



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

INFLUENCIA DE LA ASOCIACIÓN INDUCIDA ENTRE *Dodonaea viscosa* Y UN HONGO ENDÓFITO SOBRE LA TOLERANCIA Y BIOACUMULACIÓN DE PLOMO Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

PRESENTA:

IBQ. Blanca Estela Anicacio Acevedo

DIRECTORA:

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Lector externo:

Dra. María del Rosario Peralta Pérez

Abril 2014

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la Idónea Comunicación de Resultados:

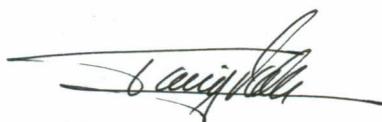
INFLUENCIA DE LA ASOCIACIÓN INDUCIDA ENTRE *Dodonaea viscosa* Y UN HONGO ENDÓFITO SOBRE LA TOLERANCIA Y BIOACUMULACIÓN DE PLOMO Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Presentada por la alumna:

Blanca Estela Anicacio Acevedo

Comité tutorial:

Directora:

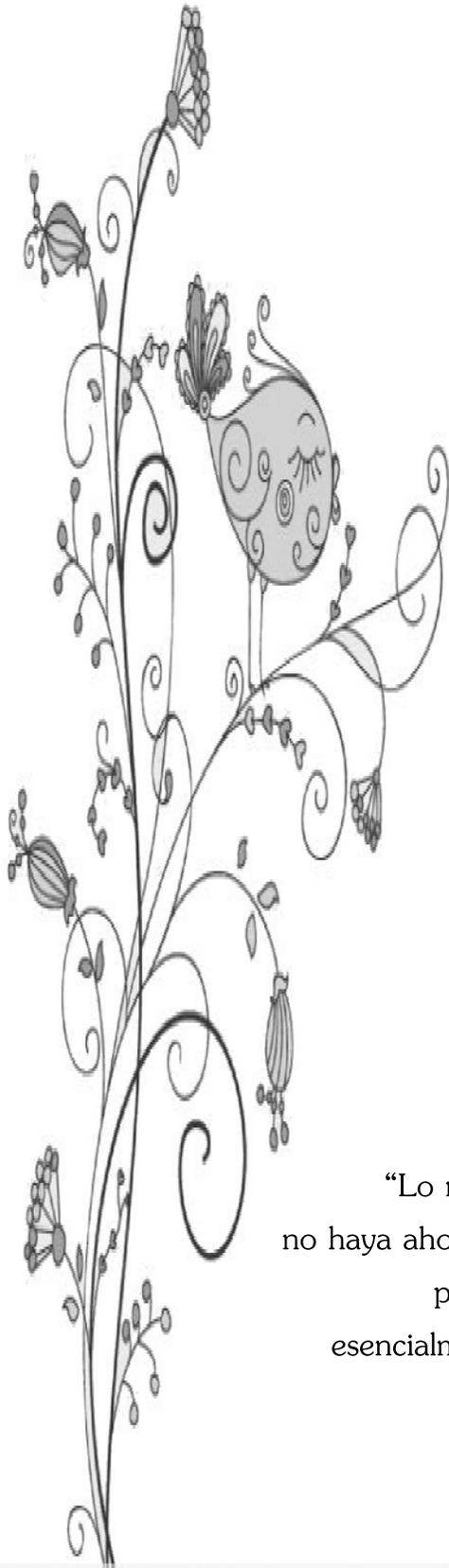


Dra. Tania L. Volke Sepúlveda
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Lector externo:



Dra. María del Rosario Peralta Pérez
Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Ciencias Químicas



“Lo maravilloso es que el ejercicio moderno de la enseñanza no haya ahogado por completo la sagrada curiosidad por investigar, pues esta delicada plantita, además de estímulo, necesita, esencialmente, la libertad, sin la cual perece de modo inevitable”

Albert Einstein.

Dedicatoria

A mi mamá

Por ser ese eje que me impulsa día a día a crecer y a no limitarme por las adversidades.

Aurora

Por sembrar la semillita, por creer en mí y ser esa luz que ilumina mi camino.

Tania

Sin ella no habría sido posible cumplir este proyecto tan significativo en mi vida.

Gloria e Isabel

Por ser las amigas incondicionales que siempre tienen palabras de aliento y me ponen en sus oraciones.

Agradecimientos

A mi directora Dra. Tania Volke:

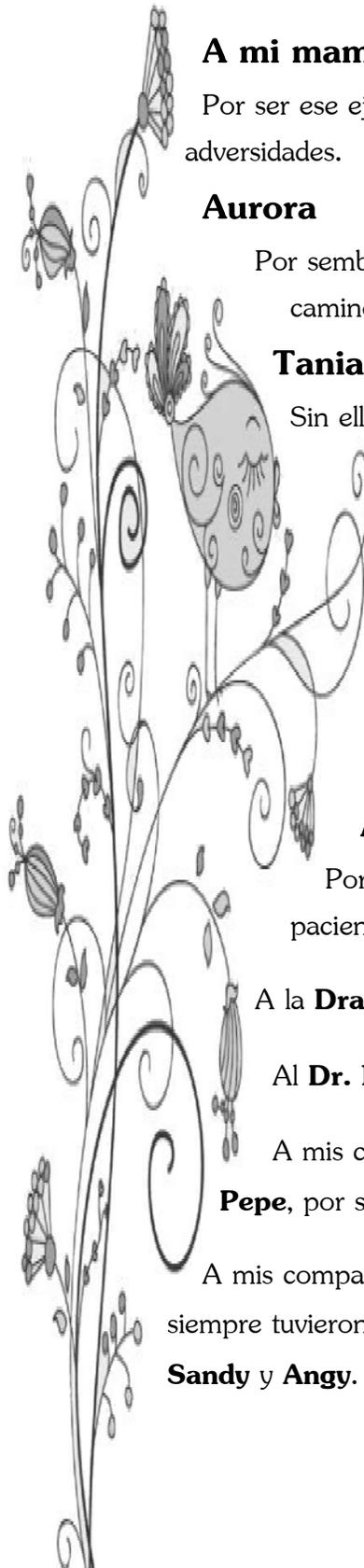
Por darme la oportunidad y creer en mí, por su apoyo incondicional, su paciencia, sus consejos y sobre todo su cariño y amistad.

A la **Dra. Rosario Peralta**, por brindarme su apoyo y cariño.

Al **Dr. Mariano** por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: **Nemi, César, Asma, Oli** y **Pepe**, por su amistad, paciencia y por su apoyo y ayuda cuando la necesite.

A mis compañeros de laboratorio que aunque no siempre estuvimos juntos, siempre tuvieron consejos y apoyo para mí: **Bety, Gloria, Nancy, Sheila, Yeny, Sandy** y **Angy**.



CONTENIDO

1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
1.1	La contaminación de suelos por elementos potencialmente tóxicos (EPT)	2
1.2	Fitorremediación de suelos contaminados por EPT.....	3
1.3	Hongos endófitos septados oscuros	9
1.4	Fitotoxicidad por elementos potencialmente tóxicos	11
1.5	Mecanismos de resistencia a elementos potencialmente tóxicos	13
2	JUSTIFICACIÓN.....	21
3	HIPÓTESIS.....	23
4	OBJETIVOS.....	25
4.1	General	25
4.2	Específicos	25
5	MÉTODOS Y MATERIALES.....	27
5.1	Estrategia experimental	27
5.2	Material biológico	28
5.3	Medios de cultivo	29
5.4	Pruebas de asociación con <i>D. viscosa</i>	31
5.5	Tolerancia y acumulación de plomo	33
5.6	Métodos analíticos	33
5.7	Actividades enzimáticas	35
5.8	Análisis estadístico	36
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1	Identificación morfológica de cepas fúngicas	38
6.2	Pruebas de asociación con <i>D. viscosa</i>	40
6.3	Pruebas de tolerancia y acumulación de plomo	47
6.4	Defensa antioxidante	55
7	CONCLUSIONES.....	61
8	BIBLIOGRAFÍA	63
9	ANEXO 1	68

ABREVIATURAS.

•OH:	Radical Hidroxilo
¹O₂:	Oxígeno singlete
Ag:	Plata
As:	Arsénico
Au:	Oro
C/K:	Relación Carbono-Potasio
C/N:	Relación Carbono-Nitrogeno
C/P:	Relación Carbono-Fósforo
CAT:	Catalasa
Cd:	Cadmio
Cu:	Cobre
DI	Desionizada
EPT:	Elemento (s) Potencialmente Toxico(s).
ERO:	Especies Reactivas de Oxígeno
ESO:	Endófito Septado Oscuro
FBC:	Factor de bioacumulación
FEst:	Factor de estabilización
FT:	Factor de translocación
G-POX:	Guayacol Peroxidasa
GSH:	Glutación
GST:	Glutación-S-transferasa
H:	Hongo solo
H₂O₂:	Peróxido de Hidrógeno
Hg:	Mercurio
MSM:	Murashige-Skoog Modificado (medio de cultivo)
MSM1:	Murashige-Skoog modificado (medio de cultivo con baja concentración de nutrientes)
MSM2:	Murashige-Skoog modificado (medio de cultivo con el doble de la cantidad de nutrientes de MSM1)
O₂:	Oxígeno molecular
O₂^{•-}:	Radical superóxido
P:	Planta sola
Pb:	Plomo
Pb(NO₃)₂:	Nitrato de plomo
PH:	Planta con hongo
POX:	Peroxidasa
ppm:	Partes por millón (mg·kg ⁻¹)
Se:	Selenio
Si:	Silicio
Zn:	Zinc
ε	Coeficiente de extinción molar

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del Pb en las actividades enzimáticas de diferentes especies de plantas.	16
Tabla 2. Composición del medio Murashige-Skoog modificado (MSM) utilizado en los ensayos de asociación entre <i>D. viscosa</i> y hongos endófitos.	30
Tabla 3. Composición del medio Murashige-Skoog modificado (MSM2) utilizado en los ensayos de tolerancia y acumulación de Pb por <i>D. viscosa</i> y la asociación planta-hongos endófitos.	31
Tabla 4. Acumulación de Pb en tallos y raíces de <i>D. viscosa</i> crecida sin hongo (P+Pb) y con hongo (PH+Pb). Los datos de H+Pb corresponden a la biomasa de <i>Cladosporium sp.</i> recuperada de la agrolita de la zona radicular. Se muestran los factores de translocación (FT), fitoestabilización (FEst) y bioconcentración (FBC)*.	51
Tabla 5. Valores de pH y distribución de fracciones de Pb en el sistema agrolita-planta-hongo. Las plántulas de <i>D. viscosa</i> fueron expuestas a 2000 mg Pb·kg ⁻¹ por 60 días, en presencia (P+Pb) o no de <i>Cladosporium sp.</i> (PH+Pb). Los datos indican la fracción de Pb soluble (Pb soluble) e insoluble (Pb insoluble) en la agrolita, y la fracción bioacumulada en biomasa fúngica (Hongo) y en la planta (Planta)*.	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de los procesos de fitorremediación aplicables a suelos contaminados con EPT. Éstos procesos implican el uso de plantas y los microorganismos asociados para extraer (fitoextracción), transformar y/o estabilizar (fitoestabilización) contaminantes inorgánicos en un suelo (Kidd et al., 2009).....	3
Figura 2. Principales grupos de hongos asociados a las plantas, capaces de colonizar los tejidos de la misma, (modificado de Porras-Alfaro y Bayman, 2011).	6
Figura 3. Como parte de la comunidad fúngica, los hongos endófitos pueden tener uno o varios papeles funcionales durante su ciclo de vida como respuesta a señales ambientales o de las plantas (modificado de Porras-Alfaro y Bayman, 2011).	7
Figura 4. Los beneficios de la simbiosis planta-hongo incluye el intercambio recíproco de nutrientes y la protección contra condiciones bióticas y abióticas de estrés en el ambiente del suelo (modificado de Selosse y Rousset, 2011).	9
Figura 5. Polímero de eumelanina constituido por los polímeros 5,6-dihidroindol (DHI) y 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHIAC) (modificado de Manivasagan et al., 2013).	10
Figura 6. Generación de ERO por transferencia de energía (Modificado de Gill y Tuteja, 2010).	12
Figura 7. Las ERO son moléculas producidas en diferentes compartimentos celulares a partir de diferentes rutas metabólicas en las plantas. Cuando una planta se encuentra bajo condiciones de estrés abiótico, las células sobreproducen ERO, lo que conduce a un daño oxidativo y, eventualmente, a la muerte celular (Modificado de Gill y Tuteja, 2010).	13
Figura 8. Estructura del glutati6n (GSH) mostrando su grupo ti6lico (SH) (Modificada de Konigsberg, 2008).	17
Figura 9. Estructura del complejo formado por el glutati6n (GSH) y los EPT por acci6n de la enzima glutati6n S-transferasa (GST) (modificada de Townsend y Tew, 2003).	18
Figura 10. Estrategia experimental general. Los cuadros oscuros muestran las variables de respuesta que fueron determinadas.	27
Figura 11. Semillas de <i>Dodonaea viscosa</i> L. (Jacq.) (Chapuixtle), un arbusto perenne de la familia Sapindaceae con frutos secos dentro de una c6psula con 3 alas.	28
Figura 12. Morfología colonial de cepas aisladas de semillas de <i>D. viscosa</i> (a, b y c), identificadas dentro del género <i>Cladosporium</i> (DSE). Morfología colonial de cepas aisladas de raíces de árboles de los géneros <i>Acacia</i> (d) y <i>Prosopis</i> (e), identificadas dentro de los géneros <i>Penicillium</i> (AA-1) y <i>Aspergillus</i> , (CE-1).	29
Figura 13. Características morfológicas de las cepas DO-S. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a, b y c) y la morfología microsc6pica de hifas y estructuras reproductoras (10X) (d, e y f).	38
Figura 14. Características morfológicas de la cepa AA-1. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a) y la morfología microsc6pica de hifas y estructuras reproductoras (10X) (b).	39
Figura 15. Características morfológicas de las diferentes cepas. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a) y la morfología microsc6pica de hifas en (fase asexual) y células hülle (fase sexual) (10X) (b y c, respectivamente).	40
Figura 16. Crecimiento de plántulas de <i>D. viscosa</i> después de 60 días de incubaci6n sin in6culo (control) o inoculada con las cepas identificadas como DO-S, DO-PB, DO-PC, AA-1, CE-1. Las cepas identificadas como DO, son hongos septados oscuros del género <i>Cladosporium</i> , AA-1 son hongos del género <i>Penicillium</i> y CE-1 son hongos del género <i>Aspergillus</i> . MSM1 corresponde al medio de cultivo con menor contenido de nutrientes y MSM2 al medio con mayor concentraci6n de nutrientes.	41

Figura 17. Numero de hojas producidas por <i>D. viscosa</i> en función de la composición del medio de cultivo y de la cepa inoculada. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$, $n = 5$)	42
Figura 18. Producción de biomasa (peso seco, PS) de tallos y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas durante 60 días en ausencia (C) o presencia de los hongos en estudio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$, $n = 5$).....	43
Figura 19. Elongación de tallos y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas durante 60 días en ausencia (C) o presencia de los hongos en estudio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$, $n = 5$).	44
Figura 20. Crecimiento de la cepa DO-S en fragmentos desinfectados de tallos (izquierda) y de hojas (derecha) de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas en presencia del hongo. Los fragmentos se colocaron en gotas de Phytigel con $MgSO_4$ y antibióticos (a). Se observa la proliferación de hifas desde el interior del fragmento a las 48 (b), 72 (c) y 96 (d) horas de incubación.	46
Figura 21. Crecimiento de la cepa DO-S en placas con PDA a partir de fragmentos desinfectados de tallos, raíces y hojas de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas durante 4 días con el hongo. Se muestra el crecimiento a las 96 horas de incubación a 30°C.	47
Figura 22. Crecimiento de plántulas de <i>D. viscosa</i> durante 60 días en presencia o no (control) de la cepa DO-S de <i>Cladosporium</i> sp. en medio MSM2 con agrolita como soporte inerte. P: planta sin Pb sin hongo; PH: planta sin Pb con hongo; P + Pb: planta con Pb sin hongo; PH + Pb: planta con Pb con hongo.	48
Figura 23. Número de hojas (a), producción de biomasa (peso seco, PS) de tallos y raíces (b) y crecimiento relativo con respecto a la biomasa total (c) de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas por 60 días con diferentes tratamientos. P: planta sin Pb sin hongo; PH: planta sin Pb con hongo; P + Pb: planta con Pb sin hongo; PH + Pb: planta con Pb con hongo. Letras diferentes indican diferencias significativas por variable ($p < 0.05$, $n = 10$).	49
Figura 24. Actividad catalasa (CAT) en extractos celulares de tallos de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas durante 60 días con diferentes tratamientos. P, planta sin Pb sin hongo; PH, planta sin Pb con hongo; P+Pb, planta con Pb sin hongo; PH+Pb, planta con Pb con hongo ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).	56
Figura 25. Actividad guayacol peroxidasa (G-POX) en extractos celulares de tallos y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas durante 60 días con diferentes tratamientos. P, planta sin Pb sin hongo; PH, planta sin Pb con hongo; P+Pb, planta con Pb sin hongo; PH+Pb, planta con Pb con hongo ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).	57
Figura 26. Actividad glutatión-S-transferasa (GST) en extractos frescos de tallos y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas durante 60 días con diferentes tratamientos. P, planta sin Pb sin hongo; PH, planta sin Pb con hongo; P+Pb, planta con Pb sin hongo; PH+Pb, planta con Pb con hongo ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).....	59

RESUMEN

La **fitorremediación** es una de las pocas alternativas técnica y económicamente factible para la remediación de suelos contaminados por EPT, como el Pb. No obstante, para aplicar esta tecnología debe considerarse el efecto de los microorganismos asociados. En este sentido, las interacciones planta microorganismo en condiciones de estrés por EPT ha ganado gran atención debido al potencial biotecnológico que tienen muchos microorganismos para removerlos directamente de medios contaminados y a su efecto benéfico en el crecimiento vegetal. Sin embargo, es importante considerar que el éxito de estas asociaciones en la recuperación de suelos contaminados depende de las condiciones particulares del suelo.

El presente estudio evaluó el efecto de la concentración de nutrientes en el medio sobre el efecto de la asociación *Dodonaea viscosa*-hongo endófito con cinco cepas y el efecto de la asociación con una de las cepas, bajo condiciones de estrés por Pb. Las cepas fueron identificadas molecularmente como los géneros: *Cladosporium* spp. (DO-S, DO-PB y DO-PC), *Penicillium* sp. (AA-1) y *Aspergillus* sp. (CE-1). De los dos medios evaluados (MSM1 y MSM2) se encontró que en el medio con alta concentración de nutrientes (MSM2), las cepas pertenecientes al género *Cladosporium* spp., estimularon el crecimiento vegetal (37-76%), con respecto al control. Con base en estos resultados, se seleccionó el medio MSM2 para evaluar el efecto de la asociación con la cepa DO-S (*Cladosporium* sp.) en la tolerancia y bioacumulación de Pb por *D. viscosa*. De estos experimentos se observó que la presencia del hongo estimuló el crecimiento de la planta en presencia de Pb (>70%); además de que provocó una disminución (~50%) en la bioacumulación en raíces con respecto al control (~14,000 mg kg⁻¹ PS). De acuerdo a los resultados de la actividad CAT, la tolerancia al Pb mostrada por *D. viscosa* se relaciona con la actividad de esta enzima, independientemente de la asociación con *Cladosporium* sp. Mientras que la actividad G-POX en la asociación, se estimuló en tallos y disminuyó en raíces independientemente de la exposición a Pb.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El suelo es un cuerpo natural no consolidado, compuesto por sólidos (material mineral y orgánico), líquidos y gases, que se caracteriza por tener horizontes o capas diferenciales, resultado de las adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia a través del tiempo, y cuyo espesor puede ir desde la superficie terrestre hasta varios metros de profundidad. Constituye un recurso natural de gran importancia, que desempeña funciones en la superficie terrestre como reactor natural y hábitat de organismos, así como soporte de infraestructura y fuente de materiales no renovables (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). El suelo constituye junto con el agua, el aire y la luz solar, el fundamento de la vida en los ecosistemas terrestres, albergando una gran diversidad de organismos (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

1.1 La contaminación de suelos por elementos potencialmente tóxicos (EPT)

Actualmente, el desarrollo de nuevas tecnologías de toda índole depende de diversos elementos potencialmente tóxicos (EPT), que se recuperan de minerales mediante actividades minero-metalúrgicas o del reciclaje de otros materiales, ya que muchos de los componentes de los nuevos equipos (computadoras, instrumentos analíticos y teléfonos celulares, entre otros) están fabricados de EPT, como el hierro (Fe), cobre (Cu), cadmio (Cd), oro (Au), plomo (Pb), plata (Ag) y silicio (Si) (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). La excavación de minas, la remoción de minerales y el proceso y la extracción de EPT pueden causar daños ambientales y, en casos extremos, destruir el ecosistema; por ejemplo, se pueden dañar tierras de cultivo, favorecer la erosión y contaminar cuerpos de agua con sales solubles de EPT, como arsénico (As), selenio (Se), plomo (Pb), cadmio (Cd) y óxidos de selenio (Se), entre otros (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

En México, la separación del mineral de los materiales sin valor se lleva a cabo básicamente a través de dos métodos: la flotación y la hidrometalurgia. Los impactos ambientales ocasionados por los métodos de flotación aumentan proporcionalmente con el incremento del uso de reactivos para favorecer el proceso. Los EPT más comunes derivados de estos procesos son Pb, Cd, Zn, As, Se y Hg (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

La contaminación del suelo con estos EPT, afecta actualmente alrededor de 235 millones de hectáreas, siendo el Cd y el Pb dos de los contaminantes más frecuentes (Seregin e Ivanov, 2001). Debido a que los EPT no pueden ser eliminados por procesos fisicoquímicos o biológicos, una vez liberados en el suelo, la remediación únicamente se puede lograr a través de los cambios en su estado redox, modificando su solubilidad, movilidad y/o toxicidad (Kidd *et al.*, 2009; Rajkumar *et al.*, 2012).

1.2 Fitorremediación de suelos contaminados por EPT

La **fitorremediación** (Figura 1) es una de las pocas alternativas técnica y económicamente factible para la remediación de suelos contaminados por EPT. En tal caso, la recuperación de un suelo ocurre a través de varios procesos que involucran a las plantas y los microorganismos asociados a ellas. La fitorremediación de EPT puede lograrse a través de: (i) la fitoextracción, que implica la remoción del EPT por su acumulación en los tejidos aéreos, o de (ii) la fitoestabilización, en la cual se promueve la estabilización de EPT a través de su transformación, reducción de solubilidad o su acumulación en las raíces (Kidd *et al.*, 2009; Rajkumar *et al.*, 2012).

A pesar de ser considerada como una tecnología muy prometedora y factible para la remediación de sitios contaminados, aún existe una serie de limitantes para su implementación, lo que conduce a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias. Ya que la fitorremediación no depende únicamente de las funciones de la planta, siempre debe considerarse en combinación con el efecto de los microorganismos. En este sentido, las interacciones entre EPT, microorganismos y plantas ha ganado gran atención debido al potencial biotecnológico que tienen muchos microorganismos para remover EPT directamente de medios contaminados y a su posible efecto benéfico en el crecimiento vegetal en suelos contaminados (Deng *et al.*, 2011).

