83±0.09 ^b	1.66±0.12 ^{bc}	1.69±0.15 ^c	123.36	0.00**
TRAM	0.01	0	0.41±0.02 ^a	0.25±0.01 ^b	0.20±0.01 ^c	0.19±0.01 ^c	121.74	0.00**
TCR	0.01	0	0.18±0.01 ^a	0.00 ^c	0.03±0.01 ^b	0.02±0.01 ^{bc}	206.17	0.00**
DLR	0.01	0	0.47±0.02 ^b	0.51±0.03 ^b	0.70±0.05 ^a	0.94±0.08 ^a	33.03	0.00**
DRAM	0.01	0	0.05±0.002 ^c	0.07±0.003 ^b	0.08±0.004 ^a _b	0.10±0.006 ^a	43.71	0.00**
AIA-BAP							N=384	
TE	0.01	0	3.06±0.14 ^a	1.63±0.09 ^b	1.18±0.08 ^c	1.02±0.10 ^d	210.92	0.00**
TRAM	0.01	0	0.40±0.01 ^a	0.22±0.01 ^b	0.15±0.01 ^c	0.12±0.01 ^c	207.17	0.00**
TCR	0.01	0	0.17±0.01 ^a	0.004±0.01 ^b	0.005±0.01 ^b	0.005±0.01 ^b	175.37	0.00**
DLR	0.01	0	0.42±0.02	0.45±0.02	0.49±0.04	0.57±0.05	1.2944	0.73
DRAM	0.01	0	0.05±0.00	0.06±0.00	0.06±0.00	0.07±0.01	1.1518	0.76

p<0.01** (muy significativo); p<0.05* (significativo); p<0.1⁺ (marginamente significativo).

TE= Tasa de elongación, TRAM=Tasa de ramificación, TCR=Tasa de crecimiento relativo, DRAM= Densidad de ramificación, DLTR= Densidad de la longitud total de la raíz. AIA=Ácido indolacético, CIN=Cinetina, BAP= Bencilaminopurina.

Tabla S1B. Resumen estadístico de las variables de Velocidad y Superficie de contacto en el EXP 1 AIA-CIN.

Variable dependiente	Fuente de Variación	Parámetros estadísticos					
		gl	SC	CM	H	F	P
TE	AIA	3			5.8405		0.119
	CINETINA	3			12.0459		0.007**
	AIA *CIN	9	11.597	1.289		1.0554	0.405
	Tratamiento	15	50.390	3.359		2.7516	0.001**
TRAM	AIA	3			13.363		0.004**
	CINETINA	3			10.9984		0.011**
	AIA *CIN	9	0.10693	0.01188		0.5410	0.840
	Tratamiento	15	0.75168	0.05011		2.2816	0.009**
TCR	AIA	3	0.018025	0.006008		2.576	0.059
	CINETINA	3	0.034452	0.011484		4.923	0.003*
	AIA *CIN	9	0.011261	0.001329		0.570	0.817
	Tratamiento	15	0.064975	0.004332		1.857	0.041*
NR	AIA	3			14.5155		0.002
	CINETINA	3			31.1117		0.001
	Tratamiento	15			55.1376		0.001
DRAM	AIA	3	0.087907	0.029302		9.6974	0.001**
	CINETINA	3	0.148579	0.049526		17.0048	0.001**
	AIA *CIN	9	0.065904	0.007323		2.5142	0.013*
	Tratamiento	15	0.308096	0.020540		7.0523	0.001**
LTR	AIA	3			8.4378		0.037*
	CINETINA	3			36.7283		0.001**
	Tratamiento	15			54.2748		0.001**
DLTR	AIA	3			8.4378		0.037*
	CINETINA	3			36.7283		0.001**
	Tratamiento	15			54.2748		0.001**

p<0.01** (muy significativo); p<0.05* (significativo); p<0.1⁺ (marginamente significativo).

TE= Tasa de elongación, TRAM=Tasa de ramificación, TCR=Tasa de crecimiento relativo, NR=Número de raíces, DRAM=Densidad de ramificación, LTR=Longitud total de la raíz, DLTR=Densidad de la longitud total de la raíz, AIA=Ácido Indolacético, CIN=Cinetina.

Tabla S1C. Promedios de velocidad y superficie de contacto del sistema radicular de germinados *in vitro* de *Typha domingensis* del EXP 1 AIA-CIN.

