

Ciudad de México a 08 de mayo de 2017.

El jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**DEFENSA ANTIOXIDANTE DURANTE LA REMOCIÓN DE UNA MEZCLA DE
HIDROCARBUROS POR LA ASOCIACIÓN INDUCIDA ENTRE
Festuca arundinacea Y *Lewia* sp.**

Que presentó la estudiante

M en B. CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

Comité tutorial

Directora: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Asesor interno: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor externo: Dr. Humberto González Márquez

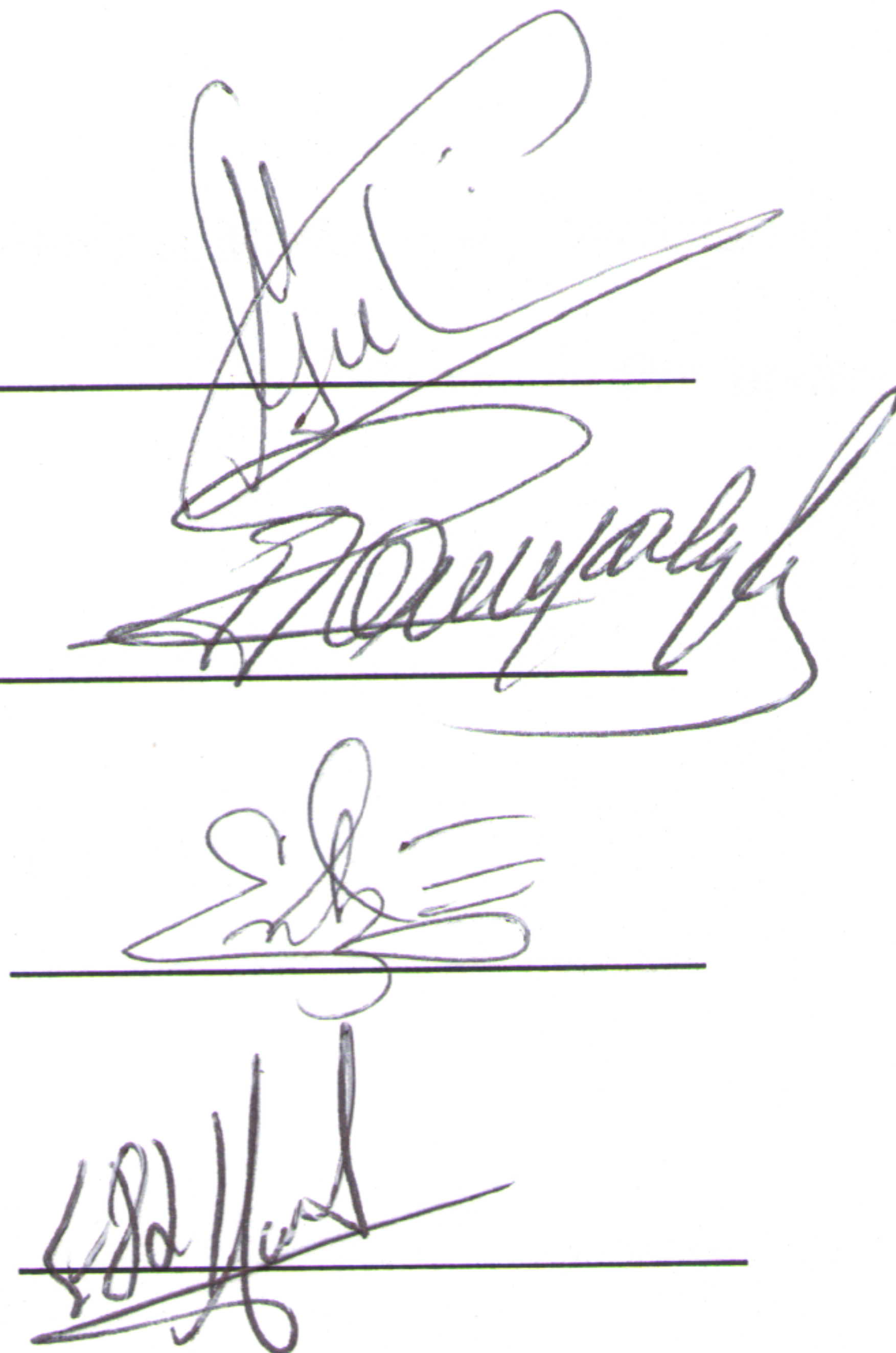
Jurado

Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Secretario: Humberto González Márquez

Vocal: Erika Escalante Buendía

Vocal: Fernando Díaz de León Sánchez



The image shows four handwritten signatures, each written over a horizontal line. From top to bottom, they correspond to: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas (President), Humberto González Márquez (Secretary), Erika Escalante Buendía (Vocal), and Fernando Díaz de León Sánchez (Vocal). The signatures are in dark ink and are highly stylized.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Biotecnología

**DEFENSA ANTIOXIDANTE DURANTE LA REMOCIÓN DE UNA MEZCLA DE
HIDROCARBUROS POR LA ASOCIACIÓN INDUCIDA ENTRE
Festuca arundinacea Y *Lewia* sp.**

T E S I S

Para obtener el grado de

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

Comité tutorial:

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Directora

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor

Dr. Humberto González Márquez

Asesor

Ciudad de México, 8 de mayo 2017

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados (PNPC) del CONACYT en el nivel de Competencia Internacional, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el No. de referencia 001466.

Ciudad de México a 08 de mayo de 2017.

El jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**DEFENSA ANTIOXIDANTE DURANTE LA REMOCIÓN DE UNA MEZCLA DE
HIDROCARBUROS POR LA ASOCIACIÓN INDUCIDA ENTRE
Festuca arundinacea Y *Lewia* sp.**

Que presentó la estudiante

M en B. CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

Comité tutorial

Directora: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Asesor interno: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor externo: Dr. Humberto González Márquez

Jurado

Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas _____

Secretario: Humberto González Márquez _____

Vocal: Erika Escalante Buendía _____

Vocal: Fernando Díaz de León Sánchez _____

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso:

Quien nos muestras su amor en la naturaleza y me ciñe de conocimiento

A mi madre:

Olga Lidia

Por su amor incondicional

A mis hermanas:

Danae y Calipso

Por su inmenso amor y vivencias

A mis sobrinos:

Osmara, Yael y Alcides

Por sus enseñanzas

A mis abuelitos:

Celsa y Everardo

Por su ternura y cariño

A mis tíos y primos:

Elvira, Mario, Fabiola, Alberto, Mario, Isaí y Miroslaba

Por animarme a continuar

Al resto de mi familia:

Por estar ahí

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tania L. Volke, por dirigir este proyecto.

Especialmente a los doctores Mariano Gutiérrez Rojas y Humberto González Márquez por su gran apoyo y consejos para mi crecimiento personal y profesional.

A todos los compañeros de los laboratorios W-103 y W-108.

A las amigas y amigos que siempre me escucharon: Lizbeth Morales, Leisy Mariela, Esperanza Jazmín, Tania Anayansi, Fabiola y Luis Daniel.

Especialmente al doctor César C. Rojas Loria, por ser un hombre extraordinario y estar siempre.

A Carlos Francisco Millán Medina, por ser mi amigo incondicional.

A Beatriz Salazar la secretaria del laboratorio, por sus consejos y apoyo administrativo.

RESUMEN

La fitorremediación asistida por microorganismos endófitos es una tecnología que permite la recuperación de sitios contaminados con compuestos orgánicos. La eficiencia de esta tecnología puede mejorarse a través del establecimiento de asociaciones endófitas entre plantas y microorganismos tolerantes que degraden o estabilicen contaminantes particulares. Para lo anterior, es posible inducir la asociación en condiciones *in vitro*, permitiendo su establecimiento antes de su uso en sitios contaminados. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Lewia* sp., un ascomiceto, en la asociación endófito inducida con *Festuca arundinacea* sobre el control del estrés oxidante durante la remoción de una mezcla de hidrocarburos (MHC) en un suelo modelo. Para lo anterior, primero se establecieron las condiciones para inducir la asociación endófito y determinar la tolerancia de los organismos a concentraciones crecientes de la MHC, compuesta por hexadecano, fenantreno y pireno, en un suelo modelo. Posteriormente, plantas solas y asociadas se expusieron a una concentración fija de la MHC (800 mg kg⁻¹) durante 45 días, para cuantificar el daño oxidante, la defensa antioxidante y la remoción de la MHC. El medio de cultivo que permitió el mejor desarrollo de plantas, fue el medio con sales completas de Murashige y Skoog adicionado con 10 g L⁻¹ de sacarosa. En este mismo medio, fue posible inducir la asociación endófito planta-hongo en 15 días, obteniendo plantas visiblemente sanas. Al término del periodo de inducción de la asociación en condiciones *in vitro* (15 días), el hongo incrementó significativamente el crecimiento vegetal, la concentración de H₂O₂ y de malondialdehído, y causó la disminución de la actividad glutatión S-transferasa (GST). Estas respuestas permitieron que *Lewia* sp. mejorara la tolerancia de las plantas a la MHC en un suelo modelo. La asociación de *F. arundinacea* con *Lewia* sp. incrementó el crecimiento y la remoción de hexadecano y pireno en el suelo modelo contaminado a través de una disminución en el estrés oxidante en las plantas expuestas a la MHC.

Palabras clave: asociación endófito · *Festuca arundinacea* · hidrocarburos · *Lewia* sp. · estrés oxidante · defensa antioxidante.

Abstract

Endophyte-assisted phytoremediation is a technology that allows the recovery of sites contaminated with organic compounds. The efficiency of this technology can be improved through the establishment of endophytic associations between tolerant plants and microorganisms that degrade or stabilize particular contaminants. For this, it is possible to induce the association under *in vitro* conditions, allowing its establishment before its use in contaminated sites. The aim of this work was to evaluate the effect of *Lewia* sp., an ascomycete, on the endophytic association induced with *Festuca arundinacea* on the control of oxidative stress during the removal of a hydrocarbon mixture (HCM) in a model soil. Thus, we first established the conditions to induce the endophytic association and to determine the tolerance of organisms to different concentrations of HCM, which was composed of hexadecane, phenanthrene and pyrene, in a model soil. Subsequently, endophyte-free and endophyte-associated plants were exposed to 800 mg kg⁻¹ of HCM for 45 days, allowing to quantify oxidant damage, antioxidant defense and HCM removal. The culture medium that allowed obtaining healthy plants was the Murashige and Skoog medium with complete salts and 10 g L⁻¹ of sucrose added. With this same medium, it was possible to induce the plant-fungus endophytic association in 15 days, obtaining visibly healthy plants. After the induction period under *in vitro* conditions (15 days), the fungus significantly increased plant growth, as well as H₂O₂ and malondialdehyde concentration and, caused a decrease in glutathione S-transferase (GST) activity. These responses led to an improvement in plant tolerance to the HCM in a model soil by fungus effect. The association of *F. arundinacea* with *Lewia* sp. increased the growth and the removal of hexadecane and pyrene in the model soil through of a decrease in the oxidative stress in plants exposed to HCM.

Key words: endophytic association · *Festuca arundinacea* · hydrocarbons · *Lewia* sp. · oxidative stress · antioxidant defense.

