

TOLERANCIA DE *AGAVE TEQUILANA* A ALTAS CONCENTRACIONES DE CATIONES METÁLICOS DIVALENTESTOLERANCE OF *AGAVE TEQUILANA* TO HIGH LEVELS OF DIVALENT METAL CATIONS

Cen-Cen, Elmi Roseida, Fernando Gómez-Merino, y Aída Martínez-Hernández
Colegio de Postgraduados campus Campeche.
Correo electrónico: aidamh@colpos.mx

RESUMEN

Los agaves son plantas que pertenecen a un género constituido por numerosas especies, adaptadas para crecer en muy diversos hábitats, algunos con condiciones ambientales extremas. Distintas especies de agave crecen sobre distintos tipos de suelos, algunas en suelos con muy bajo contenido de nutrientes minerales y otras en suelos salinos o en suelos contaminados con iones metálicos. La relación planta-suelo ha sido escasamente estudiada en este género por lo que se desconoce, entre otras cuestiones, cuál es la capacidad de los agaves para absorber, transportar y almacenar nutrientes minerales, cuáles son los mecanismos celulares y bioquímicos que utilizan, o si poseen especial sensibilidad o tolerancia a los iones metálicos. Este estudio reporta el efecto de diversas concentraciones de sulfato de cadmio, cobalto, cobre, zinc o de manganeso sobre plántulas de *Agave tequilana*, bajo condiciones controladas de laboratorio; la concentración mínima de esos iones metálicos requerida para inducir un efecto tóxico visualmente detectable en tiempos cortos (ocho días); describimos los efectos tóxicos que estos metales generan sobre las plántulas de agave; y reportamos la cantidad de Cu^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} que se acumula

en las hojas de plántulas de agave tratadas con altas concentraciones (milimolares) de esos metales. Nuestros resultados muestran que, en experimentos de toxicidad aguda y bajo las condiciones aquí establecidas, el *A. tequilana* posee una notable tolerancia a altas concentraciones de los distintos metales iónicos probados, incluyendo tanto micronutrientes como metales tóxicos, así como la capacidad de transportar en altas cantidades estos metales a tejido aéreo.

Palabras clave: *Agave tequilana*, micronutrientes minerales, toxicidad de iones metálicos, tolerancia.

ABSTRACT

The agaves belong to a plant genus which includes many species adapted to grow in numerous habitats, some of them with extreme environmental conditions. Distinct agave species grow on different soil types, some in soils with a low mineral nutrient content, and others in saline soils or in soils contaminated with metal ions. The plant-soil relationship has been scarcely studied in agaves, and several questions remain to be elucidated such as their ability uptake, transport and storage mineral nutrients, the cellular and biochemical mechanisms involved in these

processes, or if the agaves are specially sensitive or tolerant to metal ions. Here we report the effect on *Agave tequilana* young plants after exposure to cadmium, cobalt, copper, zinc or manganese sulfate at several concentrations, under lab conditions. We also report the minimal concentration of these metal ions required to induce a toxic effect detectable with visual inspection in short exposition times (8 days); we describe the toxic effects of these metal ions on the agave plantlets and the amount of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Co^{2+} accumulated in leaves of plants exposed to high metal concentrations (milimolar). Our results show that in acute toxicity experiments under our conditions, *A. tequilana* has a remarkable tolerance to high concentrations of the tested metal ions, including micronutrients and toxic metals, as well as the ability to transport high quantities of these metals to aerial tissues.

Key words: *Agave tequilana*, mineral micronutrients, toxicity by metal ions, tolerance.

INTRODUCCIÓN

Agave es un género de plantas monocotiledóneas suculentas cuyo centro de origen está localizado en México y el cual engloba a una gran diversidad de especies, alrededor de 200, las cuáles se han distribuido a través una amplia gama de latitudes y altitudes desde Aridoamérica (sur de los Estados Unidos de América y norte de México), hasta parte de Sudamérica (Colombia y Venezuela), incluyendo Mesoamérica, Centroamérica e islas del Caribe (García-Mendoza, 2002; García-Mendoza y Galván, 1995). Así, las diversas especies de *Agave* se han adaptado para sobrevivir y crecer en muy diversos ambientes, y sus diferentes

hábitats incluyen desde bosques templados y zonas desérticas hasta selvas tropicales y matorrales, desde planicies y praderas hasta montañas escarpadas, acantilados, o costas marinas (García-Mendoza, 2002; Gentry, 1982). Consecuentemente, las diferentes especies de *Agave* están adaptadas para crecer sobre diferentes tipos de suelo, de diferente origen geológico y con diversas características fisicoquímicas; desde suelos básicos de piedra caliza de origen marino hasta suelos ácidos rocosos de origen volcánico. Con base en la información edafológica del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (<http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/datosgeogra/fisigeo/suelos.cfm>) y en la distribución reportada de agaves en México por la CONABIO (2005) (<http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mezcales/mMapa.html>; García-Mendoza, 2002); observamos que éstos se encuentran distribuidos en zonas cubiertas con regosoles, litosoles, xerosoles, y rendzinas, entre otros tipos de suelos. Hay especies de *Agave* que crecen en zonas mineras, en suelos presumiblemente con un alto contenido de minerales; mientras que otras especies crecen en zonas descritas con suelos someros, con baja disponibilidad de nutrientes, con alto o bajo pH, o con alta salinidad.

Las plantas obtienen del suelo los nutrientes minerales que requieren para su adecuado crecimiento y desarrollo. Los minerales por razones geoquímicas, pero también por actividades antropocéntricas, se encuentran en el suelo en diversas cantidades y con diferentes grados de disponibilidad (Adriano, 1992; Basta *et al.*, 2005; Merian, 1991; Senesil *et al.*, 1999). La baja disponibilidad de nutrientes minerales esenciales en los suelos causa baja productividad y síntomas de deficiencia nutricional en los cultivos, por

lo que estos nutrientes suelen ser suplementados a través de fertilizantes químicos o con manejo agroecológico. Sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes químicos, un mal manejo agronómico, la salinidad y el pH de los suelos, o la presencia de contaminantes derivados de actividades industriales o mineras pueden incrementar la cantidad y disponibilidad de diversos elementos químicos en el suelo hasta alcanzar niveles tóxicos (He *et al.*, 2005; Tchounwou *et al.*, 2012; US-EPA, 1999).

En el caso de metales con toxicidad conocida como el cadmio (Cd), cromo (Cr), plomo (Pb), o aluminio (Al), entre otros; éstos no tienen un papel fisiológico en las plantas, pero producen claros efectos tóxicos, ya sea porque interfieren con la absorción de minerales esenciales afectando la nutrición mineral de las plantas, o porque al ser acumulados en los tejidos alteran el metabolismo y fisiología de las plantas (Sharma y Agrawal, 2005, Hasan *et al.*, 2009). En el caso de metales como el hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu), manganeso (Mn), molibdeno (Mo); los cuales son micronutrientes esenciales para las plantas requeridos en cantidades relativamente bajas, participan por ejemplo como constituyentes de metaloproteínas o cofactores de enzimas involucradas en procesos metabólicos fundamentales como la respiración y la fotosíntesis (revisado recientemente en Yruela, 2013). Sin embargo, los micronutrientes esenciales también resultan tóxicos a las plantas en altas concentraciones (Becker y Asch, 2005; Broadley *et al.*, 2007; Fernandes y Henriques, 1991; Millaleo *et al.*, 2010). Metales como el níquel (Ni) o el cobalto (Co) son considerados tóxicos (Sharma y Agrawal, 2005), pero se ha demostrado su participación como micronutrientes

benéficos en bajas cantidades para algunas plantas (Ahmad y Ashraf, 2011; Pilon-Smits *et al.*, 2009). Los micronutrientes minerales esenciales y otros metales presentes en el suelo son absorbidos por las plantas en su estado soluble iónico.