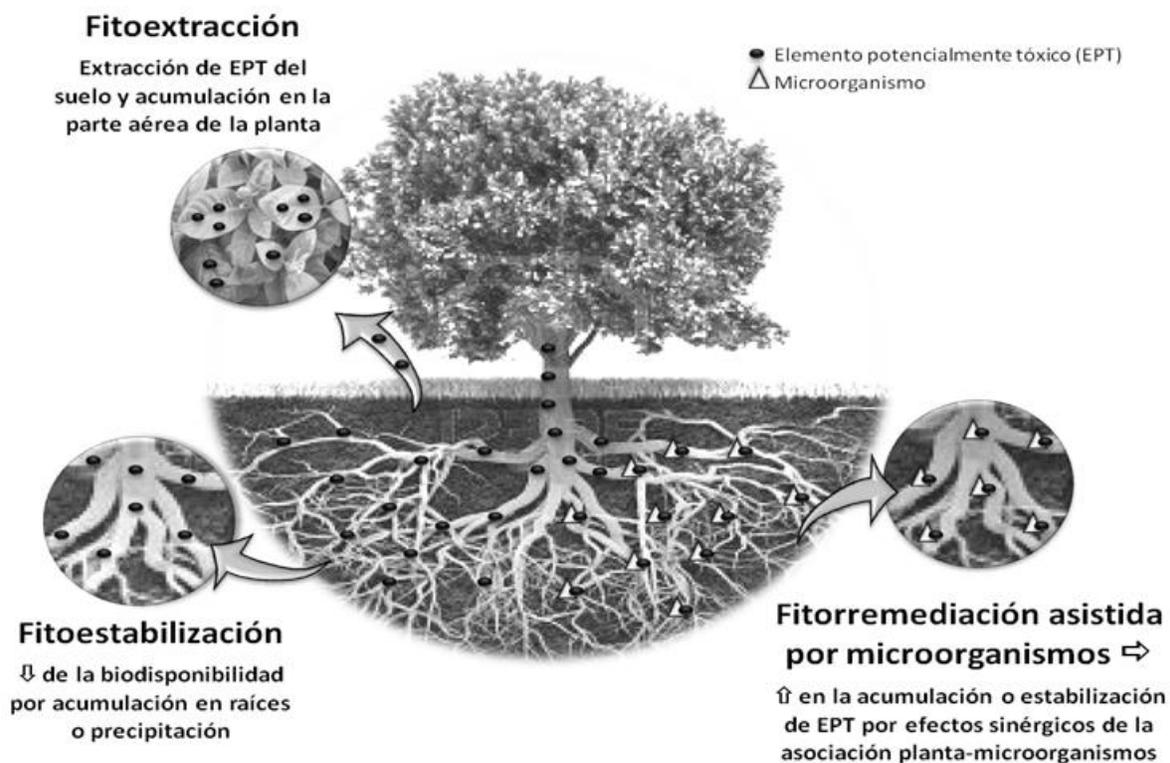


Figura 1. Esquema general de los procesos de fitorremediación aplicables a suelos contaminados con EPT. Éstos procesos implican el uso de plantas y los microorganismos asociados para extraer (fitoextracción), transformar y/o estabilizar (fitoestabilización) contaminantes inorgánicos en un suelo (Kidd *et al.*, 2009).

La acción combinada de plantas y microorganismos durante un proceso de remediación se conoce como **fitorremediación asistida por microorganismos**, la cual mejora la eficiencia de extracción y/o estabilización de los EPT. El uso de este tipo de asociaciones puede actuar a través de un aumento en la biodisponibilidad de los contaminantes por los microorganismos, mientras la planta interviene en su extracción y remoción del sitio contaminado (Adams *et al.*, 2007; Kidd *et al.*, 2009). La interface suelo-raíz (rizósfera) y el volumen que rodea las raíces, llamado rizoplasma, se caracteriza por procesos como la exudación de compuestos orgánicos, respiración de la raíz, liberación de iones y por la adsorción de agua y solutos. La liberación de compuestos orgánicos y los procesos metabólicos de plantas y microorganismos asociados en la rizósfera, determinan el comportamiento de los EPT en esta zona (Kidd *et al.*, 2009).

Esta serie de procesos en la rizósfera modifica de diferentes maneras el comportamiento de un EPT en el suelo. Por un lado, pueden estimularse procesos de **biomineralización**¹, lo cual puede mejorar el crecimiento vegetal en suelos muy contaminados y aumentar la inmovilización de EPT para su fitoestabilización. La actividad en esta zona puede también conducir a un aumento en la disponibilidad de los EPT para su captación por plantas, favoreciendo el proceso de fitoextracción (Kidd *et al.*, 2009). Con base en lo anterior, los microorganismos pueden afectar el éxito de la fitorremediación de dos maneras: (i) reduciendo la toxicidad de los EPT por la disminución de la acumulación en los tejidos aéreos de las plantas, o (ii) mejorando el crecimiento vegetal y/o acumulación de EPT por una disminución en el estrés provocado por estos últimos (Adams *et al.*, 2007; Gadd, 2007).

1.2.1 Fitorremediación asistida por microorganismos rizosféricos

Los **microorganismos rizosféricos** son aquellos que habitan sobre o alrededor de las raíces (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). El rol de estos microorganismos en la fitorremediación no se comprende del todo (Zhuang *et al.*, 2007), por lo que es importante mejorar la comprensión acerca de los mecanismos implicados en la tolerancia, acumulación, exclusión y movilización de EPT por estos microorganismos y su relación con las plantas fitorremediadoras. No obstante, se sabe que éstos modifican la solubilidad, movilidad y la disponibilidad de EPT en el suelo, afectando directamente su adsorción y/o exclusión por las plantas (Zhuang *et al.*, 2007; Kidd *et al.*, 2009). El éxito de las asociaciones rizosféricas en la recuperación de los suelos contaminados depende de la combinación planta-microorganismo-EPT y es influenciada por las condiciones particulares del suelo (Gadd, 2007).

La intensa actividad microbiana en la rizósfera se debe a la presencia de grandes cantidades de carbono liberado como parte de los exudados de las raíces. Las plantas responden a la presencia de microorganismos a través de modificaciones en su crecimiento, por ejemplo, a través de relaciones simbióticas o con organismos de vida libre.

¹ Formación de minerales metálicos por acción de metabolitos producidos por microorganismos (p.ej. oxalatos).

Los efectos directos incluyen la producción de sustancias promotoras de crecimiento, antibióticos y sideróforos, liberados al mismo tiempo por plantas y microorganismos (Kidd *et al.*, 2009).

Las raíces y los microorganismos modifican su entorno en el suelo y las concentraciones en equilibrio de los contaminantes a través de los productos de su actividad metabólica (ácidos carboxílicos, aminoácidos, sideróforos, etc.), que afectan a la fitodisponibilidad de los contaminantes. Por ejemplo, si la concentración de fosfato es limitada, la secreción de ácidos orgánicos por las raíces aumenta, mientras que algunas plantas tolerantes a aluminio liberan ácidos orgánicos como parte de su mecanismo de tolerancia (Kidd *et al.*, 2009).

1.2.2 Fitorremediación asistida por microorganismos endófitos

Aunque altas concentraciones de EPT pueden afectar negativamente la densidad de poblaciones microbianas en la rizosfera de plantas que crecen en los suelos contaminados, usualmente hay microorganismos con mecanismos que les permiten hacer frente a esos contaminantes y que pueden promover procesos de fitorremediación (Kidd *et al.*, 2009). Los grupos microbianos más estudiados para tal fin, han sido las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y los hongos micorrícicos. Entre ellos, los hongos son generalmente más tolerantes que las bacterias (Kidd *et al.*, 2009). Además de estos grupos, hay hongos de vida libre que, en cierta etapa de su ciclo de vida, forman asociaciones benéficas y estables con las raíces, aproximándose a una relación mutualista (Lynch y Moffat, 2005), donde se comportan como organismos endófitos.

El término **endófito** se refiere a un organismo simbiótico (hongos o bacterias) que habita dentro de los tejidos de una planta sin causar síntomas de enfermedad aparente. Estos organismos interactúan y tienen funciones iguales a las de otros grupos que colonizan los tejidos vegetales, como hongos micorrícicos, patógenos, saprótrofos y epífitos (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). Este grupo de microorganismos ha mostrado poseer un gran potencial económico en áreas como la agronomía y la medicina. También se han usado como grupo modelo para estudiar aspectos teóricos de la ecología de comunidades y de la interacción planta microorganismo (Gamboa-Gaitán, 2006). Recientemente, se ha puesto atención al uso de endófitos con fines de fitorremediación, ya que confieren gran potencial adaptativo a las plantas hospederas frente a condiciones abióticas adversas, como la mejora en el crecimiento vegetal, tolerancia a sequía y salinidad, al estrés oxidativo, y a suelos ácidos con alto contenido de Zn y Al, entre otras (Gill y Tuteja, 2010; Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

El uso de microorganismos endófitos con fines de fitorremediación ofrece ventajas con respecto a los rizosféricos: (i) su población es controlada por la planta, reduciendo el problema de competencia entre poblaciones; (ii) pueden mejorar la fitorremediación de EPT, ya que suelen ser más tolerantes que los rizosféricos (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). De hecho, se ha demostrado que algunas bacterias endófitas mejoran la tolerancia de algunas

plantas y su capacidad para degradar contaminantes en el suelo. Por ejemplo, la inoculación de *Lolium perenne* con *Acremonium loliae* incrementó la resistencia de la planta a la toxicidad por Zn (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). Mientras que muchos estudios se centran en el uso de bacterias endófitas, los estudios con hongos endófitos son escasos. No obstante, éstos tienen una gran capacidad para inmovilizar EPT, mediante la formación de oxalatos metálicos insolubles o por su biosorción o quelación como polímeros de melanina (Deng *et al.*, 2011). De hecho, se ha demostrado que hongos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*, además de hongos micorrízicos, tienen gran potencial para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con EPT (Adams *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008).

Además de lo anterior, existen especies de plantas que acumulan altas concentraciones de EPT en sus tejidos, por lo que éstas pueden albergar endófitos tolerantes con potencial de biorremediación. Sin embargo, tales potenciales no han sido bien explorados para la biorremediación de EPT (Deng *et al.*, 2011). Los hongos endófitos reportados como resistentes a EPT pertenecen a una amplia gama de géneros: *Mucor*, *Microsphaeropsis*, *Phoma*, *Alternaria*, *Peyronellaea*, *Steganosporium* y *Aspergillus*. Se han encontrado aislados del mismo taxón en diferentes especies de plantas o en diferentes tejidos de la misma planta con diferente sensibilidad a los EPT, lo que sugiere que los aislados poseen diferentes tolerancias a los EPT debido a la adaptación, a largo plazo, del nicho en los tejidos vegetales que contienen diferentes concentraciones de contaminantes (Li *et al.*, 2012a).

1.2.3 Fitorremediación asistida por hongos endófitos

Los hongos asociados a plantas usualmente se dividen en 5 principales grupos: micorrízicos, patógenos, epífitos, endófitos y saprófitos (Figura 2). La mayoría de los estudios realizados con hongos se centran en uno solo de estos grupos (los micorrízicos), y pocos consideran la interacción entre ellos o entre los hongos y las bacterias (Porras-Alfaro y Bayman, 2011).



Figura 2. Principales grupos de hongos asociados a las plantas, capaces de colonizar los tejidos de la misma, (modificado de Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

En el caso de los hongos endófitos, éstos colonizan las raíces de plantas saludables sin transferir nutrientes, como se observa comúnmente en los micorrícicos. Los endófitos que comúnmente se encuentran en las raíces se han ignorado durante años en comparación con las micorrizas, y solo recientemente han sido considerados como componentes fundamentales del ecosistema (Figura 3) (Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

Los endófitos generalmente se consideran organismos mutualistas debido a que el microorganismo subsiste completamente a partir de los recursos de las plantas hospederas. Cuando el endófito ha perdido o limitado su capacidad para propagarse por esporas, depende en gran medida de la salud de la planta hospedera. Los hongos endófitos le aportan una serie de beneficios a la planta, entre las que destacan las siguientes (Porras-Alfaro y Bayman, 2011):

- Aumento de la tolerancia a factores de estrés abiótico, como sequía, inundaciones, y contaminación.
- Mayor resistencia contra el ataque de herbívoros y patógenos.
- Disminuye la susceptibilidad a enfermedades.
- Incremento de la capacidad competitiva
- Mejoras en el crecimiento vegetal

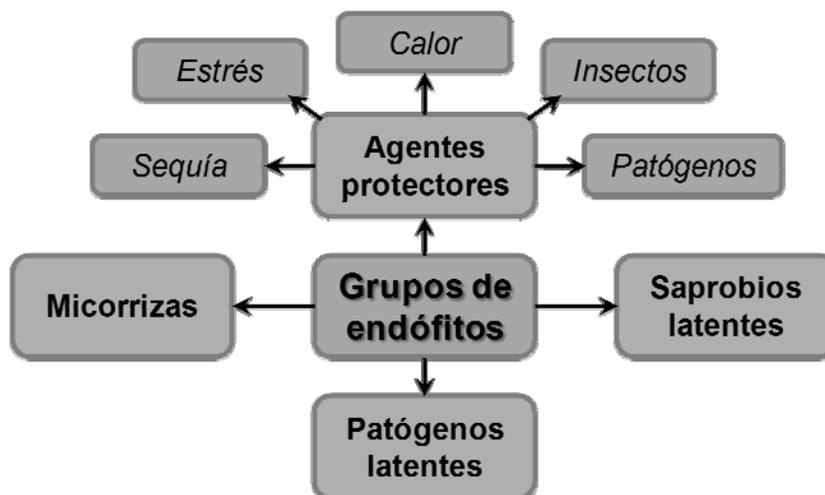


Figura 3. Como parte de la comunidad fúngica, los hongos endófitos pueden tener uno o varios papeles funcionales durante su ciclo de vida como respuesta a señales ambientales o de las plantas (modificado de Porras-Alfaro y Bayman, 2011).

La mayoría de los endófitos se propagan horizontalmente en sus plantas hospederas a través de esporas en el aire. En contraste, algunos endófitos también pueden ser propagados verticalmente a las próximas generaciones de plantas a través de las semillas (Aly *et al.*, 2011). Hay estudios en los cuales se demostró que los endófitos de transmisión vertical (sistémica), que crecen dentro de las semillas, son más propensos a ser mutualistas, mientras que los endófitos de transmisión horizontal (no sistémica), tienden a ser más antagónicos para el hospedero (Aly *et al.*, 2011).

Varios estudios (Adams *et al.*, 2007; Arriagada *et al.*, 2007) han demostrado que la inoculación de ciertas plantas con hongos que se comportan como endófitos, como *Trichoderma harzianum* y *Fusarium concolor*, además de estimular el crecimiento vegetal, mejoran la acumulación de EPT en las raíces (fitoestabilización). En otros casos, este tipo de hongos también puede aumentar la translocación de EPT a la parte aérea en plantas tolerantes, lo cual implica un importante potencial para su aplicación para fitoextracción (Cao *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008). Por lo que es importante resaltar que los hongos endófitos no sólo tienen la capacidad de proteger contra EPT, sino también pueden aumentar la adquisición de nutrientes para las plantas y mejorar su actividad metabólica para combatir el estrés (Ban *et al.*, 2012). Así, el mejoramiento en la eficiencia de la fitorremediación puede ser resultado de una mejor nutrición, la protección contra patógenos y/o la acumulación de EPT en estructuras específicas. Por ejemplo, Li *et al.*, (2012b) reportaron un efecto positivo en la asociación de un hongo endófito (*Sordariomycetes* sp.) con *Oryza sativa*, encontrando una mejora en el crecimiento de la planta y en la actividad antioxidante bajo condiciones de estrés por Pb. Zhang *et al.*, (2009), reportaron que el endófito *Neotyphodium gansuense* mejoró la tolerancia a Cd en plantas de *Achnatherum inebrians* en comparación con las no infectadas.

Hasta la fecha se ha estudiado el potencial de estos hongos con fines de biorremediación, sin embargo, las investigaciones que se enfocan a fitorremediación asistida por hongos endófitos aún son escasas (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Es de suma importancia realizar más estudios en este campo, ya que también se ha demostrado que, además de factores genéticos, dos factores clave que pueden cambiar de una asociación planta-hongo mutualista a una parasítica, es el desequilibrio en el intercambio de nutrientes o las variaciones ambientales (Aly *et al.*, 2011). De hecho, la simbiosis planta-hongo se establece debido al grado de la aportación mutua de nutrientes (Figura 4). Estos microorganismos también inciden en la salud vegetal a través de la fijación del nitrógeno (N) y adquisición de fósforo (P), así como a la protección contra condiciones bióticas y abióticas de estrés (Selosse y Rousset, 2011).

Al respecto, se ha demostrado que ambientes ricos en carbohidratos y nutrientes como N y P, pueden suprimir o retardar la formación de la asociación planta-hongos endófitos (Usuki *et al.*, 2002). Por tal motivo, es importante establecer las condiciones nutricionales adecuadas que aseguren la interacción entre una planta con potencial fitorremediador y hongos endófitos.

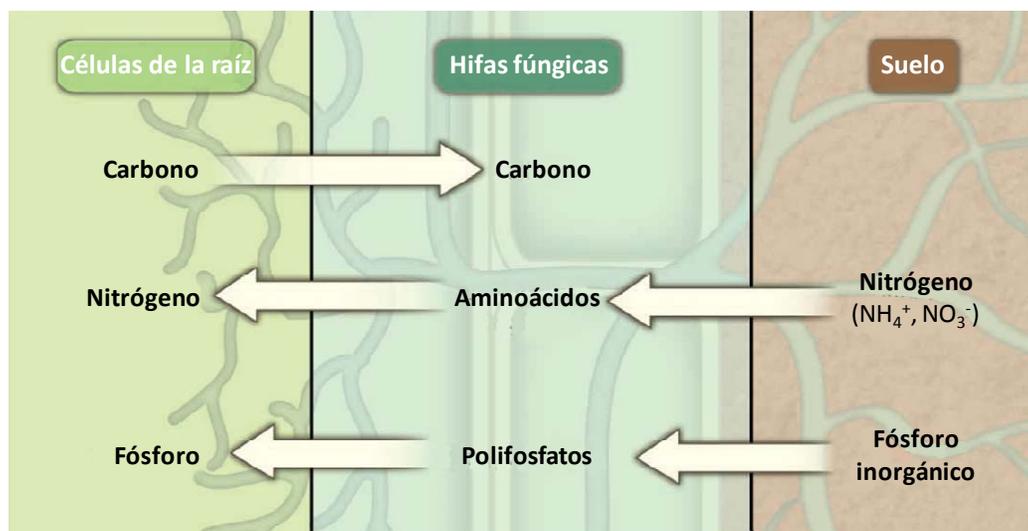


Figura 4. Los beneficios de la simbiosis planta-hongo incluye el intercambio recíproco de nutrientes y la protección contra condiciones bióticas y abióticas de estrés en el ambiente del suelo (modificado de Selosse y Rousset, 2011).

Como resultado de su adaptación a diferentes condiciones fisiológicas en las plantas, los hongos endófitos pueden exhibir especificidad por un cierto órgano y tejido. Lo anterior se debe a que el conjunto de presiones selectivas que ocurre en ciertos tejidos vegetales, afecta a sus habitantes endófitos y pueden ser diferentes a los presentes en otros tejidos. Por lo tanto, diferentes hongos dominan diferentes órganos aéreos, formando comunidades características específicas para cada tipo de tejido. En consecuencia, la comparación entre las comunidades endófitas foliares y de raíces muestran poca superposición. En contraste, varios estudios sugieren que las comunidades endófitas que habitan las hojas y los troncos comparten algunas especies, pero el balance de evidencias sugiere que hojas completamente infectadas (al final de una temporada) muestran mayor diversidad y albergan un conjunto adicional de endófitos distintos (Aly *et al.*, 2011).

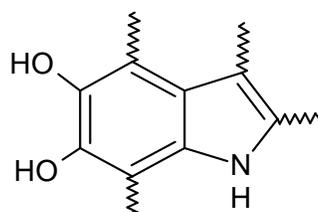
1.3 Hongos endófitos septados oscuros

Entre los hongos endófitos, se encuentran los septados oscuros (DSE, por sus siglas en inglés), los cuales son ubicuos y abundantes en ambientes estresantes, incluyendo el estrés por EPT. La mayoría de los DSE son ascomicetos que colonizan los tejidos de plantas vivas sin causar efectos negativos aparentes. Se han encontrado cerca de 320 géneros de DSE colonizando cerca de 600 especies vegetales (Ban *et al.*, 2012). Aunque el conocimiento sobre el papel de los DSE sobre la mejora de la tolerancia a EPT por las plantas hospedadoras es escaso, estudios recientes han demostrado que tienen un gran potencial para su aplicación en estrategias de fitorremediación asistida por microorganismos (Li *et al.*, 2011). De hecho, muchas especies de plantas dominantes en suelos contaminados con EPT se han encontrado asociadas con DSE (Ban *et al.*, 2012).

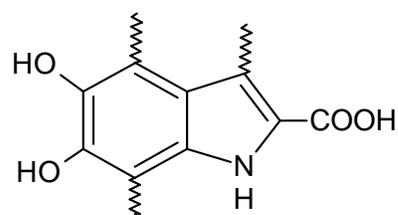
Por ejemplo, Li *et al.*, (2011), observaron un efecto positivo en el crecimiento de maíz (*Zea mays*), bajo condiciones de estrés por Pb, Zn y Cd, cuando se inoculó con una cepa de un DSE tolerante, *Exophiala pisciphila*. En el estudio se observaron estructuras típicas de colonización de *E. pisciphila* en los tejidos de la planta.

Una de las características de los hongos DSE, es que producen pigmentos oscuros conocidos como **melaninas**. Estas moléculas se encuentran principalmente en la pared celular y pueden reducir el efecto de los EPT debido a la presencia de varios grupos con alta afinidad por iones metálicos (Fogarty y Tobin, 1996; Ledin, 2000). Las melaninas son macromoléculas biológicas que se forman por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos. Tienen varias funciones biológicas, incluyendo la fotoprotección y la termorregulación, además de que participan en la regulación de radicales libres y como agentes quelantes de cationes y antibióticos. A pesar de que se ha demostrado que las melaninas cumplen múltiples funciones, aún no se conoce del todo su estructura. Sin embargo, su uso se extiende en la industria de la medicina, la farmacológica y la cosmética, y también tienen un gran potencial de aplicación en la industria de la agricultura (Manivasagan *et al.*, 2013).

Las melaninas también pueden ser excretadas de la célula, las cuales son definidas como **melaninas extracelulares**. Esto puede ocurrir ya sea a través de la secreción de compuestos fenólicos que más tarde se oxidan, o a través de la secreción de las fenol-oxidasas que oxidan fenoles en el medio externo a los hongos. Las melaninas generalmente son solubles en álcalis, generalmente insolubles en agua, ácidos acuosos y comúnmente en solventes orgánicos. A veces se produce la conjugación con carbohidratos o proteínas, en cuyo caso las melaninas se vuelven solubles en agua (Fogarty y Tobin, 1996). El tipo más común de melaninas es la eumelanina. Se piensa que este polímero está constituido por 2 polímeros entrecruzados: 5,6-dihidroindol (DHI) y el 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHIAC). Aunque la estructura detallada de la eumelanina aún no es del todo conocida, en la Figura 5 se muestra la propuesta por Manivasagan *et al.* (2013). Como resultado de su composición química, esta molécula tiene propiedades que le permiten actuar como receptor o donador de protones (Fogarty y Tobin, 1996; Manivasagan *et al.*, 2013).



5,6-dihidroindol (DHI)



5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHIAC)

Figura 5. Polímero de eumelanina constituido por los polímeros 5,6-dihidroindol (DHI) y 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHIAC) (modificado de Manivasagan *et al.*, 2013).

Entre la gran variedad de DSE, se encuentra el género *Cladosporium*, que es uno de los géneros más grandes (con más de 772 especies) de hifomicetos **dematiáceos**². El género incluye especies endófitas, patógenas, fitopatógenas y saprófitas (Llorente *et al.*, 2012). A pesar de que se sabe poco de la respuesta de DSE expuestos a EPT, se ha demostrado que *Cladosporium* se asocia favorablemente con plantas que crecen en suelos contaminados con EPT como Pb y Zn (Ban *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011).

1.4 Fitotoxicidad por elementos potencialmente tóxicos

Con frecuencia, los organismos que habitan en un suelo están en contacto con EPT en su ambiente natural, debido a que se encuentran como componentes de minerales y en residuos de diversas industrias. La toxicidad de los EPT hacia un organismo depende del ambiente fisicoquímico del medio y del comportamiento químico del EPT en particular. Con base en las propiedades físicas y químicas, los EPT pueden ejercer efectos tóxicos sobre un organismo a través de los siguientes mecanismos: (i) sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO); (ii) interacción con los sistemas que protegen contra el efecto dañino de ERO; (iii) sustitución de iones de los EPT en biomoléculas; (iv) inhibición de enzimas; (v) ruptura de membranas. Así, los EPT y sus compuestos pueden interactuar con plantas y microorganismos de varias maneras, dependiendo de la especie del EPT, organismo y ambiente, mientras que la actividad metabólica puede también influenciar su especiación y movilidad (Schutzendubel y Polle, 2002; Gadd, 2007).