	NR	LR	Superficie de contacto		Velocidad		
			DRAM	DLR	TE	TRAM	TCR
AIA-CIN	#raíz planta ⁻¹	mm planta ⁻¹	#raíz cm ³	mm cm ³	mm día	#raíz día ⁻¹	mm mm ⁻¹ día ⁻¹
0.0 - 0.0	11.67±0.95	150.02±9.94 ^a	0.23±0.02 ^a	3.00±0.20 ^c	5.57±0.83 ^a	0.62±0.08 ^a	0.26 ±0.02 ^a
0.0 - 0.1	5.00±1.10 ^{abc}	30.38±2.85 ^{ab}	0.10±0.02 ^{def}	0.61±0.06 ^{ab}	3.19±0.35 ^c	0.43±0.06 ^{bcd}	0.18±0.02 ^c
0.0 - 1.0	3.33±0.56 ^{bc}	27.30±3.73 ^{ab}	0.07±0.01 ^{ef}	0.55±0.07 ^{ab}	3.36±0.26 ^c	0.36±0.05 ^{bcd}	0.19±0.01 ^{bc}
0.0 - 10.0	3.00±0.37 ^{bc}	22.77±2.10 ^b	0.06±0.01 ^{ef}	0.46±0.04 ^b	3.23±0.38 ^c	0.40±0.04 ^{bcd}	0.18±0.02 ^{bc}
0.1 - 0.0	7.50±1.28 ^{abc}	90.97±21.65 ^{ab}	0.15±0.03 ^{bc}	1.82±0.43 ^{ab}	4.74±0.59 ^{ab}	0.52±0.06 ^{ab}	0.24±0.02 ^{ab}
0.1 - 0.1	7.33±1.02 ^{abc}	66.10±15.61 ^{ab}	0.14±0.02 ^{bc}	1.32±0.31 ^{ab}	3.67±0.43 ^{bc}	0.45±0.08 ^{abcd}	0.20±0.02 ^{abc}
0.1 - 1.0	7.67±0.67 ^{abc}	49.98±3.47 ^{ab}	0.15±0.01 ^{bc}	1.00±0.07 ^{ab}	3.29±0.58 ^c	0.38±0.06 ^{bcd}	0.18±0.03 ^c
0.1 - 10.0	3.17±0.40 ^{bc}	21.67±2.33 ^b	0.06±0.01 ^{ef}	0.43±0.05 ^b	2.86±0.27 ^c	0.40±0.04 ^{bcd}	0.17±0.02 ^c
1.0 - 0.0	8.50±0.56 ^{ab}	66.86±8.07 ^{ab}	0.17±0.01 ^{ab}	1.34±0.16 ^{ab}	3.36±0.51 ^c	0.52±0.10 ^{ab}	0.18±0.03 ^{bc}
1.0 - 0.1	6.80±0.95 ^{abc}	55.17±16.13 ^{ab}	0.14±0.02 ^{bcd}	1.10±0.32 ^{ab}	2.74±0.23 ^c	0.50±0.10 ^{abc}	0.16±0.01 ^c
1.0 - 1.0	5.33±1.23 ^{abc}	26.33±4.21 ^{ab}	0.11±0.06 ^{cde}	0.53±0.08 ^{ab}	2.83±0.33 ^c	0.33±0.03 ^{cd}	0.17±0.02 ^c
1.0 - 10.0	3.00±0.45 ^{bc}	26.45±2.31 ^b	0.06±0.01 ^{ef}	0.41±0.05 ^b	2.74±0.41 ^c	0.43±0.06 ^{bcd}	0.16±0.02 ^c
10.0 - 0.0	5.00±0.86 ^{abc}	54.62±16.62 ^{ab}	0.10±0.02 ^{def}	1.09±0.33 ^{ab}	3.47±0.38 ^{bc}	0.33±0.03 ^{cd}	0.20±0.02 ^{bc}
10.0 - 0.1	4.00±0.93 ^{abc}	32.81±6.13 ^b	0.08±0.05 ^f	0.66±0.21 ^b	2.90±0.44 ^c	0.31±0.02 ^{cd}	0.17±0.02 ^c
10.0 - 1.0	2.05±0.22 ^{bc}	23.78±2.16 ^b	0.05±0.00 ^{ef}	0.48±0.04 ^b	3.25±0.31 ^c	0.29±0.00 ^d	0.19±0.02 ^{bc}
10.0 - 10.0	2.33±0.21 ^c	20.33±2.98 ^b	0.05±0.01 ^f	0.40±0.06 ^b	2.84 ±0.43 ^c	0.31±0.02 ^{cd}	0.16±0.02 ^c

p<0.01** (muy significativo); p<0.05* (significativo); p<0.1 (marginamente significativo).

TE= Tasa de elongación, TRAM=Tasa de ramificación, TCR=Tasa de crecimiento relativo, NR=Número de raíces, DRAM=Densidad de ramificación, LTR=Longitud total de la raíz, DLTR=Densidad de la longitud total de la raíz, AIA=Ácido indolacético, CIN=Cinetina.

Tabla S1D. Resumen estadístico de las variables de velocidad y vuperficie de contacto en el EXP 2 AIA-BAP.