La cantidad de nutrientes óptima para el crecimiento de las plantas, así como la concentración a partir de la cual cada metal resulta tóxico, varía para las diferentes especies vegetales. Para el caso de los agaves; aunque está ampliamente difundido que son capaces de sobrevivir sobre suelos poco profundos y nutricionalmente “pobres”, y existen algunos estudios respecto a las características de los suelos donde se cultivan algunas especies de *Agave* (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2010; Bautista-Cruz *et al.*, 2007; Bautista-Cruz *et al.*, 2011), o referentes al efecto de la fertilización con macronutrientes sobre algunas especies (Barrios-Ayala *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2011; Martínez-Ramírez *et al.*, 2012; Nobel *et al.*, 1988; Valenzuela y González, 1995); los estudios publicados son escasos, la gran mayoría de ellos se han realizado sólo en *A. tequilana* (Rulfo *et al.*, 2007), y la carencia de información no permite optimizar el cultivo con un manejo agronómico racional y sustentado en otras especies cultivadas de *Agave*. En el caso de las especies silvestres de *Agave*; algunas de ellas microendémicas y/o en peligro de extinción (García-Mendoza, 2002; NOM-059-ECOL-2001); los suelos donde crecen naturalmente estas especies han sido aún menos estudiados, y para la gran mayoría de las especies se desconoce su composición química, las características edafológicas óptimas para su crecimiento, los requerimientos nutrimentales mínimos, o el efecto de la deficiencia en micronutrientes.

Analizando el contenido del transcriptoma de *A. tequilana*, derivado de un proyecto de secuenciación masiva de ADN complementario (datos no publicados), nuestro grupo determinó que plantas de *A. tequilana* muestreadas bajo condiciones de campo contienen altos niveles de transcritos codificantes de metalotioneínas; los cuáles se expresan constitutivamente en todos los tejidos, tanto vegetativos como reproductivos (Cen-Cen, 2009). Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteínas presentes en todos de los organismos, capaces de formar complejos metal-tiolato con cationes de metales de transición como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{1+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} . Inicialmente identificadas en tejidos de mamíferos por su capacidad de unir Cd^{2+} (Margoshes y Valee, 1957) estas proteínas han sido estudiadas por décadas; sin embargo, su función no está plenamente comprendida (Coyle *et al.*, 2002; Palmiter, 1998), pero se les adjudica un papel en la protección contra metales tóxicos, en la homeostasis de nutrientes como Zn y Cu y en la protección contra el estrés oxidativo (Babula *et al.*, 2012; Klaassen *et al.*, 2009). Las metalotioneínas de plantas han sido menos caracterizadas, poseen características estructurales propias y muy diversas (Freisinger, 2010 y 2011; Leszczyszyn *et al.*, 2013), por lo que se considera que pueden también tener diversas funciones (Grennan, 2011). La expresión de metalotioneínas de plantas en sistemas heterólogos (bacterias, levaduras u otras plantas) ha demostrado su participación en la tolerancia contra metales tóxicos como el Cd y la homeostasis del Zn y Cu (Guo *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012; Suh *et al.*, 1998; Turchi *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2009; Zhigang *et al.*, 2006). La presencia de transcritos de metalotioneínas constitutivamente expresados en el *A. tequilana* sugiere

que esta especie podría tener la capacidad de tolerar altas concentraciones de cationes metálicos divalentes y tener, por lo tanto, capacidades distintas a otras plantas en cuanto a su homeostasis nutricional, o bien tener potencial como agente biorremediador. Méndez-Hurtado y cols. (2013) reportaron recientemente que plántulas de *A. lechuguilla* recién germinadas a partir de semillas colectadas en sitios contaminados con metales pesados incorporan más Cd que plántulas germinadas a partir de semillas colectadas en sitios no contaminados, mostrando además un mayor nivel de expresión basal de metalotioneínas que las plantas control, el cual es regulado por efecto del Cd. Sin embargo estas plántulas son más susceptibles a los efectos tóxicos del Cd. Previamente Nobel y Berry (1985) reportaron que *A. deserti* posee tolerancia relativamente alta a Cu y Zn. Para analizar si *A. tequilana* es tolerante a iones metálicos divalentes evaluamos, bajo condiciones de laboratorio, la tolerancia de plántulas a diversas concentraciones tanto de nutrientes esenciales (Cu, Zn y Mn), como de metales tóxicos (Cd y Co), y cuantificamos los metales presentes en las hojas de las plántulas expuestas a altas concentraciones de estos metales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Germinación y condiciones de crecimiento de plántulas de *Agave tequilana*

Semillas de *Agave tequilana* fueron colectadas a partir de cápsulas secas de plantas cultivadas bajo condiciones de jardín en Guanajuato, México. Debido a que el porcentaje de germinación de las semillas colectadas era bajo (50%), se seleccionaron las semillas que mostraban tener un embrión viable (protuberancia palpable en el centro

de la semilla), desechando las semillas que se percibían planas o vacías. Las semillas fueron desinfectadas con tritón al 0.02% durante 20 min y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Posteriormente, para facilitar su germinación, se cortó longitudinalmente una orilla de la testa de la semilla cuidando de no dañar el embrión. Las semillas desinfectadas se colocaron en una charola con algodón humedecido con agua destilada estéril. La charola se cubrió con plástico transparente y las semillas se incubaron a 25 +/- 1°C bajo ciclo natural de luz/oscuridad durante tres semanas (fig. 1A).

Las plántulas de *Agave* de tres semanas de edad fueron trasplantadas gentilmente a una mezcla de perlita, vermiculita, tezontle y tierra de invernadero en proporción 1:1:1:1 contenida en una maceta con cubierta de plástico transparente. El sustrato se hidrató a saturación con agua corriente previo al trasplante. Para aclimatar las plántulas, las macetas se mantuvieron cubiertas con la tapa transparente durante cinco días y posteriormente se abrieron paulatinamente hasta retirar por completo la cubierta plástica a las dos semanas. Las plántulas se mantuvieron en ciclo luz/oscuridad natural y se continuaron regando con agua corriente cada semana durante once meses (fig. 1B), tiempo en el que generaron cuatro hojas expandidas y alcanzaron un tamaño promedio de 10 a 15 cm de la base del tallo a la punta apical.

Exposición de plántulas a soluciones de iones metálicos

Las plantas de once meses de edad fueron extraídas de la tierra, y se seleccionaron plantas homogéneas en cuanto a su altura y número de hojas para realizar los experimen-

tos de exposición a los diferentes metales. Las raíces de las plántulas delicadamente sustraídas del sustrato fueron enjuagadas con abundante agua destilada, y expuestas a soluciones de sales de sulfato de cada uno de los iones metálicos a evaluar. Para evitar interacciones de los iones metálicos a evaluar con los componentes de un medio de cultivo, las sales de sulfato fueron disueltas y diluidas en agua ultrapura.

Las plántulas fueron colocadas individualmente dentro de frascos de vidrio conteniendo 3 g de algodón embebido con 50 ml de la solución correspondiente de cada ión metálico; o con 50 ml de agua ultrapura en el caso de las plantas control. Las raíces fueron cubiertas con el algodón para sostener las plantas y asegurar el contacto con la solución, evitando el contacto directo con el tallo (fig. 1C). Midiendo con espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) la cantidad de iones metálicos en la solución circundante, se corroboró que el algodón no captura a los iones metálicos por adsorción y que permanecen disponibles para ser absorbidos por las plantas.