La toxicidad de los EPT, tiene serias implicaciones para los suelos, ya que provoca su degradación y puede disminuir la calidad, productividad y crecimiento de las plantas. Entre éstos EPT, el plomo (Pb²⁺) se considera con una acción tóxica específica sobre las plantas, ya que inhibe procesos metabólicos, como la asimilación de nitrógeno, fotosíntesis, respiración y absorción de agua, además de que puede inactivar varias enzimas a través de su unión con grupos -SH. Cuando el Pb²⁺ se une con ácidos nucleicos, éste causa la condensación de la **cromatina**³, inhibiendo los procesos de replicación y transcripción del ADN. Otro de los efectos de este EPT sobre las plantas, es la sobreproducción de ERO, provocando una condición conocida como **estrés oxidativo** (Youssef y Azooz, 2013). El **estrés oxidativo** se refiere al efecto tóxico provocado por especies químicas altamente reactivas (ERO) producidas durante la reducción del oxígeno molecular (O₂) en los organismos aerobios, que pueden ser o no **radicales libres**⁴ (Halliwell, 2006).

² El término **dematiáceo** se refiere a la característica de apariencia oscura de este grupo de hongos cuando crecen sobre agar. Las colonias presentan color gris oscuro, café o negro (http://labmed.ucsf.edu/education/residency/fung_morph/fungal_site/dematpage.html)

³ Conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas y que constituye su cromosoma.

⁴ Un radical libre se refiere a una especie que contiene uno o más electrones no apareados (Halliwell, 2006).

La formación de ERO proviene de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singlete (1O_2) o de la transferencia de uno de sus electrones al O_2 dando origen al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual puede dismutar de forma espontánea o por reacción enzimática a la forma de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), molécula que puede dar origen al radical hidroxilo ($\cdot OH$) a través de la Reacción de Fenton, siendo esta última una de las ERO más tóxicas para los organismos (Figura 6) (Konigsberg, 2008; Gill y Tuteja, 2010)

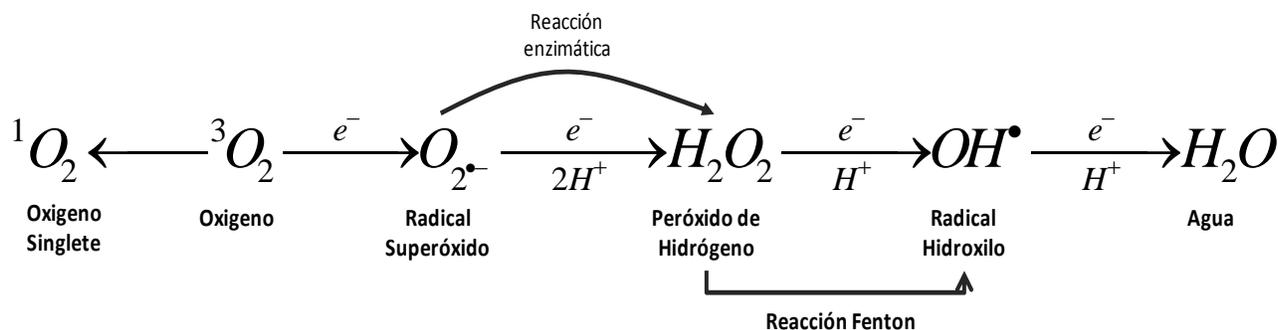


Figura 6. Generación de ERO por transferencia de energía (Modificado de Gill y Tuteja, 2010).

En las plantas, las ERO se producen continuamente como productos normales de diversas rutas metabólicas que ocurren en diferentes compartimentos celulares como los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Sin embargo, la producción de ERO es estimulada en respuesta a desbalances metabólicos generados por una condición de estrés por factores bióticos y abióticos como la salinidad, la radiación UV, la sequía, las temperaturas extremas, la deficiencia de nutrientes, la contaminación del aire, los herbicidas, los ataques de patógenos y por la acción de EPT (Gill y Tuteja, 2010). Este aumento repentino de los niveles intracelulares de ERO pueden causar un daño significativo a las estructuras celulares en presencia de contaminantes, que rompe la **homeostasis**⁵ celular (Gill y Tuteja, 2010).

Las ERO son altamente reactivas, tóxicas y capaces de oxidar diversas biomoléculas, como los lípidos de las membranas, proteínas y DNA, lo que puede alterar el metabolismo y conducir a la muerte celular (Figura 7). Las ERO reaccionan con las biomoléculas en función de su reactividad química, potencial redox, vida media y la movilidad dentro de los compartimentos celulares (Arora *et al.*, 2002; Gill y Tuteja, 2010).

⁵ Proceso por el cual un organismo mantiene constantes las condiciones celulares necesarias para la vida.

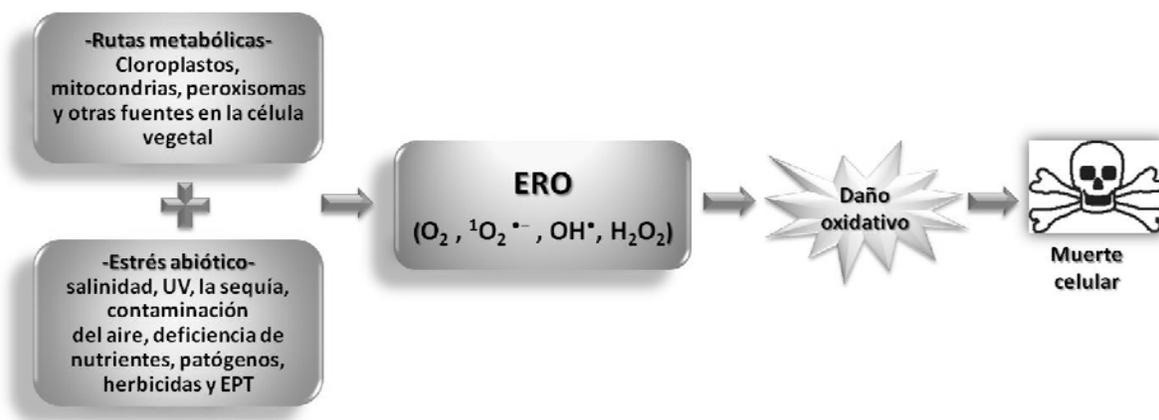


Figura 7. Las ERO son moléculas producidas en diferentes compartimentos celulares a partir de diferentes rutas metabólicas en las plantas. Cuando una planta se encuentra bajo condiciones de estrés abiótico, las células sobreproducen ERO, lo que conduce a un daño oxidativo y, eventualmente, a la muerte celular (Modificado de Gill y Tuteja, 2010).

Debido a que en las plantas hay una producción normal de ERO, éstas poseen una eficiente red de defensa antioxidante, que incluye enzimas y moléculas para la homeostasis (Gill y Tuteja, 2010). Como se mencionó, además de la sobreproducción de ERO, otros efectos de la exposición de un organismo a EPT, incluyen la interacción con moléculas y enzimas involucradas en la red de defensa antioxidante, la sustitución de iones en biomoléculas y la inhibición de enzimas. Sin embargo, los organismos tolerantes han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a la presencia de EPT.

1.5 Mecanismos de resistencia a elementos potencialmente tóxicos

La capacidad de cualquier organismo para sobrevivir en presencia de un contaminante en particular depende de su **resistencia**. El término resistencia se refiere a la respuesta de un organismo al estrés causado por un EPT, de manera que pueda sobrevivir y reproducirse. Esta característica puede lograrse por una de dos estrategias: (i) la **exclusión**, que implica una protección externa a la influencia del EPT, o (ii) la **tolerancia**, que involucra mecanismos intracelulares que le permiten al organismo crecer normalmente (Baker, 1987). Se ha reportado una serie de especies de plantas y hongos resistentes a la presencia de diversos EPT, lo cuáles pueden sobrevivir, crecer y prosperar en lugares contaminados a través de mecanismos que evitan el estrés y contribuyen a la tolerancia.

1.5.1 Mecanismos de exclusión

Estos mecanismos evitan o regulan la entrada de EPT al interior de las células a través de varios mecanismos que incluyen: (i) formación de complejos en el medio externo o en la pared celular por la producción de exudados; (ii)

precipitación extracelular en forma de minerales por la producción de exudados y/o metabolitos como ácidos orgánicos (AO); (iii) inmovilización extracelular por adsorción en la pared celular por componentes con capacidad para atrapar EPT como son: la quitina y melanina en hongos, y lignina en plantas; (iv) alteración de sistemas de transporte activo en la membrana que bombean hacia el exterior los EPT y controlan su concentración en el citosol y sitios importantes dentro de la célula (Hall, 2002; Gadd, 2007).

Además de estos procesos, los microorganismos pueden influir en la movilidad del metal indirectamente, ya que modifican el pH. A medida que aumenta el pH, los sitios funcionales en la superficie microbiana se desprotonan y los EPT catiónicos pueden ocupar estos sitios, dando como resultado un aumento en la acumulación del EPT con el aumento en la alcalinidad del medio (Ledin, 2000).

1.5.2 Mecanismos de tolerancia

Estos mecanismos reducen el efecto tóxico de iones de EPT dentro de la célula y se activan cuando los iones llegan a la membrana celular. Éstos ocurren a través de procesos como: (i) secuestro intracelular en compartimentos (compartimentación) donde los EPT no afecten procesos vitales, como la vacuola; (ii) detoxificación por la formación de complejos con péptidos ricos en grupos tiólicos (-SH) como el glutatión (GSH), fitoquelatinas (FQ) y metalotioneínas (MT); (iii) biotransformación a través de reacciones que disminuyen la toxicidad de los EPT (Gadd, 2007; Pal y Rai, 2010); (iv) control de los niveles celulares de ERO mediante la activación de una red de defensa antioxidante (Peralta-Perez y Volke-Sepúlveda, 2012). Los tres primeros procesos se encuentran relacionados entre sí, ya que la biotransformación y detoxificación de EPT implica, entre otros, su conjugación con péptidos por enzimas como las glutatión S-transferasas, para su posterior compartimentación. Bajo condiciones de estrés, como la presencia de EPT, las plantas y los hongos activan uno o varios de estos mecanismos para tolerar condiciones adversas (Gadd, 2007). A continuación se describen brevemente los mecanismos de tolerancia relacionados con la formación de conjugados y la defensa antioxidante.

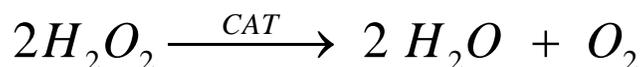
1.5.2.1 Defensa antioxidante

Los niveles celulares de ERO son estrictamente regulados por una compleja red de defensa antioxidante, que incluye reacciones enzimáticas y moléculas antioxidantes que, junto con las enzimas productoras de ERO, mantienen la homeostasis en los compartimentos celulares (Blokina *et al.*, 2003). La red de defensa antioxidante actúa controlando las cascadas de oxidación y protegiendo a las células contra el estrés oxidativo, reduciendo la posibilidad de un daño celular (Peralta-Perez y Volke-Sepúlveda, 2012). La eliminación de ERO ocurre a través de la acción de moléculas **antioxidantes** y de varias enzimas que interactúan directamente con

ERO y regeneran las formas reducidas de las moléculas antioxidantes mediante el ciclo ascorbato-glutatión (Blokhina *et al.*, 2003). Considerando que el término **antioxidante** describe a cualquier compuesto capaz de disminuir los niveles de ERO sin que, por sí misma, se convierta en un radical destructivo (Blokhina *et al.*, 2003).

Enzimas antioxidantes. Estas enzimas participan en varios procesos fisiológicos y bioquímicos, tales como el crecimiento de células, la diferenciación y el desarrollo, el catabolismo de auxinas y lignificación, así como en respuesta al estrés biótico (defensa contra organismos patógenos) y abiótico (presencia de contaminantes) (Peralta-Perez y Volke-Sepúlveda, 2012). Dentro de las principales enzimas que participan en la remoción de ERO en las plantas, se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), y peroxidasas (POX), ya que éstas proveen a la célula de condiciones altamente eficientes para la desintoxicación de $\bullet O_2^-$ y del H_2O_2 , previniendo la formación del $\bullet OH$, considerado como el radical más agresivo (Arora *et al.*, 2002; Konigsberg, 2008). En las plantas, la SOD es la única enzima que dismuta este radical en H_2O_2 y O_2 . Una vez que se produce el H_2O_2 , éste puede ser directamente descompuesto por catalasas (CAT) o, en presencia de sustratos reductores, por varios tipos de peroxidasas (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012).

La **catalasa** (CAT, EC 1.11.1.6) es la enzima que cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en O_2 y agua. Para ello, ocupa dos moléculas de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante:



La actividad de la CAT no depende del estado redox celular. La CAT es una de las enzimas más rápidas que existen (Konigsberg, 2008). Ya que el H_2O_2 se difunde a través de los compartimentos celulares, la CAT está presente en cloroplastos, citosol, mitocondria y principalmente en peroxisomas. Su actividad protege a las plantas de diferentes condiciones de estrés que se generan de manera exógena o endógena, mediante la modulación de los niveles de H_2O_2 (Konigsberg, 2008). Diferentes factores de estrés, como la contaminación por EPT, radiación, salinidad, cambios climáticos como sequía, frío e intensidad luminosa elevada, entre otros, pueden estimular la actividad de esta enzima (Reddy *et al.*, 2005; Gill y Tuteja, 2010). En el 2010, Gill y Tuteja, realizaron una revisión de diferentes plantas con respecto a la tolerancia por el estrés abiótico y encontraron que esta actividad puede se puede ver estimulada, reducir o no tener efecto, dependiendo del factor estrés.

Las **peroxidasas** (POX, EC 1.11.1.7) son enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, utilizando un peróxido como agente oxidante y otra molécula como agente reductor. Estas enzimas catalizan la oxidación de compuestos donadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol y pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de H₂O₂. Uno de los sustratos más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasas (Konigsberg, 2008):



La POX son glicoproteínas que se encuentran en tejidos animales y vegetales, así como en microorganismos. Estas enzimas juegan un papel importante en una amplia gama de procesos bioquímicos, como el metabolismo de auxinas y etileno, reacciones redox en las membranas celulares, modificaciones en la pared celular, así como en los procesos de desarrollo y de defensa (Konigsberg, 2008).

Existen diversos reportes en los cuales se ha observado un efecto en la actividad enzimática antioxidante que neutraliza los radicales libres y los peróxidos, cuando las plantas se encuentran bajo estrés por EPT (Blokhina *et al.*, 2003; Gill y Tuteja, 2010). Un ejemplo es el de Seregin e Ivanov, (2001), donde realizan una revisión de plantas bajo estrés por Pb y Cd, y se ve promovida la formación ERO, en consecuencia se ve modificada la actividad enzimática antioxidante, entre las que se encuentran la CAT y la POX, aunque en estos caso estas actividades se vieron estimuladas de manera positiva, es importante considerar que la actividad antioxidante depende de la planta en particular, el EPT y la intensidad del estrés. En la Tabla 1 se pueden observar algunos ejemplos del efecto de diversos factores de estrés que afectan las actividades de CAT y POX con respecto al control, en diferentes especies de plantas.

Tabla 1. Efecto del Pb en las actividades enzimáticas de diferentes especies de plantas.

Enzima	Factor de estrés	Actividad enzimática	Especie de la planta	Referencia
Catalasa	Pb	↑	<i>Zea mays</i>	Seregin e Ivanov (2001)
	Salinidad	↓	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Gill y Tuteja (2010)
	UV-B	↑	<i>Cassia auriculata</i>	Gill y Tuteja (2010)
Peroxidasa	Cd	↑	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Lemna sp.</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Hordeum vulgare</i>	Seregin e Ivanov (2001)
	Cd	↑	<i>Triticum aestivum</i>	Gill y Tuteja (2010)
	Salinidad	↑	<i>Oryza sativa</i>	Gill y Tuteja (2010)

↑ y ↓ indican un aumento y una reducción, respectivamente, en la actividad enzimática.

Moléculas antioxidantes. En las células vegetales, los antioxidantes más importantes que regulan la homeostasis de ERO son el ascorbato (ASC) y el glutatión (GSH), además de taninos, flavonoides, α -tocoferol, carotenoides y precursores de la lignina (Apel y Hirt, 2004). Estas moléculas, a través de una serie de reacciones redox, evitan el daño por ERO (Peralta-Perez y Volke-Sepúlveda, 2012). El ASC es el antioxidante hidrosoluble más abundante que protege las membranas por la eliminación directa de $\bullet\text{O}_2^-$ y $\bullet\text{OH}$ y es sustrato de la ascorbato-peroxidasa, que cataliza la reducción de H_2O_2 .

El **GSH**, además de estar involucrado en una serie de funciones vitales, se considera la defensa más importante contra ERO, ya que mantiene el ambiente intracelular reducido. Esta molécula antioxidante es un tripéptido no proteico compuesto por los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina (Figura 8). El grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína sirve como donador de protones y es el responsable de la actividad biológica del GSH (Konigsberg, 2008).

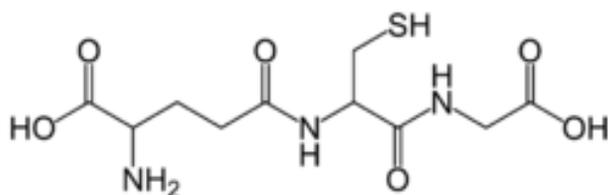


Figura 8. Estructura del glutatión (GSH) mostrando su grupo tiólico (SH) (Modificada de Konigsberg, 2008).

El H_2O_2 , que se produce de manera endógena se reduce por el GSH en presencia de la GSH-peroxidasa (GPx), como resultado, el GSH se oxida a GSSG, el cual para que vuelva a tener su actividad antioxidante, se debe reducir nuevamente (GSH), a través de la enzima GSH-reductasa más NADPH, en lo que se conoce como un ciclo redox (Konigsberg, 2008).

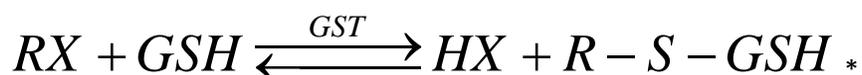
La relación entre los desequilibrios redox celulares, que conducen al estrés oxidativo, y la toxicidad por EPT en plantas ha sido estudiada intensamente durante las últimas décadas. Esta interdependencia se considera un reflejo indirecto del efecto de EPT sobre la mala regulación celular y el desarrollo progresivo de un daño secundario. El GSH puede funcionar como agente reductor o cofactor en las reacciones redox que involucran a EPT. Esto se debe a que el grupo sulfhidrilo del segmento de la cisteína tiene una alta afinidad por EPT, por lo que puede formar compuestos con ellos (Konigsberg, 2008).

1.5.2.2 Conjugación y compartimentación

Un mecanismo importante en la detoxificación intracelular de EPT implica la quelación con ligandos peptídicos como el GSH, FQ y MT. Una vez formados, estos conjugados son transportados a las vacuolas por bombas dependientes de ATP en donde son compartimentados. Las FQ son sintetizadas enzimáticamente a partir de

GSH, mientras que las MT son codificadas genéticamente. Las primeras se han identificado en levaduras, algas y una variedad de plantas en respuesta a la presencia de EPT (Pal y Rai, 2010). Además de la gran importancia del GSH como molécula antioxidante, las plantas también contienen varias enzimas destoxificantes dependientes de este péptido. Las enzimas que catalizan la unión (conjugación) del GSH con EPT se conocen como glutatión-S-transferasas (Figura 9) (Townsend y Tew, 2003; Reddy *et al.*, 2005).

Las **glutatión-S transferasas** (GST, EC 2.5.1.18) son una familia de enzimas que cataliza la conjugación del glutatión (GSH) con una variedad de sustratos hidrofóbicos, electrofílicos y citotóxicos y se encuentran en casi todos los organismos vivos (Blokhina *et al.*, 2003; Konigsberg, 2008).



*R puede ser un grupo Alifático, aromático o heterocíclico y X puede ser un sulfato, nitrato o un grupo haluro (Blokhina *et al.*, 2003).

Si bien, la formación de conjugados puede ocurrir en ausencia de la GST, la presencia de esta enzima acelera significativamente las reacciones de conjugación (Reddy *et al.*, 2005).

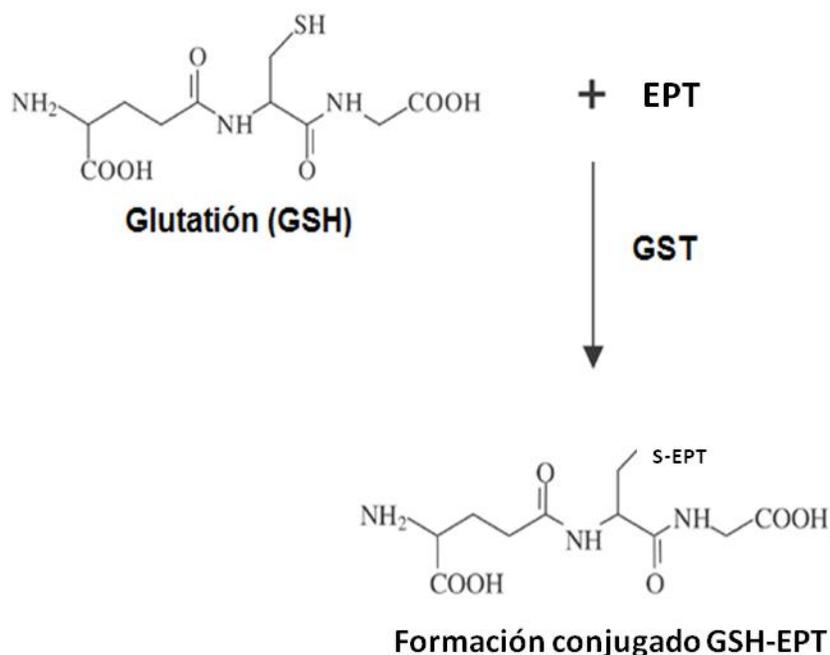


Figura 9. Estructura del complejo formado por el glutatión (GSH) y los EPT por acción de la enzima glutatión S-transferasa (GST) (modificada de Townsend y Tew, 2003).

Para eliminar xenobióticos, las células vegetales, primero los conjugan con GSH para formar moléculas objetivo que deben eliminarse. Una vez formados, los conjugados de GSH son transportados a las vacuolas por bombas ATP-dependientes y degradados (Rouhier *et al.*, 2008).

Por sus propiedades catalíticas, estas enzimas también sirven como proteínas de unión y son responsables del acomodo de un rango amplio de ligandos xenobióticos y endógenos (Rouhier *et al.*, 2008). Se ha demostrado la presencia de esta enzima en las plantas, algunos invertebrados y vertebrados inferiores, en bacterias y en hongos; en donde son las principales enzimas involucradas en procesos metabólicos de detoxificación (Morel *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

2 JUSTIFICACIÓN

La fitorremediación es una de las pocas opciones para tratar suelos contaminados con EPT. No obstante, hasta ahora, el papel que juegan los microorganismos tolerantes que se asocian con plantas fitorremediadoras ha sido poco estudiado. Por lo anterior, el realizar investigación acerca de mecanismos implicados en la tolerancia, exclusión, acumulación y movilización de EPT por este tipo de microorganismos es importante para mejorar los procesos de fitorremediación de este tipo de suelos. Se sabe que algunos de estos mecanismos se relacionan con la producción de moléculas como el glutatión y de enzimas antioxidantes como la catalasa y peroxidasas, entre otras.

Hasta ahora, muchos estudios sustentan el efecto benéfico de rizobacterias y hongos micorrícicos sobre la fitorremediación de suelos contaminados con EPT, pero los estudios enfocados hacia el papel de hongos no micorrícicos, como los endófitos, son escasos. Por otro lado, se ha demostrado que éstos hongos toleran y detoxifican EPT, además de mejorar el desarrollo vegetal y procesos como la fitoextracción o la fitoestabilización. Además de sus efectos benéficos sobre las plantas, los endófitos tienen un gran potencial biotecnológico para mejorar la aplicabilidad y la eficiencia de la fitorremediación. Sin embargo, la aplicación de microorganismos endófitos para mejorar la fitorremediación de EPT ha sido retrasada por la falta de cepas tolerantes a EPT.