LISTA DE ABREVIATURAS

APX: Ascorbato peroxidasa	MDHA: Mono-dehidroascorbato
ASC: Ascorbato	MDHAR: Mono-dehidroascorbato reductasa
CAT: Catalasa	NADPH-oxidasas:
CI₅₀: Concentración inhibitoria media	¹O₂: Oxígeno singulete
DHA: Dehidroascorbato	•O₂⁻: Radical superóxido
DHAR: Dehidroascorbato reductasa	•OH: Radical hidroxilo
EPA: Environmental Protection Agency	PEMEX: Petróleos Mexicanos
ERO: Especies reactivas de oxígeno	PF: Peso fresco
FE: Factor de estabilización	PHE: Fenantreno
FT: Factor de translocación	PS: Peso seco
Grupos CO: Grupos carbonilo	POD: Peroxidasas no específicas
GR: Glutación reductasa	PPO: Polifenol oxidasas
GSSG: Glutación disulfuro	PROFEPA: Procuraduría Federal de Protección Ambiental
GSH: Glutación	PYR: Pireno
GST: Glutación S-transferasa	RP: Residuo peligroso
HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos	SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno	SOD: Superóxido dismutasa
HXD: Hexadecano	
IT: Índice de tolerancia	

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
1.1. El suelo y su contaminación	3
1.2. Fitorremediación de suelos contaminados.....	6
1.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidante	9
1.4. La defensa antioxidante	15
1.5. Fitorremediación asistida por microorganismos.....	20
2. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos específicos.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Estrategia experimental.....	30
5.1 Material biológico.....	31
5.2 Medios de cultivo.....	31
5.3 Inducción de la asociación	32
5.4 Preparación del sistema de cultivo.....	34
5.5 Determinación de la tolerancia a una mezcla de hidrocarburos	34
5.6 Cinética de remoción de hidrocarburos	35
5.7 Determinación de la supervivencia y el crecimiento	36
5.8 Preparación de extractos crudos libres de células.....	37
5.9 Determinación de estrés oxidante.....	37
5.10 Actividades enzimáticas	38
5.10.4 Estimación de índices relativos de actividad enzimática	39
5.11 Extracción y cuantificación de hidrocarburos	40
5.12 Análisis estadístico	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Establecimiento de la asociación <i>F. arundinacea-Lewia</i> sp.	42
6.2 Efecto de la asociación endófito sobre <i>F. arundinacea</i>	45
6.3 Evaluación de la tolerancia a hidrocarburos en un suelo modelo.....	49
6.4 Efecto de una mezcla de hidrocarburos sobre <i>F. arundinacea</i> y la asociación endófito..	61
6.5 Influencia de <i>Lewia</i> sp. sobre plantas de <i>F. arundinacea</i> expuestas a hidrocarburos	70
7. CONCLUSIONES	78
8. RECOMENDACIONES	80
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO I	96
ANEXOII	98
ANEXO III	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura molecular, nombre, masa molecular y solubilidad en agua a 25°C de los 16 HAP considerados contaminantes prioritarios por la EPA.	5
Tabla 2. Concentración de sacarosa y de nutrientes, y relación carbono/nitrógeno (C/N) resultante para los medios de cultivo en los tratamientos.	32
Tabla 3. Concentraciones iniciales teóricas y disponibles de la mezcla de hidrocarburos (MHC) añadida al suelo modelo para la evaluación de la tolerancia.	35
Tabla 4. Efecto de la inducción de la asociación endófitas entre <i>F. arundinacea</i> y <i>Lewia</i> sp. sobre la acumulación de H ₂ O ₂ y el daño oxidante (MDA y CO), después de 15 días de contacto.	47
Tabla 5. Efecto de la inducción de la asociación endófitas entre <i>F. arundinacea</i> y <i>Lewia</i> sp. sobre la defensa antioxidante (SOD, POD y GST).	48
Tabla 6. Correlación entre la remoción de hexadecano (HXD), fenantreno (PHE) y pireno (PYR) y los diferentes parámetros determinados.	69
Tabla 7. Contenido de H ₂ O ₂ en <i>F. arundinacea</i> y la asociación endófitas <i>F. arundinacea-Lewia</i> sp. creciendo con y sin 800 mg kg ⁻¹ de la MHC en suelo modelo.	72
Tabla 8. Daño oxidante medido como contenido de malondialdehído (MDA) y proteínas oxidadas (grupos CO) en <i>F. arundinacea</i> y la asociación endófitas <i>F. arundinacea-Lewia</i> sp. creciendo con y sin 800 mg kg ⁻¹ de la MHC en suelo modelo.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas de reducción del oxígeno en sistemas biológicos (Li y Moore 2007).	10
Figura 2. Radical libre del carbono centrado en una cadena lateral de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular (Minotti y Aust 1987).....	12
Figura 3. Representación del ciclo ASC-GSH o de Halliwell-Asada (Singh y col. 2012).....	18
Figura 4. Reciclaje de glutatión (Almroth y col. 2008).....	19
Figura 5. Estrategia experimental general utilizada para cumplir los objetivos del proyecto.	30
Figura 6. Criterios para la división de las raíces y tallos para verificar la endofiticidad de <i>Lewia</i> sp. en plantas de <i>F. arundinacea</i>	33
Figura 7. Criterios considerados para cuantificar la longitud de las raíces y tallos.	36
Figura 8. Índice de germinación acumulado de semillas de <i>F. arundinacea</i>	43
Figura 9. Tiempo de formación de la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp.....	44
Figura 10. Efecto de la asociación entre <i>F. arundinacea</i> y <i>Lewia</i> sp. sobre la producción de biomasa vegetal.	46
Figura 11. Supervivencia de <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp. expuestas a diferentes concentraciones de la MHC.	51
Figura 12. Elongación de raíces y tallos de <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp. después de la exposición a diferentes concentraciones de la MHC.....	52
Figura 13. Producción de biomasa de raíces y tallos de <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp. expuestas a diferentes concentraciones de la MHC.	55
Figura 14. Concentración de clorofila <i>a</i> y clorofila <i>b</i> en <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp. después de la exposición a diferentes concentraciones de la MHC.	56
Figura 15. Índices de tolerancia de <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp. expuestas a diferentes concentraciones de la MHC.....	58
Figura 16. Supervivencia e incidencia de clorosis de <i>F. arundinacea</i> en medios de cultivo concentrados 3, 4, 5 y 6 veces.....	59
Figura 17. Elongación y producción de biomasa de raíces y tallos de <i>F. arundinacea</i> en medio de cultivo MS con las sales concentradas 3, 4, 5 y 6 veces.	60
Figura 18. Producción de biomasa en raíces y tallos de <i>F. arundinacea</i> y la asociación entre <i>F. arundinacea</i> y <i>Lewia</i> sp. expuestas a 800 mg kg ⁻¹ de la MHC en el suelo modelo.....	61
Figura 19. Efecto del tiempo de exposición a 800 mg kg ⁻¹ de la MHC sobre el contenido de malondialdehído de <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp.	63
Figura 20. Efecto del tiempo de exposición a 800 mg kg ⁻¹ de la MHC sobre las actividades SOD y POD de <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp.	64
Figura 21. Efecto del tiempo de exposición a 800 mg kg ⁻¹ de la MHC sobre la actividad GST de <i>F. arundinacea</i> y la asociación <i>F. arundinacea</i> - <i>Lewia</i> sp.	66

Figura 22. Remoción de hexadecano (HXD), fenantreno (PHE) y pireno (PYR) por <i>F. arundinacea</i> y <i>F. arundinacea</i> asociada con <i>Lewia</i> sp.	67
Figura 23. Producción de biomasa de <i>F. arundinacea</i> y <i>F. arundinacea</i> asociada con <i>Lewia</i> sp. expuesta o no a 800 mg kg ⁻¹ de hidrocarburos (MHC).	71
Figura 24. Actividades SOD y POD de <i>F. arundinacea</i> creciendo asociada o no con <i>Lewia</i> sp. en un suelo modelo conteniendo o no 800 mg kg ⁻¹ de una MHC.	74
Figura 25. Actividad enzimática relativa de SOD y POD de <i>F. arundinacea</i> creciendo no asociada o asociada con <i>Lewia</i> sp. en un suelo modelo contaminado con una MHC.	75
Figura 26. Actividad GST de <i>F. arundinacea</i> creciendo no asociadas o asociadas con <i>Lewia</i> sp. en un suelo modelo conteniendo o no 800 mg kg ⁻¹ de una MHC.	76
Figura 27. Actividad enzimática relativa GST de <i>F. arundinacea</i> creciendo no asociada o asociada con <i>Lewia</i> sp. en un suelo modelo contaminado con una MHC.	77

INTRODUCCIÓN

El asentamiento de las poblaciones ha provocado el aumento de la contaminación y en especial, la debida a hidrocarburos, como los alifáticos, aromáticos policíclicos (HAP) y otros hidrocarburos derivados del petróleo. Estos compuestos poseen características tóxicas para los organismos, ya que tienen propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Lo anterior ha conducido a las autoridades ambientales a promover el desarrollo de tecnologías eficientes y económicamente factibles que permitan su eliminación del ambiente. De hecho, se ha demostrado que la remoción de HAP es más rápida en suelos con vegetación en crecimiento, comparado con suelos sin vegetación. La fitorremediación es una alternativa tecnológica, en la que se aprovecha la capacidad de las plantas para extraer, degradar, volatilizar y/o estabilizar contaminantes del aire, agua y suelo. Durante las últimas décadas, se han encontrado varias especies de gramíneas (Poaceae) eficaces para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos y HAP. Una de las más estudiadas y utilizadas para tal fin es *Festuca arundinacea*. Recientemente, se demostró que la asociación de esta planta con el hongo endófito *Lewia* sp. mejora la eficiencia de la fitorremediación. Sin embargo, aún no se conoce el papel de *Lewia* sp. en el aumento de la tolerancia a HAP en *F. arundinacea*.

En este trabajo se evaluaron varias condiciones para la producción de plantas de *F. arundinacea* y para inducir su asociación endófitica con *Lewia* sp. en un medio semisólido, seleccionando las mejores condiciones para el establecimiento de la asociación en un periodo de 15 días. Posteriormente se evaluó la tolerancia de la planta y la asociación planta-hongo a una mezcla definida de hidrocarburos en un suelo modelo. Asimismo, se determinó la influencia del endófito sobre el estrés oxidante y la defensa antioxidante de la planta al final del periodo de infección (15 días), así como durante 45 días de exposición a una mezcla de hidrocarburos.

En el primer capítulo de este documento se presenta una revisión bibliográfica que, de manera general, aborda el tema de la contaminación de suelos por hidrocarburos, la fitorremediación como una alternativa para su remediación. Se presentan también los aspectos más relevantes acerca del daño oxidante causado por los contaminantes y la defensa antioxidante involucrada en la detoxificación. En seguida, se bosqueja el problema a partir del cual se plantea la hipótesis a demostrar y los objetivos a cumplir. En el capítulo cinco se presenta la estrategia experimental general y se detallan los materiales y métodos utilizados para alcanzar los objetivos. En el capítulo seis se presentan y discuten los resultados obtenidos. Finalmente se exponen las conclusiones del trabajo y las recomendaciones para futuros estudios.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. El suelo y su contaminación

El suelo (del latín “*solum*” que significa piso) es definido como la capa superior de la Tierra que se distingue de la roca sólida y es el sitio donde las plantas se establecen. Los suelos son formaciones geológicas naturales y desarrolladas bajo condiciones diversas de clima y materiales de origen, y están en constante evolución, lo que justifica su gran variedad (Navarro 2003).

Independientemente de su origen, el suelo tiene la función de soportar vegetales y poblaciones de organismos (macro y micro) y, por ello, el suelo debe tener las condiciones necesarias para su desarrollo. Con este enfoque, el suelo puede definirse como la mezcla de partículas sólidas pulverulentas, de agua y de aire. El suelo puede, entonces, considerarse como un sistema disperso, constituido por tres fases (sólida, líquida y gaseosa), siendo posible distinguir cuatro componentes: compuestos minerales, orgánicos, agua y aire, íntimamente ligados, mezclados entre sí y originando un medio ideal para el desarrollo de los organismos y el crecimiento de las plantas (Navarro 2003).

1.1.1 Contaminación del suelo

La contaminación es un cambio dañino en las características químicas, físicas y biológicas del agua, aire y suelo, comúnmente conducen al detrimento en el desarrollo de los organismos que habitan esos sitios (Lucho-Constantino y col. 2005). En particular, la contaminación del suelo aumenta como resultado de su explotación, el asentamiento de poblaciones y las actividades antropogénicas, lo que ha provocado el aumento de residuos que llegan al agua, aire y suelo. Particularmente en México, como consecuencia de años de actividad minera y, posteriormente, debido a las actividades industriales (farmacéutica, química básica y petrolera) se han producido grandes cantidades de residuos peligrosos (RP) (Lucho-Constantino y col. 2005). La generación de RP se ha incrementado en los últimos años. Tan sólo en el periodo del 2004 al 2011 se reportaron 1.92 millones de toneladas de RP resultantes de 68,733 empresas en toda la República Mexicana (SEMARNAT 2013). Además, el manejo inadecuado de los RP, el uso industrial de suelo y las emergencias ambientales afectan de manera inmediata la salud humana. De acuerdo con datos de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), en el 2015 se presentaron 1,562 emergencias ambientales, de las cuales el 85.2% fueron provocadas por derrames de hidrocarburos.

1.1.2 Contaminación de suelos por hidrocarburos

Hasta 2016, en México, Petróleos Mexicanos (PEMEX) ha sido el monopolio a cargo de las actividades de exploración, transformación almacenamiento y distribución de petróleo crudo y sus derivados. La mala disposición o manejo de petróleo crudo y de sus derivados impacta negativamente sobre la calidad del ambiente, provocando contaminación en el aire, agua y suelo.

En el país, tan sólo en 2015, se tenían identificadas 1162 hectáreas de suelo contaminado con petróleo y sus derivados (PEMEX 2016).





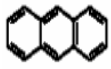



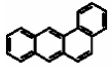
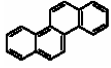

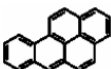
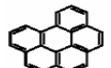
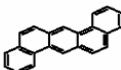
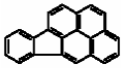

El petróleo está formado principalmente por hidrocarburos, que están constituidos esencialmente por átomos de carbono (76 a 86%) e hidrógeno (10 a 14%). Se conoce una gran diversidad de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos (Lee y col. 2008). Los hidrocarburos alifáticos son cadenas sencillas de carbono e hidrógeno y también se conocen como hidrocarburos saturados, ya que sólo presentan un enlace entre carbono e hidrógeno. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se encuentran compuestos por dos o más anillos de benceno fusionados que comparten dos átomos de carbono. Los HAP se encuentran distribuidos en el suelo porque, además de que provienen de fuentes pirogénicas, por su estructura, pueden quedar retenidos durante años en los suelos (Lee y col. 2008).