Para determinar el límite de tolerancia y registrar los efectos tóxicos, el intervalo de concentraciones utilizadas en cada caso fueron los siguientes: CdSO₄ 15 µM-90 mM; CoSO₄ 50 µM-100 mM; CuSO₄ 50 µM-10 mM; ZnSO₄ 1 mM-100 mM; MnSO₄ 1 mM-100 mM. El efecto de cada ión metálico se verificó en tres experimentos independientes, por cuadruplicado. Las plantas bajo los diferentes tratamientos fueron observadas diariamente y el efecto tóxico se registró fotográficamente a los dos, cuatro y ocho días de exposición.

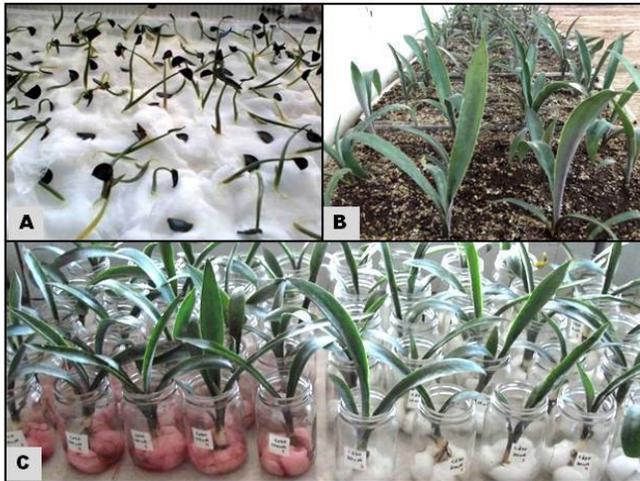


Fig. 1. A) Plántulas de *A. tequilana* recién germinadas, B) Crecimiento en tierra, C) Plantas expuestas a diferentes concentraciones de sulfato de cobalto y cadmio.

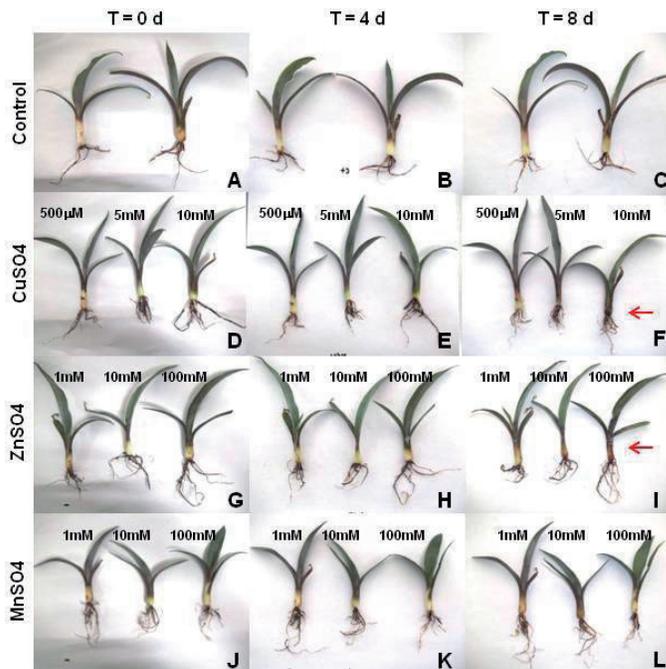


Fig. 2. Efecto de diversas concentraciones de Cu, Zn y Mn sobre plantas de *A. tequilana* a cuatro y ocho días de exposición.

La cuantificación de metales en los tejidos de las plantas se realizó en un espectrofotómetro ICP-AES de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (Varian, Brisbane, Australia) en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del Colegio de Postgraduados campus Montecillos. Las muestras fueron previamente digeridas utilizando el método de digestión húmeda convencional (Alcántar y Sandoval, 1999). Los triplicados de cada tratamiento fueron procesados individualmente.

RESULTADOS

Establecimiento de las condiciones experimentales y de la concentración tóxica mínima

La preselección de semillas viables permitió obtener hasta un 90-95% de germinación y en el trasplante a tierra se obtuvo un 100% de supervivencia. Considerando que los experimentos se realizarían en ausencia de nutrientes, y previniendo que una exposición prolongada podría alterar la concentración de los metales por evaporación; para determinar el tiempo óptimo en el cuál se realizaría la búsqueda de efectos tóxicos en las plantas tratadas con iones metálicos se realizó una observación preliminar de plantas control con las raíces embebidas en agua desionizada, durante diversos tiempos, y sin rehidratar el algodón utilizado como soporte. En el transcurso de las primeras dos semanas no se detectó ningún cambio notable, ni en las plantas ni en el nivel de hidratación del soporte. A partir de las tres semanas se detectó un menor grado de hidratación en el algodón, y a los 30 días se observó la emisión de raíces de novo. Consideramos que la emisión de estas raíces puede ser una respuesta a la carencia

prolongada de nutrientes y a la deshidratación; por lo que determinamos realizar las observaciones de los efectos tóxicos de los metales pesados en un tiempo máximo de 8 d, tiempo en el cuál se minimizan tanto el efecto de la carencia de nutrientes como el aumento de la concentración de la solución utilizada por evaporación.

Para establecer los límites de las concentraciones a utilizar de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} ; se realizaron experimentos preliminares en los cuales las plántulas de *Agave* fueron expuestas a concentraciones crecientes de cada sal de sulfato. Para el caso de los micronutrientes Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} se probó inicialmente hasta 10 mM, una concentración que excede de 100 a 300 veces la concentración utilizada en soluciones nutritivas de uso rutinario como la del medio MS (Murashige & Skoog, 1962). En la figura 2 se muestra el efecto del Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} con algunas de las concentraciones utilizadas y a diferentes tiempos de exposición. Para cada tratamiento se muestra una misma planta a los diferentes tiempos, representativa de los efectos observados en las cuatro plantas que fueron expuestas a cada tratamiento. Para el caso del Cu^{2+} se probó 50 y 500 μM , 1 y 10 mM. Con estos tratamientos se observaron efectos tóxicos ligeros en las plantas tratadas por 8 d con Cu^{2+} 5mM (fig. 2E) y más intensos en plantas tratadas con Cu^{2+} a 10 mM (fig. 2F), los cuales no se detectaron a los cuatro días (fig. 2E).

Para el caso de Zn^{2+} y Mn^{2+} se probaron 1, 5 y 10 mM. En ninguno de los tratamientos se observó efecto alguno, por lo que se realizó un segundo experimento utilizando hasta 100 mM de cada metal. Para el caso del Zn^{2+} 5, 10 y 15 mM no se observó efecto alguno, solo se observaron efectos tóxicos

claros a los ocho días en Zn^{2+} 100 mM (fig. 2I) pero no al día 4 (fig. 2H). Con 50 mM de Zn^{2+} a los 8 d se observaron signos leves de toxicidad (no mostrado). Para el caso del Mn^{2+} , las plántulas de agave no mostraron ningún efecto tóxico a los 8 d con ninguna de las concentraciones probadas, incluso la de 100 mM (fig. 2L).