Con base en lo anterior, un mayor entendimiento acerca de los mecanismos que inciden en la tolerancia y acumulación de EPT por hongos que se asocian con plantas potencialmente fitorremediadoras, es un requisito para el futuro desarrollo de estrategias de fitorremediación efectivas para EPT. Así, el estudio y caracterización de los mecanismos de tolerancia y acumulación de EPT implicados en las interacciones entre plantas y hongos, puede permitir mejorar la eficiencia de la fitorremediación de suelos contaminados con EPT mediante la manipulación de asociaciones específicas entre plantas fitorremediadoras y hongos endófitos, con la gran ventaja de que estos últimos son fácilmente cultivables.

3. HIPÓTESIS

3 HIPÓTESIS

La asociación inducida entre *Dodonaea viscosa* y un hongo endófito aumentará la bioacumulación de plomo en la planta y mejorará el crecimiento vegetal y la tolerancia, debido al incremento en la actividad de enzimas antioxidantes.

4. OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 General

Caracterizar la tolerancia y capacidad de bioacumulación de plomo por *D. viscosa* y por la asociación inducida entre *D. viscosa* y un hongo endófito, y su relación con la actividad de enzimas antioxidantes.

4.2 Específicos

- ✓ Caracterizar el crecimiento de *D. viscosa* en función de la concentración de nutrientes y de la inoculación con hongos endófitos, para seleccionar una cepa de estudio.
- ✓ Analizar el tipo de interacción durante la asociación inducida de la cepa seleccionada con plántulas de *D. viscosa*.
- ✓ Determinar la tolerancia y la capacidad de bioacumulación de plomo por *D. viscosa* y *D. viscosa*-hongo endófito, usando agrolita como soporte modelo.
- ✓ Relacionar la tolerancia y la bioacumulación de Pb por *D. viscosa* y *D. viscosa* - hongo endófito, con la actividad de enzimas antioxidantes (peroxidasa, catalasa y glutatión-S-transferasa).

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5 MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 Estrategia experimental

El presente trabajo se realizó en dos etapas generales (Figura 10). En la primera, se indujo la asociación entre *Dodonaea viscosa* y varios hongos filamentosos aislados de raíces de arbustos, para evaluar su efecto sobre el crecimiento de la planta. Para lo anterior, se utilizaron tubos de cultivo con medio Murashige-Skoog (MS) modificado con diferente concentración de nutrientes. Con los resultados obtenidos en la primera etapa, se seleccionó un medio de cultivo y una cepa fúngica que se asociara de forma positiva con *D. viscosa*, para ser utilizada en la segunda etapa. Durante la segunda etapa, se determinó la tolerancia y acumulación de Pb por *D. viscosa* y *D. viscosa*-hongo. En esta etapa se analizó el crecimiento vegetal y la acumulación de Pb por la planta y por la asociación, y se relacionó con la actividad catalasa (CAT), peroxidasa (G-POX) y glutatión-S-transferasa (GST).

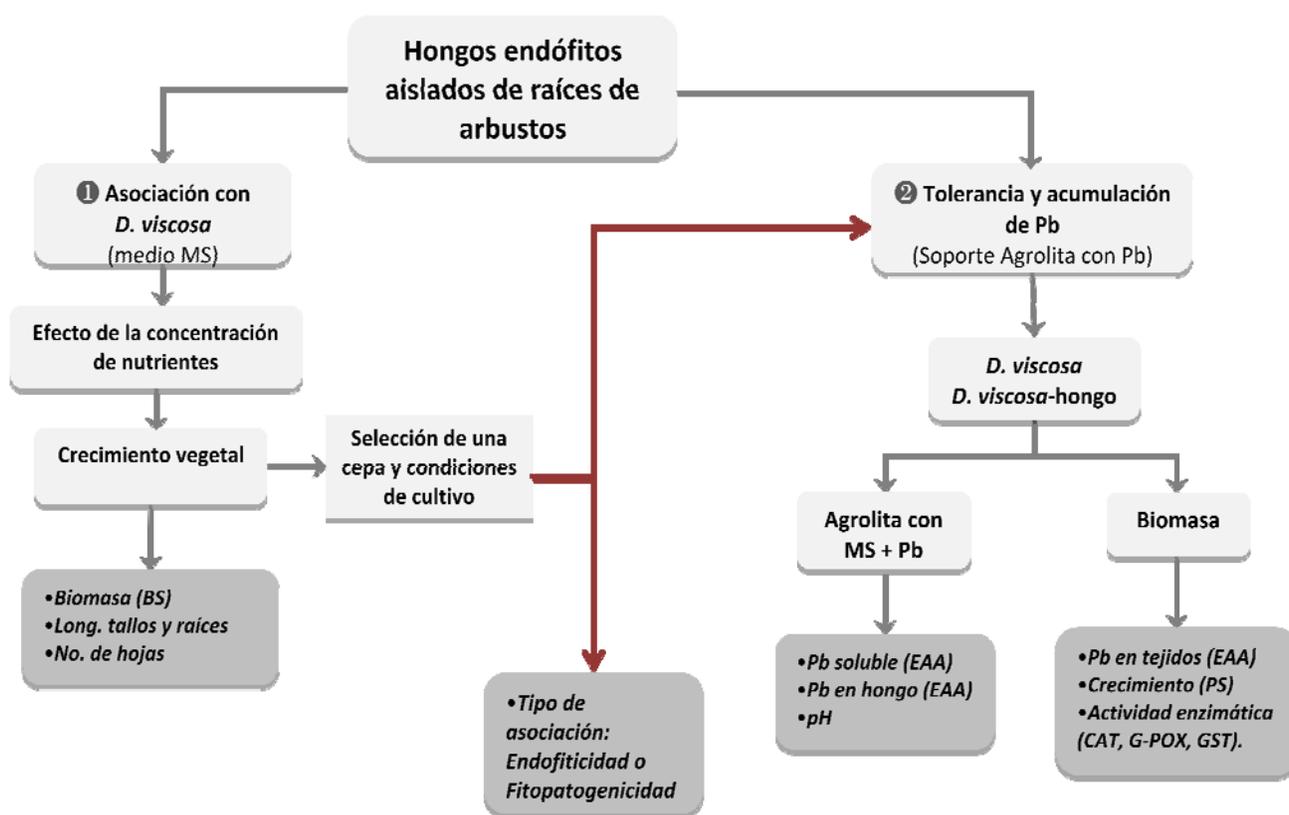


Figura 10. Estrategia experimental general. Los cuadros oscuros muestran las variables de respuesta que fueron determinadas.

5.2 Material biológico

5.2.1 *Dodonaea viscosa*

El estudio se llevó a cabo con semillas de un arbusto conocido como chapuixtle (*Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.) (Figura 11). Las semillas se obtuvieron de árboles silvestres maduros creciendo alrededor de residuos mineros en Guanajuato, se secaron al aire y se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel. *D. viscosa* es un arbusto perenne de la familia *Sapindaceae*, ampliamente distribuido en zonas tropicales, subtropicales y templadas. Es una especie tolerante a la sequía, viento, inundaciones y heladas, se utiliza para el control de la erosión, como barrera rompevientos y como restaurador de suelos. Recientemente también se demostró que esta especie tolera y puede crecer en matrices contaminadas con altas concentraciones de plomo (Rojas-Loria *et al.*, 2012).



Figura 11. Semillas de *Dodonaea viscosa* L. (Jacq.) (Chapuixtle), un arbusto perenne de la familia *Sapindaceae* con frutos secos dentro de una cápsula con 3 alas.

Para todas las pruebas descritas más adelante, se obtuvieron plántulas de *D. viscosa* a partir de semillas escarificadas y desinfestadas. Las semillas se escarificaron térmicamente, sumergiéndolas 3 min en agua destilada a 75°C. Posteriormente, se desinfestaron de la siguiente manera: (i) lavado con detergente comercial (2%), 30 min; (ii) inmersión en solución de etanol (70%), 30 seg; (iii) inmersión en solución de hipoclorito de sodio (1.8%), 25 min. Las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril entre cada procedimiento. Las semillas tratadas y desinfestadas se sembraron, bajo condiciones asépticas, en medio Murashige-Skoog (MS, *Sigma*) con sacarosa (10 g·L⁻¹, *Sigma*) y Phytigel (2 g·L⁻¹, *Sigma*) y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su germinación. Una vez germinadas, las plántulas se mantuvieron bajo una intensidad de luz de 50 μmol·m⁻²·s⁻¹ con un fotoperiodo de 16 h a 25 ± 1°C, durante 15 días. Las plántulas de 15 días fueron utilizadas para los ensayos de asociación y de tolerancia/acumulación de plomo.

5.2.2 Hongos endófitos

Los hongos endófitos que se usaron en el presente estudio, se aislaron de raíces de árboles de los géneros *Prosopis* y *Acacia*, que crecían de manera predominante en un sitio contaminado con plomo en los alrededores de una planta fundidora en la ciudad de Chihuahua. Del total de cepas aisladas (Velázquez-Osornio, 2011), se estudiaron las que, de forma preliminar, mostraron un efecto benéfico sobre el crecimiento de *D. viscosa*, las cuales fueron identificadas dentro de los géneros *Penicillium* (AA-1) y *Aspergillus* (CE-1). Además, se estudiaron tres cepas aisladas a partir de semillas de *D. viscosa*, las cuales fueron identificadas como hongos septados oscuros (DSE), del género *Cladosporium*. En la Figura 12 se muestra la morfología colonial de las cinco cepas fúngicas estudiadas.

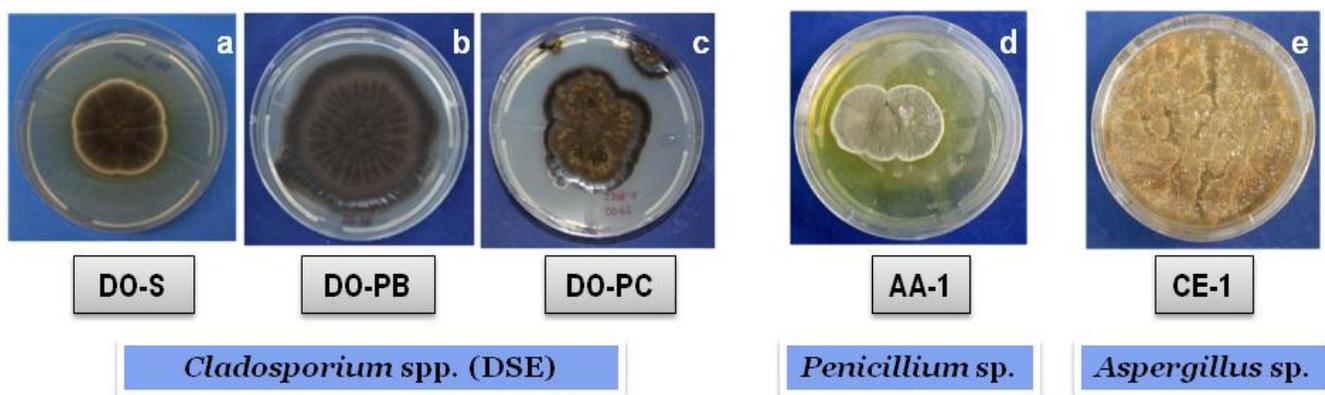


Figura 12. Morfología colonial de cepas aisladas de semillas de *D. viscosa* (a, b y c), identificadas dentro del género *Cladosporium* (DSE). Morfología colonial de cepas aisladas de raíces de árboles de los géneros *Acacia* (d) y *Prosopis* (e), identificadas dentro de los géneros *Penicillium* (AA-1) y *Aspergillus*, (CE-1).

5.3 Medios de cultivo

5.3.1 Pruebas de asociación

Las pruebas de asociación para conocer el efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento vegetal de *D. viscosa* en presencia de las cepas fúngicas en estudio, se llevaron a cabo en tubos de cultivo con medio Murashige-Skoog modificado (MSM) con diferentes concentraciones de nutrientes (Tabla 2). Antes de su esterilización, el pH del medio se ajustó a 5.7 con KOH (1 N) y se adicionó Phytigel ($1.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como agente gelificante. Las relaciones C/N, C/P y C/K de ambos medios se mantuvo en 14, 85 y 84, respectivamente.

Tabla 2. Composición del medio Murashige-Skoog modificado (MSM) utilizado en los ensayos de asociación entre *D. viscosa* y hongos endófitos.

Componente	MSM1 (g·L ⁻¹)	MSM2 (g·L ⁻¹)
Sacarosa	5.0	10.0
NH ₄ NO ₃	0.285	0.570
KNO ₃	0.360	0.720
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.190	0.380
KH ₂ PO ₄	0.110	0.220
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.220	0.440
EDTA-Na ₂	0.019	0.037
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.014	0.028
Sol. oligoelementos (mL)*	1.0	1.0

* Solución concentrada (x100) de oligoelementos (g·L⁻¹): H₃BO₃, 0.62; FeSO₄·7H₂O, 1.0; MnSO₄·4H₂O, 1.0; ZnSO₄·4H₂O, 0.86; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.025; CuSO₄·5H₂O, 0.0025; CoCl₂·6H₂O, 0.0025; KI, 0.083.

5.3.2 Tipo de interacción

Para determinar el tipo de asociación entre *D. viscosa* y la cepa fúngica seleccionada, se prepararon cajas de Petri (15 cm Ø) con gotas (20 – 25 por caja) de agar-agua. El agar-agua se preparó con agua destilada, solución de antibióticos (estreptomina 200 mg·L⁻¹, ampicilina 200 mg·L⁻¹) y MgSO₄ (0.03%, p/v). El pH del medio se ajustó a 5.7 con KOH (1 N) y se adicionó Phytigel (1.8 g·L⁻¹) como agente gelificante (Silvani *et al.*, 2008). Para observar crecimiento fúngico a partir de segmentos de tejidos de plántulas de *D. viscosa* inoculadas con la cepa seleccionada, crecidas bajo condiciones *in vitro*, se utilizó medio PDA con estreptomina (50 mg·L⁻¹).

5.3.3 Tolerancia y acumulación de plomo

Para demostrar la tolerancia y acumulación de plomo por la planta y por la asociación planta-hongo, se utilizó agrolita como soporte modelo. La agrolita se tamizó (0.4 – 2.8 mm Ø), se lavó (3 lavados con agua destilada caliente) y secó (48 h, 60°C). Los ensayos se llevaron a cabo en tubos de cultivo (Pyrex, 15.0 cm) que contenían 1.5 g de agrolita seca. La agrolita de cada tubo se humectó (73% de humedad) con 4 mL de medio MSM2 (pH 5.7), adicionado o no con 2000 mg Pb·kg⁻¹ de agrolita seca (AS). El Pb se adicionó en forma de Pb(NO₃)₂, y la concentración de nitrógeno aportada por dicha sal, se compensó en los medios control con NaNO₃ (Tabla 3). Los tubos se esterizaron a 15 lb·in⁻², 15 min. La cantidad de sales del medio MSM2 se ajustó para mantener la concentración de cada sal con base en la agrolita seca contenida en cada tubo de cultivo.

Tabla 3. Composición del medio Murashige-Skoog modificado (MSM2) utilizado en los ensayos de tolerancia y acumulación de Pb por *D. viscosa* y la asociación planta-hongos endófitos.

Componente	0 Pb (g·L ⁻¹)	2000 Pb (g·L ⁻¹)
Sacarosa	30	30
NH ₄ NO ₃	1.36	1.36
KNO ₃	1.90	1.90
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.11	1.11
KH ₂ PO ₄	0.51	0.51
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.32	1.32
EDTA-Na ₂	0.11	0.11
Sol. oligoelementos (mL)*	3.0	3.0
NaNO ₃	0.62	---
Pb(NO ₃) ₂	---	1.20

* Solución concentrada (x100) de oligoelementos (g·L⁻¹): H₃BO₃, 0.62; FeSO₄·7H₂O, 1.0; MnSO₄·4H₂O, 1.0; ZnSO₄·4H₂O, 0.86; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.025; CuSO₄·5H₂O, 0.0025; CoCl₂·6H₂O, 0.0025; KI, 0.083.

5.3.4 Conservación y preparación de inóculos

Sobre los inóculos de cada cepa se prepararon en cajas de Petri con medio PDA, en donde se incubaron a 30°C durante el tiempo adecuado, de acuerdo a su tasa de crecimiento. Todas las cepas se conservaron a 4°C en tubos inclinados con medio PDA.

5.4 Pruebas de asociación con *D. viscosa*

Para las pruebas de asociación con *D. viscosa* se utilizaron plántulas de 15 días, obtenidas en medio MSM1 o MSM2 como se describe en la Sección 5.2.1, las cuales se inocularon con cada cepa. En la Figura 12 se mostraron las morfologías coloniales de las cinco cepas fúngicas estudiadas.

5.4.1 Prueba cuantitativa

Debido a que el comportamiento de un hongo en una asociación hongo-planta depende de diversos factores, entre los cuales, la concentración y disponibilidad de nutrientes es clave (Porras-Alfaro y Bayman, 2011), esta prueba se realizó en medio MSM con diferentes concentraciones de nutrientes (Tabla 1). Para lo anterior, las semillas tratadas se sembraron directamente en tubos de cultivo con medio MSM1 o MSM2 y se germinaron a temperatura ambiente en la oscuridad. 15 días después de la germinación, cuando las plántulas alcanzaron ~5 cm en los brotes y ~3 cm de raíz, cada una se inoculó por piquete con las diferentes cepas y se mantuvieron bajo las condiciones antes descritas ~60 días más.

Como controles, se usaron tubos de cultivo con la planta sin inocular. Cada tratamiento se evaluó con cinco plántulas y al cabo del periodo total de incubación se cuantificó el crecimiento de *D. viscosa* a través del número de hojas, la biomasa (base seca) y elongación de tallos y raíces de cada plántula. A partir de los resultados de esta prueba, se seleccionó la cepa DO-S (*Cladosporium* sp.) para realizar el resto de los ensayos.

5.4.2 Prueba cualitativa

Para verificar el tipo de asociación entre *D. viscosa* y la cepa DO-S, tejidos de plántulas de 20 días de contacto con el hongo, se esterilizaron superficialmente. Las raíces, tallos y hojas por separado, se lavaron con una solución jabonosa, se desinfectaron superficialmente y se cortaron en segmentos de ~1 cm. Para analizar si el tipo de asociación es endófito o **epífita**⁶, se realizaron tres diferentes técnicas que se describen a continuación.

Placa con gota. Una vez esterilizados superficialmente, los fragmentos de raíces, tallos y hojas, por separado, se transfirieron con pinzas estériles a cajas de Petri con gotas de ~30 μ L de agar-agua con antibióticos. Los fragmentos se incubaron a 25°C en la oscuridad, y cada 24 horas, se revisaron para observar la aparición de crecimiento fúngico a partir de los extremos de los cortes. Todas las observaciones se realizaron en un microscopio binocular (Olympus SZ61) con un aumento total de 1-3.5X (Silvani *et al.*, 2008).

Placa con PDA. Los fragmentos de raíz, tallos y hojas tratados superficialmente se transfirieron, por separado bajo condiciones asépticas, a cajas Petri con PDA y antibióticos. En cada caja de Petri se marcaron 4 cuadrantes, colocando un fragmento de tejido por cuadrante. Los fragmentos se incubaron a 30°C, y cada 24 horas, se revisaron para observar la aparición de hifas que en los extremos de los cortes en un microscopio óptico (Olympus SZ61) con un aumento total de 3.5X.

Tinción con calor. Los segmentos de raíces se clarearon en KOH (10%) a una presión de 10 lb-in⁻² por 10 min. Este tratamiento se realizó tres veces debido al color oscuro de las raíces. Los fragmentos se enjuagaron 3 veces con agua estilada para eliminar el exceso de KOH. Posteriormente, éstos se sumergieron en H₂O₂ (3%) por 20 min, se enjuagaron con agua destilada (3 veces) y se sumergieron en HCl (2%) por 20 min. Se eliminó la solución ácida y, sin enjuagar, los fragmentos de raíz se tiñeron con azul tripano (0.05% en glicerol al 50%) y se pusieron en autoclave (10 lb-in⁻²) por 10 min. Este procedimiento tiñe al hongo de color azul para permitir su inspección al microscopio. Las raíces se dejaron con glicerol (50%) durante ~12 h para eliminar el exceso de colorante. Las muestras se cortaron con un bisturí, se colocaron en un portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos y se presionó ligeramente por 1 min. Las muestras se observaron en un microscopio óptico (Olympus CX31) con un aumento total de 40X (Fuentes-Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007).

⁶ Microorganismos que habitan en la superficie externa de las plantas (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011).

5.5 Tolerancia y acumulación de plomo

Las pruebas de tolerancia y acumulación de plomo por *D. viscosa* y *D. viscosa*-hongo, se llevaron a cabo con la cepa DO-S, la cual favoreció significativamente el crecimiento de *D. viscosa* con respecto a las plantas control. Para lo anterior, las plántulas de 15 días obtenidas como se describe en la Sección 5.2.1, se transfirieron a tubos de cultivo con 1.5 g de agrolita seca, humectada (73%) con medio MSM2 con o sin 2000 mg Pb·kg⁻¹ (Sección 5.3.3). Las plantas se aclimataron a las nuevas condiciones de cultivo durante un periodo de 7 días después del trasplante. Posteriormente, una parte de las plántulas se inoculó con 500 µL de una suspensión de biomasa (3.5 x 10³ mg PS) de la cepa DO-S (*Cladosporium sp.*). Con base en lo anterior, se corrieron cuatro tratamientos: (i) planta sin Pb (P); (ii) planta con Pb (P+Pb); (iii) planta con hongo (P+H); (iv) planta con hongo con Pb (P+H+Pb). Cada tratamiento se mantuvo 60 días más, bajo una intensidad de luz de 50 µmol·m⁻²·s⁻¹ con un fotoperiodo de 16 h a 25 ± 1°C. Cada tratamiento se realizó con 13 réplicas, en las cuáles se determinó: (i) crecimiento de *D. viscosa*, medido a través de la elongación y peso seco de la parte aérea y raíces; (ii) plomo en tejidos; (iii) actividad guayacol-peroxidasa (G-POX), (v) actividad catalasa (CAT) y (vi) actividad glutatión-S-transferasa (GST). En la agrolita se determinaron las siguientes variables al final de periodo de cultivo: (i) plomo soluble; (ii) plomo en biomasa fúngica y (iii) pH.

Para las pruebas de tolerancia y acumulación se prepararon cultivos de la cepa seleccionada (DO-S) en medio PDA. Para lo anterior, se inoculó un pequeño corte del micelio de la periferia de una colonia de la cepa en cajas de Petri con medio PDA, la cepa se incubó durante 7 días a 30°C. Posteriormente, se obtuvieron 15 fragmentos de micelio (5 mm Ø) de la periferia de las colonias. Los fragmentos se depositaron en tubos de cultivo con 15 mL de agua estéril y 30 perlas de vidrio (7 mm Ø). Los tubos se agitaron vigorosamente en vórtex hasta disgregar el micelio para obtener una suspensión homogénea, la cual fue utilizada como inóculo en los ensayos con plomo. La suspensión obtenida contenía una concentración de biomasa de 1.2 ± 0.2 mg·mL⁻¹.

5.6 Métodos analíticos

5.6.1 Cuantificación del crecimiento de *D. viscosa*

El crecimiento de *D. viscosa* se evaluó a través del crecimiento relativo cuantificando el número de hojas al final del cultivo y midiendo la elongación de tallos y raíces (cm), por separado. La producción de biomasa se cuantificó mediante la determinación del peso seco (60°C, 48 h) de la parte aérea y las raíces, por separado. Para determinar el crecimiento relativo se utilizó la siguiente relación (Rojas-Loria *et al.*, 2012):

$$CR(\%) = \frac{\text{Biomasa en medio} + \text{Hongo}}{\text{Biomasa en medio} - \text{Hongo}} \times 100$$

5.6.2 pH en la agrolita

La agrolita de los cultivos se secó (60°C, 48 h) y a ~1.5 g de agrolita seca se le adicionaron 20 mL de agua desionizada (18 M Ω ·cm⁻¹, *Milli-Q Millipore*). La agrolita se mantuvo en agitación (150 rpm) a 30°C durante 24 h. Posteriormente, se separó la fase acuosa por filtración (Whatman 2) y se registró el pH en un potenciómetro (*OAKTON* pH 1100 Series).