Uno de los hidrocarburos alifáticos en los residuos de diésel es el hexadecano ($C_{16}H_{34}$; 226.4 g mol^{-1} ; solubilidad en agua a 25°C : $9 \times 10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$) (Krummenacher y col. 2003). Éstos han sido señalados por las normas mexicanas como peligrosos (Ferrera-Cerrato y col. 2007). Por otra parte, los efectos de los HAP sobre los organismos están relacionados con su tamaño y estructura. De acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), se ha reportado el potencial mutagénico y carcinogénico de 16 HAP sobre los seres humanos (Lee y col. 2008) (Tabla 1). El comportamiento de los HAP en el suelo depende de sus propiedades físicas y químicas, además de las características del suelo donde se encuentran. Todas las propiedades antes mencionadas son el conjunto que define el tamaño y la distribución de la contaminación en una zona específica cuando existen derrames de petróleo.

El derrame del petróleo y sus derivados produce una contaminación constante de suelos que son utilizados para el cultivo de productos agrícolas de consumo humano, representando un gran peligro para la salud pública, ya que los HAP pueden introducirse en estos productos (Lee y col. 2008). Debido a los daños que los HAP pueden causar a la salud, en México se han tomado medidas de saneamiento en los sitios contaminados; para tal propósito, por varias décadas, se han investigado diversas técnicas (Ferrera-Cerrato y col. 2007).

El saneamiento o detoxificación de los sitios contaminados requiere de investigación, innovación y/o adaptación de tecnologías que sean amigables con el ambiente y de bajo costo. El uso de procesos biológicos cumple con esos requisitos, sin embargo, existen algunas limitantes que dificultan su aplicabilidad, como la disponibilidad de nutrientes, el alto contenido de arcillas, la aireación, disponibilidad y tiempo de contaminación.

Tabla 1. Estructura molecular, nombre, masa molecular y solubilidad en agua a 25°C de los 16 HAP considerados contaminantes prioritarios por la EPA.*

Estructura molecular	Nombre	Masa molecular (g mol⁻¹)	Solubilidad (mg L⁻¹) en agua
	Naftaleno	128.17	31.60
	Acenafteno	154.21	1.91
	Acenaftileno	152.20	3.93
	Fluoreno	166.20	1.98
	Antraceno	178.20	0.76
	Fenantreno	178.20	1.20
	Pireno	202.30	7.7 X 10 ⁻²
	Fluoranteno	202.26	0.26
	Benzo[a]antraceno	228.29	1.0 X 10 ⁻²
	Criseno	228.30	2.8 X 10 ⁻³
	Benzo[b]fluoranteno	252.30	1.2 X 10 ⁻³
	Benzo[a]pireno	252.30	2.3 X 10 ⁻³
	Benzo[g, h, i]perileno	276.34	2.6 X 10 ⁻⁴
	Dibenzo[a, h]antraceno	278.35	5.0 X 10 ⁻⁴
	Indeno[1, 2, 3-c, d]pireno	276.30	6.2 X 10 ⁻²
	Benzo[e]pireno	252.30	6.3 X 10 ⁻³

*Modificado de Lee y col. (2008).

Como parte de los esfuerzos para mejorar o acelerar la detoxificación de los sitios contaminados, se han estudiado plantas tolerantes a los contaminantes, con el fin de favorecer su oxidación y degradación en el suelo (Ferrera-Cerrato y col. 2007). A continuación, se esbozan algunas de las razones por las que las plantas han sido seleccionadas para el saneamiento de los suelos contaminados con hidrocarburos.

1.2. Fitorremediación de suelos contaminados

La fitorremediación es una alternativa tecnológica en la que se aprovecha la capacidad de las plantas para extraer, degradar, volatilizar y/o estabilizar contaminantes del aire, agua y suelo. Esta tecnología se ha aprovechado para remediar suelos con contaminantes como metales pesados, residuos radiactivos y compuestos orgánicos, como hidrocarburos alifáticos y HAP derivados del petróleo (Lee y col. 2008).

Varias especies de plantas exhiben una tolerancia alta a los contaminantes; entre estas, una de las familias más estudiadas es la de las gramíneas (Poaceae) (Aprill y Sims 1990). Durante las últimas décadas, se han sugerido varias especies de gramíneas como plantas eficaces para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos y HAP (Parrish y col. 2004). Lo anterior se debe a que poseen sistemas radiculares fibrosos, por lo que la superficie de contacto con el suelo es mayor, de este modo, también se amplía la superficie de colonización de los microorganismos del suelo en la rizósfera, lo que permite incrementar la interacción entre la comunidad microbiana de la rizósfera y el contaminante (Aprill y Sims 1990). Por ejemplo, Parrish y col. (2004) reportaron que después de 12 meses, aumentaba (24%) la remoción de HAP en un suelo contaminado utilizando *Festuca arundinacea* (Schreb.) comparado con un suelo sin plantas.

F. arundinacea (Schreb.) es una gramínea originaria de Europa y ampliamente distribuida en América, de acuerdo a la base de datos Tropicos del Missouri Botanical Garden, esta especie pertenece a la clase Equisetopsida, con subclase Magnoliidae, superorden Lillanae, orden Poales, familia Poaceae y subfamilia Pooideae (<http://www.tropicos.org/Name/25509613>). *F. arundinacea* (Schreb) es una gramínea perenne amacollada con un tamaño variable (0.5 cm-2 m de alto); tiene tallos no ramificados, con nodos de color oscuro; con hojas alternas y dispuestas en dos hileras sobre el tallo, divididas en dos porciones, la anterior (vaina) envuelve al tallo, la parte superior de la hoja (lámina) es muy larga, angosta, plana o a veces plegada y en su unión con la vaina se prolonga en dos lóbulos, entre la vaina y la lámina, por la cara interna, presenta una prolongación membranácea de ápice truncado, llamada lígula; su inflorescencia es panícula, generalmente angosta y densa, de hasta 40 cm de largo, ubicada en la punta del tallo, compuesta de varias ramitas ascendentes en las que se disponen varias espiguillas sobre pedicelos muy cortos, el eje y las ramas

de la inflorescencia son angulosas y ásperas al tacto; sus flores son muy pequeñas y se encuentran cubiertas por una serie de brácteas puntiagudas pero sin aristas evidentes; producen una sola semilla fusionada a la pared del fruto; y su raíz es fibrosa y con tallos subterráneos (rizomas) cortos (Walsh 1995). Por sus propiedades nutrimentales *F. arundinacea* ha sido considerada una gramínea forrajera importante en la producción extensiva de ganado y en algunos países se le cultiva con ese fin (Cuyeu y col. 2013). Es una planta que una vez establecida proporciona cobertura efectiva del suelo y controla la erosión, mejora la estructura del suelo y retrasa o previene la invasión de la maleza (Walsh 1995).

Una de las razones por las que *F. arundinacea* se ha seleccionado como una planta con gran potencial fitorremediador es porque se ha demostrado que tolera condiciones de estrés tanto bióticas (patógenos, herbívoros), como abióticas (salinidad, sequía, contaminantes orgánicos y metales pesados, entre otros). Además, *F. arundinacea* puede coexistir con microorganismos endófitos de manera natural e inducida, permitiendo mayor tolerancia a las condiciones de estrés. Los mecanismos de fitorremediación han podido ser caracterizados utilizando plantas como *F. arundinacea* (Pilon-Smits 2005).

1.2.1 Mecanismos de fitorremediación

Dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones climatológicas del sitio y el nivel de limpieza requerido, la fitorremediación se puede utilizar ya sea como un medio de contención (rizofiltración, fitoestabilización) o de remoción (fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización, fitoestimulación y fitorremediación asistida con microorganismos) de los contaminantes (Pilon-Smits 2005). A continuación, se detallan cada los mecanismos de acuerdo con Pilon-Smits (2005).

La **rizofiltración** es el uso de las plantas para adsorber y absorber los contaminantes, principalmente metales, del suelo o del agua a través de las raíces. Cuando el sistema radicular de las plantas está bien desarrollado, éstas se introducen en el sitio contaminado. A medida que las raíces se van saturando del contaminante, las plantas se cosechan y se disponen de manera segura.

La **fitoestabilización** permite inmovilizar el contaminante en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces, o bien, por su precipitación en la zona de la rizósfera. Este mecanismo reduce la biodisponibilidad y movilidad de los contaminantes evitando su migración a las aguas subterráneas o al aire.

La **fitoextracción** se basa en la absorción de los contaminantes a través de las raíces, para ser translocados y acumulados en altas concentraciones en los tejidos aéreos de las plantas. Así se logra extraer los contaminantes del suelo para concentrarlos y disponerlos de forma segura.

En la **fitovolatilización**, las plantas pueden convertir los contaminantes en formas volátiles que son, generalmente, menos tóxicas y liberarlas hacia la atmósfera, a través de la evapo-transpiración.

Durante la **fitodegradación**, las plantas y los microorganismos asociados degradan los contaminantes orgánicos en productos menos tóxicos, o bien, los mineralizan hasta CO₂ y H₂O. En este mecanismo, los contaminantes son metabolizados y transformados dentro de los tejidos vegetales. La fitodegradación se ha utilizado para la remoción de diversos hidrocarburos, incluidos los HAP.

La **fitoestimulación** se lleva a cabo porque las raíces de las plantas exudan sustancias (azúcares, ácidos carboxílicos y aminoácidos, entre otros) que son aprovechadas por los microorganismos degradadores de contaminantes que se encuentran cercanos a la rizósfera y el contaminante puede ser degradado tanto por las plantas como por los microorganismos.

La **fitorremediación asistida por microorganismos** se basa en la asociación entre plantas y microorganismos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, los hongos micorrízicos arbusculares, bacterias u hongos endófitos, que facilitan y pueden mejorar significativamente los mecanismos de fitorremediación antes descritos (Glick 2010).

Los mecanismos de fitorremediación mencionados pueden ocurrir de manera simultánea en una misma planta y, para saber qué tan eficiente es la fitorremediación, existen varios factores de medición; entre los más usados, se encuentra el factor de fitoestabilización (FE) y el factor de translocación (FT). Uno de los factores cuantitativos más utilizados para medir la eficiencia de fitorremediación de una planta, es el FT con el que se establece la capacidad de una planta para transportar los contaminantes, a través del xilema, desde la raíz hasta los tallos, y representa la concentración del compuesto en el tallo de la planta. Mientras que el FE, ayuda a determinar la cantidad del contaminante que es fijada o inmovilizada fuera de la planta. Los mecanismos de fitorremediación son el resultado de procesos bioquímicos que se llevan a cabo tanto dentro como fuera de las células vegetales, que llevan a la detoxificación de los contaminantes.

1.2.2 Mecanismos de detoxificación de suelos contaminados con hidrocarburos

Durante la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos, se busca reducir la concentración de los contaminantes, lo que puede ocurrir a través de la acción de al menos uno de los siguientes procesos de detoxificación: (i) bioquímicos: metabolismo en el interior y exterior (rizósfera) de la planta (excreción, conjugación); transformación y/o mineralización; y (ii) físico: absorción (extracción y compartimentación) (Kvesitadze y col. 2009). La detoxificación bioquímica puede llevarse a cabo mediante las siguientes etapas.

Activación. Las moléculas orgánicas hidrofóbicas xenobióticas adquieren grupos funcionales hidrofílicos (hidroxilos, carboxilos y grupos amino, entre otros), como resultado de una oxidación, reducción o hidrólisis enzimática, entre otras. Debido a la adición del grupo funcional, las moléculas adquieren polaridad y su toxicidad se modifica. Esto promueve un incremento en la afinidad de las enzimas que catalizan sus modificaciones posteriormente (Mika y Lüthje 2002).

Conjugación. Ocurre como un mecanismo básico en la fitorremediación y consiste en la formación de complejos químicos entre los contaminantes y compuestos intracelulares (proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos orgánicos, mono, oligo, o poli-sacáridos, lignina), formando enlaces peptídicos, éter, éster, tio-éter u otro tipo de enlace covalente (Shahrtash 2013). A partir de aquí el conjugado puede ser secuestrado en un organelo celular o degradado a un compuesto menos tóxico para la planta.

Compartimentación o secuestro. Implica el almacenamiento (en la mayoría de los casos), en un compartimento celular, como la vacuola, de los productos resultantes de la conjugación. Los conjugados solubles de compuestos tóxicos, conjugados a péptidos, azúcares y aminoácidos, son acumulados en estructuras celulares como las vacuolas. Los conjugados insolubles, conjugados a lignina, almidón, pectina, celulosa y xilanos, son excretados de la célula vía exocitosis en el apoplasto para ser acumulados en la pared celular. Este proceso de excreción, ocurre mediante transporte activo facilitado, que es controlado por la bomba de ATP y depende de glutatión. El almacenaje de estos compuestos permite que la célula elabore las enzimas necesarias para la degradación de los compuestos (Chrikishvili y col. 2006).