Variable dependiente	Fuente de Variación	Parámetros estadísticos					
		gl	SC	CM	H or U	F	P
TE	AIA	3			13.426		0.003**
	BAP	3			8.757		0.032*
	Tratamiento	15			33.812		0.003
TRAM	AIA	3			6.541		0.088
	BAP	3			19.371		0.001**
	AUX*BAP	9	0.31831	0.03537		2.677	0.009
	Tratamiento	15	0.98310	0.06554		4.962	0.001**
TCR	AIA	3	0.031321	0.010440		5.630	0.001
	BAP	3			8.781		0.035*
	Tratamiento	15			33.809		0.032
NR	AIA	3			9.297		0.025*
	BAP	3			38.243		0.001**
	Tratamiento	15			64.016		0.001**
DRAM	AIA	3			9.297		0.025*
	BAP	3			38.243		0.001**
	Tratamiento	15			64.016		0.001**
LTR	AIA	3			11.591		0.008**
	BAP	3			24.906		0.001**
	Tratamiento	15			52.690		0.001**
DLTR	AIA	3			11.572		0.009**
	BAP	3			24.909		0.001**
	Tratamiento	15			52.713		0.001**

p<0.01** (muy significativo); p<0.05* (significativo); p<0.1⁺ (marginamente significativo).

TE= Tasa de elongación, TRAM=Tasa de ramificación, TCR=Tasa de crecimiento relativo, NR=Número de raíces, DRAM=Densidad de ramificación, LTR=Longitud total de la raíz, DLTR=Densidad de la longitud total de la raíz, AIA=Ácido indolacético, BAP=Bencilaminopurina.

Tabla S1E. Promedios de velocidad y superficie de contacto del sistema radicular de germinados *in vitro* de *T. domingensis* del Experimento 2 AIA-BAP.

AIA-BAP			Superficie de contacto		Velocidad		
	NR	LTR	DRAM	DLTR	TE ^{ns}	TRAM	TCR ^{ns}
	#raíz planta ⁻¹	mm planta ⁻¹	#raíz cm ³	mm cm ³	mm día ⁻¹	#raíz día ⁻¹	mm mm ⁻¹ día ⁻¹
0.0 - 0.0	11.33±0.84 ^a	84.18±16.62 ^a	0.23±0.02 ^a	1.68±0.12 ^a	5.43±1.04	0.60±0.10 ^a	0.25±0.03
0.0 - 0.1	3.04±0.40 ^{abc}	22.87±0.83 ^{ab}	0.06±0.02 ^{abc}	0.46±0.02 ^{ab}	3.27±0.12	0.55±0.06 ^{abc}	0.19±0.01
0.0 - 1.0	2.33±0.21 ^{bc}	19.25±1.46 ^{ab}	0.05±0.01 ^{bc}	0.39±0.03 ^{ab}	2.80± 0.20	0.33± 0.03 ^{ef}	0.17±0.01
0.0 - 10.0	2.50±0.22 ^{bc}	23.20±2.03 ^{ab}	0.05 ±0.01 ^{bc}	0.46±0.04 ^{ab}	3.31± 0.29	0.36±0.05 ^{def}	0.02 ±0.01
0.1 - 0.0	6.33±0.67 ^{ab}	40.78±8.26 ^{ab}	0.13±0.03 ^{ab}	0.82±0.17 ^{ab}	3.16± 0.36	0.48±0.05 ^{bcd}	0.18 ±0.01
0.1 - 0.1	3.00±0.37 ^{abc}	20.20 ±3.30 ^{ab}	0.06 ±0.02 ^{abc}	0.40±0.07 ^{ab}	2.85±0.46	0.40± 0.04 ^{def}	0.16 ±0.03
0.1 - 1.0	2.00±0.00 ^c	17.05±1.96 ^b	0.04±0.00 ^c	0.34 ±0.0 ^{4b}	2.44± 0.28	0.29±0.00 ^f	0.14 ±0.02
0.1 - 10.0	2.67±0.21 ^{abc}	16.23±1.42 ^b	0.05 ±0.01 ^{abc}	0.32±0.03 ^b	2.32± 0.20	0.38± 0.03 ^{ef}	0.14±0.01
1.0 - 0.0	6.00±0.58 ^{ab}	83.92±17.37 ^a	0.12 ±0.03 ^{ab}	1.68±0.35 ^a	4.85±1.08	0.57± 0.05 ^{ab}	0.23 ±0.02
1.0 - 0.1	2.17±0.17 ^{bc}	17.12±1.94 ^b	0.04±0.01 ^{bc}	0.34±0.04 ^b	2.52± 0.14	0.31±0.02 ^{ef}	0.15 ±0.01
1.0 - 1.0	2.50±0.22 ^{abc}	19.78±1.65 ^{ab}	0.05±0.01 ^{abc}	0.40±0.03 ^{ab}	2.83± 0.24	0.43± 0.04 ^{cde}	0.17±0.01
1.0 - 10.0	2.23±0.21 ^{bc}	18.93±0.99 ^{ab}	0.05±0.00 ^{bc}	0.38±0.02 ^{ab}	2.67± 0.16	0.33± 0.05 ^{ef}	0.16 ±0.01
10.0 - 0.0	2.50±0.34 ^{abc}	17.40±0.83 ^b	0.05 ±0.02 ^{abc}	0.35±0.02 ^b	2.49± 0.12	0.38± 0.05 ^{def}	0.15±0.01
10.0 - 0.1	2.83±0.31 ^{abc}	21.18±2.58 ^{ab}	0.06 ±0.00 ^{abc}	0.42±0.04 ^{ab}	3.01± 0.36	0.38±0.03 ^{def}	0.17±0.02
10.0 - 1.0	2.17±0.17 ^{bc}	17.93±2.30 ^{ab}	0.04±0.01 ^{bc}	0.36±0.05 ^{ab}	2.56± 0.33	0.31±0.05 ^{ef}	0.15±0.02
10.0 - 10.0	2.50±0.34 ^{abc}	17.82±3.11 ^b	0.05 ±0.01 ^{abc}	0.36±0.06 ^b	2.55±0.44	0.33±0.06 ^{ef}	0.15±0.02