5.6.3 Análisis de plomo

El contenido de Pb en solución se determinó en un espectrómetro de absorción atómica (EAA, *Shimadzu, AA-6300*) por el método de flama a una longitud de onda de 283 nm, con una mezcla de aire-acetileno (1.5-2.0 L·min⁻¹) y una abertura del quemador de 0.5 nm. La curva (0 - 12.5 mg·L⁻¹) para la cuantificación de Pb se preparó con una solución estándar de 1000 μ g·mL⁻¹ (*J.T. Baker, Instra-analyzed*) en ácido nítrico (0.1%).

Plomo total en agrolita. Para el análisis del contenido total de Pb en muestras de agrolita, éstas se secaron (60°C, 48 h) y se sometieron a una digestión ácida asistida por microondas (*CEM, MARSXpress*). Para lo anterior, ~0.5 g de agrolita seca se adicionó con 10 mL de ácido nítrico concentrado (*J.T. Baker, Instra-analyzed*) y se digirió por 10 min a 175°C (1600 Watts). Las muestras se aforaron a 25 mL con agua desionizada (DI) y se filtraron (0.45 μ m, *Nylaflo PALL*).

Plomo soluble en agrolita. El Pb soluble en la agrolita se cuantificó directamente por EAA-flama, en los mismos extractos acuosos obtenidos para la cuantificación del pH (Sección 5.6.2).

Plomo en biomasa de *D. viscosa*. El contenido de Pb acumulado en tejidos de *D. viscosa*, se determinó en muestras de ~100 mg (peso seco, PS) de tallos y ~30 mg PS de raíces. Las muestras se adicionaron con 5 mL de HNO₃ concentrado y 4 mL de agua DI y fueron digeridas (~15 min) en un digestor de microondas (*CEM, MARSXpress*). Las muestras completamente digeridas, se filtraron y se aforaron a 10 mL con agua DI. El Pb se determinó en los extractos por EAA-flama.

Plomo en biomasa fúngica. Para recuperar la biomasa fúngica adherida a la agrolita, después de los ensayos de tolerancia/acumulación de Pb, a la agrolita seca (60°C, 48 h) recuperada de cada tubo de cultivo (~1.5 g PS) se le agregaron 15 mL de agua DI con Tween 80 (2 gotas por cada 100 mL). Las muestras se agitaron en vórtex por 3 min, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó (13000 rpm, 10 min) en tubos *Eppendorf*. Se recuperó la pastilla, se adicionó con una solución de sacarosa (10%), se homogeneizó en un vórtex y se centrifugó nuevamente (13000 rpm, 10 min). Se recuperó la pastilla, se le agregó agua DI, se homogeneizó y se centrifugó (13000 rpm, 10 min). La pastilla obtenida, se secó a temperatura ambiente durante 48 h y la biomasa en la superficie de la pastilla se desprendió de las partículas finas de agrolita. Finalmente, la biomasa recuperada, se llevó a peso constante (60°C, 24 h). La biomasa recuperada de los ensayos (20 - 60 mg PS), se digirió por microondas y el Pb en los extractos se cuantificó por EAA-flama.

Determinación del potencial fitorremediador. Con el objeto de cuantificar la capacidad de la planta y de la asociación planta-hongo para estabilizar o acumular plomo, la concentración de Pb ($[Pb^{2+}]$) cuantificada, se usó para estimar los factores de translocación (FT), Fitoestabilización y de bioconcentración (FBC) mediante las siguientes ecuaciones (Audet y Charest, 2007):

$$FT = \frac{[Pb^{2+}]_{tallos}}{[Pb^{2+}]_{raíces}} \quad ; \quad FBC = \frac{[Pb^{2+}]_{planta}}{[Pb^{2+}]_{medio}} \quad ; \quad FEst = \frac{[Pb^{2+}]_{zona\ radicular}}{[Pb^{2+}]_{agrolita}}$$

Balance de plomo. Se realizó un balance de Pb con la finalidad de conocer la distribución de las diferentes fracciones del EPT en función del tratamiento. Para el balance se consideró que el plomo total ($Pb_T = 100\%$) cuantificado inicialmente en cada unidad experimental, tiene una fracción soluble (Pb_{sol}). En el caso de los tratamientos en donde creció la planta o la asociación planta-hongo, una fracción del Pb total se bioacumuló en la biomasa vegetal (Pb_{planta}) y en la biomasa fúngica (Pb_{hongo}). Finalmente, la fracción de Pb que quedó en la agrolita después de los tratamientos, se consideró como el Pb residual (Pb_{res}):

$$Pb_T = Pb_{sol} + Pb_{planta} + Pb_{hongo} + Pb_{res}$$

5.7 Actividades enzimáticas

5.7.1 Obtención de extractos enzimáticos crudos

Para obtener los extractos enzimáticos crudos (EEC), entre 50 y 100 mg de biomasa (peso fresco, PF) de cada plántula (raíces y brotes por separado), se trituró y homogeneizó con N_2 líquido 4 min. La biomasa se resuspendió en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.0) con inhibidor de proteasas ($5 \mu L \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ de biomasa (PF), *Sigma-Aldrich*), utilizando una proporción de 1 mL de buffer por 100 mg de PF. La suspensión se centrifugó (14000 rpm, 15 min, 4°C) y el sobrenadante obtenido (EEC) se utilizó para determinar la actividad guayacol-peroxidasa (G-POX), catalasa (CAT) y glutatión-s transferasa (GST).

El contenido total de proteína en los EEC se determinó con base en el método de Lowry (1951), utilizando un kit comercial (*DCTM Protein Assay, Bio-Rad*) y seroalbúmina bovina como estándar ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

5.7.2 Guayacol peroxidasa (G-POX)

La actividad G-POX (EC. 1.11.1.7) se determinó espectrofotométricamente en los EEC, usando guayacol como sustrato reductor (Yong y Young, 1996). La tasa de producción de tetraguayacol por acción de peroxidasas se cuantificó espectrofotométricamente mediante el aumento en la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (*ELx808_{IU}, Bio-tek Instruments, Inc.*). La actividad enzimática se determinó considerando un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $26.6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ para el tetraguayacol (Santos de Araujo *et al.*, 2004).

La mezcla de reacción contenía 10 μL de EEC, 10 μL de guayacol (1% en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7), 30 μL de H_2O_2 (20 mM en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7) y 200 μL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7). La reacción se inició con la adición de H_2O_2 y en el control éste se sustituyó por H_2O .

Una unidad (U) de actividad G-POX se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de tetraguayacol por min a 27°C.

5.7.3 Catalasa (CAT)

La actividad CAT (EC. 1.11.1.6) se determinó en los EEC mediante la descomposición del H_2O_2 por acción de la enzima. La tasa de desaparición del H_2O_2 se cuantificó espectrofotométricamente mediante la disminución en la absorbancia a 240 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (*Varian, Cary Win UV 50Conc*). La actividad enzimática se determinó considerando un $\epsilon = 39.4 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ (Aebi, 1984). La mezcla de reacción contenía 50 μL de EEC y 200 μL de H_2O_2 (20 mM en buffer de fosfatos 50 mM, pH 7). La reacción se inició con la adición del EEC y en el control se sustituyó el H_2O_2 por H_2O .

Una unidad (U) de actividad CAT se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de H_2O_2 por min a 27°C.

5.7.4 Glutatión-S-transferasa (GST)

La actividad GST (EC. 2.5.1.18) se determinó en los EEC con un kit comercial (CS0410, *Sigma*). El aumento en la absorbancia debido a la conjugación del glutatión (GSH) con 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), catalizada por la GST se cuantificó a 340 nm (Habig y Jakoby, 1981) en un lector de microplacas. La actividad enzimática se calculó a partir de la tasa inicial de la reacción con un $\epsilon = 9.6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ para el conjugado GSH-CDNB. La mezcla de reacción contenía 190 μL de la solución con el sustrato y 10 o 20 μL de EEC para tallos o raíces, respectivamente. La solución con el sustrato contenía 980 μL de buffer de fosfatos Dulbecco (pH 7.5), 10 μL de L-glutatión reducido (200 mM) y 10 μL de CDNB (100 mM). La reacción se inició con la adición del EEC y, en el control, el glutatión reducido (GSH) se sustituyó por H_2O .

Una unidad (U) de actividad GST se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol del conjugado GSH-CDNB por min a 27°C.

5.8 Análisis estadístico

Para establecer diferencias significativas entre las medias de las variables analizadas se realizó un análisis de varianza y una prueba de Duncan con el paquete estadístico SAS. Todas las pruebas se corrieron con al menos 3 réplicas por tratamiento.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación morfológica de cepas fúngicas

Las cepas **DO-S**, **DO-PB** y **DO-PC** fueron identificadas como hongos del género *Cladosporium*, muestran características macro- y microscópicas típicas de los hongos septados oscuros (DSE), con colonias que van de un color verde olivo a café o negro (Figura 13 a, b y c), e hifas claramente septadas de color oscuro (Figura 13 d, e y f). Estas tres cepas de DSE (DO-S, DO-PB y DO-PC), fueron aisladas de semillas de *D. viscosa*, lo que indica que son endófitos propios de la planta en estudio. Lo anterior es de gran relevancia para este estudio, ya que en general, se ha observado que los endófitos transmitidos a través de semillas son mayormente mutualistas, en contraste con los que se transmiten a través de esporas que, pueden presentar un efecto antagónico en las plantas hospederas (Aly *et al.*, 2011).

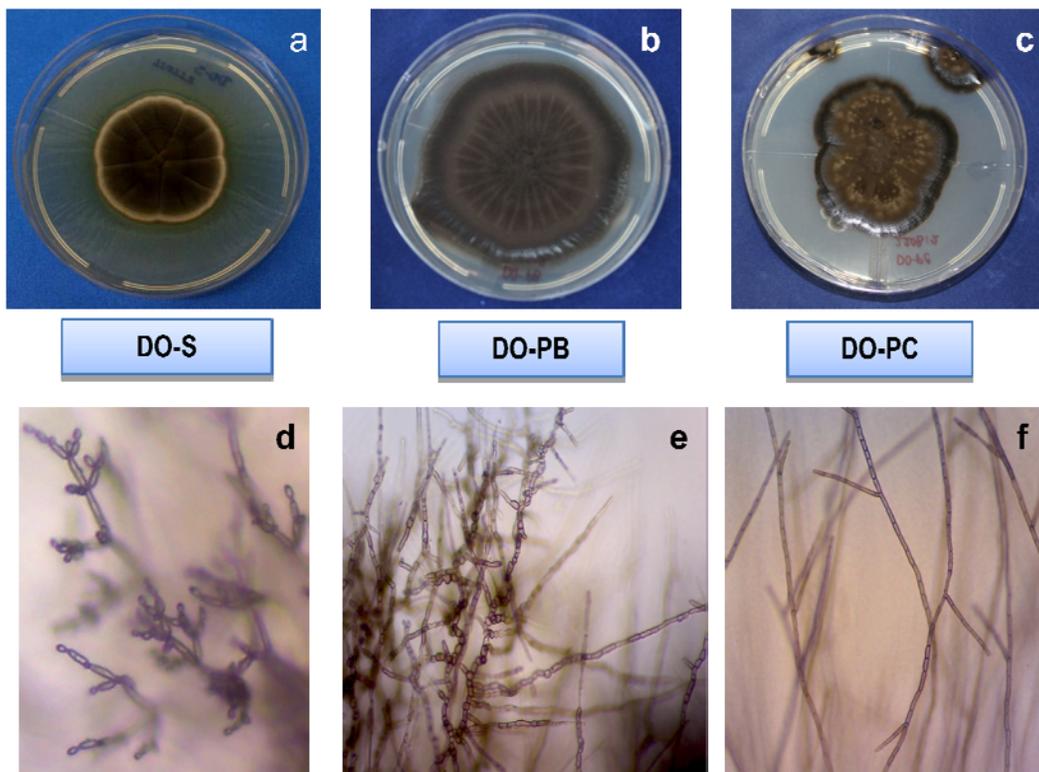


Figura 13. Características morfológicas de las cepas DO-S. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a, b y c) y la morfología microscópica de hifas y estructuras reproductoras (10X) (d, e y f).

Las cepas de DSE se identificaron molecularmente⁷, encontrando que DO-S y DO-PC tienen 95% y DO-PB tiene un 93% de identidad con el género *Cladosporium*, de acuerdo con la secuencia de bases (**Anexo 1**).

⁷ Dra. Ainhoa Arana. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca. La designación de géneros se basó en el análisis de secuencias de la región ITS-5 del ADN r fúngico y la información se comparó con la base de datos "Attach".

Los DSE son comúnmente observados en raíces de plantas que habitan en ambientes limitados en nutrientes y bajo condiciones de estrés, lo que sugiere que pueden facilitar el establecimiento de las plantas y su supervivencia (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). Aún no hay un consenso acerca de cómo los estos hongos modifican el crecimiento vegetal y el estado nutricional de las plantas, pero este efecto se ha demostrado en varios estudios (Newsham, 2011).

El género *Cladosporium* incluye uno de los más grandes grupos de hifomicetos dematiáceos, con más de 772 especies, dentro de los cuales se incluyen los endófitos. Este género se ha logrado aislar a partir de diversos entornos, como aire, suelo y otros sustratos, así como de manera endófito en plantas. Dentro de las plantas de las que se han aislado endófitos de este género, se encuentran *Symplocos paniculata*, *Arenaria serpyllifolia* y *Rosa longicuspis*. De éstas, Li *et al.* (2012a), obtuvieron 2, 3 y 1 aislados, respectivamente. Pethkar *et al.* (2001), obtuvieron 2 aislados de *Cladosporium* a partir de plantas de algodón negro, encontrando que poseen propiedades preferenciales para adsorber EPT, lo que puede favorecer la fitorremediación.

La cepa **AA-1** se identificó dentro del género *Penicillium*, hongos filamentosos ampliamente distribuidos en la naturaleza y se hallan en el suelo, la vegetación caída, el aire y el suelo. La cepa muestra características morfológicas macro y microscópicas típicas del género de *Penicillium*, colonias azuladas-gris y blancas en la periferia. El reverso de la colonia es amarillento. Sus hifas son septadas hialinas con conidióforos simples o ramificados y conidios (Figura 14) (Carrillo, 2003; Velázquez-Osornio, 2011).

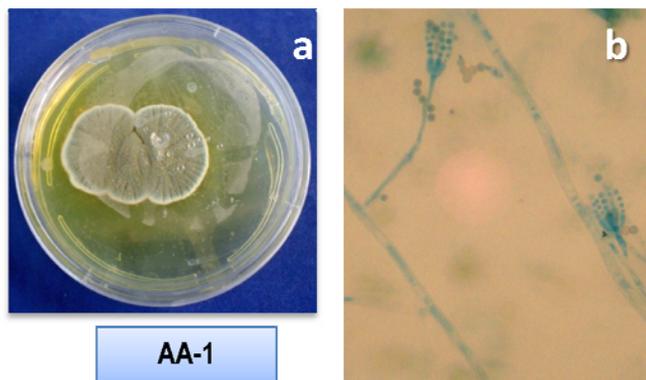


Figura 14. Características morfológicas de la cepa AA-1. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a) y la morfología microscópica de hifas y estructuras reproductoras (10X) (b).

Hay antecedentes en los que se reporta a *P. chrysogenum* como un hongo con alta capacidad para la biosorción de EPT, entre los cuales se encuentra el Pb (Ahluwalia, 2007; Velázquez-Osornio, 2011). Este género es considerado con alto potencial para la biorremediación. Wang *et al.* (2007) demostraron un efecto benéfico en la producción de biomasa y la acumulación de Cu, Zn y Pb por plantas de *Elsholtzia splendens*, cuando se inocularon con un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares y *Penicillium* sp.

La cepa **CE-1** fue identificada dentro del género *Aspergillus*. Las colonias presentaron una textura aterciopelada con una tonalidad beige y de aspecto arenoso, la cepa presenta hifas septadas hialinas y estructuras reproductoras asexuales típicas del género *Aspergillus*, con fiálides y conidióforos monoverticiliados. Después de un periodo de crecimiento de aproximadamente 10 días se forman células “hülle” y ascosporas de color rojizo, características del género *Emericella* (Figura 15), la fase sexual (teleomorfo) de *Aspergillus* (Carrillo, 2003; Velázquez-Osornio, 2011).

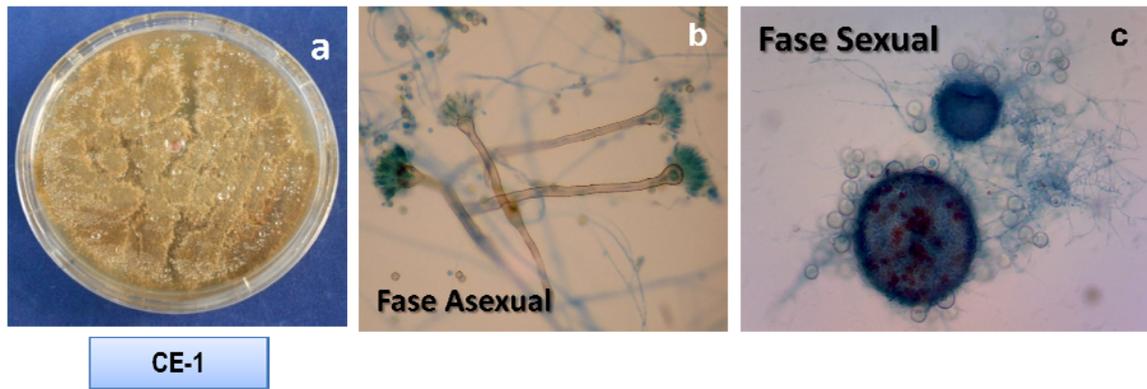


Figura 15. Características morfológicas de las diferentes cepas. Se observa la morfología colonial en medio PDA (a) y la morfología microscópica de hifas en (fase asexual) y células hülle (fase sexual) (10X) (b y c, respectivamente).

Varios estudios han demostrado un alto potencial del género *Aspergillus* para hacer más eficiente la fitorremediación de suelos contaminados con EPT (Aly *et al.*, 2011). Por ejemplo, la inoculación de *B. juncea* con *Trichoderma* sp. o *Aspergillus* sp. mejoró la producción de biomasa (41 - 109%), favoreciendo el crecimiento (100 - 178%) y la translocación (~67%) de Ni y Cd a los brotes (Jiang *et al.*, 2008). También se encontró que los ácidos orgánicos que produce *Aspergillus niger* movilizó grandes cantidades de Pb y fósforo a partir de piromorfita. Además, se observó que *A. niger* mejoró significativamente la absorción de Pb y fósforo por *Lolium perenne*. Lo anterior indica el potencial de este género para mejorar la fitoextracción de EPT en suelos contaminados (Rajkumar *et al.*, 2012).

6.2 Pruebas de asociación con *D. viscosa*

6.2.1 Análisis cuantitativo

Porras-Alfaro y Bayman (2011), describen a los endófitos como un grupo de organismos simbióticos que viven dentro de los tejidos de una planta sin causar síntomas de la enfermedad aparente. Este grupo de microorganismos vive asintómicamente dentro de tejidos vegetales sanos, durante parte o todo su ciclo de vida. Sin embargo, el comportamiento de un hongo en una asociación hongo-planta depende de diversos fac-

tores, entre los cuales, la concentración y disponibilidad de nutrientes es clave (Porras-Alfaro y Bayman, 2011). Con base en lo anterior, la capacidad de cada cepa aislada para interactuar con *D. viscosa* se verificó en función de la composición del medio de cultivo. En general, el crecimiento de *D. viscosa* en el MSM1, en presencia de los hongos en estudio, no presentó cambios visibles con respecto a las plantas control (Figura 16).

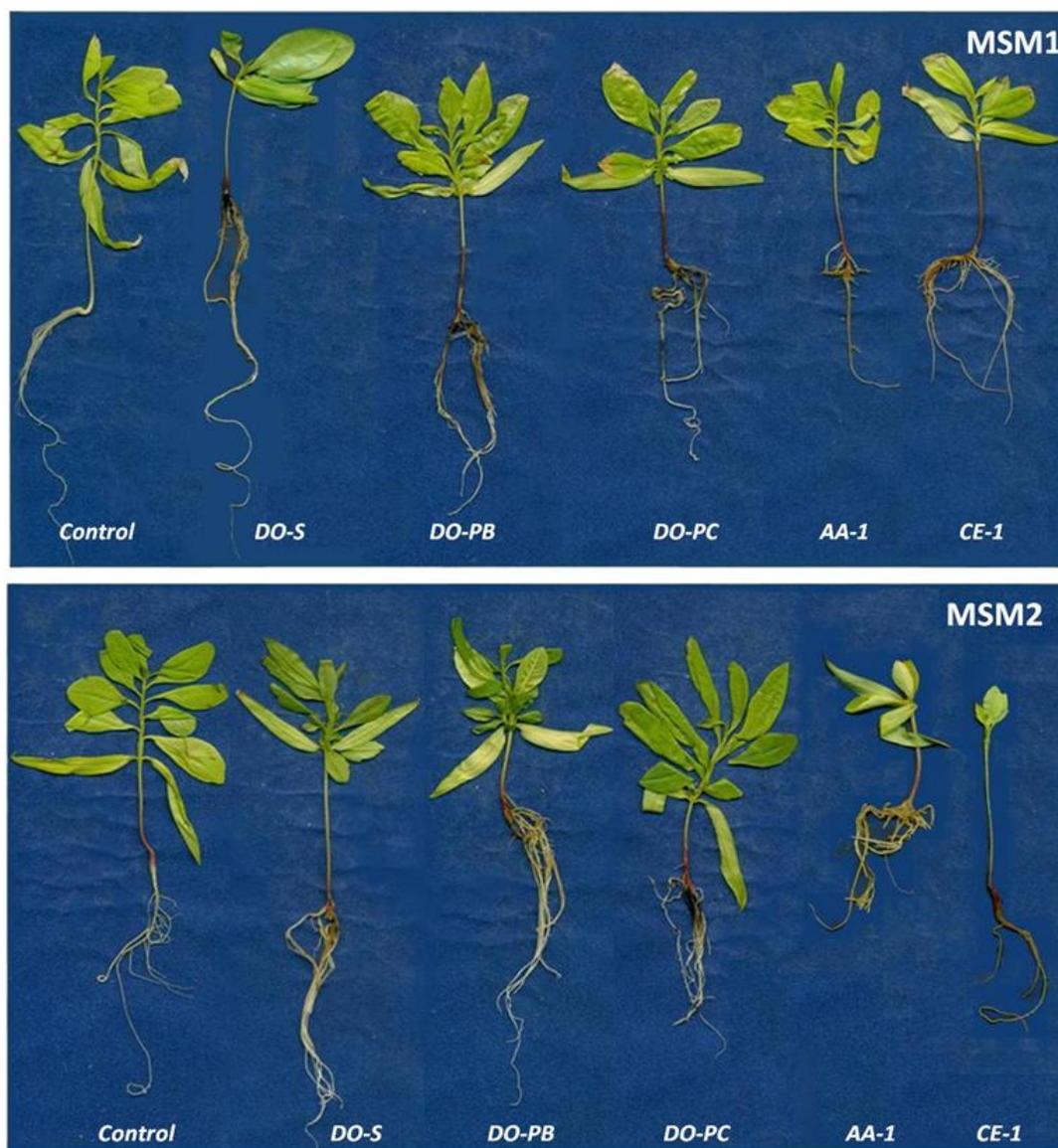


Figura 16. Crecimiento de plántulas de *D. viscosa* después de 60 días de incubación sin inoculo (control) o inoculada con las cepas identificadas como DO-S, DO-PB, DO-PC, AA-1, CE-1. Las cepas identificadas como DO, son hongos septados oscuros del género *Cladosporium*, AA-1 son hongos del género *Penicillium* y CE-1 son hongos del género *Aspergillus*. **MSM1** corresponde al medio de cultivo con menor contenido de nutrientes y **MSM2** al medio con mayor concentración de nutrientes.

En contraste, en el medio MSM2, se observó un efecto positivo en el crecimiento de la planta por efecto de las cepas de hongos septados oscuros (DSE): DO-S, DO-PB y DO-PC (Figura 16). Asimismo, la producción de hojas fue influenciada tanto por efecto del medio de cultivo, como de la inoculación con las diferentes cepas (Figura 16). Se encontró un efecto positivo por efecto del medio en la producción de hojas en las plantas control y en las inoculadas con las cepas de DSE, mientras que en el medio MSM2 no hubo diferencias significativas en esta variable. El número de hojas en el MSM2 aumentó significativamente (26 y 43%, respectivamente) en las plantas control (C) y en las inoculadas con DO-PB, con respecto a las plantas del mismo tratamiento en medio MSM1. En contraste, cuando la planta se inoculó con AA-1 y CE-1, la producción de hojas se redujo 66.3, 84.3%, respectivamente, con respecto a las plantas control crecidas en MSM2 (Figura 17).