Durante los procesos bioquímicos de detoxificación de compuestos orgánicos, participan muchas enzimas que, en condiciones naturales, intervienen en el metabolismo del ciclo celular de las plantas. Sin embargo, concentraciones altas de los contaminantes modifican la actividad de esas enzimas, llevando a la célula a sobre-producir especies reactivas de oxígeno (ERO) y, consecuentemente a una condición de estrés oxidante.

1.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidante

La producción de ERO es una consecuencia inevitable en la vida de los organismos aerobios, producidas continuamente como productos secundarios de varias vías metabólicas y también por algunos sistemas específicos bajo el control celular. Al mismo tiempo, las ERO son degradadas a través de varios mecanismos, tanto específicos como no específicos, además algunas ERO son utilizadas como moléculas de señalización en la célula (Cheeseman 2006).

Tanto la generación como la degradación de ERO se encuentran bajo un control celular estricto, manteniendo concentraciones bajas ($<10^{-8}$ M) en el interior de la célula (Li y Moore 2007). Más del 90% del oxígeno consumido por los organismos vivos se utiliza para producir energía mediante la fosforilación oxidativa, con la acción de la cadena de transporte de electrones, a través de un mecanismo que involucra la transferencia de cuatro electrones que conducen a la producción de ATP y agua. La adición consecutiva de electrones a la molécula de O_2 también conduce a la producción de agua (pero no de ATP) a través de formas intermediarias del oxígeno, las ERO (Fig. 1). Entre las ERO se incluyen radicales libres como el anión superóxido ($\bullet O_2^-$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$), y también especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete (1O_2).

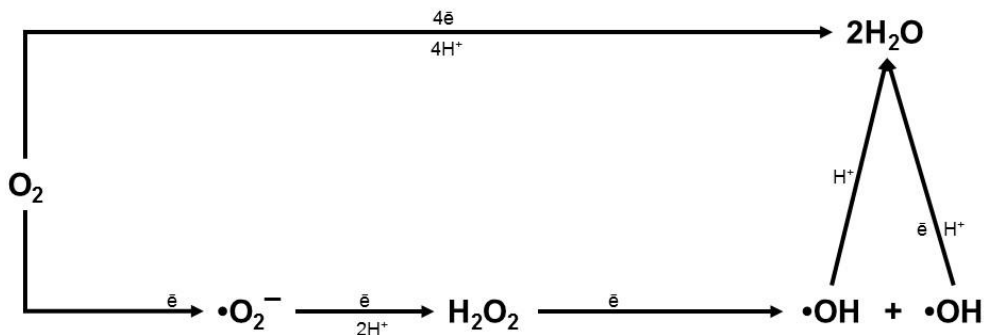


Figura 1. Formas de reducción del oxígeno en sistemas biológicos. La parte superior muestra los cuatro electrones (e^-) de la reducción del oxígeno molecular en la cadena del transporte de e^- . La parte inferior muestra la adición consecutiva de un e^- a una molécula de oxígeno con la formación de productos intermedios-ERO- anión superóxido ($\bullet O_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet OH$). Al final se aceptan los cuatro e^- y protones para dar lugar a dos moléculas de agua. En ambos casos el máximo estado de reducción del oxígeno se alcanza en la molécula de agua (Li y Moore 2007).

La mayor parte de las ERO (>90%) de los organismos son producidas por la cadena de transporte de electrones mitocondrial, del retículo endoplásmico, de la membrana plasmática nuclear y del sistema fotosintético (Starkov 2008). Además, cantidades menores de ERO se generan por algunas enzimas como las oxidasas, a través de la auto-oxidación de diferentes moléculas. Las oxidasas que producen ERO son NADPH-oxidasas, lipooxigenasas, ciclooxigenasas y xantinaoxidasas (Møller y col. 2007). En presencia de luz, en los cloroplastos de las plantas se genera la mayor producción de ERO. Mientras que, en las partes que no son verdes y durante la oscuridad, las mitocondrias parecen ser los mayores productores de ERO. Las NADPH-oxidasas de la membrana plasmática producen $\bullet O_2^-$, los cloroplastos producen 1O_2 en el fotosistema II y $\bullet O_2^-$ en los fotosistemas I y II. La mitocondria produce $\bullet O_2^-$ en dos complejos (I y III), mientras que los peroxisomas producen $\bullet O_2^-$ y H_2O_2 (Starkov 2008).

Cuando el balance entre la producción de ERO y su eliminación se altera a favor de las primeras, ocurre el llamado estrés oxidante (Almroth y col. 2008). El estrés oxidante es un evento común en

muchos estados patológicos, incluyendo el envejecimiento, y este conduce a consecuencias adversas en la célula. Por lo anterior, la investigación sobre el estrés oxidante se ha hecho cada vez más importante, no sólo desde el punto de vista básico, sino también en aspectos aplicados como la medicina, el deporte, la ciencia, la toxicología y las ciencias ambientales.

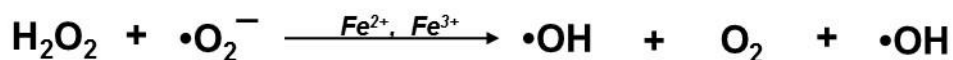
1.3.1 Consecuencias del estrés oxidante

La interacción de las ERO con los componentes de la célula depende de muchas circunstancias, tales como su lugar de formación y su naturaleza. El efecto de las ERO en la célula depende de su actividad química, la que aumenta en el orden siguiente: ${}^1\text{O}_2 < \bullet\text{O}_2^- < \text{H}_2\text{O}_2 < \bullet\text{OH}$. El radical ${}^1\text{O}_2$ puede oxidar ácidos grasos poliinsaturados, guanidina presente en el DNA, así como aminoácidos (histidina, tirosina, metionina y cisteína). Por su parte el radical $\bullet\text{O}_2^-$ difícilmente oxida ácidos grasos poliinsaturados, pero sí reacciona fácilmente con los centros Fe-S de las proteínas. Mientras que el H_2O_2 reacciona poco con los ácidos grasos poliinsaturados, puede oxidar fácilmente la cisteína de las proteínas. El radical $\bullet\text{OH}$ oxida rápidamente ácidos grasos poliinsaturados, DNA, carbohidratos y proteínas (Møller y col. 2007).

Los radicales libres pueden reaccionar químicamente con moléculas similares o con moléculas que no son radicales, de modo que la reacción entre un radical libre y una molécula no radical puede ser (Møller y col. 2007):

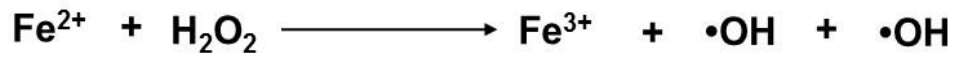
- La reacción convierte la molécula no radical en una molécula radical.
- Estas reacciones tienden a ser reacciones en cadena: un radical produce otro radical y así sucesivamente.
- La intensidad de la reactividad química es variable según el radical que intervenga.

Así, la toxicidad del radical $\bullet\text{O}_2^-$ se atribuye a su interacción con el peróxido de hidrógeno con el que reacciona para formar el radical hidroxilo (Reacción 1).

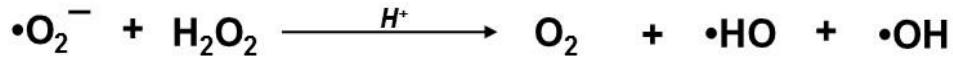


Reacción 1. Reacción entre el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno en presencia de Fe^{2+} , dando como productos Fe^{3+} , el radical hidroxilo y oxígeno molecular (Minotti y Aust 1987).

El H_2O_2 , es convertido en radical libre (radical hidroxilo, $\bullet\text{OH}$) por medio de las reacciones de Fenton (Reacción 2) o de Haber-Weiss (Reacción 3), en presencia de Fe^{2+} o Cu^{2+} presentes en la célula.



Reacción 2. Reacción de Fenton. El Fe^{2+} es oxidado en presencia de peróxido de hidrógeno para dar como resultado Fe^{3+} y dos radicales hidroxilos (Minotti y Aust 1987).



Reacción 3. Reacción de Haber-Weiss para la formación del radical hidroxilo (Minotti y Aust 1987).

El radical $\cdot\text{OH}$ es conocido como la ERO más reactiva, puesto que ataca y daña casi todas las moléculas encontradas en las células y en su vecindad inmediata, conduciendo una reacción en cadena que implica daño celular. Dos ejemplos de oxidación por el radical $\cdot\text{OH}$ son:

- El $\cdot\text{OH}$ puede atacar el DNA, originando reacciones en cadena que afectan las bases púricas y las pirimídicas, lo que a su vez, puede conducir a mutaciones.
- El $\cdot\text{OH}$ destruye membranas en una reacción en cadena que se denomina peroxidación de lípidos o lipoperoxidación. Esto ocurre cuando el $\cdot\text{OH}$ se genera cerca de las membranas y ataca las cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados, dando como resultado un radical libre del carbono centrado ($-\text{C}\cdot-$) (Fig. 2).

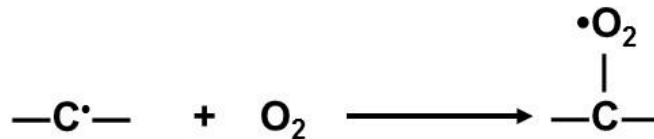


Figura 2. Radical libre del carbono centrado en una cadena lateral de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular que reacciona con el oxígeno molecular formando así el peroxirradical (Minotti y Aust 1987).

El radical $\cdot\text{OH}$ comúnmente se combina con oxígeno, generando un nuevo radical conocido como radical peroxilo o peroxirradical. El peroxirradical puede reaccionar con otras cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados, continuando la reacción en cadena para originar hidroperóxidos lipídicos. Estos alteran la fluidez de la membrana y pueden conducir a su ruptura o generar productos citotóxicos que dañan las proteínas de las membranas, inactivan receptores, dañan mecanismos de transducción y proteínas de transporte (Starkov 2008).

El inicio de la peroxidación de los lípidos de membrana requiere de la presencia de hierro en la célula, por lo que, en condiciones sin estrés, se producen cantidades pequeñas de hidroperóxidos lipídicos o endoperóxidos lipídicos. Los endoperóxidos lipídicos contienen al menos 3 dobles enlaces de metilenos interrumpidos que pueden dirigir a la formación del malondialdehído (MDA) como

producto final. El MDA es conocido como uno de los subproductos cuantificables de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática (Minotti y Aust 1987).

De igual manera que los lípidos de membrana, los carbohidratos, el DNA y las proteínas pueden ser modificadas por las ERO (Cvjetko y col. 2010). La modificación de las proteínas comienza con la oxidación de alguno de sus componentes. Dependiendo de la ERO, la oxidación de proteínas puede ser: (i) específica, como en el caso de la oxidación catalizada por un metal, que daña las proteínas con conjuntos Fe-S o con Fe libre por formación del radical hidroxilo; (ii) inespecífica, como ocurre en la oxidación por radicación en la que se produce $^1\text{O}_2$; (iii) reversible, como la glutationilación y S-nitrosilación; (iv) irreversible, como la carbonilación, nitración, formación de enlaces proteína-proteína y ruptura de enlaces peptídicos. Las proteínas dañadas pueden ser reconocidas dentro de la célula para después ser reparadas; sin embargo, cuando su reparación es ineficiente las proteínas oxidadas comienzan a acumularse. La oxidación de proteínas puede considerarse como un biomarcador del estrés oxidante ya que se forman grupos carbonilo (cetonas y aldehídos) que permiten su detección (Juszczuk y col. 2008).

El estrés oxidante puede ser originado por la sobre-producción de ERO, pero también se puede originar durante el metabolismo de compuestos orgánicos reducidos como los HAP, ya que, cuando los HAP son activados pueden dar lugar a moléculas que podrían reaccionar con las biomoléculas de las plantas y producir compuestos oxidantes (Liu y col. 2009).

1.3.2 Estrés oxidante provocado por hidrocarburos

En las plantas, además de ser subproductos citotóxicos, las ERO funcionan como moléculas de señalización. En condiciones normales, se producen durante la fotosíntesis en la cadena de transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias, y son subproductos de la vía metabólica de los peroxisomas. Debido a que las ERO pueden atacar químicamente nucleótidos, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, las plantas poseen varios mecanismos para neutralizarlos. Bajo condiciones anormales, como el ataque de patógenos, las plantas utilizan niveles bajos de ERO como moléculas de señalización como respuesta defensiva. En tal caso, ocurre una acumulación de ERO en el apoplasto de la célula, seguido de la muerte programada del sitio del tejido infectado. Desde una perspectiva evolutiva, este tipo de respuesta surgió para restringir, especialmente, un ataque microbiano. Las células detectan los niveles de ERO y transmiten las señales por mecanismos que incluyen cambios en el estado de oxidación y reducción de la cisteína contenida en varias proteínas (Tanaka y col. 2006).