p<0.01** (muy significativo); p<0.05* (significativo); p<0.1⁺ (marginamente significativo). TE= Tasa de elongación, TRAM=Tasa de ramificación, TCR=Tasa de crecimiento relativo, NR=Número de raíces, DRAM=Densidad de ramificación, LR=Longitud total de la raíz, DLR=Densidad de la longitud total de la raíz, AIA=Ácido indolacético, CIN=Cinetina

Suplemento 2. Tablas resumen de pruebas estadísticas y promedios

Tabla S2A. Resumen estadístico de las variables de Velocidad y Superficie de contacto en el EXP 3 Luz y EXP 4 Oscuridad.

Variable dependiente	Fuente de Variación	Parámetros estadísticos				
		SC	gl	CM	F	P
Luz						
TRAM	AIA	0.091213	2	0.045607	4.17408	0.022976
	CIN	0.036111	2	0.018056	1.65251	0.205038
	EXP	0.914512	2	0.457256	41.84981	0.000000
TE	AIA	0.269163	2	0.134582	10.39851	0.000250
	CIN	0.078260	2	0.039130	3.02340	0.060466
	EXP	0.637612	2	0.318806	24.63269	0.000000
DRAM	AIA	0.028604	2	0.014302	4.17408	0.022976
	CIN	0.011324	2	0.005662	1.65251	0.205038
	EXP	0.286791	2	0.143396	41.84981	0.000000
DLTR	AIA	0.084410	2	0.042205	10.39851	0.000250
	CIN	0.024542	2	0.012271	3.02340	0.060466
	EXP	0.199955	2	0.099978	24.63269	0.000000
Oscuridad						
TRAM	AIA	0.055159	2	0.027579	1.84759	0.171497
	CIN	0.001757	2	0.000879	0.05886	0.942920
	EXP	0.826077	2	0.413039	27.67020	0.000000
TE	AIA	0.064737	2	0.032368	1.90507	0.162757
	CIN	0.036004	2	0.018002	1.05952	0.356640
	EXP	0.719694	2	0.359847	21.17901	0.000001
DRAM	AIA	0.017298	2	0.008649	1.84759	0.171497
	CIN	0.000551	2	0.000276	0.05886	0.942920
	EXP	0.259058	2	0.129529	27.67020	0.000000
DLTR	AIA	0.020302	2	0.010151	1.90507	0.162757
	CIN	0.011291	2	0.005645	1.05952	0.356640
	EXP	0.225696	2	0.112848	21.17901	0.000001

$p < 0.01^{**}$ (muy significativo); $p < 0.05^{*}$ (significativo); $p < 0.1^{+}$ (marginamente significativo).

TE= Tasa de elongación, TRAM=Tasa de ramificación, DRAM=Densidad de ramificación, DLTR=Densidad de la longitud total de la raíz. AIA=Ácido indolacético, CIN=Cinetina y EXP= Explante.

Tabla S2B. Efecto en la velocidad y superficie de contacto del sistema radicular de germinados, raíz y base caular de *T. domingensis* en los EXP 3 LUZ y EXP 4 OSCURIDAD.