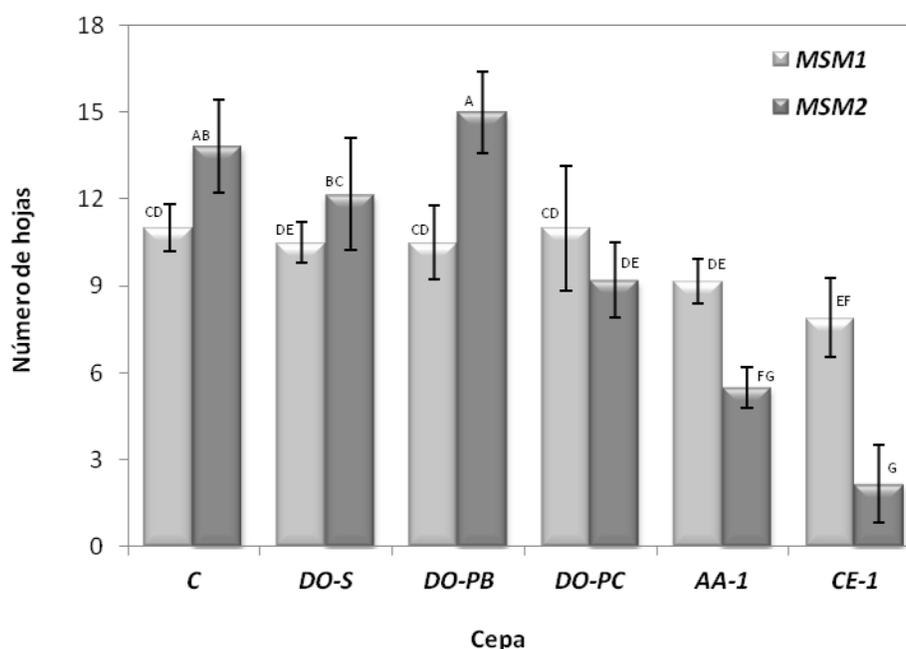


Figura 17. Numero de hojas producidas por *D. viscosa* en función de la composición del medio de cultivo y de la cepa inoculada. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$, $n = 5$)

Los resultados cualitativos se corroboraron cuantitativamente a través de la longitud y producción de biomasa (peso seco) de tallos y raíces de *D. viscosa*. En la Figura 18 se muestra el efecto de la composición del medio de cultivo y la inoculación con diferentes hongos sobre la producción de biomasa de *D. viscosa* después de 60 días de incubación. Nuevamente en esta variable se observa que la variación en la concentración de nutrientes en el medio tuvo un efecto significativo en el crecimiento de *D. viscosa*.

Mientras que en el medio MSM1 no se registraron diferencias significativas en la producción de biomasa aérea por efecto de la inoculación con hongos endófitos, en las plantas cultivadas en medio MSM2, las cepas AA-1 y

CE-1 redujeron significativamente (46 y 69%, respectivamente) dicha variable, con respecto a las plantas control (Figura 18). En el medio MSM1, todas las cepas provocaron un importante aumento (52 - 115%) en la producción de biomasa de raíces de *D. viscosa*. En MSM2, nuevamente se registró un efecto negativo de las cepas AA-1 y CE-1 sobre la biomasa de raíces, causando una disminución de 9 y 40% respectivamente. En contraste, las cepas DO-S y DO-PC aumentaron en un 87 y 99%, respectivamente, la producción de raíces, con respecto a las plantas control.

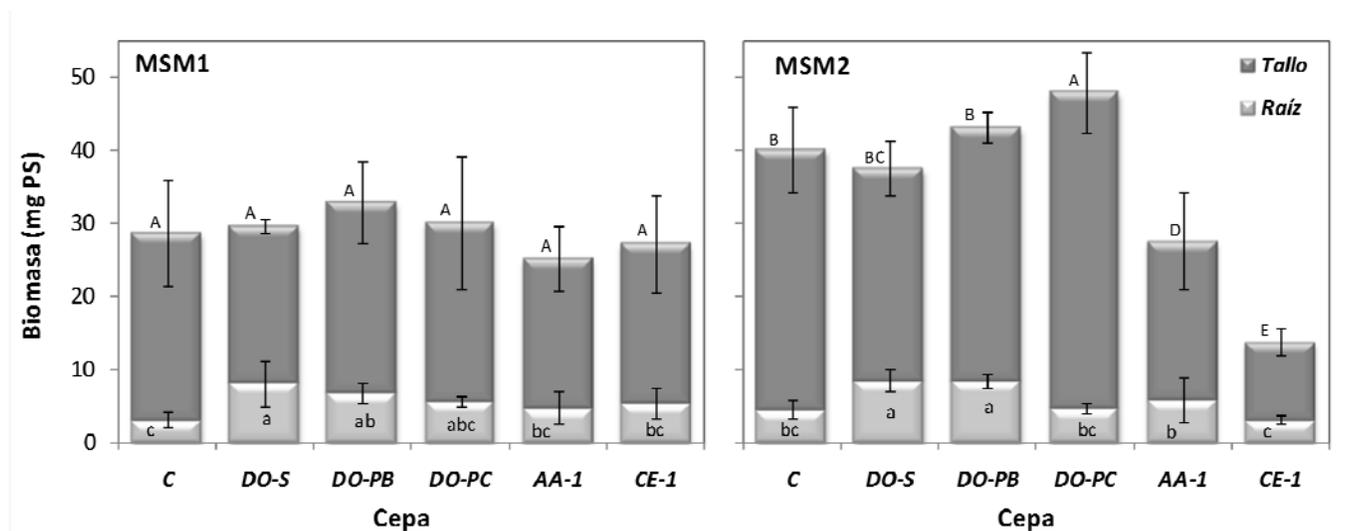


Figura 18. Producción de biomasa (peso seco, PS) de tallos y raíces de plántulas de *D. viscosa* crecidas durante 60 días en ausencia (C) o presencia de los hongos en estudio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$, $n = 5$).

En cuanto a la elongación de raíces y tallos, en el medio MSM2 no se registraron diferencias significativas por efecto de la inoculación con los diferentes hongos. En MSM1, se encontró una ligera disminución en la elongación de raíces en plantas inoculadas con las cepas DO-PB, DO-PC, AA-1 Y CE-1 (Figura 19). Estos datos sugieren que la elongación de raíces no es una variable adecuada para estimar los efectos de una asociación sobre el crecimiento de la planta en estudio.

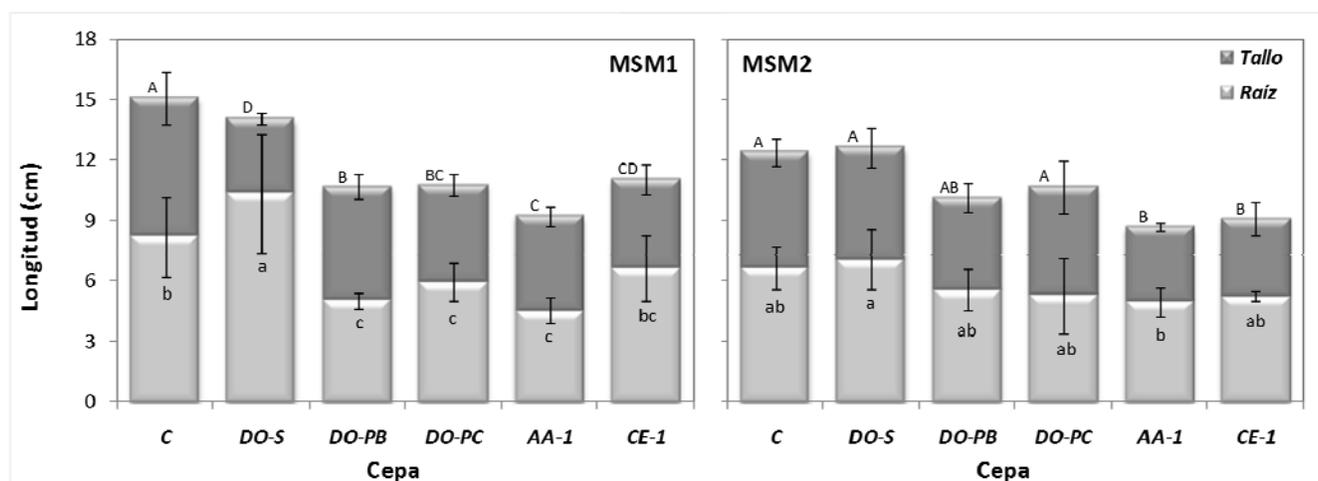


Figura 19. Elongación de tallos y raíces de plántulas de *D. viscosa* crecidas durante 60 días en ausencia (C) o presencia de los hongos en estudio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$, $n = 5$).

Las interacciones mutualistas entre un hongo y una planta dependen de un equilibrio que es controlado por factores ambientales, fisiológicos y genéticos, que resulta en beneficios para la salud de ambas partes (Aly *et al.*, 2011). En este tipo de interacciones, el comensalismo ofrece beneficios al endófito al permitir una existencia sin alteraciones y un suministro de nutrientes sin afectar al hospedero, mientras que el mutualismo implica una interacción benéfica para ambas partes. Además de los beneficios para el endófito, el mutualismo con frecuencia resulta en mejoras en el crecimiento del hospedero (Kogel *et al.*, 2006).

Los resultados anteriores demuestran que la composición del medio de cultivo tiene un efecto determinante sobre el crecimiento de *D. viscosa* en presencia de diferentes hongos endófitos y que este efecto también es dependiente de la naturaleza del endófito ya que, independientemente del medio, los hongos que mostraron una mejor respuesta fueron los aislados de *D. viscosa*. Existen reportes que indican que ambientes ricos en carbohidratos y nutrientes como fósforo y nitrógeno, suprimen o retardan la formación de la asociación planta-hongo, por lo que la concentración y disponibilidad de nutrientes es clave (Usuki *et al.*, 2002). Con base en lo anterior, nuestros resultados sugieren que, bajo las condiciones probadas, un medio con mayor contenido de nutrientes favorece la asociación entre *D. viscosa* y *Cladosporium* spp.

Como se mencionó, el tipo de interacción entre un endófito y una planta es modulada por condiciones de estrés fisiológico y/o senescencia. Varias investigaciones han demostrado que, además de factores genéticos, dos factores clave que pueden cambiar de una interacción mutualista a una parasítica son el desequilibrio en el intercambio de nutrientes y las variaciones ambientales (Aly *et al.*, 2011).

En el caso particular de los DSE, Newsham (2011) reporta datos de 18 investigaciones en las que se inocularon diferentes plantas con DSE en sustratos estériles. Entre los resultados más sobresalientes, este autor destaca los siguientes: (i) en ningún caso se registraron efectos negativos en el rendimiento de la planta por efecto de los DSE; (ii) en todas las plantas estudiadas se encontraron efectos positivos por efecto de la inoculación con DSE en la biomasa aérea y de raíces y en el contenido de N y P; (iii) la inoculación aumentó la biomasa aérea y de raíces cuando no se suministró N inorgánico adicional, o cuando todo o la mayor parte del N se suministró en forma orgánica; (iv) la inoculación con *Phialocephala fortinii* (un DSE) aumentó la biomasa de raíces y de brotes, así como el contenido de P y N en brotes con relación a los testigos sin inocular; (v) la inoculación con DSE, incrementó significativamente la producción de biomasa de raíces o brotes cuando se aplicó N orgánico.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son importantes, ya que demuestran que el tipo de asociación entre una planta y un hongo endófito puede establecerse a través de cambios en la composición nutrimental del medio de cultivo. Lo anterior, puede aprovecharse para estimular el crecimiento de *D. viscosa*, una planta con potencial para fitoestabilizar Pb, cuando se asocia con un hongo endófito. Lo anterior demuestra que la composición del medio de cultivo es un factor clave para establecer la asociación entre una planta y un hongo, particularmente hongos septados oscuros.

6.2.2 Análisis cualitativo: tipo de asociación

Debido a los resultados favorables obtenidos en cuanto a la producción de raíces de *D. viscosa* en presencia de la cepa DO-S en medio MSM2, se seleccionó esta cepa para analizar el tipo de asociación que se indujo con *D. viscosa*. Dicho análisis se realizó con el fin de determinar si esta cepa de *Cladosporium* sp. se comporta como un hongo endófito o epífita con la planta en estudio.

En la Figura 20 se muestran los resultados de la prueba en **placa con gota** para tallos, hojas y raíces de *D. viscosa*. Esta prueba permitió observar que la cepa DO-S se comporta como un hongo endófito cuando crece con *D. viscosa* en el medio con mayor contenido de nutrientes (MSM2). Es importante también resaltar que la frecuencia de colonización de esta cepa en los diferentes tejidos analizados se encontró en el siguiente orden: tallos (100%) > hojas (9%) > raíces (0%). Este resultado puede atribuirse al hecho de que los hongos endófitos comúnmente exhiben especificidad por un órgano o un tejido, como resultado de su adaptación a diferentes condiciones fisiológicas en las plantas (Aly *et al.*, 2011).

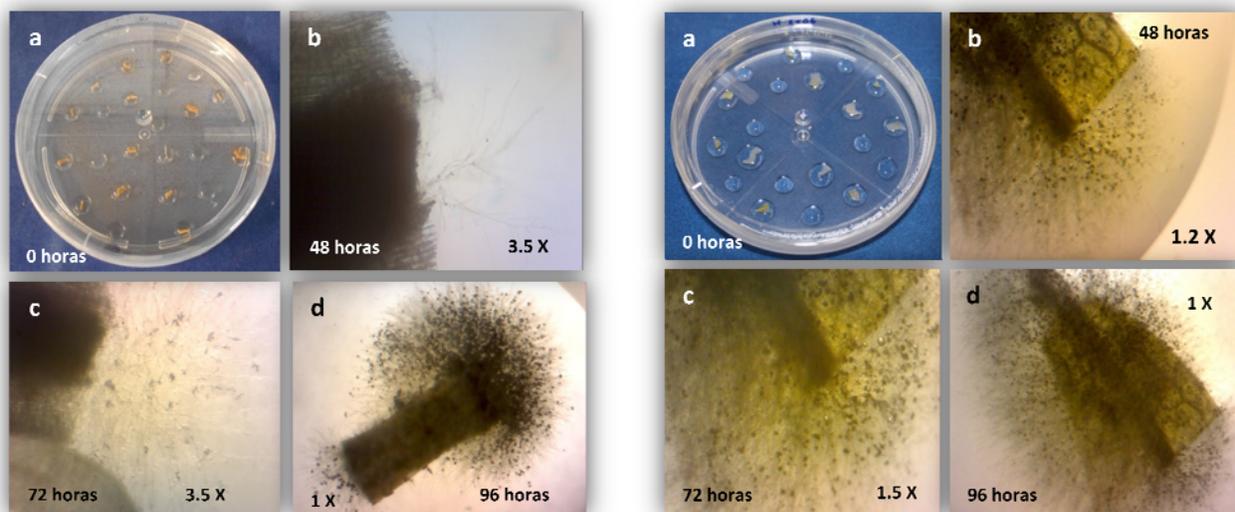


Figura 20. Crecimiento de la cepa DO-S en fragmentos desinfectados de tallos (izquierda) y de hojas (derecha) de plántulas de *D. viscosa* crecidas en presencia del hongo. Los fragmentos se colocaron en gotas de Phytigel con $MgSO_4$ y antibióticos (a). Se observa la proliferación de hifas desde el interior del fragmento a las 48 (b), 72 (c) y 96 (d) horas de incubación.

Para corroborar los resultados anteriores, en placas con medio PDA, se colocaron fragmentos desinfectados de tallos, raíces y hojas de plántulas de *D. viscosa* que crecieron durante 4 días en presencia de la cepa DO-S en medio MSM2. En la Figura 21 se muestra el crecimiento fúngico en las **placas con PDA**, en donde puede verse que con esta técnica se registró crecimiento a las 96 h de cultivo en los tres tipos de tejidos en el siguiente orden: tallos (100%) > raíces (50%) > hojas (25%).

Aunque los resultados obtenidos por el método de **placa con gota** y **placa con PDA** resultaron diferentes en cuanto a la frecuencia de colonización en hojas y raíces, con ambos métodos se obtuvo un 100% en los tallos. Este resultado indica que la cepa DO-S es un hongo endófito que habita preferencialmente en los tallos de *D. viscosa*. De forma similar, en un estudio realizado con seis plantas dominantes (*Arabis hirsuta*, *Acacia decurrens*, *Symplocos paniculata*, *Rabbosia eriocalyx*, *Arenaria serpyllifolia*, *Rosa longicuspis*) en un sitio contaminado con plomo y zinc, se encontró que los tallos albergaron un mayor número de hongos endófitos que las hojas (Li *et al.*, 2011). Este comportamiento puede atribuirse al hecho de que el conjunto de presiones selectivas que ocurre en cada tejido vegetal afecta a sus habitantes endófitos (Aly *et al.*, 2011), por lo que los que se encuentran en un tejido en particular, no necesariamente serán los mismos presentes en otros tejidos.



Figura 21. Crecimiento de la cepa DO-S en placas con PDA a partir de fragmentos desinfectados de tallos, raíces y hojas de plántulas de *D. viscosa* crecidas durante 4 días con el hongo. Se muestra el crecimiento a las 96 horas de incubación a 30°C.

De hecho, se sabe que las hojas, raíces y tallos leñosos de una misma planta a menudo difieren en gran medida entre los miembros dominantes de sus comunidades endófitas e incluso pueden mostrar diferencias funcionales (Porrás-Alfaro y Bayman, 2011). Por ejemplo, Pang *et al.*, (2008), encontraron que las hojas, tallos y raíces de plantas de alfalfa se encuentran colonizados por diferentes hongos que producen diferentes tipos de metabolitos secundarios. En un estudio realizado con mangle (*Kandelia candel*), se aislaron diversos hongos endófitos de la corteza leñosa y del tejido foliar. Los resultados indicaron la aparición recurrente de hongos endófitos similares en la corteza (674 aislados), identificando tres familias de ascomicetos, 18 anamorfos y 29 morfotipos de micelio. En las hojas (63 aislados), los endófitos más comunes fueron de los géneros *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Guignardia* y *Xylaria* (Aly *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2008).

Por otra parte, aunque comúnmente puede ser posible observar la presencia de microorganismos endófitos dentro de una planta (Phillips y Hayman, 1970), en este caso, al realizar la prueba de **tinción con calor**, no se observó la presencia del hongo en estudio en ningún tejido de *D. viscosa* analizado. De manera similar, Wagner y Lewis (2000), no observaron estructuras de *Beauveria bassiana* dentro de plantas de maíz infectadas con el hongo. No obstante, al comparar la presencia de un metabolito característico producido por el hongo, la beauvericina, éste solo se encontró en plantas infectadas.

6.3 Pruebas de tolerancia y acumulación de plomo

6.3.1 Crecimiento vegetal

Para que el proceso de fitorremediación se lleve a cabo de forma eficiente es necesario que las plantas y los microorganismos involucrados sean tolerantes al contaminante en particular (Peralta-Pérez y Volke-Sepulveda, 2011). Una vez que se determinó que la asociación de *D. viscosa* con la cepa DO-S en medio MSM2 fue de naturaleza endófito y tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta, se cuantificó la tolerancia y la

capacidad de acumulación de plomo por la asociación en agrolita. Para lo anterior, se realizaron cuatro tratamientos (Sección 5.3.3): (i) planta, P; (ii) planta con 2000 mg Pb·kg⁻¹ de agrolita seca (AS), P+Pb; (iii) planta con hongo, PH; (iv) planta con hongo con 2000 mg Pb·kg AS⁻¹, PH+Pb (Figura 22).



Figura 22. Crecimiento de plántulas de *D. viscosa* durante 60 días en presencia o no (control) de la cepa DO-S de *Cladosporium* sp. en medio MSM2 con agrolita como soporte inerte. **P:** planta sin Pb sin hongo; **PH:** planta sin Pb con hongo; **P + Pb:** planta con Pb sin hongo; **PH + Pb:** planta con Pb con hongo.

En la planta crecida en presencia de plomo y sin hongo, se encontró una alta tolerancia al metal, pues no se observaron signos de fitotoxicidad como clorosis o disminución de la producción de biomasa (Aly *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012b y Newsham, 2011). Cuando la planta se inoculó con la cepa DO-S, se observó un mayor número de hojas, de mayor tamaño y de color verde más intenso que en las plantas control (Figuras 23 y 24).

En la Figura 23 se muestran los resultados cuantitativos de las características observadas en la Figura 22. Esta serie de resultados demuestra que la inoculación de *D. viscosa* con la cepa DO-S de *Cladosporium* sp. favoreció significativamente el crecimiento vegetal con respecto a las plantas sin inocular, particularmente en presencia de plomo. Se registró un aumento significativo (31%) en la producción de hojas cuando la planta creció en presencia del hongo (Figura 23a). En cuanto a la producción de biomasa, también se encontró un estímulo significativo por efecto del hongo, tanto en la biomasa aérea como en la de raíces (Figura 23b). La presencia del hongo incrementó hasta en 53 y 56% la biomasa de raíces y de tallos, respectivamente, cuando ambos organismos crecieron en presencia de 2000 mg Pb·kg PS⁻¹. Estos resultados se vieron reflejados en un aumento

significativo en el crecimiento relativo de raíces y tallos (58 y 31%, respectivamente), estimado a partir de los datos de biomasa total, cuando la planta creció en presencia del hongo con o sin plomo (Figura 23c).

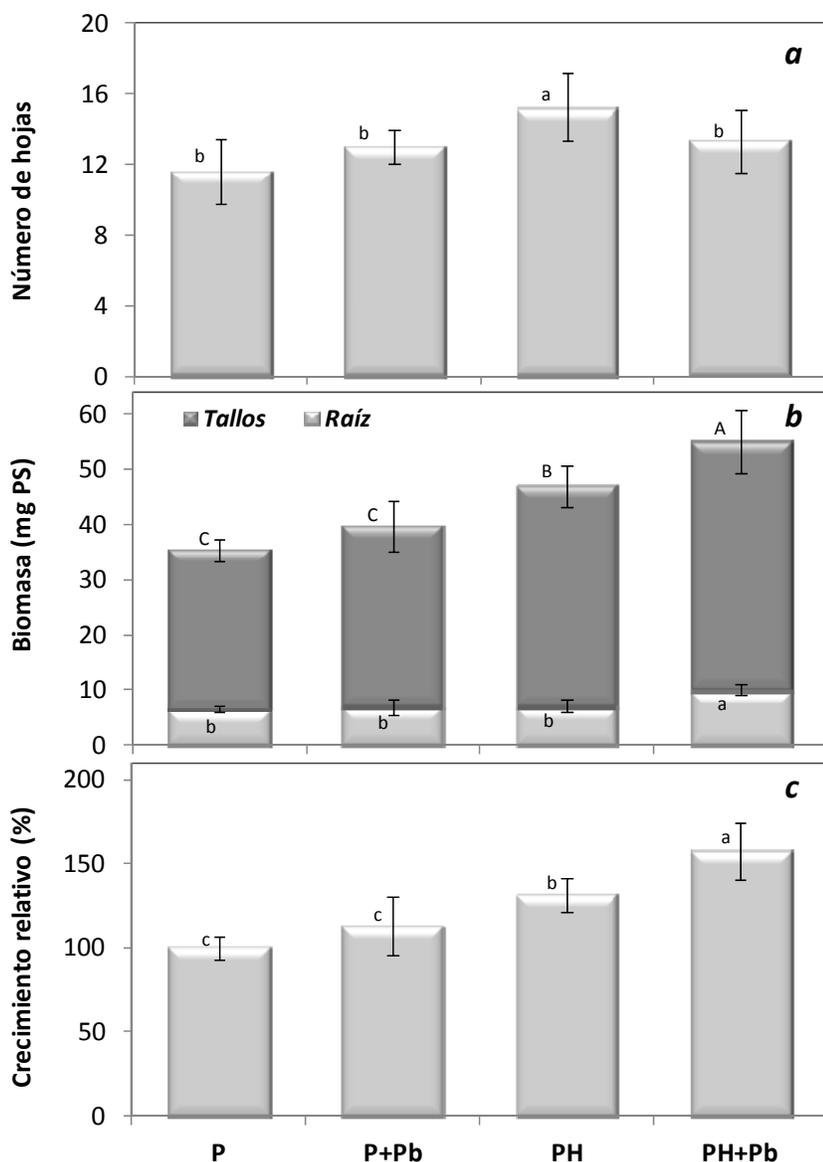


Figura 23. Número de hojas (a), producción de biomasa (peso seco, PS) de tallos y raíces (b) y crecimiento relativo con respecto a la biomasa total (c) de plántulas de *D. viscosa* crecidas por 60 días con diferentes tratamientos. **P:** planta sin Pb sin hongo; **PH:** planta sin Pb con hongo; **P + Pb:** planta con Pb sin hongo; **PH + Pb:** planta con Pb con hongo. Letras diferentes indican diferencias significativas por variable ($p < 0.05$, $n = 10$).