La exposición a contaminantes puede modificar la producción de ERO dentro de la célula, debido a la acumulación de H_2O_2 por acción de la NADPH-oxidasa, o por la inhibición en la fijación de CO_2

en el ciclo de Calvin. Cuando esta vía metabólica es inhibida, la reserva disponible de NADP⁺ se agota, permitiendo así que la cadena de transporte de electrones disminuya y, en última instancia, conduce a la formación de ERO en los cloroplastos. Otra posibilidad es la formación de subproductos químicos tóxicos durante el metabolismo de los contaminantes (Rodríguez y col. 2005; Liu y col. 2009).

La fitotoxicidad de muchos compuestos químicos orgánicos ha sido muy documentada. El interés de estos estudios se ha centrado en el efecto de los contaminantes sobre el estrés oxidante. El estudio de Alkio y col. (2005) muestra una clara correlación entre los cambios morfológicos de *Arabidopsis thaliana* y el estrés oxidante ocasionado por la exposición a fenantreno. También se ha reportado incremento en la actividad de enzimas antioxidantes y en los niveles de glutatión en *Fontinalis antipiretica* expuesta a benzo[a]antraceno y a una mezcla de HAP en un suelo contaminado (Roy y col. 1994; Roy y col. 1996). Badu y col. (2005) encontraron un efecto sinérgico de una mezcla de HAP y metales (dihidroxiantraquinona y cobre) sobre la inducción de estrés oxidante en plantas acuáticas de *Lemna gibba*. Por su parte, Martí y col. (2009), observaron inhibición en el crecimiento de alfalfa, junto con un aumento en la oxidación de proteínas y en la actividad de las enzimas involucradas en la detoxificación de HAP por efecto de los hidrocarburos. Liu y col. (2009) demostraron que la presencia de fenantreno incrementó la producción de ERO y la oxidación de los lípidos de membrana en *A. thaliana*. Por otro lado, Hernández-Ortega y col. (2013) observaron que la presencia de los hidrocarburos del diésel disminuyeron el crecimiento de plantas de *Melilotus albus*, e incrementaron la actividad de enzimas antioxidantes totales y el contenido de compuestos fenólicos. Liu y col. (2014) observaron que la presencia de una mezcla de HAP (fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno y dibenzo[a,h]antraceno) incrementó la actividad de las enzimas deshidrogenasa, peroxidasa y catalasas de plantas *Phoenix* sp. Wei y col. (2014) reportaron una disminución mayor al 50% en la concentración de clorofilas *a* y *b* en plantas *Triticum aestivum* expuestas a 200 mg kg⁻¹ de fenantreno. Tomar y Jajoo (2015) demostraron que los HAP intactos y los HAP-fotomodificados inhiben la germinación, el crecimiento y el contenido de pigmentos, así como las actividades peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa en plantas de *T. aestivum*.

El estrés oxidante, causado en plantas debido a la presencia de los contaminantes también ocurre en microorganismos. Sin embargo, el grado de estrés depende de la tolerancia de los organismos a los contaminantes, y la tolerancia de plantas y microorganismos a los contaminantes está relacionada con sus sistemas de defensa antioxidante (Yankova y col. 2002).

1.4. La defensa antioxidante

La defensa antioxidante fue desarrollada en células aerobias para contrarrestar los daños causados por la producción de ERO durante la respiración. La defensa antioxidante puede ser enzimática y no enzimática. En la defensa no enzimática, se incluyen compuestos con propiedades intrínsecamente antioxidantes, tales como las vitaminas C y E, el glutatión (GSH) y el β -caroteno (Pannangpetch y col. 2007). El sistema enzimático, incluye un conjunto de enzimas entre las que están las superóxido dismutasas (SOD, E.C.1.15.1.1), catalasas (CAT, EC.1.11.1.6) y peroxidasas (POD, EC.1.11.1.7), que protegen directamente a la célula eliminando el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente, para convertirlos en especies menos reactivas (Lee y col. 2007). Las SOD catalizan la dismutación del $\bullet\text{O}_2^-$ a H_2O_2 (Reacción 4), mientras que las CAT y POD actúan reduciendo el H_2O_2 a H_2O . Por lo tanto, estas tres enzimas sirven como primera línea de defensa ante las ERO.



Reacción 4. Dismutación del $\bullet\text{O}_2^-$ a O_2 y H_2O_2 por la superóxido dismutasa (Dufernez y col. 2008).

La SOD presenta varias isoenzimas, han sido aisladas y caracterizadas en una gran variedad de organismos. Las isoenzimas cambian dependiendo del metal cofactor metálico que contengan. La isoforma citosólica, en células eucariotas, cloroplastos y algunos procariotas, contiene Cu/Zn (Cu/Zn-SOD) en su sitio activo, igual que la forma extracelular (Lee y col. 2007). Existe una forma mitocondrial única de SOD que tiene Mn en su sitio activo (Mn-SOD), que también se puede encontrar en células procariotas. El tercer grupo, tiene Fe (III) (Fe-SOD) y constituye parte del sistema enzimático antioxidante de procariotas, algas y cloroplastos de algunas plantas. El cuarto grupo, tiene Ni (II/III) (Ni-SOD) y se ha encontrado en estreptomicetos (Dufernez y col. 2008).

A diferencia de otros organismos, que sólo tienen un tipo de SOD en varios compartimentos celulares, las plantas tienen muchas formas de SOD debido a que estas son codificadas por más de un gen, lo que indica que las plantas tienen defensas antioxidantes más complejas que otros organismos aerobios (Dufernez y col. 2008). La inactividad de las SOD en las plantas conduce a fenotipos dañados, incluyendo crecimiento retrasado, daño fotooxidante, daño en el DNA, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daño en los sistemas fotosintéticos.

La dismutación de $\bullet\text{O}_2^-$ a O_2 y H_2O_2 por la SOD implica la formación de H_2O_2 , que puede reaccionar con iones metálicos dando lugar al $\bullet\text{OH}$. Sin embargo, la CAT interviene degradando el H_2O_2 a O_2 y H_2O . La mayoría de los organismos aerobios, incluyendo mamíferos, poseen al menos una forma de CAT con un grupo hemo en su sitio activo (Yankova y col. 2002).

La CAT es una enzima que descompone H_2O_2 a un ritmo extremadamente rápido dentro de las células mediante la reacción que se muestra abajo (Reacción 5). La CAT es una enzima homotetramérica que, en gran parte, se localiza en los peroxisomas de todos los organismos aerobios, donde hay muchas enzimas productoras de H_2O_2 . La CAT exhibe una alta afinidad por el H_2O_2 y puede actuar sobre este antes de que se difunda a otras partes de la célula. Debido a su amplia distribución, conservación evolutiva y capacidad para degradar rápidamente el H_2O_2 , se ha propuesto que la CAT desempeña un papel de suma importancia en los sistemas que permiten que los organismos vivan en ambientes aerobios. Como en el caso de la SOD, existen múltiples isoenzimas de CAT codificadas por genes específicos en plantas, mientras que los animales presentan sólo una forma (Yankova y col. 2002).



Reacción 5. Formación de agua y oxígeno molecular a partir de peróxido de hidrógeno, en la reacción catalizada por la catalasa (Yankova y col. 2002)

Las POD catalizan la oxidación del H_2O_2 a H_2O (Reacción 6), en presencia de un sustrato reducido. Pertenecen a un grupo extenso de enzimas ubicuas en hongos, plantas y vertebrados. Usualmente contienen un grupo prostético ferritoporfirínico y oxidan diversos sustratos en presencia de H_2O_2 (Mika y Lüthje 2002).



Reacción 6. Oxidación de un compuesto con un grupo OH en presencia de peróxido de hidrógeno, reacción catalizada por una peroxidasa (Mika y Lüthje 2002).

Las POD catalizan reacciones con radicales libres y, en ocasiones, el compuesto oxidado resultante oxida a otros compuestos orgánicos (incluidos los hidrocarburos). De hecho, se ha encontrado que la mayoría de los contaminantes orgánicos son oxidados por POD en plantas (Stiborová y Anzenbachlr 1991). Lo anterior se basa en su distribución ubicua de estas enzimas en las plantas y en su alta inespecificidad por contaminantes como N,N-dimetilanilina, 3,4-benzopireno, 4-nitro-o-fenilendiamina, 4-cloroanilina, fenol, aminofluoreno, acetaminofén e hidroxianisoles. En las plantas, las isoenzimas de POD se producen en las paredes celulares, plasmalema, tonoplasto, membranas del retículo endoplásmico, plástidos y citoplasma.

En plantas superiores, la actividad POD se incrementa en respuesta al estrés y participan en la fase I de detoxificación de contaminantes (activación). Entre las múltiples funciones de las POD en las plantas, se encuentra la protección de las células de las reacciones oxidantes que ocurren debido a

la fotosíntesis. La gran versatilidad de las POD es su característica predominante y, por lo tanto, no existe una única función para estas enzimas multifuncionales (Stiborová y Anzenbachlr 1991).

Otro grupo de enzimas multifuncionales en la célula son las glutatión-S-transferasas (GST). Las GST (EC.2.5.1.18) de las plantas son enzimas codificadas por una súper-familia de genes y se dividen en cinco clases: fi: GSTF; tau: GSTU; teta: GSTT; zeta: GSTZ y lambda: GSTL. Las GST están involucradas en la detoxificación celular a través de la conjugación de compuestos endógenos o xenobióticos con el tripéptido glutatión (GSH) (Shahrtash 2013).

Las GST desempeñan un papel muy importante en la fase II de detoxificación (conjugación) de compuestos xenobióticos. En tal caso, las GST actúan después de que las enzimas de la fase I han introducido un grupo funcional en los compuestos xenobióticos (activación). Este grupo funcional ofrece un centro electrofílico que es atraído por el GSH, en una reacción catalizada por la GST. La adición de GSH a la molécula xenobiótica permite que el conjugado sea alojado en la vacuola durante la fase III de detoxificación (compartimentación) o excretado de la célula. Además de catalizar reacciones de conjugación con el GSH, las GST pueden funcionar como transportadoras de auxinas y fenil-propanoides, así como de antocianinas en la vacuola y en el catabolismo de tirosina. Pueden servir como moléculas de señalización, activando el metabolismo de fenil-propanoides después de la exposición a luz ultravioleta. Las GST inducibles por estrés también tienen actividad peroxidasa, protegiendo así a las células de la sobreproducción de ERO, a través de la detoxificación de hidroperóxidos orgánicos de ácidos grasos y nucleicos. Los hidroperóxidos orgánicos se generan en las plantas durante procesos como la fotosíntesis, ataque de patógenos, la detoxificación de toxinas y fitoalexinas producidas durante la respuesta hipersensible (Shahrtash 2013).

Se sabe que los compuestos intermediarios de las ERO funcionan como reguladores de la expresión génica de las GST (Moons 2005). El análisis de la expresión de GST de clase Lambda, particularmente durante el daño oxidante de la célula en arroz, sugiere que varios miembros de esta familia se expresan diferencialmente durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como durante el estrés biótico y abiótico (Kumar y col. 2013). Se han encontrado varias isoenzimas de GST en muchos géneros de hongos de los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota*, entre los cuales se ha demostrado una capacidad notable para degradar muchos compuestos orgánicos complejos como los HAP (Shahrtash 2013).

Aunado al sistema enzimático de defensa antioxidante, las plantas producen compuestos antioxidantes como defensas de segundo nivel que permiten mantener el estado redox de la célula en condiciones de estrés (Singh y col. 2012). Entre estos, el glutatión (GSH) y el ascorbato (ASC) son los más importantes, mantienen el balance de oxidación y reducción intracelular a través del

ciclo ascorbato-glutati3n (ASC-GSH) o de Halliwell-Asada (Fig. 3). Otras mol3culas antioxidantes importantes son los tocoferoles, flavonoides, carotenoides y alcaloides, que actúan mitigando la acumulaci3n de ERO (Singh y col. 2012). Todas las plantas y los animales, excepto los primates y los conejillos de indias, pueden sintetizar 3cido asc3rbico. En las plantas, el ASC, se puede acumular en concentraciones milimolares tanto en tejidos fotosint3ticos como no fotosint3ticos (Gao y col. 2012). De las muchas funciones atribuidas al ASC, la de antioxidante es la m3s importante, ya que, reacciona de manera directa con el ox3geno singulete y los radicales super3xido e hidroxilo.

El ciclo ASC-GSH es uno de los m3s eficientes sistemas de detoxificaci3n de ERO y ayuda a mantener el balance de oxidaci3n y reducci3n en la c3lula (Singh y col. 2012). El ciclo incluye enzimas de oxidaci3n y reducci3n, entre las cuales la ascorbato peroxidasa (APX, EC.1.11.1.11) es la m3s abundante, y requiere ascorbato para reducir el H_2O_2 a H_2O . El monodehidroascorbato (MDHA) es reducido a dehidroascorbato por la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR, EC.1.6.5.4), que requiere NADH, o puede descomponerse en ascorbato y dehidroascorbato (DHA). En seguida, la dehidroascorbato reductasa (DHAR, EC.1.8.5.1) regenera el ascorbato a partir de DHA, utilizando GSH como reductor. El GSH oxidado, el glutati3n disulfuro (GSSG), es regenerado por la glutati3n reductasa (GR, EC1.6.4.2) en presencia de NADPH como poder reductor.