TRA	AIA	CIN	EXP	NR	LTR	TRAM	TE	DRAM	DLTR
Oscuridad									
T1	0.0	0.0	Germinado	11.00±1.10	12.20±1.64	0.39±0.39	0.44±0.06	0.22±0.02	0.24±0.03
T2	0.0	0.1	Raíz	1.00±0.00	0.00	0.04±0.00	0.00	0.02±0.00	0.00
T3	0.0	1.0	BC	5.80±2.44	5.30±3.35	0.21±0.09	0.19±0.12	0.12±0.05	0.11±0.07
T4	0.1	0.0	Raíz	1.00±0.00	0.00	0.04±0.00	0.00	0.02±0.00	0.00
T5	0.1	0.1	BC	9.20±1.53	5.44±0.90	0.33±0.05	0.19±0.03	0.18±0.03	0.11±0.02
T6	0.1	1.0	Germinado	11.4±0.68	8.38±0.71	0.41±0.02	0.30±0.03	0.23±0.01	0.17±0.01
T7	1.0	0.0	BC	5.20±2.27	4.38±2.17	0.19±0.08	0.16±0.08	0.10±0.05	0.09±0.04
T8	1.0	0.1	Germinado	8.20±2.35	5.32±1.79	0.29±0.08	0.19±0.06	0.16±0.05	0.11±0.04
T9	1.0	1.0	Raíz	1.00±0.00	0.00	0.04±0.00	0.00	0.02	0.00
Luz									
T1	0.0	0.0	Germinado	9.60±2.87	11.60±3.58	0.34±0.10	0.41±0.13	0.19±0.06	0.23±0.07
T2	0.0	0.1	Raíz	1.00±0.00	0.00	0.04±0.00	0.00	0.02±0.00	0.00
T3	0.0	1.0	BC	10.60±1.69	9.76±1.48	0.38±0.06	0.35±0.05	0.21±0.03	0.20±0.03
T4	0.1	0.0	Raíz	1.00±0.00	0.00	0.04±0.00	0.00	0.02±0.00	0.00
T5	0.1	0.1	BC	11.40±0.68	6.38±0.79	0.41±0.02	0.23±0.03	0.23±0.01	0.13±0.02
T6	0.1	1.0	Germinado	11.40±0.68	8.38±0.71	0.41±0.02	0.30±0.03	0.23±0.01	0.17±0.01
T7	1.0	0.0	BC	6.60±1.57	2.34±0.60	0.24±0.06	0.08±0.02	0.13±0.03	0.05±0.01
T8	1.0	0.1	Germinado	7.20±1.11	3.18±0.71	0.26±0.04	0.11±0.03	0.14±0.02	0.06±0.01
T9	1.0	1.0	Raíz	1.00±0.00	0.00	0.04±0.00	0.00	0.02±0.00	0.00

$p < 0.01^{**}$ (muy significativo); $p < 0.05^{*}$ (significativo); $p < 0.1^{+}$ (marginamente significativo).

TE= Tasa de elongación, TRAM=Tasa de ramificación, DRAM=Densidad de ramificación, DLTR=Densidad de la longitud total de la raíz, OSC= Oscuridad. AIA=Ácido indolacético, CIN=Cinetina y EXP= Explante. TRA= Tratamiento.

Suplemento 3. Dendrogramas de líneas rizogénicas, experimentos 3 y 4

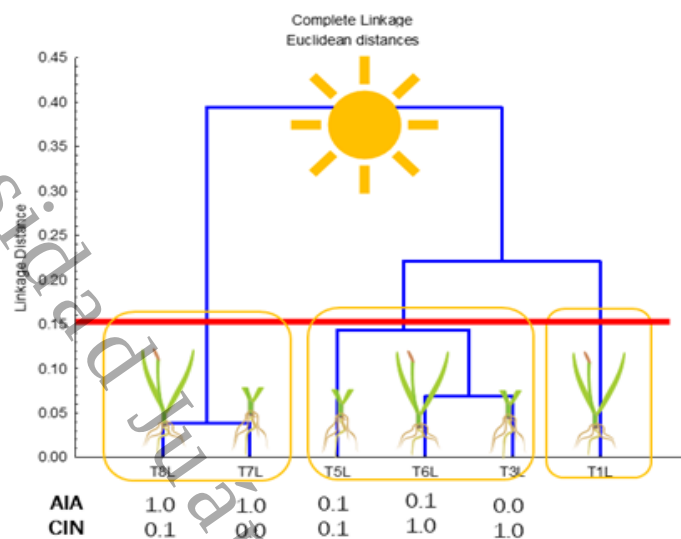


Figura S3A. Dendrograma de seis líneas rizogénicas en luz de *Typha domingensis* basada en cuatro variables de calidad del sistema radicular adventicio.