Nuestros resultados indican que la cepa DO-S favorece el crecimiento de *D. viscosa* particularmente cuando la planta se encuentra bajo estrés por plomo. Este tipo de hongos (DSE) puede incidir en la captación de EPT por las plantas y mejorar su tolerancia al estrés causado por estos elementos (Regvar *et al.*, 2010). De hecho, se ha demostrado que los hongos endófitos confieren diversos beneficios a las plantas hospederas bajo condiciones de estrés abiótico, mejorando además la producción de biomasa aérea y de raíces (Rodríguez y Redman, 2008). Similar a nuestros resultados, Li *et al.* (2011), observaron que la inoculación de plantas de maíz con *Exophiala pisciphila*, un DSE, disminuyó los efectos negativos de EPT (Pb, Zn y Cd) y se estimuló el crecimiento vegetal con

respecto a plantas no inoculadas. Regvar *et al.* (2010) encontraron que la colonización de plantas de *Salix caprea* por DSE aumentó en suelos con bajos niveles de materia orgánica y altas concentraciones de Cd y Pb. Adams *et al.* (2007) encontraron que plantas de *Salix fragilis* inoculadas con *Trichoderma harzianum* produjeron más del doble de la biomasa (PS) obtenida en plantas no inoculadas y hasta 39% más cuando se cultivaron en un suelo contaminado con EPT.

El hecho de encontrar una mejora significativa en el crecimiento de *D. viscosa* por efecto de la inoculación con *Cladosporium* sp. en presencia de Pb, podría atribuirse a un fenómeno recientemente observado, conocido como simbiosis adaptada al hábitat. En dicho tipo de simbiosis, los endófitos de un hábitat estresante confieren a las plantas una tolerancia específica a las condiciones particulares de estrés en el lugar, permitiendo su establecimiento en hábitats altamente estresantes (Rodríguez *et al.*, 2008). Al respecto, es importante recordar que las semillas de *D. viscosa*, de las cuales se aisló la cepa DO-S, provienen de arbustos maduros que crecían en los alrededores de un sitio contaminado con residuos mineros. Con base en lo anterior, nuestros resultados sugieren que *Cladosporium* sp. le confiere a *D. viscosa* una tolerancia específica a la presencia de EPT como el Pb.

En el caso particular del estrés por EPT, se ha reportado una amplia variedad de DSE que se asocia con plantas dominantes en áreas contaminadas. La prevalencia de este tipo de hongos en hábitats extremos y su presunto papel en la protección de plantas bajo estrés abiótico aún no son claros (Regvar *et al.*, 2010) y no se sabe si la tolerancia a la fitotoxicidad por EPT se debe principalmente a los hongos o al resultado de la interacción entre hongos DSE y sus plantas huésped (Ban *et al.*, 2012).

6.3.2 Potencial fitorremediador

Durante la fitorremediación de EPT, los endófitos resistentes pueden mejorar el crecimiento de la planta, disminuir la fitotoxicidad del EPT, y modificar su translocación y acumulación en la planta (Li *et al.*, 2012a). Con el objeto de determinar el potencial fitorremediador de *D. viscosa* y de la asociación entre *D. viscosa* y *Cladosporium* sp. (DO-S), se estimaron los factores de translocación (FT), de bioconcentración (FBC) y de fitoestabilización (FEst). El FT indica la capacidad de una planta para transportar (translocar) un metal desde las raíces hasta la parte aérea (Regvar *et al.*, 2010). El FBC se utiliza como una medida de la eficiencia de bioacumulación de un metal por un organismo y, comúnmente, valores > 1 se consideran como un indicador del potencial de una especie para hiperacumular un elemento en particular (Audet y Charest, 2007). El FESt se estimó de forma análoga al FBC, pero considerando solamente la bioacumulación de plomo en las raíces de *D. viscosa*, y se consideró como una medida del potencial fitoestabilizador de la planta.

Se encontró que *D. viscosa* crecida en ausencia del hongo acumuló altas concentraciones de Pb en las raíces, alcanzando una concentración promedio de 13.0 ± 2.2 mg Pb·g PS⁻¹. En las plantas inoculadas con *Cladosporium*

sp., se registró una disminución de 43% en la bioacumulación de Pb en raíces (Tabla 4). En cuanto a la bioacumulación en tallos, se alcanzaron valores alrededor de 0.59 mg Pb·g PS⁻¹, independientemente de la presencia del hongo. Como parte del análisis de distribución de Pb en la planta y el hongo, se cuantificó la acumulación del metal en la biomasa fúngica recuperada de la zona radicular (H+Pb), encontrando una concentración promedio de 8.9 ± 0.4 mg Pb·g PS⁻¹. Este último resultado indica una notable capacidad de bioacumulación de Pb por la cepa DO-S.

Tabla 4. Acumulación de Pb en tallos y raíces de *D. viscosa* crecida sin hongo (P+Pb) y con hongo (PH+Pb). Los datos de H+Pb corresponden a la biomasa de *Cladosporium* sp. recuperada de la agrolita de la zona radicular. Se muestran los factores de translocación (FT), fitoestabilización (FEst) y bioconcentración (FBC)*

Tratamiento	Pb (mg/g PS)		FT	FEst	FBC
	Tallo	Raíz			
P+Pb	0.592 (±0.06)	13.05 (±2.20)	0.046 (±0.005) ^b	6.1 (±1.1) ^b	6.7 (±1.1) ^b
PH+Pb	0.589 (±0.12)	7.44 (±1.58)	0.080 (±0.011) ^a	3.6 (±0.8) ^c	3.9 (±0.8) ^c
H+Pb	8.88 (±0.43)		0.036 (±0.004) ^b	8.0 (±0.7) ^a	8.2 (±0.7) ^a

* FT, FEst y FBC en el tratamiento H+Pb se estimaron con los datos de bioacumulación de la planta, considerando además el Pb acumulado en la biomasa fúngica extracelular. Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos (n = 3, p < 0.01).

En general, en todos los tratamientos, los valores del FT fueron muy bajos (<<< 1), lo cual puede atribuirse a la alta acumulación del metal en las raíces con respecto a los tallos. Asimismo, las altas concentraciones de Pb encontradas en las raíces de *D. viscosa*, se reflejaron en valores del FEst y del FBC muy superiores a 1, indicando que la planta tiene una alta capacidad para bioacumular Pb (Audet y Charest, 2007). Similar a nuestros resultados, Marmioli *et al.* (2005), encontraron ~1000 veces menos Pb en la parte aérea de plantas de *Juglans regia* con respecto al contenido en raíces (9.0 ± 0.1 mg·g PS⁻¹) después de 4 años de exposición a Pb (5000 mg Pb·kg suelo⁻¹·año⁻¹). De hecho, varios estudios indican que una forma común de resistencia a EPT en varias especies de árboles y arbustos ocurre a través de mecanismos de exclusión mediados por: (i) precipitación del metal, o (ii) acumulación del metal en las raíces (Marmioli *et al.*, 2005). En las plantas, la formación de complejos con materiales orgánicos, la sorción en la superficie radicular y la acumulación en los tejidos radiculares son formas comunes de inmovilización de EPT (Baranowska-Morek y Wierzbicka 2004).

Cuando se consideró la acumulación de Pb en la biomasa fúngica producida extracelularmente alrededor de las raíces, tanto el FBC como el FEst aumentaron 24 y 25%, respectivamente, con respecto a los valores estimados para la planta sola. Lo anterior, junto con la reducción en la bioacumulación de Pb por efecto del hongo en la asociación con *D. viscosa*, sugieren que *Cladosporium* sp. podría mejorar el crecimiento vegetal debido a una reducción en la fitotoxicidad del Pb mediante la restricción de la entrada del metal en las células vegetales por la

retención del metal en el micelio. De hecho, uno de los mecanismos de resistencia a EPT en los hongos incluye su biotransformación y la biosorción en componentes de la pared celular como *quitina* y pigmentos como *melanina* (Zafar *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2013).

La melanina en particular, tiene una alta capacidad de biosorción de EPT. En las paredes de las hifas fúngicas, ésta influye fuertemente en su capacidad para actuar como biosorbentes. Por ejemplo, las clamidosporas con melanina de *Aureobasidium pullulans* pueden absorber tres veces más cobre que las células hialinas (Gadd, 2007). Asimismo, varios estudios han demostrado un importante papel de la melanina sobre la tolerancia a la toxicidad por EPT en hongos (Zhan *et al.*, 2011; Ban *et al.*, 2012). Zhan *et al.* (2011) registraron una fuerte actividad antioxidante de la melanina obtenida del DSE *Exophiala pisciphila*, y que la adición de Cd (50-350 mg·L⁻¹) incrementó su producción. Ban *et al.* (2012) encontraron que el contenido de melanina en el DSE *Gaeumannomyces cylindrosporus* aumentó cuando el hongo se expuso a 200 y 300 mg Pb·L⁻¹. Este tipo de eventos puede conducir a la reducción de la bioacumulación de Pb por las raíces de *D. viscosa* cuando ésta se encuentra asociada con el DSE *Cladosporium* sp.

Por otra parte, el contenido de EPT en plantas asociadas con hongos endófitos puede aumentar o disminuir, dependiendo de la especie fúngica y del tipo y concentración del metal (Shen *et al.*, 2013). Por ejemplo, Adams *et al.* (2007) encontraron que *Trichoderma harzianum*, además de estimular el crecimiento de *Salix fragilis* en un suelo contaminado, favoreció la acumulación de Cd, Pb, Mn, Ni y Zn en las raíces. En contraste, Cao *et al.* (2008), demostraron que la asociación entre *T. atroviridae* y *Brassica juncea* disminuyó la fitotoxicidad de Cd y Ni, y favoreció la producción de biomasa (40 - 170%) y la translocación (22%) de los EPT a la parte aérea de la planta. Jiang *et al.* (2008) encontraron que la inoculación de plantas de *B. juncea* con *Trichoderma* sp. o *Aspergillus* sp. mejoró la producción de biomasa (41 - 109%), y que la co-inoculación con ambos hongos favoreció el crecimiento de las plantas (100 - 178%) y la translocación (~67%) de Ni y Cd a los brotes. Shen *et al.* (2013) analizaron el efecto de 16 cepas del hongo endófito *Peyronellaea* sp. sobre el crecimiento y la bio-acumulación de Pb (3000 mg·kg⁻¹) por plantas de *Zea mays*. En ningún caso la presencia del hongo modificó el crecimiento vegetal y solo una cepa aumentó el contenido de Pb en tallos. El resto de las cepas causó una disminución de la bioacumulación de Pb tanto en tallos como en raíces, en comparación con plantas sin inocular.

Con base en esta serie de resultados, especies de plantas como *D. viscosa*, que acumulan altas concentraciones de EPT en las raíces con una mínima translocación a la parte aérea, pueden considerarse una buena opción para la fitoestabilización de Pb, ya que disminuyen su movilidad, toxicidad y dispersión por el crecimiento de las raíces. La fitoestabilización de Pb en la zona radicular de *D. viscosa* podría mejorarse significativamente a través de la aplicación de la asociación específica entre la planta y el DSE *Cladosporium* sp. (DO-S).

6.3.3 Balance de plomo

En el suelo, los EPT se pueden encontrar en diferentes formas: (1) en solución, como iones metálicos libres o como complejos metálicos solubles; (2) adsorbidos en los sitios de intercambio iónico de los constituyentes inorgánicos del suelo; (3) ligados a la materia orgánica; (4) precipitados como óxidos, hidróxidos y carbonatos; (5) incorporado en las estructuras de minerales con sílice. Para que un metal pueda ser bioacumulado por un organismo debe encontrarse biodisponible. Solamente los EPT asociados a las fracciones 1 y 2 se encuentran biodisponibles para su absorción por las plantas. Siendo el Pb un EPT que se encuentran en el suelo normalmente como precipitado, es significativamente menos biodisponible (Lasat, 2000).

Con base en lo anterior, se realizó un balance de Pb en el sistema agrolita-planta-hongo después de 60 días de exposición a 2000 mg Pb·kg⁻¹ (Tabla 5). Se encontró que la fracción soluble inicial de Pb (17%) aumentó significativamente (2 unidades) por efecto de la asociación planta-hongo, mientras que cuando se cultivó la planta sola esta fracción se redujo 7 unidades. La solubilidad de iones como el Pb en un suelo, está influenciada por la producción de exudados radiculares y de metabolitos microbianos, a través de efectos indirectos – actividad microbiana y dinámica de crecimiento de las raíces – y directos – reacciones de acidificación, quelación, precipitación y oxidación-reducción – (Yang *et al.*, 2006). Comúnmente, entre 0.1 y 14% del Pb total contenido en una matriz sólida, puede encontrarse en forma libre accesible para las plantas (Marmioli *et al.*, 2005).

Se encontró que después de 60 días de exposición, el Pb total bioacumulado por la asociación planta-hongo fue de 17% con respecto al contenido inicial en la agrolita (2.05 ± 0.19 mg·g⁻¹), mientras que cuando la planta creció sola, se encontró un valor promedio de Pb bioacumulado de 3.8%. La bioacumulación de Pb en biomasa fúngica fue muy superior (4.4 veces) a la bioacumulación en la biomasa de raíces (Tabla 5), considerando la producción final de biomasa en cada caso. Lo anterior indica que la retención de Pb por las hifas fúngicas extracelulares es un mecanismo importante durante el proceso de fitoestabilización de Pb bajo las condiciones estudiadas.

Tabla 5. Valores de pH y distribución de fracciones de Pb en el sistema agrolita-planta-hongo. Las plántulas de *D. viscosa* fueron expuestas a 2000 mg Pb·kg⁻¹ por 60 días, en presencia (**P+Pb**) o no de *Cladosporium sp* (**PH+Pb**). Los datos indican la fracción de Pb soluble (Pb soluble) e insoluble (Pb insoluble) en la agrolita, y la fracción bioacumulada en biomasa fúngica (Hongo) y en la planta (Planta)*.

Tratamiento	Fracción de Pb (%)				pH
	Pb soluble	Pb insoluble	Planta	Hongo	
Abiótico	17.1 (0.6) ^b	82.9 (0.6) ^b	-----	-----	6.4 (0.1) ^b
P + Pb	9.7 (1.4) ^c	86.6 (1.4) ^a	3.8 (0.57) ^a	-----	3.3 (0.2) ^c
PH + Pb	19.5 (1.4) ^a	62.8 (1.4) ^c	3.3 (0.66) ^a	14.4 (2.93)	7.5 (0.2) ^a

* Letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamientos (n = 6, p < 0.01).

En cuanto al pH, se encontró una disminución de ~3 unidades por efecto de la planta con respecto al control abiótico, independientemente de la presencia de Pb. En contraste, en el tratamiento donde se cultivó la asociación planta-hongo por 60 días, con o sin Pb, se registró un aumento de cerca de una unidad en el pH con respecto al control (Tabla 5). La fuerte disminución del pH en los tratamientos donde creció la planta sola puede atribuirse a la producción de exudados radiculares.

El pH es un factor determinante en la adsorción de Pb en los constituyentes de una matriz sólida. Entre los exudados producidos por las raíces, los ácidos orgánicos (AO) de bajo peso molecular como el cítrico, oxálico, tartárico, málico y succínico, entre otros, son de particular importancia debido a sus propiedades como quelantes para la movilización de EPT. Éstos modifican la sorción, solubilidad y movilidad de los EPT a través de la reducción del pH y la formación de complejos metálicos. El efecto de los AO sobre el transporte de los EPT es complejo y depende del EPT, el ácido y las condiciones ambientales (Yang *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2008). Así, es posible que la reducción en el pH de la agrolita por efecto de la planta haya favorecido la acumulación de Pb en las raíces de *D. viscosa*. De hecho, la producción de AO puede alterar la biodisponibilidad y la eficiencia de la fitorremediación de EPT en un suelo (Yang *et al.*, 2006).

Por otra parte, los hongos en presencia de EPT pueden producir AO con capacidad acomplejante (agentes quelantes), lo cual incide en la especiación y la movilidad de los EPT. Esto conduce a la movilización de EPT en formas biodisponibles, o a su inmovilización a través de: (i) sorción en componentes celulares (pared celular, pigmentos y exopolímeros), (ii) transporte, acumulación y secuestro intracelular, (iii) precipitación extracelular de compuestos metálicos. Estos eventos, además de la inmovilización, también reducen la concentración de EPT libre y pueden dirigir el equilibrio hacia la liberación de más iones de esta naturaleza en solución. Así mismo, la capacidad de sorción de EPT en la biomasa depende del pH, causando una disminución en valores bajos de pH (Gadd, 2007; Alloway, 2013). En suelos ácidos, la desorción de un EPT de sitios de unión en la solución del suelo se estimula debido a la competencia por los sitios de unión H^+ , por lo que el pH del suelo afecta no sólo la biodisponibilidad, sino también el proceso de absorción por un organismo (Alloway, 2013; Lasat, 2000).

Así, con base en lo anterior, el aumento significativo del pH en los tratamientos planta-hongo y su notable capacidad de bioacumulación de Pb en la biomasa fúngica (Tabla 5), pudieron conducir el equilibrio del sistema hacia un aumento en la liberación de iones de Pb^{+2} a la solución, generando el aumento significativo de la fracción soluble de Pb en la agrolita. El equilibrio relativo entre la movilización y la inmovilización de un metal, varía en función de los organismos involucrados y las propiedades fisicoquímicas del entorno (Gadd, 2007).

6.4 Defensa antioxidante

Varios estudios han conducido a la hipótesis de que los endófitos pueden proteger a sus plantas hospederas a través del control de especies reactivas de oxígeno (ERO). Se sabe que la sobreproducción de ERO en las plantas, es un proceso bioquímico común en respuesta a una condición de estrés (Apel y Hirt, 2004). La acumulación de ERO es una condición extremadamente tóxica para las células y, si su concentración no es controlada, causan daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN (Gill y Tuteja, 2010).

Para evitar el daño celular por la acumulación de ERO, los organismos producen una variedad de moléculas antioxidantes (glutatión [GSH], ascorbato [ASC], taninos, flavonoides, α -tocoferol, carotenoides) y de enzimas que interactúan con ERO y regeneran las formas reducidas de las moléculas antioxidantes (superóxido dismutasa [SOD], catalasa [CAT] y una serie de peroxidasas [POX]) (Apel y Hirt, 2004). Varios estudios han demostrado una correlación entre el aumento de la defensa antioxidante y la tolerancia de plantas a diversas condiciones de estrés (Gill y Tuteja, 2010).

El beneficio de los hongos endófitos sobre un grupo diverso de plantas, ha sido comúnmente observado en ambientes limitados en nutrientes y cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés, como sequía, salinidad y contaminación. Existen evidencias que indican que los hongos endófitos producen antioxidantes *in vitro* y también alteran la actividad de antioxidantes en las plantas (Hamilton *et al.*, 2012). Con base en estos antecedentes y en la escasa información al respecto, en este trabajo se cuantificó la actividad de dos enzimas antioxidantes (CAT y POX) en plantas de *D. viscosa* expuestas o no a 2000 mg Pb·kg⁻¹, en presencia y ausencia de *Cladosporium* sp. (DO-S).

6.4.1 Catalasa (CAT)

Como se mencionó, una de las consecuencias de la exposición de una planta a EPT, es la sobreproducción de ERO. Para evitar sus efectos adversos en las células, las plantas poseen moléculas y enzimas antioxidantes que degradan diferentes ERO. Entre éstas, la catalasa (CAT) es una de las enzimas antioxidantes más poderosas en las plantas, ya que cataliza la conversión del H₂O₂ a H₂O y O₂. En general, se ha encontrado que la actividad CAT en las plantas se modifica de diferentes maneras en respuesta al estrés por EPT, dependiendo de la especie vegetal y del tipo y concentración del elemento (Ban *et al.*, 2012).

En el presente estudio, no se detectó actividad CAT en las raíces de plantas de *D. viscosa* independientemente del tratamiento. En la parte aérea se detectaron niveles de actividad CAT alrededor de 15 U·g PF⁻¹ en las plantas crecidas en ausencia de plomo, mientras que en las plantas expuestas a 2000 mg Pb·kg⁻¹, la actividad enzimática registró un aumento de casi el doble (Figura 24). En este caso, se encontraron efectos significativos

en la actividad CAT por la presencia de plomo, pero no por la presencia de *Cladosporium* sp. De manera similar, Zhang *et al.* (2007) encontraron un marcado aumento en la actividad CAT especialmente en la parte verde de plantas de *Kandelia candel* debido a la exposición a EPT (Pb, Cd y Hg). De forma similar, en frondes de plantas del helecho hiperacumulador de As, *Pteris vittata*, se encontró un incremento (1.5 veces) en la actividad CAT por efecto de la exposición al metaloide (Kertulis-Tartar *et al.*, 2009).

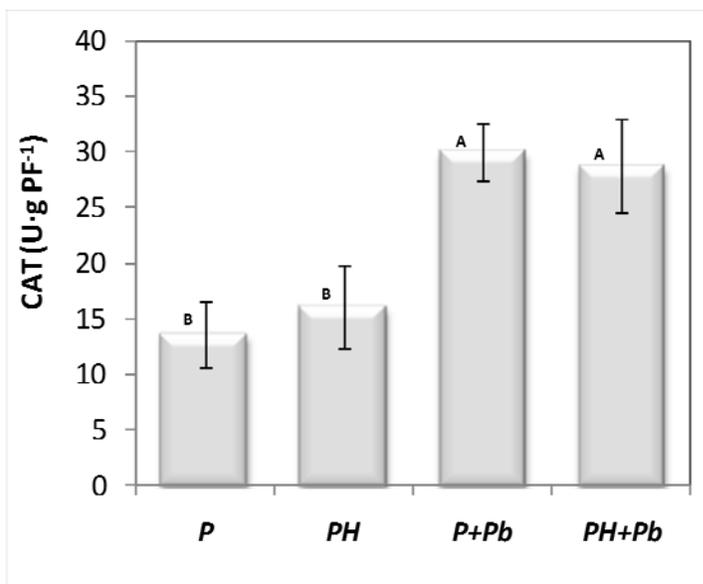


Figura 24. Actividad catalasa (CAT) en extractos celulares de tallos de plántulas de *D. viscosa* crecidas durante 60 días con diferentes tratamientos. **P**, planta sin Pb sin hongo; **PH**, planta sin Pb con hongo; **P+Pb**, planta con Pb sin hongo; **PH+Pb**, planta con Pb con hongo ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).

La mayor actividad CAT encontrada en la parte aérea de plantas de *D. viscosa* expuestas a plomo con respecto a las plantas control, puede atribuirse a su participación en la mediación del estrés generado por el plomo a través del control de la producción de H₂O₂ (Kertulis-Tartar *et al.*, 2009). El hecho de no detectar actividad CAT en las raíces puede deberse a que en la parte aérea es en donde ocurre la fotosíntesis, una de las principales rutas de generación de ERO en las plantas (Konigsberg, 2008; Apel y Hirt 2004).