Para el caso de Cd^{2+} y Co^{2+} , metales altamente tóxicos para la mayoría de los organismos, inicialmente se probaron concentraciones entre 15 μ M y 1.5 mM, las cuales incluyen concentraciones reportadas como tóxicas para otras especies vegetales. Para Cd^{2+} se probaron inicialmente 15, 150 y 300 μ M, pero no se observó ningún efecto tóxico con esas concentraciones en plantas tratadas durante 8 d. Se utilizaron entonces concentra-

ciones hasta de 3 mM de Cd^{2+} y tampoco se observaron efectos, por lo que nuevamente se incrementaron las concentraciones. En la figura 3 se muestra el efecto de algunas de las concentraciones probadas para el caso de Cd^{2+} , a diferentes tiempos de evaluación. Para efectos comparativos se muestra a los diferentes tiempos de exposición una misma planta de cada tratamiento, con síntomas representativos de los observados en el cuadruplicado. A los dos días de exposición las plantas tratadas con 90 mM de Cd^{2+} ya mostraban efecto tóxico, pero las plantas tratadas con 60 mM de Cd^{2+} mostraban solo un ligero efecto sobre una de las hojas (fig. 3B). A los cuatro días de exposición ligeros daños comienzan a evidenciarse en las plantas tratadas con 45 mM de Cd^{2+} , mientras que los daños sobre las plantas tratadas con

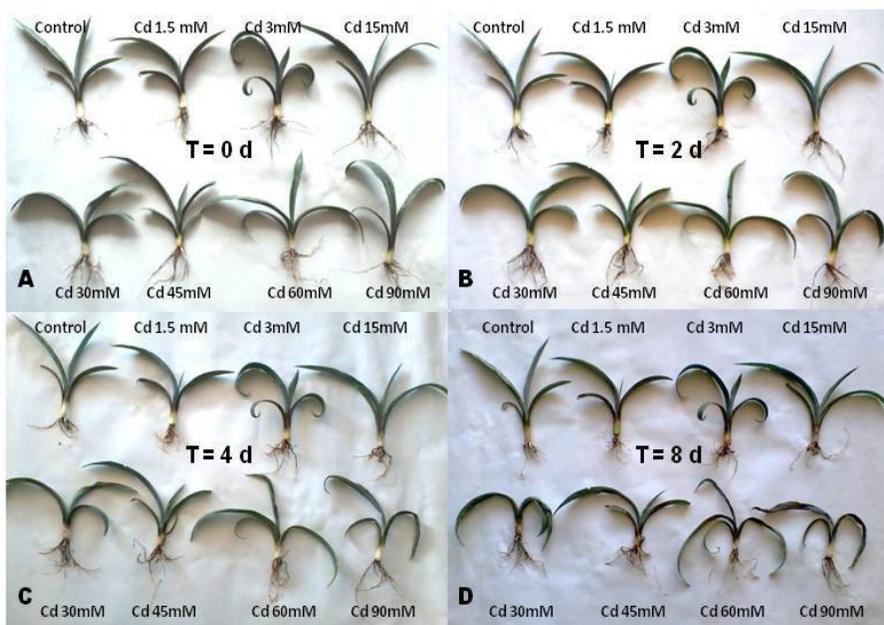


Fig. 3. Efectos tóxicos de diversas concentraciones de Cd ($CdSO_4$) sobre plantas de *A. tequilana* a dos, cuatro y ocho días de exposición.

Cd^{2+} 60 y 90 mM son más evidentes (fig. 3C). A los ocho días (fig. 3D) el efecto tóxico es claramente perceptible en las plantas tratadas con 30, 45, 60, y 90 mM, pero se registraron solo efectos tóxicos ligeros en las plantas tratadas con 15 mM (veáanse detalles en la fig. 5). Sin embargo, consistentemente con los resultados anteriores, las plantas tratadas con 1.5 y 3 mM de Cd^{2+} no mostraron ningún efecto en tallo u hojas a los ocho días de tratamiento.

En el caso de Co^{2+} , inicialmente se probó a 50, 100 y 500 μM , pero no se observaron efectos tóxicos, por lo que se incrementaron las concentraciones hasta 5 mM, en la cual tampoco se observó ningún efecto a los ocho días. Para definir la concentración tóxica mínima de Co^{2+} se incrementaron entonces las concentraciones hasta 100mM. En la figura 4 se muestra el efecto a los ocho días de algunas de las diferentes concentraciones utilizadas de Co^{2+} . Solo se detectaron efectos tóxicos a partir de 50 mM de Co^{2+} . Las plantas tratadas con Co^{2+} 20 mM durante ocho días no mostraron ningún efecto tóxico.

Con base en los resultados anteriormente descritos, en la tabla I se reportan la concentración mínima aquí identificada en la que cada metal produce algún efecto tóxico en plántulas de *A. tequilana* a los ocho días; así como el límite de tolerancia observado en ese mismo tiempo (concentración máxima evaluada en la que las plantas no mostraron síntomas de toxicidad a los ocho días). Cabe mencionar que, con excepción del Co^{2+} 50mM. El resto de los metales no causaron daños evidentes a los cuatro días de exposición en las concentraciones reportadas en la tabla 1 como mínimas para causar toxicidad. Resulta notorio e inesperado que en todos los casos, aún en el caso de metales

altamente tóxicos como el Cd^{2+} y el Co^{2+} , se requirió adicionarlos a concentraciones milimolares para poder inducir algún efecto tóxico observable sobre las plántulas de *A. tequilana*. En el caso del Mn^{2+} la concentración mínima tóxica no pudo ser definida ya que no se observaron efectos tóxicos aun con la concentración más alta aquí evaluada (100mM). Tres experimentos realizados independientemente, con cuadruplicados en cada tratamiento, corroboraron los resultados aquí reportados. Experimentos utilizando concentraciones intermedias entre las que aquí resultaron ser tóxicas y las que no lo fueron, son requeridos para definir la concentración mínima en la que se generan efectos tóxicos.

Descripción de los efectos tóxicos ocasionados en *A. tequilana* por diversos iones metálicos

Los efectos tóxicos de diversas concentraciones de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} sobre plántulas de *A. tequilana* expuestas por cuadruplicado, fueron observados a los dos, cuatro y ocho días. Las plántulas de *A. tequilana* mostraron diferentes tipos de daños al ser expuestas a cada uno de los metales probados. En la figura 5 se muestran detalles de los daños generados en la zona expandida de las hojas y en la zona del tallo de plantas expuestas durante ocho días a Cu^{2+} 5 y 10 mM (fig. 5B y C, respectivamente), Zn^{2+} 100 mM (fig. 5D), Cd^{2+} 15 y 90 mM (fig. 5E y F) y Co^{2+} 100 mM (fig. 5G); así como las plantas tratadas con Mn^{2+} (fig. 5H) en las cuales no se detectó visualmente ningún efecto tóxico.

En el caso del Cu^{2+} , el daño detectado con la concentración tóxica mínima (5mM) a los ocho días fue clorosis entre los haces

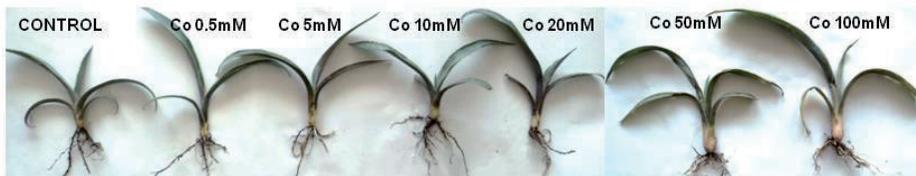


Fig. 4. Efecto de diversas concentraciones de Co (CoSO_4) sobre plantas de *A. tequilana* a ocho días de exposición.

vasculares, en el tallo se observa un ligero oscurecimiento en la base de las hojas. A más altas concentraciones (10mM) se observaron amplias zonas de oxidación en el área foliar de las hojas internas, rodeadas de una zona clorótica, en el tallo la base de las hojas externas mostraron oxidación y un ligero grado de deshidratación.

En el caso de Zn^{2+} a 100mM, se generó severa oxidación y necrosamiento, ligera pudrición y pérdida de turgencia en el tallo, la extrema oxidación y necrosamiento se extienden desde la base de las hojas hacia su extremo apical asociadas a los haces vasculares, con ligera clorosis alrededor de las zonas oxidadas. A 50 mM de Zn^{2+} los síntomas son similares pero en menor grado (no mostrado).