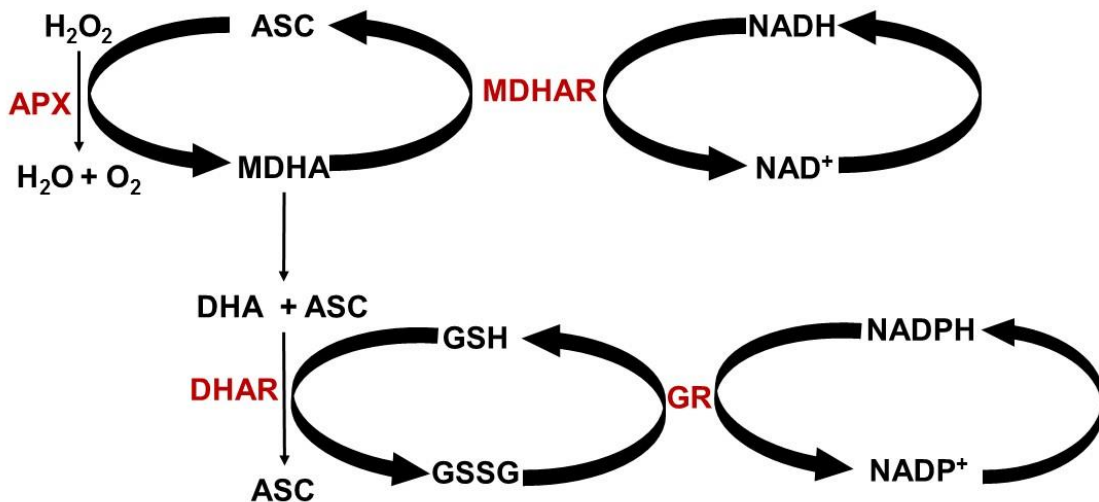


Figura 3. Representaci3n del ciclo ASC-GSH o de Halliwell-Asada (Singh y col. 2012).

El ascorbato es la forma predominante a pH fisiol3gico. Su capacidad antioxidante le permite reaccionar directamente con ERO, oxid3ndose sucesivamente a MDHA y DHA. Adem3s, el ascorbato es cofactor de las dioxigenasas y participa en la regulaci3n del ciclo celular y en la organog3nesis. La regeneraci3n del ASC en el ciclo requiere de la participaci3n de GSH, la coordinaci3n de estos antioxidantes permite que la c3lula mantenga un estado de oxidaci3n y reducci3n que le permita un buen funcionamiento.

El GSH es un tripéptido (γ -glu-cys-gly), cuya utilidad como agente antioxidante consiste en la actividad multifuncional del átomo de azufre en su residuo de cisteína. Se caracteriza por ser el compuesto tiólico no-proteico más abundante en las células. Presenta una capacidad alta para donar electrones y, en condiciones normales, el 90% del GSH se encuentra en su estado reducido. Así, el GSH proporciona equivalentes reductores para enzimas como glutatión-S-transferasas (GST) y glutatión peroxidasas (G-POX), durante su función para reducir peróxidos lipídicos. La G-POX, que contiene selenio (Se) como cofactor metálico, utiliza los grupos sulfhidrilo (SH) del GSH como donadores de H^+ para producir el glutatión disulfuro (GSSG) (Almroth y col. 2008). El GSSG es regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR), que utiliza el $NADPH^+$ formado en la ruta de las pentosas fosfato como donador de H^+ (Fig. 4).

De este modo, el GSH puede reciclarse y participar en otras reacciones, como en la detoxificación de contaminantes o manteniendo la fuente de ácido ascórbico en su estado reducido (ciclo del ácido ascórbico). Durante la detoxificación de contaminantes, el GSH actúa como citoprotector a través de la formación de conjugados que conducen a un péptido polar no tóxico. Esta reacción (conjugación) es catalizada por la acción de las GST.

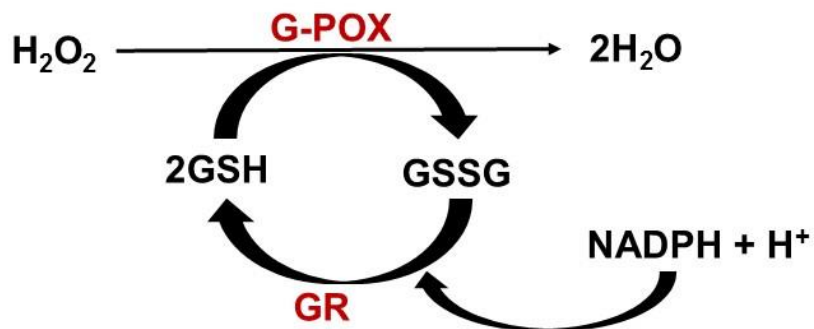


Figura 4. Reciclaje de glutatión en el ciclo de la enzima glutatión peroxidasa (Almroth y col. 2008).

Para mejorar la eficiencia de la defensa antioxidante tanto enzimática como no enzimática y con esto mejorar la fitorremediación, se han propuesto algunas estrategias: (i) selección de plantas con mayor tolerancia a contaminantes específicos; (ii) utilización de técnicas agronómicas (como el ajuste de pH), adición de fertilizantes y quelantes; (iii) manipulación genética, como las técnicas de sobreexpresión de los genes responsables de la resistencia y/o tolerancia o degradación de contaminantes; (iv) la asociación de plantas con microorganismos que resisten, toleran y/o degradan contaminantes, al mismo tiempo que benefician a la planta (Ferrera-Cerrato y col. 2006; Gao y col. 2011).

1.5. Fitorremediación asistida por microorganismos

La posibilidad de aumentar la tolerancia al estrés oxidante de las plantas fitorremediadoras es uno de los temas críticos en este campo de estudio. Las plantas se han asociado con microorganismos (bacterias, hongos) de la rizósfera como una estrategia de adaptación a condiciones adversas (Tanaka y col. 2006), y esto se ha utilizado como una variante de la fitorremediación, conocida como fitorremediación asistida por microorganismos (Glick 2010).

La rizósfera se define como el volumen del suelo adyacente a las raíces, que representa una región de intensa actividad microbiana tanto benéfica como patógena, que afecta el estado fisiológico y el crecimiento de las plantas (Schnoor y col. 1995). En la rizósfera se desarrollan relaciones simbióticas entre microorganismos y plantas, debido a que estas últimas exudan nutrientes (azúcares, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, aminoácidos, esteroides, flavonoides y enzimas, entre otros) útiles para el metabolismo microbiano. Al mismo tiempo, los microorganismos proveen muchos beneficios para la planta, ayudando en el crecimiento, regulando la actividad metabólica de la raíz e influenciando en las propiedades físicas y químicas del suelo y de sus contaminantes. Así, la degradación de compuestos orgánicos puede ocurrir más rápidamente en la zona de la rizósfera (Schnoor y col. 1995). Por lo anterior, los microorganismos que habitan en la rizósfera contribuyen de manera importante en la degradación de materia orgánica y material contaminante.

Además de que la asociación de plantas con rizobacterias aumenta la eficiencia de la fitorremediación, debido a que estas bacterias promueven el crecimiento vegetal, y atenúan el efecto tóxico de los contaminantes (Debiane y col. 2009), otros microorganismos, entre los que están los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), han sido estudiado con el mismo fin. Se ha demostrado que contrarrestan el estrés de las plantas generado por los contaminantes, además de aumentar la captación de nutrientes, la absorción de agua y la fijación de nitrógeno. La importancia de los HMA no sólo se debe su efecto benéfico sobre el crecimiento y nutrición de las plantas, sino también a su capacidad de adaptación a ecosistemas diversos (Liu y col. 2004; Alarcón y col. 2006).

Otro grupo microbiano que ha recibido atención creciente en el área de la fitorremediación asistida por microorganismos, son los hongos endófitos (Mei y Flinn 2010). Éstos habitan dentro de los tejidos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad (Porrás-Alfaro y Bayman 2011). En el caso particular de los hongos endófitos, se ha encontrado que mejoran el crecimiento vegetal a través de mejorar la captación de nutrientes, inhibir el crecimiento de fitopatógenos, reducir enfermedades y aumentar la tolerancia al estrés ambiental por factores como la sequía, salinidad, calor y la presencia de contaminantes (Rodríguez y col. 2009). Benefician a plantas creciendo bajo condiciones de estrés provocado por la presencia de contaminantes – metales pesados (Ahmad 2011) y organoclorados (Becerra-Castro y col. 2013) – o altas concentraciones de sal y sequía (Tiwari y col. 2016), mediante

el control del estrés oxidante. La colonización de los endófitos en las plantas causa cambios bioquímicos y modificaciones en la expresión genética, que permiten tanto el establecimiento de la asociación como la mejora de la tolerancia a los contaminantes (Dupont y col. 2015).

Hasta ahora, el papel que desempeñan los microorganismos endófitos en la fitorremediación no es claro (Zhuang y col. 2007), pero se sabe que la eficiencia del proceso puede modificarse debido a: (i) la transformación del contaminante; (ii) la reducción de su toxicidad mediante el control del estrés generado; y (iii) la mejora del crecimiento vegetal. El éxito de estas asociaciones en la fitorremediación de un suelo depende de la combinación planta-microorganismo-contaminante y está influenciado por las condiciones particulares de cada sitio (Gadd 2007).

La mayoría de los estudios acerca de la fitorremediación asistida con microorganismos se han enfocado en la asociación de plantas como *Chichorium intybus* o *Glycine max* cv. Don Mario 4800 con HMA del género *Glomus* sp. (Debiane y col. 2009; Bressano y col. 2010) o plantas como *Festuca arundinacea* en asociación con el endófito *Neotyphodium coenophialum* (Soleimani y col. 2010) bajo condiciones de estrés por HAP y metales pesados. Sin embargo, la asociación de *F. arundinacea* con *N. coenophialum* puede desarrollar “festucosis” en ganado vacuno, caballos y ovejas, lo que provoca disminución de peso, menores tasas de embarazo y disminución en la producción de leche (Walsh 1995). Particularmente, para el caso de los HAP, pocos son los estudios en los que se reporta la utilización de hongos endófitos diferentes a *N. coenophialum* en asociación con plantas de *F. arundinacea*, por lo que el estudio de otras asociaciones benéficas, no sólo para la planta, puede proporcionar una alternativa a la fitorremediación de suelos contaminados.

Recientemente, se reportó que un hongo endófito del género *Lewia* incrementa la tolerancia de *F. arundinacea* expuesta a una mezcla de hidrocarburos (Cruz-Hernández y col. 2013) y que mejoró la bioacumulación de plomo y el crecimiento de plantas de *Dodonaea viscosa* (Rojas-Loria y col. 2011). *Lewia* sp. es un hongo ascomiceto de la familia *Pleosporaceae*, y se ha reportado que el género incluye varias especies que actúan como fitopatógenos (*L. avenicola*, *L. infectoria*) que reducen la calidad de los cultivos, especialmente de gramíneas (Kwasna y col. 2006). Además, *Lewia* sp. también fue identificado como un endófito de plantas halófilas como *Limonium tetragonum* y *Phragmites australis* (Khalmuratova y col. 2015). *L. infectoria* y *L. eureka* se identificaron como endófitos de *Betula pendula* (Kwasna y col 2008) y *Theobroma gileri* (Thomas y col. 2008), respectivamente.

Aunque los estudios reconocen la importancia de los hongos endófitos en la tolerancia y remoción de hidrocarburos, aún no está claro el papel que desempeñan, por lo que resulta relevante contribuir al conocimiento sobre los mecanismos que permiten mejorar la fitorremediación asistida con

microorganismos endófitos y ofrecer alternativas a la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

2.JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre la respuesta biológica y los mecanismos de tolerancia de las plantas y los microorganismos a la exposición de compuestos orgánicos tóxicos, es una herramienta indispensable para mejorar las estrategias de limpieza de suelos y obtener mejores rendimientos durante la fitorremediación.

Varios estudios reconocen la importancia del papel que desempeñan los hongos micorrízicos arbusculares en asociación con las plantas, particularmente en la tolerancia y remoción de compuestos orgánicos. Sin embargo, poco se sabe acerca del papel y del potencial de los hongos endófitos para contrarrestar los efectos negativos de los hidrocarburos en plantas con potencial para fitorremediación.