6.4.2 Guayacol Peroxidasa (G-POX)

Tanto la CAT como las peroxidasas (POX) son enzimas respiratorias comúnmente usadas como indicadores de la actividad metabólica relacionada con el crecimiento y senescencia en plantas. Las POX pertenecen a una gran familia de enzimas ubicuas en hongos, plantas y animales. Estas enzimas oxidan diversos sustratos en presencia de H₂O₂ y están involucradas en un amplio rango de procesos fisiológicos en las plantas, como la lignificación, suberización, metabolismo de pared celular, catabolismo de auxinas, tolerancia al estrés biótico y abiótico y la senescencia (Tamás *et al.*, 2007). Asimismo, se ha demostrado que ciertos EPT como Zn, Pb y Cd estimulan la actividad de varias POX (Subhadra *et al.*, 1991).

Independientemente del tratamiento, la actividad guayacol peroxidasa (G-POX) en las plantas de *D. viscosa*, se encontró una mayor actividad (2.3 – 7.6 veces) en las raíces que en los tallos (Figura 25). En el caso de las raíces de plantas asociadas con *Cladosporium* sp., se registró una disminución (1.7 – 2.4 veces) en la actividad G-POX con respecto a las plantas crecidas en ausencia del hongo, mientras que en la parte aérea se encontró un incremento significativo en la actividad (21 – 37%) por efecto del hongo.

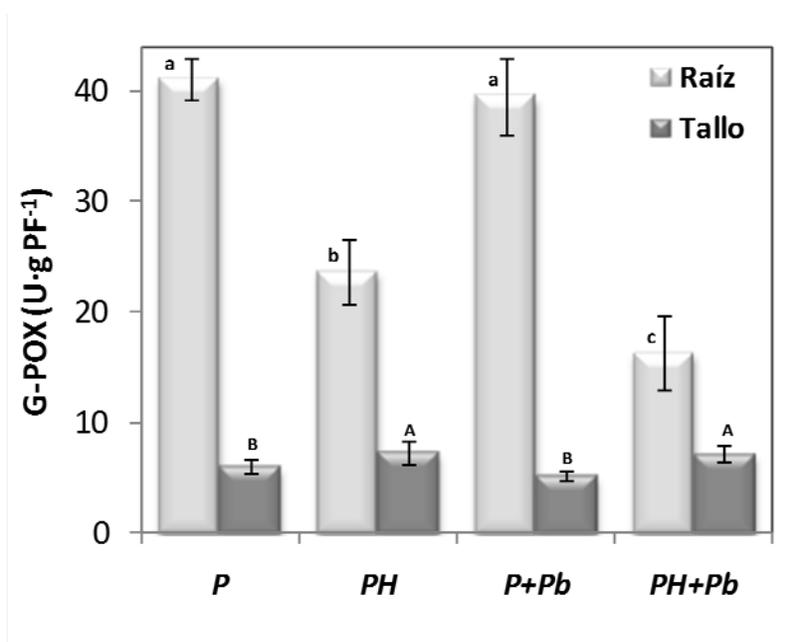


Figura 25. Actividad guayacol peroxidasa (G-POX) en extractos celulares de tallos y raíces de plántulas de *D. viscosa* crecidas durante 60 días con diferentes tratamientos. **P**, planta sin Pb sin hongo; **PH**, planta sin Pb con hongo; **P+Pb**, planta con Pb sin hongo; **PH+Pb**, planta con Pb con hongo ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).

La mayor actividad G-POX en las raíces con respecto a los brotes es un resultado común en varias especies vegetales. De hecho, una alta proporción de actividad peroxidasa se expresa en los tejidos de raíces en comparación con otros órganos como tallos, brotes y flores en especies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* y *Brassica oleracea*, entre otras (Mika y Lüthje, 2003; Tamás *et al.*, 2007). Lo anterior indica que la actividad de las peroxidases es importante especialmente durante el desarrollo y mantenimiento de la función de las raíces (Tamás *et al.*, 2007).

Aunque, en general, la acumulación de EPT en tejidos vegetales modifica la actividad de enzimas antioxidantes, la respuesta puede ser positiva o negativa y depende de la especie vegetal, tipo de EPT, y de la edad y condiciones de cultivo. Similar a nuestros resultados, Zhang *et al.* (2007), observaron un aumento en la actividad POX particularmente en raíces de plantas de *Bruguiera gymnorrhiza* y *K. candel* crecidas bajo condiciones de estrés por Pb y Cd. Ederli *et al.* (2004) encontraron un marcado estímulo en la actividad POX en plantas tolerantes de *Phragmites australis* crecidas en presencia de altas concentraciones de Cd. Dicho grupo atribuye tal respuesta

al papel de estas enzimas en la lignificación de las raíces, lo cual contribuye a la alta tolerancia a Cd en esta planta. Pandolfini *et al.* (1992) registraron un incremento en la actividad G-POX tanto intra- como extra-celular en tallos y raíces de *Triticum aestivum* por efecto de la exposición a Ni. Subhadra *et al.* (1991), encontraron la máxima actividad CAT y POX en frondes de plantas de *Lemna minor* expuestas a 0.008 mg HgCl₂·L⁻¹, mientras que en raíces de *Allium cepa*, la exposición a 0.05 mg HgCl₂·L⁻¹ indujo la máxima actividad POX.

Como se observa, en comparación con las raíces de plantas crecidas en ausencia de *Cladosporium* sp., la actividad G-POX disminuyó significativamente por efecto de la presencia del hongo y, particularmente, en el tratamiento con Pb. Es importante recalcar que la actividad G-POX se cuantificó en extractos intracelulares, de manera que la disminución en esta actividad en presencia del hongo podría deberse a la producción, incluso extracelular, de otras enzimas y/o moléculas antioxidantes por el hongo. Aunque aún los estudios son escasos, hay evidencia que indica que los hongos endófitos producen antioxidantes *in vitro* y también modifican el nivel y actividad de antioxidantes *in planta*. De hecho, el beneficio de este tipo de hongos sobre diversas plantas comúnmente se observa en ambientes pobres en nutrientes y bajo condiciones de estrés (Hamilton *et al.*, 2012). Por ejemplo, Huang *et al.* (2007) estudió 292 endófitos fúngicos aislados de 29 especies de plantas, encontrando una alta y generalizada capacidad antioxidante que se correlacionó con el contenido de fenoles; algunos de los aislados también produjeron otros metabolitos con una fuerte actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos para las actividades CAT y G-POX sugieren una acción coordinada tanto en tallos como en raíces de *D. viscosa*. La baja actividad G-POX registrada en los tallos fue compensada con una mayor actividad CAT, asimismo la actividad CAT indetectable en raíces fue compensada por una alta actividad G-POX.

6.4.3 Glutación-S-transferasa (GST)

Las glutación S-transferasas (GSTs) son un grupo diverso de proteínas multifuncionales ampliamente distribuidas en los organismos. Originalmente se definieron como enzimas que catalizan la conjugación del GSH a un sustrato electrófilo, pero ahora es claro que catalizan una variedad de reacciones. Se ha demostrado que además de su función como GSH-transferasas, también actúan como peroxidases, oxidorreductasas e isomerasas dependientes del GSH, además de su función como proteínas de transporte no enzimáticas (Sappl *et al.*, 2009). Cuando se evaluó el efecto de la asociación con *Cladosporium* sp. y de la exposición a Pb sobre la actividad GST en *D. viscosa*, no se encontraron efectos significativos en las raíces (Figura 26). En cuanto a los tallos, la actividad GST disminuyó significativamente (>50% con respecto al control) en las plantas crecidas con el hongo en ausencia de Pb.

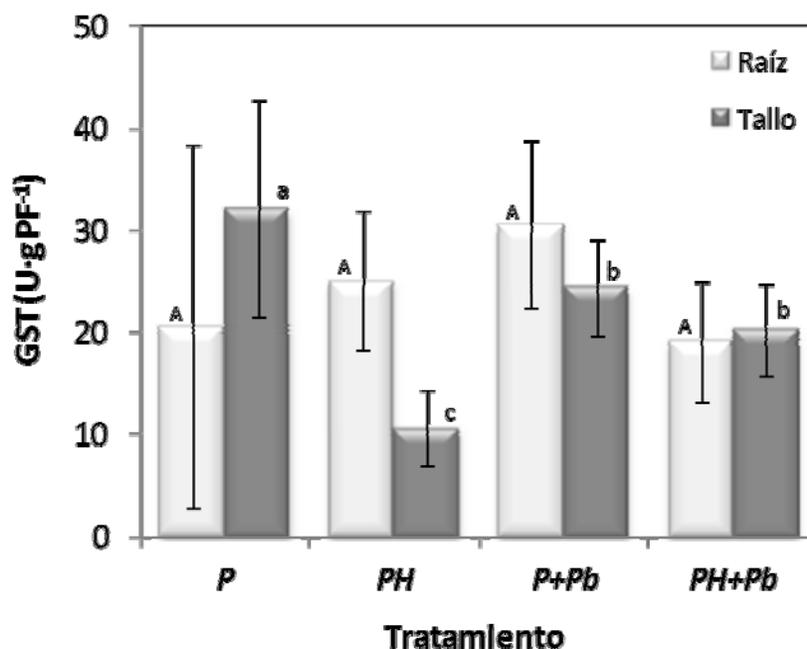


Figura 26. Actividad glutatión-S-transferasa (GST) en extractos frescos de tallos y raíces de plántulas de *D. viscosa* crecidas durante 60 días con diferentes tratamientos. **P**, planta sin Pb sin hongo; **PH**, planta sin Pb con hongo; **P+Pb**, planta con Pb sin hongo; **PH+Pb**, planta con Pb con hongo ($\alpha = 0.05$, $n = 3$).

Una respuesta común de la toxicidad por EPT en las plantas, es la inducción de enzimas como las GST, que se relacionan con una serie de respuestas al estrés, incluyendo el estrés oxidativo (Marrs, 1996). Otro papel clave de estas enzimas es su capacidad para inactivar elementos o compuestos tóxicos a través de la formación de conjugados con el GSH (Reddy *et al.*, 2005). Por ejemplo, Reddy *et al.* (2005) encontraron un incremento (3–4 veces) en la actividad GST en hojas y raíces de dos plantas tolerantes a Pb (*Macrotyloma uniflorum* y *Cicer arietinum*) a los 12 días de estrés por Pb ($800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Este grupo atribuyó esta respuesta a la formación de conjugados entre iones de Pb y GSH catalizada por la GST, o a su participación directa como una proteína capaz de atrapar iones metálicos.

Nuevamente en este caso, se observó la disminución significativa de la actividad GST de las plantas asociadas con el hongo con respecto a las plantas control, lo que podría atribuirse a la excreción de enzimas fúngicas que disminuyen las condiciones intracelulares de estrés en la planta (Hamilton *et al.*, 2012).

7. CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

- La concentración de nutrientes en el medio determina el efecto de los hongos endófitos sobre el crecimiento de *D. viscosa*. Mientras que en el medio con baja concentración de nutrientes (MSM1) ninguna cepa causó efectos significativos en el crecimiento de *D. viscosa*, en el medio con alta concentración (MSM2), las cepas DO-S, DO-PB y DO-PC estimularon significativamente (37-76%) el crecimiento vegetal.
- La endofiticidad de la cepa seleccionada de *Cladosporium* sp. (DO-S) puede inducirse en *D. viscosa* bajo condiciones *in vitro* después de 20 días.
- La cepa DO-S estimuló significativamente (>70%) el crecimiento de *D. viscosa* en presencia de Pb y provocó una disminución (~50%) de su bioacumulación en raíces con respecto a la planta sola (~14,000 mg kg⁻¹ PS). Esto indica que DO-S mejora la tolerancia de la planta a Pb a través de mecanismos de exclusión.
- La actividad CAT participa en la tolerancia de *D. viscosa* durante la bioacumulación de Pb en tallos, independientemente de la presencia de *Cladosporium* sp.
- La cepa DO-S tuvo un efecto significativo en la defensa antioxidante relacionada con la actividad G-POX en *D. viscosa*, causando un estímulo en tallos y una disminución en raíces independientemente de la exposición a Pb.
- La actividad GST en *D. viscosa* no mostró una respuesta clara por efecto de la asociación con *Cladosporium* sp. ni por la exposición a Pb.

8. BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- Adams P., De Leij F.A.A.M. y Lynch J. M. 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 129522 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal contaminated soil. *Microbial Ecology*, 54: 306–313.
- Aebi H.E. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (1984): 121–126.
- Ahluwalia S.S. y Goyal D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98: 2243–2257.
- Alloway B.J. 2013. Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils, 3rd ed. In: Alloway B.J. y Trevors J.T. (Eds.). *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*, 22: 11-50. Springer, London.
- Aly A.H., Debbab A. y Proksch P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1829–1845.
- Apel K. y Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399.
- Arora A., Sairam R.K. y Srivastava G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82: 1227–1238.
- Arriagada C.A., Herrera M.A. y Ocampo J.A. 2007. Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 84: 93–99.
- Audet, P. y C. Charest. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147: 231–237.
- Baker A.J.M. 1987. Metal tolerance. *The New Phytologist*, 106: 93–111.
- Ban Y., Tang M., Chen H., et al., 2012. The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture. *PLoS ONE*, 7(10, e47968): 1–11.
- Baranowska-Morek A. y Wierzbička M. 2004. Localization of lead in root tip of *Dianthus carthusianorum*. *Acta biologica cracoviensia series botanica*, 46: 45–56.
- Blokhina O., Virolainen E. y Fagerstedt K. 2003. Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179–194.
- Cao L., Jiang M., Zeng Z., et al., 2008. *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere*. 71(9): 1769–1773.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Salta*, 44–69.
- Deng Z., Cao L., Huang H., et al., 2011. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapeseed (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 185: 717–724.
- Ederli L., Reale L., Ferrari F. y Pasqualini, S. 2004. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiologia Plantarum*, 121: 66–74.
- Fogarty R.V. y Tobin J.M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microbial Technology*, 19: 311–317.
- Fuentes-Dávila G. y Ferrera-Cerrato R. 2007. *Ecología de la Raíz, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.*, 110-111.
- Gadd G.M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111: 3–49.
- Gamboa-Gaitán M.A., M.Sc. 2006, Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento Actual y Perspectivas, *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia*. Bogotá, Colombia, AA 14490: 1–5.
- Gill S.S. y Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930
- Habig, W. H. y Jacoby, W. B. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods in Enzymology*, 77: 218–223.

- Hall J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 1–11.
- Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry*, 97: 1634–1658.
- Hamilton C.E., Gundel P.E., Helander M. y Saikkonen K. 2012. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity*, 54: 1–10
- Huang W-Y., Cai Y-Z., Xing J., et al., 2007. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*, 61: 14–30.
- Jiang M., Cao L. y Zhang R. 2008. Effects of Acacia (*Acacia auriculiformis* A. Cunn) associated fungi on mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) growth in Cd and Ni contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 561–565.
- Kertulis-Tartar G.M., Rathinasabapathi B. y Ma L.Q. 2009. Characterization of glutathione reductase and catalase in the fronds of two *Pteris* ferns upon arsenic exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 960–965.
- Kidd P., Barceló J., Bernal M.P., Navari-Izzo F., et al., 2009. Trace element behaviour at the root–soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 67: 243–259.
- Kogel K-H., Franken P. y Hüchelhoven R. 2006. Endophyte or parasite – what decides?. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 358–363.
- Konigsberg F. M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas*. Ed. Manual Moderno. México.
- Lasat M. M. 2000. The use of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil. *U.S. Environmental Protection Agency (EPA)*, 1-33.
- Ledin M. 2000. Accumulation of metals by microorganisms: Processes and importance for soil systems. *Earth Science*. 51: 1–31.
- Llorente C., Bárcena A., Vera B. J., C. N. Saparrat M. A., et al., 2012. *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 Produces the 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin-Like Compound and Carries a Putative *pks* Gene. *Mycopathologia*, 174: 397–408.
- Li H.Y., Li D.W., He C.M., Zhou Z.P., et al., 2012a. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*, 5: 309–315.
- Li T., Liu M.J., Zhang H.B., Sha T. y Zhao Z.W. 2011. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, 409: 1069-1074.
- Li X., Bu N., Li Y., Ma L., et al., 2012b. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 213-214:55-61.
- Lynch, J.M. y Moffat, A.J. 2005. Bioremediation prospects for the future application of innovative applied biological research. *Annals of Applied Biology* 146: 217-221.
- Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K. y Kim S. K. 2013, Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 1737–1750.
- Marmiroli M., Antonioli G., Maestri E. y Marmiroli N. 2005. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environmental Pollution*, 134: 217–227.
- Marrs K. A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 127-158.
- Mika A. y Lüthje S. 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, 132: 1489–1498.
- Morel, M., Ngadin A. A., Droux M., Jacquot J. P. y Gelhaye E. 2009. The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(23): 3711-3725.
- Newsham K.K. 2011. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *Research of New Phytologist*, 190: 783–793.

- Pal R. y Rai J.P.N. 2010. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 945–963.
- Pandolfini T., Gabbriellini R. y Comparini C. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell and Environment*, 15: 719–725.
- Pang K-L., Vrijmoed L.L.P., Goh T. K., Plaingam N. y Gareth J.E.B. 2008. Fungal endophytes associated with *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) in Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. *Botanica Marina*, 51(3): 171–178.
- Pethkar A. V., Gaikawai R. P. y Paknikar K. M. 2001. Biosorptive removal of contaminating heavy metals from plant extracts of medicinal value. *Current Science*, 80(9-10): 1216-1219.
- Phillips, J.M. y Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158–161.
- Porrás-Alfaro A. y Bayman P. 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 291–315.
- Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M.N.V., Freitas H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30: 1562-1574.
- Reddy A.M., Kumar S.G., Jyonthsnakumari G., Thimmanai S. y Sudhakar C. 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60: 97-104.
- Regvar M., Likar M., Piltaver A., Kugonic N. y Smith J.E. 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant and Soil*, 330: 345-356.
- Rodríguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., et al., 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society of Microbial Ecology*, 2: 404–416.
- Rodríguez R. y Redman R. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1109-1114.
- Rojas-Loria C.C., Peralta-Pérez M.R., Buendía-González L. y Volke-Sepúlveda T. 2012. Effect of a saprophytic fungus on the growth and the lead uptake, translocation and immobilization in *Dodonaea viscosa*. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 518-529.
- Rouhier N., Lemaire S.D. y Jacquot J.P. 2008. The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 143–66.
- Santos de Araujo B., Omena de Oliveira J., Salgueiro M. S. y Pletsch M. 2004. Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Plant Science*, 167: 1151–1157.
- Sappl P.G., Carroll A.J., Clifton R., Lister R., et al., 2009. The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal*, 58: 53–68.
- Schutzendubel A. y Polle A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by micorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53(372): 1351-1365.
- Schwab A.P., Zhu D.S. y Banks M.K. 2008. Influence of organic acids on the transport of heavy metals in soil. *Chemosphere*, 72: 986-994.
- Selosse M-A. y Rousset F. 2011. The Plant-Fungal Marketplace. *Science* 333: 828-229.
- Seregin I.V. e Ivanov V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4):523–544.
- Shen M., Liu L., Li D.W., Zhou W.N., et al., 2013. The effect of endophytic *Peyronellaea* from heavy metal-contaminated and uncontaminated sites on maize growth, heavy metal absorption and accumulation. *Fungal Ecology*, 6(6): 1-7.
- Silvani V. A., Fracchia S., Fernández L., Pégola M. y Godeas A. 2008. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5): 1259-1263.

- Subhadra A.V., Nanda A.K., Behera P.K. y Panda B.B. 1991. Acceleration of catalase and peroxidase activities in *Lemna minor* L. and *Allium cepa* L. in response to low levels of aquatic mercury. *Environmental Pollution*, 69: 169-179.
- Tamás L., Durceková K., Halusková L., Huttová H., et al., 2007. Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with root growth inhibition. *Chemosphere*, 66: 1292–1300.
- Townsend D. M. y Tew K. D. 2003. "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance." *Oncogene*, 22(47): 7369-7375.
- Usuki F., Narisawa K., Yonezawa M., Kakishima M. y Hashiba T. 2002. An efficient inoculation method for colonization of Chinese cabbage seedlings by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. *Journal of General Plant Pathology*, 68: 326–332.
- Velázquez-Osornio D.T. 2011. Aislamiento de hongos endófitos de plantas tolerantes a plomo para su potencial uso en fitorremediación. Tesis de Especialidad, Posgrado en Biotecnología. *Universidad Autónoma Metropolitana*. 49 pp.
- Volke-Sepúlveda T.L., Velasco J.A. y de la Rosa D.A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Instituto Nacional de Ecología–Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT)*. ISBN: 968-817-492-0: 11-12.
- Wagner, B.L. y Lewis, L.C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3468–3473
- Wang F. Y., Lin X. G. y Yin R. 2007. Role of microbial inoculation and chitosan in phytoextraction of Cu, Zn, Pb and Cd by *Elsholtzia splendens* – a field case. *Environmental Pollution*, 147: 248–255.
- Yang J.Y., Yang X.E., He Z.L., Li T.Q., et al., 2006. Effects of pH, organic acids, and inorganic ions on lead desorption from soils. *Environmental Pollution*, 143: 9–15.
- Yong H.K. y Young J.Y. 1996. Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme and Microbial Technology. Elsevier Science*, 18: 531–535.
- Youssef M.M. y Azooz M.M. 2013. Biochemical studies on the effects of zinc and lead on oxidative stress, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in okra (*Hibiscus esculentus* cv. *Hassawi*). *Science International*, 1(3): 29–38.
- Zafar S., Aqil F. y Ahmad I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98: 2557–2561.
- Zhan F., He Y., Zu Y., Li T. y Zhao Z. 2011. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 2483–2489.
- Zhang F.Q., Wang Y.S., Lou Z.P. y Dong J.D. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere*, 67: 44–50
- Zhang X., Li C. y Nan Z. 2009. Effects of cadmium stress on growth and antioxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3): 703–709
- Zhuang X., Chen J., Shim H. y Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*, 33(3): 406–413.

9. ANEXOS

9 ANEXO 1

A continuación se presentan las secuencias de aminoácidos de los tres hongos DSE. La designación de géneros se basó en el análisis de secuencias de la región ITS-5 del ADNr fúngico y la información se comparó con la base de datos "Attach".

- **DO-S_ITS-5 (*Cladosporium sp*)**

```
AAAATGTAGTTCCAACCCACCCCAACTTATTTGGTGGGTTAGACCTACCTTGCCTTCCCACCCCCCTCAATTTGGATT
TTGGTACTCTTGCTTTACTTTCCACCCTACCAAACCTAGTTAATTTGTTAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA
TCGATGAAGAACGCATGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGACTCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGNAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGG
TCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTAAAGGGTGCTCGGG
AGGCTACGCCGTAAAACAACCCATTTCTAAGGTTGACCTCAGATCAGGTAAGGATACCCGCTGACTTAAGCATATCATAA
GCGGACACCGGAAGTATATTGATATAGCA
```

- DO-S tiene un 95% de identidad con género *Cladosporium*.

- **DO-PC_ITS-5 (*Cladosporium sp*)**

```
TGATTGGCAAAGTTTAGATCTCTGTAATGCCCTCCTAACCATTTGCTTGTTTCTGACTCTGTTTTCTCCGGGGTTACCCTGCC
TTCCACCCGGGGCTCCGGTTGGACTAATTCCTACTCTTGCCCTAATTTGCCCTGAGTAAATTAATAATAAATAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCATCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCA
AGCCTCGCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCCTCANATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTG
GAACTATTCGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCATTTCTAATTGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GGATACCCGCTGAACTTAATCATATCATAAGCGG
```

- DO-PC tiene un 95 % de identidad con *Cladosporium*.

- **DO-PB-ITS-5 (*Cladosporium sp*)**

```
AAAATTAGTTCCACCCCCAGAACTTAAATGCAGGGCTTAACTTTTCTTAAAATCCACCCACCCCCCATTTGGTTTGT
GAACTCTTGTTTTCTTTCCACCCCCACCAAACCTGGTTTGGATGTTGAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGGAACGCATGCGAAATGCGATATTTAATGTGAACTTGCAATCTCGCTGAATCATCAAATCTTTGACGCACCTGCG
CCCCATGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCACTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGCATTGGGCAACGCGGTCCG
CCACGTGCCTCTGATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTGCTTAAGGGTGCTCGGGAGGC
TACCCGTAAAACAACCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCACGTAGGGATACCCGCTGAACTTAACATATCATAAGCGGAC
AAGGCCGCTTAATGCTGTACAATGCTTTAACTTACTTACAAAACGGCAGTTAATGAATACCATGGTTTATTTTACT
```

- DO-PB tiene un 93 % de identidad con *Cladosporium*.