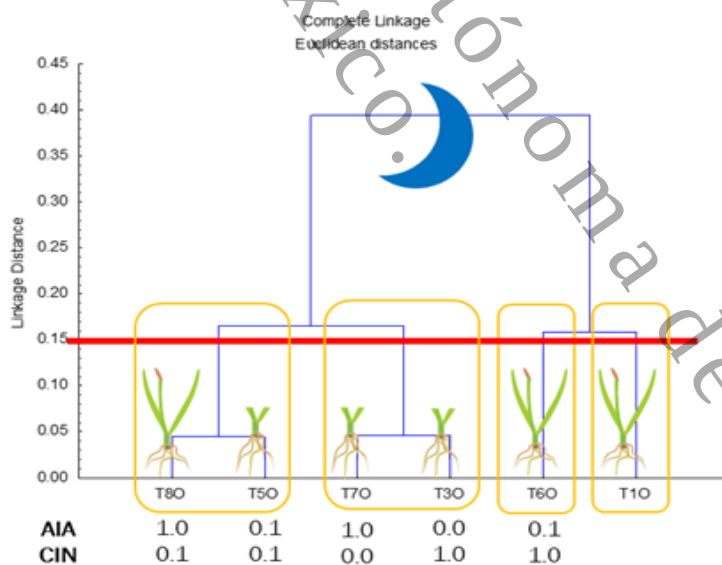
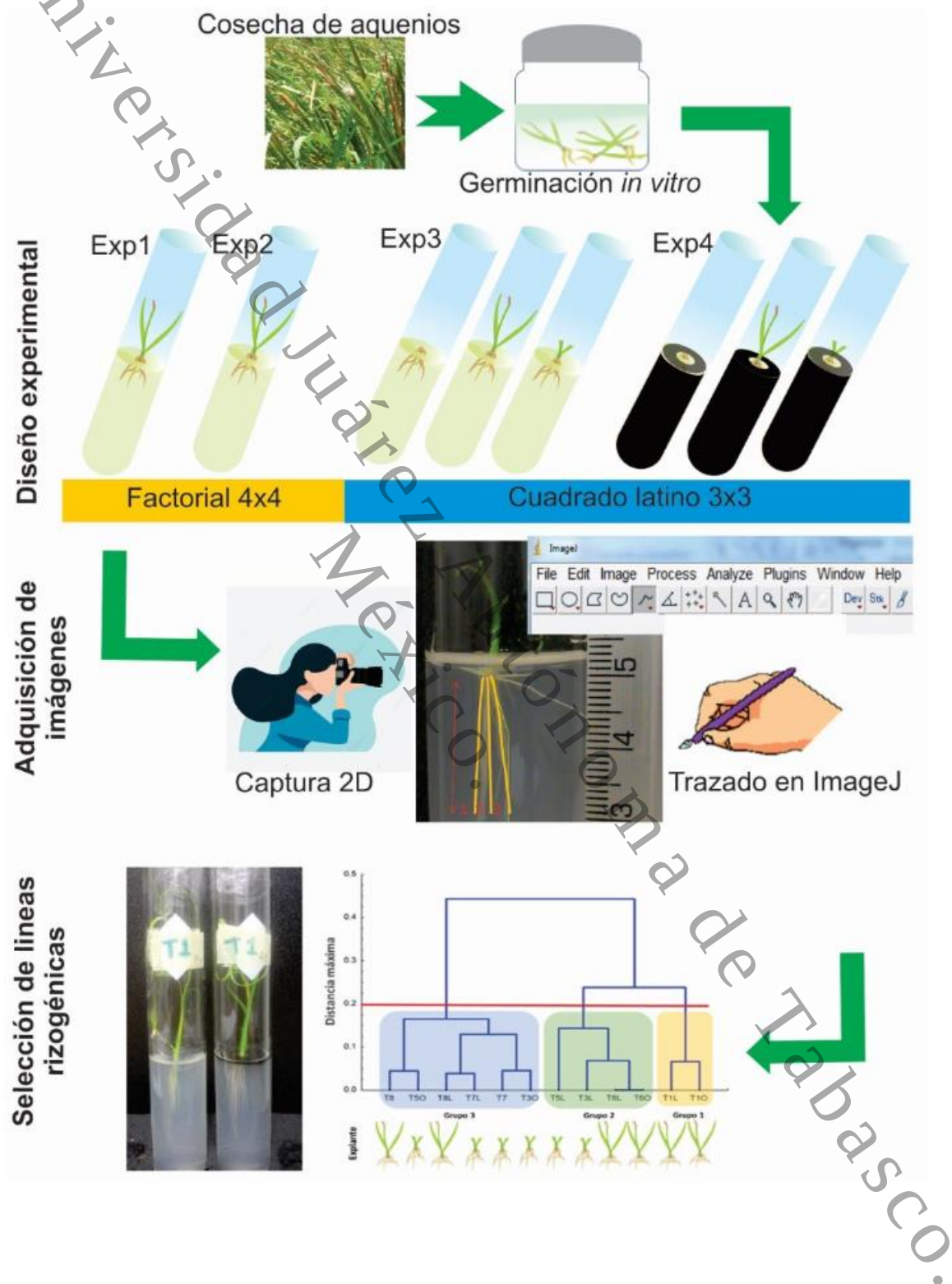


Figura S3B. Dendrograma de seis líneas rizogénicas en oscuridad de *Typha domingensis* basada en cuatro variables de calidad del sistema radicular adventicio.