Trabajos previos demostraron que *Lewia* sp. es un hongo endófito que se asocia con *F. arundinacea*, en una asociación inducible en el laboratorio. Asimismo, la aclimatación de la asociación a distintas concentraciones de una mezcla definida de hidrocarburos, durante al menos 45 días, favoreció la remoción de hexadecano, fenantreno y pireno (Mendarte-Alquisira y col. 2013). Si bien es cierto que aún se desconocen los mecanismos por los cuales se obtuvo esta respuesta, es importante resaltar que la remoción de los hidrocarburos no dependió de la concentración utilizada durante la aclimatación, pero sí del tiempo de contacto entre la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. y la mezcla de hidrocarburos.

Se ha confirmado que la presencia de hidrocarburos modifica el metabolismo en las plantas, provocando estrés. Si tal condición no es controlada, puede conducir a daños irreparables, e inclusive a la muerte. Como respuesta al estrés, las plantas han desarrollado mecanismos que involucran reacciones bioquímicas diversas. Estos mecanismos pueden mejorarse a través de la asociación de plantas con hongos endófitos. Sin embargo, la información acerca del papel que desempeñan los hongos endófitos en la reducción del estrés en las plantas durante la fitorremediación de hidrocarburos es aún escasa.

Considerando lo anterior, resulta relevante contribuir en el conocimiento acerca de los mecanismos que permitieron la mayor remoción de hidrocarburos por la asociación *Festuca arundinacea-Lewia* sp., así como ofrecer una alternativa promisoriosa para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

3. HIPÓTESIS

La remoción de una mezcla de hidrocarburos por la asociación inducida entre *Festuca arundinacea* y *Lewia* sp. aumenta debido a que el hongo favorece el control del estrés oxidante.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de *Lewia* sp. en la asociación endófito inducida con *Festuca arundinacea* sobre el control del estrés oxidante durante la remoción de una mezcla de hidrocarburos en un suelo modelo.

4.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones particulares para el cultivo *in vitro* de *F. arundinacea* y la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.
2. Determinar el efecto de la inducción de la asociación en el crecimiento y el estrés oxidante.
3. Evaluar la tolerancia de *F. arundinacea* y la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. a una mezcla de hidrocarburos.
4. Evaluar el efecto de una mezcla de hidrocarburos sobre el estrés oxidante y la defensa antioxidante en *F. arundinacea* y la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.
5. Correlacionar la defensa antioxidante con la remoción de hidrocarburos en la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.

5.MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental

Para cumplir con el objetivo general del estudio, la estrategia experimental se dividió en cuatro etapas que se representan con número en los recuadros de la Figura 5. En la primera etapa, se establecieron las condiciones particulares para la obtención de plantas de *F. arundinacea* y para la inducción de la asociación endófitra entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. en medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) semisólido; así mismo, se determinó el efecto de la inducción de la asociación sobre el estrés oxidante y la defensa antioxidante de la planta. En la segunda etapa, se evaluó la tolerancia de la planta y de la asociación a concentraciones altas de una mezcla de hidrocarburos (MHC) en un suelo modelo, de donde se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI₅₀). En la tercera etapa, se ensayaron varias concentraciones del medio de cultivo (MS), manteniendo la misma relación C/N, con el objetivo de incrementar la supervivencia de la planta y la asociación en el suelo modelo sin contaminantes y, así, asegurar, en la cuarta etapa, que el estrés generado lo provocan los hidrocarburos. En la cuarta etapa, se evaluó la influencia del endófito sobre la remoción de hidrocarburos, el estrés oxidante y la defensa antioxidante de la planta, en presencia de una mezcla de hidrocarburos.

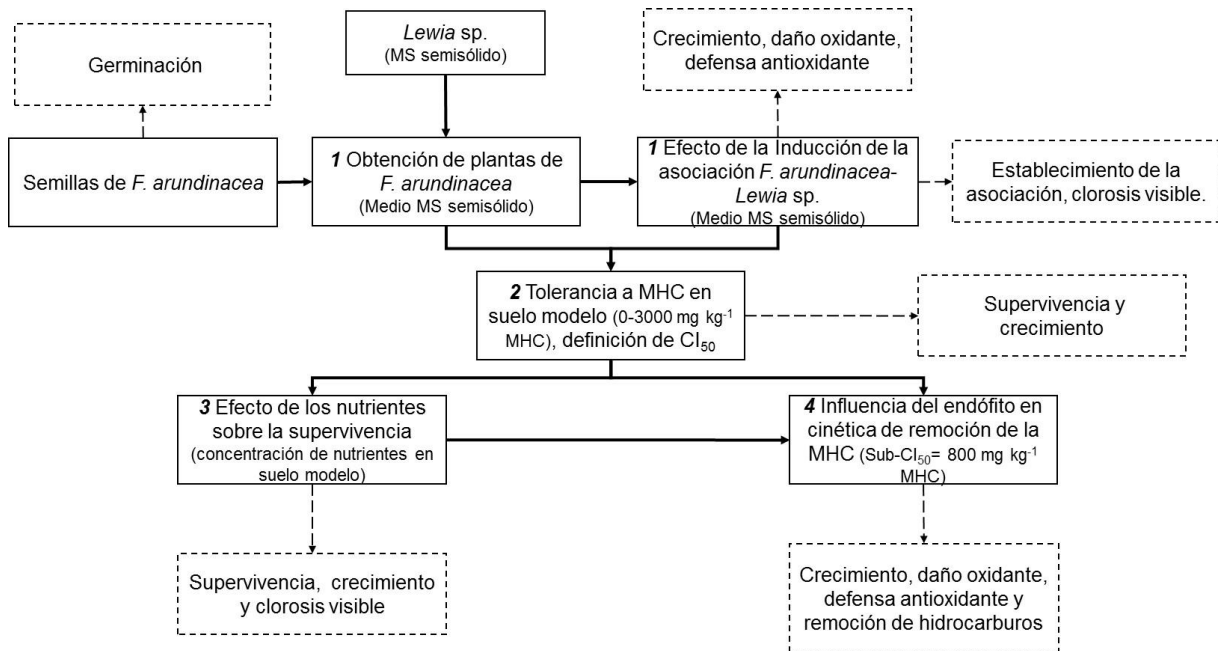


Figura 5. Estrategia experimental general utilizada para cumplir los objetivos del proyecto. Las etapas se presentan con número y las variables respuesta medidas en cada etapa se muestran en los recuadros con línea punteada.

5.1 Material biológico

5.1.1 Planta

Las semillas de *Festuca arundinacea* se adquirieron en la Central de Abasto de la Ciudad de México y se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización. Para seleccionar las semillas a cultivar, se realizó una prueba de pre-viabilidad, donde aquellas que flotaron se descartaron (Cruz-Hernández y col. 2013). Las semillas seleccionadas se colocaron en un papel filtro, se sumergieron en una solución (2%) de detergente comercial (marca Roma) por 20 min con agitación constante, y se lavaron con abundante agua de la llave. Bajo una campana de flujo laminar, el sobre con las semillas se sumergió en etanol 70% (v/v) durante 30 s, seguido por una solución de hipoclorito de sodio 1.2% (v/v) adicionado con 0.1 mL de Tween-20 estéril por 30 min. El sobre se lavó repetidamente con 150 mL de agua desionizada estéril y se abrió sobre una caja de Petri estéril y vacía, donde se mantuvieron hasta su siembra.

5.1.2 Hongo

Se inoculó la cepa del hongo filamentoso *Lewia* sp., aislado de semillas de *F. arundinacea* y conservado en el laboratorio W-108 de la UAM. Para su conservación, la cepa se sembró en medios de agar papa dextrosa (PDA) y medio Murashige y Skoog (MS, *Sigma-Aldrich*) (Murashige y Skoog 1962) con sacarosa (*Sigma-Aldrich*) (pH 5.7 ± 0.1), después de 15 días de crecimiento se obtuvieron cuadros de 1 X 1 cm que se sumergieron en agua destilada estéril, los tubos con agua se mantuvieron a 4 °C. Para la propagación de la cepa, se tomó un cuadro con la biomasa de *Lewia* sp. y se colocó en una caja con medio MS y 10 g L^{-1} de sacarosa (*Sigma-Aldrich*) y se incubaron durante 15 días a 30 °C. Para la preparación del inóculo, se tomaron 65 discos de 5 mm de la periferia de las colonias formadas y se colocaron en tubos con perlas de vidrio y solución isotónica para dispersar el micelio hasta obtener una suspensión homogénea. Dos mL de esta suspensión ($10.1 \pm 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$) se utilizaron como inóculo para las plantas.

5.2 Medios de cultivo

Durante las etapas del estudio, se utilizaron 12 medios de cultivo diferentes. Para la primera etapa (obtención de plantas y establecimiento de la asociación), la siembra de las semillas desinfectadas y la inducción de la asociación se realizaron en cajas Magenta que contenían medio MS completo y medio MS con la mitad de la concentración ($\frac{1}{2}\text{MS}$) con 5, 10, 20 y 30 g L^{-1} de sacarosa cada medio. El pH de cada medio se ajustó a 5.7 ± 0.1 con KOH 1 N y se agregaron 1.8 g L^{-1} de Phytigel (*Sigma-Aldrich*) como agente gelificante. Cada caja Magenta se adicionó con 80 mL de medio MS y se esterilizó a 15 lb in^{-2} durante 15 min. Se colocaron 16 semillas por caja Magenta y se incubaron durante 15 días con fotoperiodos de 16 h ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}$) a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. La germinación se monitoreó

durante ese periodo. La nomenclatura y composición de los medios utilizados se muestra en la Tabla 2. Para la segunda etapa (evaluación de la tolerancia de la planta y la asociación a una mezcla de hidrocarburos en suelo modelo), se utilizó el medio cuya C/N permitió la mayor germinación y la inducción de la asociación en al menos 15 días, pero concentrado 3 veces (3X) para mantener la misma cantidad de nutrientes que en el cultivo semisólido. Durante la tercera etapa (aumento en supervivencia en suelo modelo sin contaminantes), se probaron cuatro medios con concentración diferente de sales y sacarosa, pero con la misma relación C/N (3X, 4X, 5X y 6X) para aumentar la supervivencia de plantas en ausencia de hidrocarburos en suelo modelo. Durante la cuarta etapa se utilizó el medio seleccionado en la etapa tres.

Tabla 2. Concentración de sacarosa y de nutrientes, y relación carbono/nitrógeno (C/N) resultante para los medios de cultivo en los tratamientos. El 1 representa la concentración de sales de MS completa recomendada por el proveedor, ½ representa la mitad de la concentración de las sales, los tratamientos 3X al 6X son las veces que se concentraron los nutrientes en el suelo modelo. *

Tratamiento	Sacarosa (g L ⁻¹)	Relación C/N
2.5-1	5	2.5
5-1	10	5
10-1	20	10
15-1	30	15
5-½	5	5
10-½	10	10
20-½	20	20
30-½	30	30
3X	30	5
4X	40	5
5X	50	5
6X	60	5

*La composición de las sales de MS de acuerdo al proveedor (*Sigma-Aldrich*) se muestra en el Anexo I.

5.3 Inducción de la asociación

Con el propósito de determinar el tiempo necesario para establecer la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. en medio semisólido, se evaluó el efecto de la relación C/N en el medio de cultivo (Tabla 2) sobre el tiempo en el que se formó la asociación endófito. La inducción de la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp., se realizó en cajas Magenta que contenían medio MS y sacarosa con relación de C/N diferente (Tabla 2). En el medio cercano a la raíz de las plantas de 15 días de edad se inocularon 2 mL de la suspensión de *Lewia* sp. Las plantas permanecieron en

contacto con la suspensión durante 5, 10 ,15 y 20 días con fotoperiodos de 16 h ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}$) a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Al finalizar cada tiempo de contacto se determinó si la asociación se había formado, verificando la presencia del micelio en el interior de las raíces y tallos de las plantas. Con base en estos resultados, se seleccionó el medio donde se obtuvo el mayor número de plantas con apariencia sana y el establecimiento de la asociación endófito en el menor tiempo.

Una vez seleccionado el medio de cultivo MS con C/N de 5 (5-1), que permitió la obtención de plantas y la asociación en el menor tiempo de cultivo (15 días) en medio semisólido, se realizó una nueva siembra de semillas en este medio. Las plantas y la asociación obtenidas fueron utilizadas para los experimentos en suelo modelo, cuyas condiciones de cultivo se describen más adelante.

5.3.1 Pruebas de endofiticidad

Para determinar el carácter endófito de la asociación, así como para verificar el tiempo en el que ésta se establece, se siguió el procedimiento descrito a continuación (Lucero y col. 2006). Bajo campana de flujo laminar, las plantas en contacto con el hongo se cosecharon, se retiró el exceso de hongo y se separaron las raíces de los tallos. Una vez separados, raíces y tallos se desinfectaron superficialmente con una solución de etanol 70% por 30 s, seguido de una solución de hipoclorito de sodio 1.2% (v/v) por 10 min y se finalizó con un enjuague con agua destilada estéril por 1 min. Se cortaron segmentos de raíz y tallo de 1cm de longitud que fueron identificados como zonas con los siguientes nombres: 1) zona de maduración o diferenciación, 2) zona de elongación, 3) zona de elongación cercana a la zona apical y 4) zona apical o de división celular (Fig. 6). Cada segmento se colocó sobre cajas Petri con medio PDA, para corroborar la desinfección superficial y, posteriormente, se sembraron en cajas con medio PDA. Las cajas con el material vegetal se mantuvieron durante 20 días a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y el crecimiento fúngico a partir de los extremos de los cortes se verificó cada 24 h.