En los tallos de plantas tratadas con Cd^{2+} 15 mM por ocho días (fig. 5E) se observa oxidación y ligera pudrición, pero no se producen efectos visibles sobre las hojas sino hasta con 30mM, concentración a partir de la cuál es claro el efecto de deshidratación y pérdida de turgencia, las hojas se vuelven flácidas (fig. 3D). Los daños detectados en hojas con Cd^{2+} 30 mM en tiempos tempranos (dos días) consisten en zonas de oscurecimiento en las hojas que adquieren un ligero tono café, posiblemente debido a oxidación o lisis celular (no mostrado). A concentraciones más altas, además de que las hojas se deshidratan y pierden turgencia y rigidez, presentan una clara oxidación y necrosis que se extiende desde la base de las hojas y a lo largo de los haces vasculares, así como

Tabla 1. Concentración mínima identificada y el límite de tolerancia observado en que cada metal produce algún efecto tóxico en plántulas de *A. tequilana* a los ocho días.

Sales utilizadas	Límite de tolerancia	Concentración tóxica mínima
MnSO_4	100 mM	ND
CuSO_4	1mM	5mM
ZnSO_4	15mM	50mM
CoSO_4	25mM	50mM
CdSO_4	3mM	15mM

ND: No definido.

ligera clorosis (fig. 5F). Los tallos muestran síntomas de intensa oxidación.

En el caso de los tratamientos con Co^{2+} , los síntomas generados fueron menos evidentes que con los otros metales. A los ocho días, las plantas tratadas con 50 y 100 mM muestran síntomas de deshidratación y pérdida de turgencia en toda la planta (fig. 4). Las hojas presentan “arrugas” o profundas depresiones que alteran la estructura de la hoja (fig. 5G) y el perímetro de las hojas se deforma y se generan ondulaciones. A partir de los cuatro días de exposición, los tratamientos con Co^{2+} a 50 mM produjeron heridas en el tejido foliar muy focalizadas, en las que se genera una mancha blanca en la hoja, el tejido se deshidrata y adelgaza hasta adquirir una apariencia de papel delgado y transparente, con un perímetro necrótico. Estos daños parecen ser el producto de una oxidación extrema muy localizada y no extensiva ya que solo se observó una mancha de este tipo por hoja en algunas de las plantas tratadas. En los tallos no se observa ningún síntoma (fig. 5G).

Con ninguno de los diferentes metales y concentraciones probadas se observó alguna diferencia macroscópica notable en las raíces de las plantas tratadas con respecto al control. El lento crecimiento de las plantas no permitió detectar el efecto de los metales en la longitud y número de raíces a los ocho días de observación, tiempo en el cual las plantas control no mostraron crecimiento.

Incorporación de metales en tejido foliar de *A. tequilana*

El requerimiento de tan altas cantidades de metales para producir un efecto tóxico en el *A. tequilana* sugiere que estas plantas poseen mecanismos para mantener exclu-

dos los metales en exceso y no ser tomados e incorporados a los tejidos de la planta. Sin embargo, los síntomas en tallos y hojas indican que al menos una cantidad de dichos metales es capaz de ser absorbida y transportada a los tejidos aéreos provocando los daños observados, los cuáles se asocian a los haces vasculares. Para verificar lo anterior se cuantificó con ICP-AES la cantidad de metales presentes en las hojas de las plantas tratadas con diferentes concentraciones de Cu^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} , incluyendo las concentraciones tóxicas. En la figura 6 se muestra la cantidad de Cu, Cd y Co incorporado en tejido foliar. La cantidad de Cu presente en las hojas se mantiene regulada y en niveles similares al control aún en plantas tratadas con 2.5 mM de Cu^{2+} , pero se eleva significativamente a 5 mM, concentración en la cual se observa clorosis y un promedio de 116 ppm de Cu acumulado en el tejido foliar, 22.7 veces más que la cantidad promedio detectada en las plantas control (5.1 ppm). En el caso de Cd y Co la incorporación de los metales al tejido foliar se incrementa gradualmente conforme se incrementa la cantidad del metal en la solución externa. En el caso del Cd se alcanza un máximo de incorporación de hasta 4-5 μg de Cd por mg de tejido seco en las plantas expuestas a 45 y 90mM. En las plantas tratadas con la concentración tóxica mínima de Cd^{2+} (15 mM) se detecta un promedio de 350 ppm del mismo en el tejido foliar, lo cual es 1000 veces más que en las hojas de plantas control donde se hallaron trazas de Cd (0.26 ppm); mientras que en las plantas tratadas con la concentración tóxica mínima de Co^{2+} (50 mM) se detecta un promedio de 673 ppm del metal incorporado en el tejido foliar, el cual fue indetectable en hojas de plantas control. La comparación de la cantidad de metales incorporada en las hojas de plantas

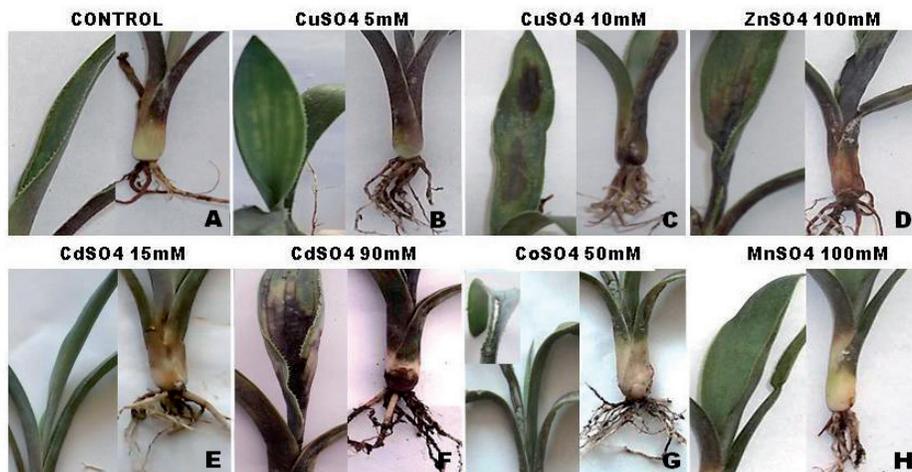


Fig. 5. Efectos tóxicos de diversos metales sobre *A. tequilana* a 8 días de exposición. A) Plantas control; B) y C) CuSO_4 a 5 y 10 mM; D) ZnSO_4 100 mM; E) y F) CdSO_4 a 15 y 90 mM; G) CoSO_4 50 mM; H) MnSO_4 100 mM.

expuestas a concentraciones similares de cada metal (por ejemplo 10 mM comparando Co con Cu, o 25-100 mM comparando Co con Cd) sugiere que la toma de Co por *A. tequilana*, o su transporte a tejido aéreo, es menos eficiente que la de Cu y Cd.

DISCUSIÓN

***Agave tequilana* es tolerante a concentraciones milimolares de diversos iones metálicos y los incorpora a sus tejidos en altas cantidades**

Como resultado de la exposición de plántulas de *A. tequilana* a concentraciones micro y milimolares de Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} se determinó que, en experimentos de corta duración, *A. tequilana* es tolerante a concentraciones extremadamente altas de estos iones, incluso en el caso de metales altamente tóxicos como el Cd^{2+} ,

para el cual para observar toxicidad, se requirieron concentraciones tres veces más altas que las concentraciones micromolares tóxicas para otras plantas, como en el caso de *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2003; Lequeux *et al.*, 2010). La tolerancia relativa del *A. tequilana* ante los diferentes metales probados, determinada con base en las concentraciones tóxicas mínimas aquí identificadas, es: $\text{Mn} \gg \gg \text{Co} = \text{Zn} \gg \text{Cd} > \text{Cu}$. Las cantidades de Cu, Cd y Co incorporada en las hojas de plantas de *A. tequilana* que mostraron efectos tóxicos, también indican que la tolerancia relativa del *A. tequilana* ante esos metales es $\text{Co} > \text{Cd} > \text{Cu}$.