Resumen gráfico



CAPÍTULO

IV

**Induction of Hairy Roots on Somatic Embryos
of Rhizoclones from *Typha domingensis*
seedlings**

Article

Induction of Hairy Roots on Somatic Embryos of Rhizoclones from *Typha domingensis* Seedlings

Guadalupe Hernández-Piedra ^{1,*}, Violeta Ruiz-Carrera ^{2,*}, Alberto J. Sánchez ², Alfonso Azpeitia-Morales ³ and Graciano Calva-Calva ⁴ 

¹ Programa de Doctorado en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km. 0.5 S/N Entronque a Bosques de Saloya, Villahermosa 86150, Tabasco, Mexico

² Diagnóstico y Manejo de Humedales Tropicales, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km. 0.5 S/N Entronque a Bosques de Saloya, Villahermosa 86150, Tabasco, Mexico; alberto.sanchez@ujat.mx

³ Campo Experimental Huimanguillo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Huimanguillo, Km. 1 Carretera Huimanguillo-Cárdenas, Huimanguillo 86400, Tabasco, Mexico; azpeitia.alfonso@inifap.gob.mx

⁴ Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Ciudad de México 07360, Mexico; gcalva@cinvestav.mx

* Correspondence: guadalupe.hernandezp@ujat.mx (G.H.-P.); violeta@ujat.mx (V.R.-C.)

Received: 7 October 2020; Accepted: 24 November 2020; Published: 1 December 2020



Abstract: A protocol for the induction of hairy roots on somatic embryos of rhizoclones from *Typha domingensis* seedlings grown in hydroponic rhizotron systems was established for the first time. Rhizogenesis was induced through the agrotransformation of somatic embryos in oblong and scutellar states of development using the K599, LBA9402, and A4 strains of *Agrobacterium rhizogenes*. The transfection to the embryos was performed by cocultivation of rhizoclones on a Murashige and Skoog mineral medium at 50% strength (MS0.5), in the dark, at 28 ± 2 °C for 72 h. In contrast to nontransformed embryos that did not exhibit any root tissue, transformed embryos presented hairy roots that varied in number, length, and density depending on the bacterial strain, and K599 was the most effective strain. After analysis via optical microscopy, the transformed embryos were collected and transferred to fresh culture media supplemented with 400 mg mL^{-1} cefotaxime and 10 mg L^{-1} ascorbic acid. The efficiency of transformation and survival of the oblong and scutellar embryos were similar among the three bacterial strains. The results show that agrotransformation of somatic embryos of rhizoclones from *T. domingensis* is a novel and viable strategy for the generation of genetic transformants of *Typha* that have potential applications in bioremediation technologies.

Keywords: agrotransformation; cattail; rhizogenesis; somatic embryos; hairy roots

CAPÍTULO V

Conclusiones generales

Conclusiones y recomendaciones generales

Se identificaron dos modelos hiperrizogénico en la especie *Typha domingensis*: raíces transformadas y raíces no transformadas. Se estableció por primera vez un protocolo para la inducción de raíces aéreas transformadas a partir de embriones somáticos de rizoclones de plántulas de *Typha domingensis* cultivadas en sistemas hidropónicos de rizotrón. La rizogénesis se indujo mediante la agro-transformación de embriones somáticos. La agro transformación de embriones somáticos de *T. domingensis* en estados de desarrollo oblongos y escutelaes utilizando las cepas K599, LBA9402 y A4 de *Agrobacterium rhizogenes* es una estrategia novedosa y viable.

Se seleccionaron seis líneas rizogénicas adventicias (LRA) que se caracterizaron por mostrar máxima dinámica radicular adventicia. Las LRA provenientes de bases caulinares y germinados completos con bajas concentraciones de auxina/cinetina mostraron ser prometedoras al tener las mayores tasas de ramificación y densidad de ramificación.

Sin embargo, preguntas como ¿Cuál es la eficiencia de remoción de nutrientes? ¿Las LRA pueden establecerse bajo condiciones de eutrofización de origen durante tiempo indefinido? ¿Cuál es la tolerancia máxima de las LRA ante el estrés por eutrofización? aún deben ser contestadas para poder validar esta ecotecnología con miras a su implementación en campo para evaluar su eficiencia de remoción real.