La cantidad de Cu que tolera *A. tequilana* en su tejido foliar antes de presentar síntomas de toxicidad, es menor que la que tolera de Co y Cd. Esto puede deberse a que, por sus funciones en la fisiología y bioquímica vegetal, las plantas requieren mantener finamente

regulada la cantidad de micronutrientes presentes en sus células. Así, entre los efectos iniciales de toxicidad que observamos en *A. tequilana* expuesta al Cu se encuentra la clorosis, un síntoma típico de toxicidad por Cu asociado a su efecto sobre la fotosíntesis (Petit *et al.*, 2012). Sin embargo, la concentración de Cu en tejido foliar de *A. tequilana* a partir de la cual se observaron efectos tóxicos es de cinco a 10 veces más alta que la concentración tóxica reportada en otras plantas (Balsberg-Pahlsson, 1989) y es similar a la concentración tisular en la que *A. deserti* presenta inhibición de la acumulación de peso seco en experimentos de larga duración (Nobel y Berry, 1985). Sin embargo, las concentraciones ahí reportadas a las cuales el Cu y Zn ejercen inhibición del crecimiento de *A. deserti* en soluciones hidropónicas en experimentos de corta duración son micromolares. La diferencia en la concentración a la cual deben ser expuestas ambas especies para detectar un efecto tóxico puede deberse a diferencias intrínsecas entre las especies, al estado de desarrollo de las plántulas tratadas en cada caso, o al sistema experimental utilizado. Siendo que el Cu se encuentra presente en fungicidas, la aplicación de estos sobre cultivos de agaves no debe ser excesiva.

La cantidad de Cd acumulada en hojas de *A. tequilana* a partir de la cual observamos síntomas tóxicos (350 ppm), excede de 35 a 70 veces lo reportado como tóxico en la mayoría de las especies (5-10 ppm), y supera el límite considerado para denominar a una especie como hiperacumuladora (Balsberg-Pahlsson, 1989; Lux *et al.*, 2011). Las plantas hiperacumuladoras son especies que, además de tolerar la presencia de altas cantidades de metales, han evolucionado con la capacidad de acumular altas concen-

traciones de estos en sus tejidos aéreos sin que presenten síntomas de toxicidad (Krämer, 2010; Macnair, 1987). *Allium sativum*; una especie filogenéticamente relacionada a los agaves ya que ambas pertenecen a las Asparagales; también tolera concentraciones milimolares de Cd^{2+} y lo acumula en sus tejidos (Jiang *et al.*, 2001; Soudek *et al.*, 2011; Wusheng *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005). Por su relación evolutiva, ambas especies podrían tener mecanismos de tolerancia similares. Sin embargo, la alta tolerancia aquí observada de *A. tequilana* frente al Cd no fue observada en estudios realizados en plántulas recién germinadas de *A. lechuguilla* (Méndez-Hurtado *et al.*, 2013), sugiriendo que *A. tequilana* podría tener mecanismos particulares dentro del género que le permiten absorber, acumular y tolerar altas concentraciones de este y otros metales. Alternativamente la mayor susceptibilidad observada en *A. lechuguilla* podría deberse a que se utilizaron plántulas recién germinadas que podrían no tener expresados los mecanismos de tolerancia.

Entre los diversos mecanismos bioquímicos y celulares implicados en mantener la homeostasis nutricional y/o conferir tolerancia a las plantas ante un exceso de metales se han descrito: 1) la exclusión (cambiando el pH de la rizósfera, secretando compuestos “quelantes” que forman complejos con los metales, o disminuyendo la capacidad de transporte hacia el interior de la planta), 2) su almacenamiento en compartimentos donde no ejerzan efectos tóxicos como vacuolas o apoplasto y en tejidos no fotosintéticos (epidermis, tricomas y hojas senescentes), y 3) la detoxificación mediante la reducción/oxidación, y la formación de complejos con ácidos orgánicos, aminoácidos, fitosideróforos o con péptidos y

proteínas con alta afinidad por los metales (Clemens, 2001; Cobbett and Goldsbrough, 2002; Hall, 2002). Las plantas hiperacumuladoras tienen además adaptaciones evolutivas en su sistema de transporte para incorporar metales, movilizarlos hacia el xilema y compartimentarlos en vacuolas (Leitenmaier y Küpper, 2013; Milner y Kochian, 2008; Verbruggen *et al.*, 2009). Así, la capacidad del *A. tequilana* para tolerar concentraciones extremadamente altas de los iones metálicos aquí probados podría deberse a la existencia de mecanismos de exclusión que impiden la entrada de esos metales a niveles excesivos manteniendo las concentraciones intracelulares a niveles normales; especialmente en el caso del Mn, metal ante el cual *A. tequilana* mostró extrema tolerancia ya que no se observaron efectos tóxicos aún en plantas expuestas a muy altas concentraciones (100 mM). La exclusión puede también estar jugando un papel en el caso de su tolerancia al Co el cual, aunque es tóxico para otras especies vegetales a concentraciones micromolares (Collins *et al.*, 2010; Gopal *et al.*, 2003), se requirió utilizar a una concentración de 50 mM para generar efectos visibles y parece ser incorporado o transportado a las hojas de *A. tequilana* con menos eficiencia que el Cu y Cd.

Sin embargo, nuestros resultados muestran que el *A. tequilana* tiene la capacidad de tomar y transportar Cu, Co y Cd hacia sus hojas en altas cantidades y que las tolera dentro de sus tejidos en mayor grado que otras especies. Los mecanismos utilizados por los agaves para absorber, transportar, almacenar y tolerar esas altas cantidades de metales deben ser elucidados; particularmente porque este tipo de plantas xerófitas suculentas poseen adaptaciones especiales

para desarrollarse en ambientes extremos como su metabolismo ácido tipo “CAM” de las Crasuláceas, y pueden poseer también mecanismos celulares y bioquímicos de homeostasis nutricional alternos a los descritos en otras plantas. El papel de proteínas “quelantes” como las metalotioneínas, las cuales tienen un espectro de unión a metales amplio y le permiten a las células detoxificarse formando complejos con diversos cationes

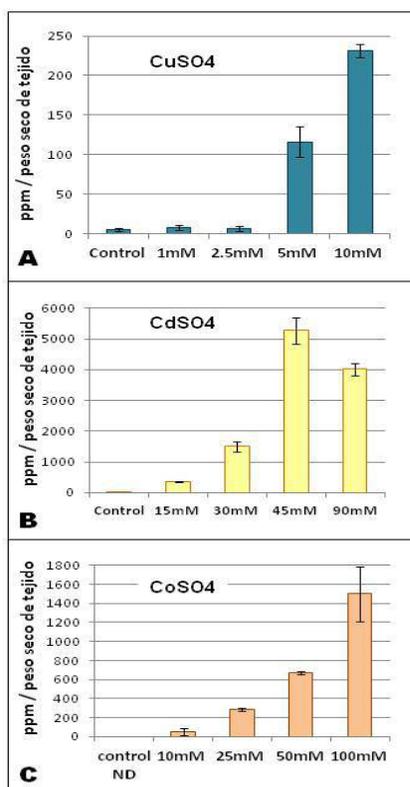


Fig. 6. Cuantificación de metales por ICP-AES en tejido foliar de plantas de *A. tequilana* tratadas durante ocho días con diferentes concentraciones de A) CuSO₄, B) CdSO₄ o C) CoSO₄.

metálicos, está siendo explorada en *A. tequilana* (Cen-Cen, 2013); aunque no es claro que tengan un papel confiriendo tolerancia a Cd en plántulas de *A. lechuguilla* (Méndez-Hurtado *et al.*, 2013). La inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por Cd y Zn, como ocurre en otras plantas (Lin y Aarts, 2012), también debe ser analizada en esta especie. La identidad, afinidad y especificidad de los transportadores involucrados en la toma, transporte y distribución de metales en los agaves debe ser elucidada. La posible interacción en la toma de distintos metales puede ser estudiada en cultivos in vitro, utilizando soluciones nutritivas.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, no existen reportes previos indicativos de que las plantas cultivadas de *A. tequilana* acumulen cantidades altas de metales en sus tejidos. Esto probablemente se debe a que este cultivo no se encuentra naturalmente expuesto a suelos con altas cantidades de metales. Sin embargo; considerando la notable producción de biomasa de los agaves y la existencia de especies que crecen en zonas mineras; experimentos de larga duración, en suelo son requeridos para explorar el potencial de esta especie como agente biorremediador.

CONCLUSIONES

A. tequilana es una especie tolerante a muy altas concentraciones de iones metálicos; en particular a Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} ; los cuales tolera a concentraciones mil veces o más altas que otras plantas, y es capaz de acumular en sus hojas una alta cantidad de metales sin presentar síntomas de toxicidad, especialmente Cd. La capacidad de los agaves para hiperacumular metales en

exposiciones prolongadas, así como su posible utilidad como agente biorremediador de suelos contaminados con metales pesados debe ser determinada. Los mecanismos bioquímicos y celulares involucrados en la gran tolerancia de los agaves ante iones metálicos deben ser elucidados.

LITERATURA CITADA

- Adriano, DC., 1992. *Biogeochemistry of trace metals. Advance in Trace Substances Research*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 513 pp.
- Ahmad, M.S., y M. Ashraf, 2011. "Essential roles and hazardous effects of nickel in plants". *Rev Environ Contam Toxicol.*, **214**: 125-167.
- Alcántar, G.G., y V.M. Sandoval, 1999. *Manual de análisis químico de tejido vegetal*. Publicación Especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México.
- Álvarez-Sánchez, M.E.; J. Velázquez-Mendoza, R. Maldonado-Torres, G. Almaquer-Vargas, y A.L. Solano-Agama, 2010. "Diagnóstico de la fertilidad y requerimiento de cal de suelos cultivados con agave azul (*Agave tequilana* Weber)". *Terra Latin*, **28**: 287-293.
- Babula, P.; M. Masarik, V. Adam, T. Eckschlager, M. Stiborova, L. Trnkova, H. Skutkova, I. Provaznik, J. Hubalek, y R. Kizek, 2012. "Mammalian metallothioneins: properties and functions". *Metallomics*, **4**(8):739-750.

- Balsberg-Pahlsson, A.M., 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants". *Water Air Soil Pollut.*, **47**(3-4):287-319.
- Barrios-Ayala, A., F.R. Ariza, M.J.M. Molina, P.H. Espinosa, M.E.Bravo, 2006. "Manejo de la fertilización de magueyes mezcaleros cultivados (*Agave* spp) de Guerrero. Iguala, Gro., México". INIFAP. Campo Experimental Iguala. 48 pp. (Folleto Técnico Núm. 13).
- Basta, N.T.; J.A. Ryan, y R.L. Chaney, 2005. "Trace Element Chemistry in Residual-Treated Soil". *J. Environ. Qual.*, **34**(1):49-63.
- Bautista-Cruz, A., R. Carrillo-González, M.R. Arnaud-Viñas, C. Robles, y F. de León-González, 2007. "Soil fertility properties on *Agave angustifolia* Haw. plantations". *Soil Till Res.*, **96**: 342-349.
- Bautista-Cruz, A.; F. De León-González, R. Carrillo-González, y C. Robles, 2011. "Identification of soil quality indicators for maguey mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) plantations in Southern Mexico". *Afr J Agr Res.*, **6**(20): 4795-4799.
- Becker, M., y F. Asch, 2005. "Iron toxicity in rice- conditions and management concepts". *J. Plant. Nutr. Soil. Sci.*, **168**: 558-573
- Broadley, M.R.; P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko, y A. Lux, 2007. *Zinc in plants*. New Phytol. **173**(4):677-702.
- Cen-Cen, E.R., 2009. "Análisis Molecular y de expresión, por RT-PCR, de genes de Metalotioneínas en *Agave tequilana* Weber var. *azul*". Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Calkiní (ITESCAM).
- Cen-Cen, E.R., 2013. "Explorando la función de las metalotioneínas del *Agave*". Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados campus Campeche.
- Clemens, S., 2001." Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis". *Planta*, **212**(4):475-486.
- Cobbett, C., y P. Goldsbrough, 2002. "Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis". *Annu Rev Plant Biol.*, **53**: 159-182.
- Collins, R.N.; E. Bakkaus, M. Carrière, H. Khodja, O. Proux. J.L Morel, y B. Gouget, 2010. "Uptake, localization, and speciation of cobalt in *Triticum aestivum* L. (wheat) and *Lycopersicon esculentum* M. (tomato)". *Environ Sci Technol.*, **44**(8): 2904-2910.
- CONABIO. 2005. Mapa Mezcales y Diversidad. © Conabio, México.
- Coyle, P.; J.C. Philcox, L.C. Carey, A.M. Rofe, 2002. "Metallothionein: the multipurpose protein". *Cell Mol Life Sci.*, **59**(4):627-647.
- Díaz, J.G.; G. Rojas, Him de F Y, Hernández de B.N., E. Torrealba, y Z. Rodríguez, 2011. "Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento en vivero

- de Cocuy (*Agave cocui* Trelease)". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, **28**(S1): 264-272.
- Fernandes, J.C., y F.S. Henriques, 1991. "Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants". *Bot. Rev.*, **57**(3): 246-273.
- Freisinger, E., 2010. "The metal-thiolate clusters of plant metallothioneins". *Chimia (Aarau)*, **64**(4): 217-224.
- Freisinger, E., 2011. "Structural features specific to plant metallothioneins". *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**(7): 1035-1045.
- García-Mendoza, A., 2002. "Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico". *Cact. Succ. J.*, **74**: 177-187.
- García-Mendoza, A., y R. Galván, 1995. "Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México". *Bol. Soc. Bot.*, **56**: 7-24.
- Gentry, H.S., 1982. *Agaves of continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona, USA. 670 pp.
- Gopal, R.; B.K. Dube, P. Sinha, y C. Chatterjee, 2003. "Cobalt Toxicity Effects on Growth and Metabolism of Tomato". *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.*, **34**(5-6): 619-628.
- Grennan, A.K., 2011. "Metallothioneins, a diverse protein family". *Plant Physiol.*, **155**(4): 1750-1751.
- Guo, W.J.; M. Meetam, P.B. Goldsbrough, 2008. "Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance". *Plant Physiol.*, **146**(4): 1697-1706.
- Hall, J.L., 2002. "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance". *J. Exp. Bot.*, **53**(366): 1-11.
- Hasan, S.A.; Q. Fariduddin, B. Ali, S. Hayat, y A. Ahmad, 2009. "Cadmium: toxicity and tolerance in plants". *J. Environ. Biol.*, **30**(2): 165-74.
- He, Z.L.; X.E. Yang, y P.J. Stoffella, 2005. "Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment". *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, **19**(2-3): 125-140.
- Jiang, W.; D. Liu, y W. Hou, 2001. "Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.)". *Biores Technol.*, **76**(1): 9-13.
- Kim, Y.O.; Y.G. Lee, D.H. Patel, H.M. Kim, S.J. Ahn, y H.J. Bae, 2012. "Zn tolerance of novel *Colocasia esculenta* metallothionein and its domains in *Escherichia coli* and tobacco". *J. Plant. Res.*, **125**(6): 793-804.
- Klaassen, C.D.; J. Liu, y B.A. Diwan, 2009. "Metallothionein protection of cadmium toxicity". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **238**(3): 215-220.
- Krämer, U., 2010. "Metal hyperaccumulation in plants". *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **61**: 517-534.
- Lee, S.; J.S. Moon, T.S. Ko, D. Petros, P.B. Goldsbrough, y S.S. Korban,