En conclusión, se validaron las hipótesis planteadas y se contribuye al enfoque actual en el tratamiento de las aguas residuales, el cual se centra en la intensificación de procesos, recuperación de recursos y eficientar los sistemas de ingeniería para mejorar la calidad del efluente. Es decir, la potencialización de tecnologías vigentes empleando estrategias basadas en raíces transformadas y raíces adventicias; dos técnicas de rizadorremediación con un objetivo común: mejorar las eficiencias de remoción de contaminantes que se alcanzan con raíces convencionales. Sumado a lo anterior, está la posibilidad de aumentar el valor agregado del proceso si la biomasa radicular generada se pudiera usar como fuente de bioenergía en un sistema de economía circular.

ANEXOS

Tabla 1 Composición química general de aguas residuales domésticas según las Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996.

[illegible]

Tabla 2 Niveles de remoción de contaminantes requerido en el tratamiento de agua residual para ser reutilizada o vertida al ambiente.

Método	Operación	Descripción	TT	TRH	ER DBO	ER SST	TO
Operaciones físicas unitarias	Tamizado	Grueso: Remoción de palos, trapos y demás escombros (>15 mm). Rejillas, mallas y platos perforados.	Pr		0	0	
		Fino: Remoción de partículas pequeñas (2.5 a 5 mm). Pueden ser reemplazos de sedimentadores primarios. Parabólico fijo Tambor rotatorio Disco rotatorio (muy fino)	Pr Pr PR		5-20 25-50 35-55	5-30 25-45 35-55	
	Floculación	Proceso común Filtración directa		30-60 min 2-10 min			
	Sedimentación	Separación por gravedad de partículas (discretas, floculantes, interferidas y compresión).					
		Remoción de arenas (Desarenador)	Pr	12-16 min			2-5 m
		SST (Tanques circulares, Imhoff)	PR	1-2.5 h	25-40	50-70	10-16 pies
		Flóculo biológicos y químicos	S				
	Flotación	Separa sólidos o líquidos contenidos en una fase líquida. Esto se consigue introduciendo finas burbujas de gas.					
	Filtración						
	Mezcla	Mezcla completa de aditivos químicos, fluidos y floculación. Turbulencia: Resalto hidráulico de canales abiertos, dispositivos Venturi, tubería y bombeo. Aporte de energía: Mezclador estático y mecánico.		10-30 s <1s			
Procesos químicos	Transferencia de gases						
	Precipitación						
	Adsorción						
Procesos biológicos	Aerobio	Cultivo en suspensión: Lodos activados y lagunas aireadas.	S	4-10 h	90		
		Cultivo fijo: Biodiscos y filtros percoladores.	S		50-70		
	Anaerobio	Cultivo en suspensión: Digestión anaerobia.	S		80-90		
		Cultivo fijo: Filtro anaerobio y lecho expandido.	S				

ER DBO= Eficiencia de remoción de DBO; ER SST= Eficiencia de remoción de SST; TRH=Tiempo de retención hidráulica; TO=Tirante operativo; TT= Tipo de tratamiento, Pr= pretratamiento, PR= Primario, S= Secundario y Terciario.

Tabla 3 Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	Cultivo de rizoclonos de <i>Typha domingensis</i> tolerantes a estrés por eutrofización
Autor(a) o autores(ras) de la Tesis:	Guadalupe Hernández Piedra
ORCID:	0000-0001-9058-0210
Resumen de la Tesis:	Las aguas residuales generadas en todo el mundo por las actividades humanas causan un problema ambiental conocido como eutrofización el cual afecta la biodiversidad y los ecosistemas acuáticos a nivel mundial. La rizogénesis in vitro es una estrategia biotecnológica utilizada cada vez más en biorremediación. La rizogénesis con o sin variación somaclonal (raíz no transformada) y raíces pilosas mediante estrategias de ingeniería genética con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (raíz transformada) permite potencializar la capacidad natural de una especie fitorremediadora. En este sentido la especie <i>Typha domingensis</i> Pers. (espadaña) una macrófita acuática emergente es ideal por la alta capacidad de adaptación de sus raíces adventicias en diferentes sistemas. Para establecer el cultivo in vitro de rizoclonos a partir de sistemas radiculares de germinados in vitro de <i>T. domingensis</i> se emplearon dos sistemas. Un sistema de raíces no transformadas utilizando un gradiente de concentración del balance de la auxina natural, ácido indolacético (AIA) con las citocininas, cinetina (CIN) o bencilaminopurina (BAP) en rizotron luz. En experimentos consecutivos evaluaron la agrotransformación sobre germinados y embriones somáticos de la línea embriogénica LE-YCI para inducir raíces peludas con tres cepas de <i>A. rhizogenes</i>. Además, se identificaron seis líneas rizogénicas que se caracterizaron por mostrar máxima dinámica radicular adventicia. Se estableció por primera vez un protocolo para la inducción de raíces peludas en embriones somáticos de rizoclonos de plántulas de <i>Typha domingensis</i>.
Palabras claves de la Tesis:	Macrófita acuática, fitorremediación, rizogénesis, hairy roots, embriogénesis, eutrofización.
Referencias citadas:	