2003. "Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress". *Plant Physiol.*, **131**(2):656-663.
- Leitenmaier, B., y H. Küpper, 2013. "Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants". *Front. Plant. Sci.*, **4**: 374.
- Lequeux, H.; C. Hermans, S. Lutts, y N. Verbruggen, 2010. "Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile". *Plant Physiol Biochem.*, **48**(8): 673-682.
- Leszczyszyn, O.I.; H.T. Imam, y C.A. Blindauer, 2013. "Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions". *Metallomics*, **5**(9): 1146-1169.
- Lin, Y.F., y M.G. Aarts, 2012. "The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants". *Cell Mol Life Sci.*, **69**(19): 3187-3206.
- Lux, A.; M. Martinka, M. Vaculik, y P.J. White, 2011. "Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review". *J. Exp. Bot.*, **62**(1): 21-37.
- Macnair, M.R., 1987. "Heavy metal tolerance in plants: A model evolutionary system". *Trends. Ecol. Evol.*, **2**(12): 354-359.
- Margoshes, M., y B.L. Valee, 1957. "A cadmium protein from equine kidney cortex". *J. Am. Chem. Soc.*, **79**: 4813-4814.
- Martínez-Ramírez, S.; A. Trinidad-Santos, C. Robles, A. Galvis-Spinola, T.M. Hernández-Mendoza, J.A. Santizo-Rincón, G. Bautista-Sánchez, y E.C. Pedro-Santos, 2012. Crecimiento y sólidos solubles de *Agave potatorum* Zucc. inducidos por riego y fertilización". *Rev. Fitotec. Mex.*, **35**(1):61-68.
- Méndez-Hurtado, A.; R. Rangel-Méndez, L. Yáñez-Espinosa, y J. Flores, 2013. "Tolerance to cadmium of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) seeds and seedlings from sites contaminated with heavy metals". *Sci. World. J.*, 2013:167834. doi: 10.1155/2013/167834. eCollection 2013.
- Merian, E., 1991. *Metals and their Compound in the Environment: Occurrence, Analysis, and Biological Relevance*. VCH, Weinheim, 1438 pp.
- Millaleo, R.; M. Reyes-Díaz, A.G. Ivanov, M.L. Mora, y M. Alberdi, 2010. "Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms". *J. Soil. Sci. Plant. Nutr.*, **10**(4): 470-481.
- Milner, M.J., y L.V. Kochian, 2008. "Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system". *Ann Bot.*, **102**(1): 3-13.
- Murashige, T., y F. Skoog, 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol Plant.*, **15**(3): 473-497.
- Nobel, P.S.; E. Quero, y H. Linares, 1988. "Differential growth responses of agaves to nitrogen, phosphorus, potas-

- sium, and boron application". *J. Plant Nutr.*, **11**: 1683-1700.
- Nobel, P.S., y W.L. Berry, 1985. "Element Responses of *Agaves*". *Am. J. Bot.*, **72**(5): 686-694.
- NOM-059-ECOL-2001. "Norma Oficial Mexicana en materia de protección de flora y fauna". *Diario Oficial de la Federación*, Segunda Sección. 6 marzo 2002.
- Palmiter, R.D., 1998. "The elusive function of metallothioneins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(15): 8428-8430.
- Petit, A.N.; F. Fontaine, P. Vatsa, C. Clément, y N. Vaillant-Gaveau, 2012. "Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants". *Photosynth. Res.*, **111**(3): 315-326.
- Pilon-Smits, E.A.; C.F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli, y M. Schiavon, 2009. "Physiological functions of beneficial elements". *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**(3): 267-274.
- Rulfo, V.F.O.; D.J.F. Pérez, L.J.I. del Real, y M.J.F. Byerly (eds.), 2007. *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de denominación de origen del tequila*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Senesil, G.S.; G. Baldassarre, N. Senesi, y B. Radina, 1999. "Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health". *Chemosphere*, **39**(2): 343-377.
- Sharma, R.K., y M. Agrawal, 2005. "Biological effects of heavy metals: an overview". *J. Environ. Biol.*, **26**(S2): 301-313.
- Soudek, P.; S. Petrová, y T. Vaněk, 2011. "Heavy metal uptake and stress responses of hydroponically cultivated garlic (*Allium sativum* L.)". *Environ. Exp. Bot.*, **74**: 289-295.
- Suh, M.C.; D. Choi, y J.R. Liu, 1998. "Cadmium resistance in transgenic tobacco plants expressing the *Nicotiana glutinosa* L. metallothionein-like gene". *Mol. Cells.*, **8**(6): 678-684.
- Tchounwou, P.B.; C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, D.J. Sutton, 2012. "Heavy metal toxicity and the environment". *EXS*, **101**: 133-164.
- Turchi, A.; I. Tamantini, A.M. Camussi, y M.L. Racchi, 2012. "Expression of a metallothionein A1 gene of *Pisum sativum* in white poplar enhances tolerance and accumulation of zinc and copper". *Plant Sci.*, **183**: 50-56.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA), 1999. *Estimating Risk from Contaminants Contained in Agricultural Fertilizers*. EPA 68-W-98e0085.
- Valenzuela, Z.G., y D.R. González E., 1995. "Fertilización del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber) en la región de Tequila, Jalisco, México. Ensayo

- de una metodología para analizar crecimiento en cultivos multianuales mediante una técnica no destructiva". *Terra*, **13**: 81-95.
- Verbruggen, N.; C. Hermans, y H. Schat, 2009. "Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants". *New Phytol.*, **181**(4): 759-776.
- Wusheng, J.; L. Donghua, y H. Wenqiang, 2001. "Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.)". *Bioresour. Technol.*, **76**(1): 9-13.
- Xu, P.; J. Zou, Q. Meng, J. Zou, W. Jiang, y D. Liu, 2008. "Effects of Cd(2+) on seedling growth of garlic (*Allium sativum* L.) and selected physiological and biochemical characters. *Bioresour. Technol.*, **99**(14): 6372-6378.
- Yang, Z.; Y. Wu, Y. Li, H.Q. Ling, y C. Chu, 2009. "OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice". *Plant. Mol. Biol.*, **70**(1-2): 219-229.
- Yruela, I., 2013. "Transition metals in plant photosynthesis". *Metallomics*, **5**(9): 1090-1109.
- Zhang, H.; Y. Jiang, Z. He, y M. Ma, 2005. "Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*)". *J. Plant. Physiol.*, **162**(9): 977-984.
- Zhigang, A.; L. Cuijie, Z. Yuangang, D. Yejie, A. Wachter, R. Gromes, y T. Rausch, 2006. "Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings". *J. Exp. Bot.*, **57**(14): 3575-3582.

Recibido: 25 noviembre 2013. Aceptado: 15 enero 2015.