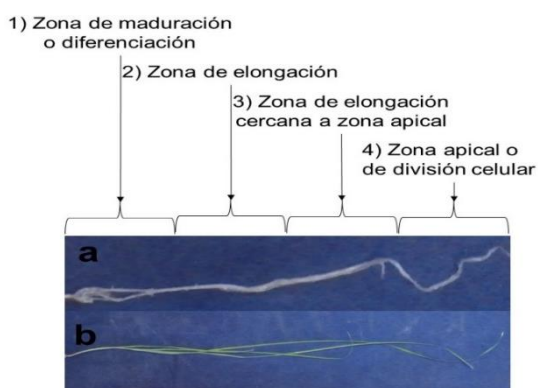


Figura 6. Criterios para la división de las a) raíces y b) tallos para verificar la endofiticidad de *Lewia* sp. en plantas de *F. arundinacea*: 1) zona de maduración o diferenciación, 2) zona de elongación, 3) zona de elongación cercana a la zona apical y 4) zona apical o de división celular

5.4 Preparación del sistema de cultivo

5.4.1 Suelo modelo

Con el fin de evaluar la tolerancia de *F. arundinacea* y la asociación endófito inducida entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp., a una mezcla de hidrocarburos definida en un suelo modelo, se utilizó un suelo modelo compuesto por una mezcla de arena:agrolita (1:1 v/v). La arena de sílice, tamizada hasta un tamaño de partícula entre 0.42 y 2 mm Ø, se trató por 24 h con una solución de ácido clorhídrico (10%, v/v) para eliminar el carbonato de calcio y la materia orgánica. La arena se lavó 10 veces con agua de la llave y 10 veces con agua destilada para eliminar el HCl, con lo que se aseguró que el pH final del agua de lavado fuera cercano a 7. La agrolita se tamizó para obtener un tamaño de partícula entre 0.4 y 2.8 mm Ø, para favorecer el anclaje de las raíces al suelo. Ya tamizada, se lavó con agua destilada caliente para retirar las impurezas. Tanto la arena como la agrolita se secaron durante 96 h a 60 °C. La mezcla arena:agrolita se impregnó con medio MS con sacarosa hasta alcanzar 30% de humedad.

5.4.2 Mezcla de hidrocarburos

La mezcla de hidrocarburos (MHC) incluyó hexadecano (HXD, pureza 99%) un hidrocarburo de cadena lineal, y dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), fenantreno (PHE, con una pureza mayor a 96%) y pireno (PYR con una pureza mayor a 98%) en una proporción 2:1:0.5. El HXD es un compuesto que se encuentra en proporciones altas en los residuos de diésel (Krummenacher y col. 2003), mientras que los HAP han sido reportados como compuestos carcinogénicos encontrados en sitios contaminados (García-Gómez y col. 2004). Todos los reactivos fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich*. Los compuestos fueron disueltos en acetona (*J.T. Baker*, pureza > 99%) para adicionarlos al suelo modelo.

5.5 Determinación de la tolerancia a una mezcla de hidrocarburos

La tolerancia de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. se determinó mediante la cuantificación de la supervivencia, el crecimiento y la concentración de clorofilas (apartado 5.7) en plantas crecidas con concentraciones crecientes de la MHC. La tolerancia se cuantificó a través de la concentración inhibitoria media (CI₅₀), en este caso de la MHC, que es la concentración necesaria para inhibir en un 50% una variable determinada (Baud-Grasset y col. 1993).

Para lo anterior, las plantas de 30 días asociadas y no asociadas, obtenidas en medio semisólido, se transfirieron a cajas Magenta (*Sigma-Aldrich*) con suelo modelo preparado en las condiciones mencionadas en el apartado 5.4. La MHC se añadió a cada caja (Tabla 3) antes de su esterilización a 15 lb in⁻² durante 15 min. Se verificó la concentración de los hidrocarburos en el suelo modelo

utilizando la metodología descrita en el apartado 5.11, obteniendo que la concentración inicial teórica fue diferente a la cuantificada disponible (Tabla 3), ya que los hidrocarburos se sorbieron en el suelo modelo y las unidades experimentales.

Tabla 3. Concentraciones iniciales teóricas y disponibles de la mezcla de hidrocarburos (MHC) añadida al suelo modelo para la evaluación de la tolerancia de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. a los contaminantes.

Concentración inicial teórica (mg kg⁻¹)	Concentración inicial disponible (mg kg⁻¹)
0	0
375	160
750	319
1000	425
1500	638
3000	1276

Cada caja Magenta contenía 16 plantas asociadas o no asociadas, cada concentración de la MHC se preparó por triplicado. Las unidades experimentales se mantuvieron durante 45 días a 25 ± 1 °C con fotoperiodos de 16 h ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}$) en una cámara de crecimiento. Después de este periodo, las plantas se cosecharon y se cuantificó la supervivencia, el crecimiento y la concentración de clorofilas (apartado 5.7).

Una vez que se cuantificó la tolerancia de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. a la MHC se seleccionó una concentración sub-inhibitoria (sub- CI_{50}) con el fin de evaluar la influencia de la asociación endófito sobre *F. arundinacea* durante una cinética de remoción de la MHC en el suelo modelo. La sub- CI_{50} (800 mg kg^{-1} inicial teóricos= 275.7 mg kg^{-1} disponibles), se seleccionó para inducir cambios en las respuestas de defensa de la planta, pero sin inhibir el crecimiento, que en este estudio fue la variable más sensible a la MHC.

5.6 Cinética de remoción de hidrocarburos

La cinética de remoción de la MHC se llevó a cabo en frascos de vidrio conteniendo el suelo modelo contaminado con la sub- CI_{50} . Las plantas de 30 días asociadas y no asociadas, obtenidas en medio semisólido se transfirieron a las unidades experimentales (UE). Las UE utilizadas para la cinética fueron frascos de vidrio con el suelo modelo y 12 plantas cada una. Las plantas asociadas o no asociadas fueron expuestas a la MHC durante 0, 7, 14, 21, 28 y 45 días e incubadas bajo las condiciones anteriores. Para los tiempos 0 y 7, se cosecharon 60 plantas de cada tratamiento, las cuales se separaron en raíces y tallos para determinar el estrés oxidante (apartado 5.9), actividades enzimáticas (apartado 5.10) y el crecimiento mediante la producción de biomasa (apartado 5.7.2).

Para los tiempos de 14, 21, 28 y 45 días, se cosecharon 36 plantas de cada tratamiento, las cuales se separaron en raíces y tallos para determinar el contenido de malondialdehído (apartado 5.9.2), la actividad enzimática (apartado 5.10) y el crecimiento mediante la producción de biomasa (apartado 5.7.2). Para cada tiempo (0 a 45 días) se determinó la remoción de la MHC (apartado 5.11).

5.7 Determinación de la supervivencia y el crecimiento

Al tiempo final de cada tratamiento, las plantas de *F. arundinacea* y *F. arundinacea* con *Lewia* sp. se cosecharon cuidadosamente, se lavaron con agua destilada y se separaron en raíces y tallos para determinar la supervivencia, el crecimiento y el contenido de clorofilas.

5.7.1 Supervivencia

Para cuantificar la supervivencia de *F. arundinacea* y la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. se consideraron aquellas plantas con color verde como vivas, mientras que las plantas cloróticas en su totalidad fueron consideradas como muertas.

5.7.2 Crecimiento

El crecimiento se cuantificó midiendo la biomasa y elongación de raíces y tallos por separado. La biomasa seca (BS), se terminó después de secarse los tejidos vegetales en una estufa (60°C, 48 h). La elongación de los tallos se obtuvo midiendo desde la unión del coleóptilo con la raíz hasta el final del ápice de la hoja primaria. La elongación de la raíz se obtuvo midiendo desde la separación del coleóptilo hasta el ápice de la raíz primaria (Fig.7).



Figura 7. Criterios considerados para cuantificar la longitud de las raíces (desde la separación del coleóptilo hasta el ápice de la raíz primaria) y tallos (desde la unión del coleóptilo con la raíz hasta el final del ápice de la hoja primaria).

5.7.3 Clorofilas

Se cosecharon tres plantas de cada tratamiento para la extracción y cuantificación de clorofilas. Para lo anterior, los tallos frescos se pesaron por separado, se colocaron en un mortero, se adicionaron 2 mL de metanol frío y se trituraron con ayuda de un pistilo. El contenido del mortero se transfirió a un tubo de ensaye de plástico con tapón, y los restos en el mortero y el pistilo se enjuagaron con 1.5 mL de metanol que se añadieron al tubo de ensaye anterior. Los tubos con el extracto de clorofilas

se centrifugaron a 804 g por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se colocó en otro tubo de ensayo y la biomasa sedimentada se lavó con 1 mL de metanol frío y se centrifugó (804 g por 10 min a 4 °C). Se recuperó el sobrenadante y se colocó con el resto de las clorofilas extraídas, las muestras se llevaron a un volumen total de 8 mL con metanol frío medido con una micropipeta.

Para cuantificar la concentración de clorofilas, mediante espectrofotometría (50 Conc, *Varian*) se colocó 1 mL de la solución en una celda de plástico de 1 cm. Las lecturas de cada muestra se realizaron a 665 y 652 nm, para determinar la concentración de clorofila *a* y *b*, respectivamente, mediante las ecuaciones propuestas por Porra y col. (1989):

$$Chl\ a = 16.29XA^{665.2} - 8.56XA^{652.0} \quad (1)$$

$$Chl\ b = 30.66XA^{652.0} - 13.58XA^{665.2} \quad (2)$$

5.8 Preparación de extractos crudos libres de células

Con el fin de obtener extractos libres de células, para cada tratamiento, se separaron tallos de raíces, y aproximadamente 100 mg del tejido fresco se pulverizó con nitrógeno líquido. El tejido fue homogenizado con amortiguador de fosfatos de sodio frío (50 mM, pH 7) con polivinilpirrolidona (1% PVP, *Sigma-Aldrich*) e inhibidor de proteasas (P8215, *Sigma-Aldrich*, 5 µL por 100 mg de tejido fresco). El homogenizado fue tratado en un disruptor celular (Mikro-Dismembrator U, *Sartorius*) por 2 min a 2000 rpm y posteriormente se centrifugó (10629 g, 4°C, 10 min). El sobrenadante resultante (extracto crudo, EC) fue usado para medir el contenido de proteína en un lector de microplaca (ELx808, *Bio-Tek*) por el método de Lowry y col. (1951) modificado (Liu y col. 2009), usando un kit comercial (*Bio-Rad*) y albúmina sérica bovina como estándar.

5.9 Determinación de estrés oxidante

5.9.1 Peróxido de hidrógeno

El ensayo de H₂O₂ se realizó mezclando el EC con KCN 5 mM para inhibir las actividades catalasa (CAT) y peroxidasas (POD). Se mezclaron 250µL del EC con la solución de reacción que contenía sulfato ferroso amónico (250 µM), sorbitol (100 µM) y naranja de xilenol (100 µM) en ácido sulfúrico 25 µM y etanol 1%. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min, el complejo formado entre el Fe y el naranja de xilenol se cuantificó espectrofotométricamente (50 Conc *Varian*) a 560 nm. El resultado se comparó con una curva estándar de H₂O₂ realizada en un intervalo de 0.5 a 80 µM (Cheeseman 2006).

5.9.2 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos de membrana se cuantificó mediante el contenido de MDA en el EC. El EC en este caso, se obtuvo homogenizando 100 mg de tejido fresco en amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) con 10 μ L de hidroxitolueno butilado 500 mM. La suspensión se centrifugó a 20817 g (4 °C, 15 min). La mezcla de reacción contenía 0.1 mL del EC en 200 mL de solución de reacción (ácido tricloroacético 15% (TCA), ácido tiobarbitúrico 0.5% (TBA) y HCl 0.25 N). La mezcla se incubó a 90 °C por 25 min y el cromóforo producido se cuantificó espectrofotométricamente a 535 nm. El contenido de MDA se estimó considerando un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Buege y Aust 1978).

5.9.3 Proteínas oxidadas

El contenido de proteínas oxidadas se determinó mediante la cuantificación de los grupos carbonilo (grupos CO) en proteínas (Juszczuk y col. 2008). Los grupos CO reaccionan con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) generando el conjugado proteína-hidrazona (proteína-DPH) que absorbe a 375 nm. La mezcla de reacción contenía la cantidad adecuada del EC equivalente a 20 μ g de proteína y 750 μ L de DNPH 10 mM en HCl 2 M. Los grupos CO se estimaron considerando un $\epsilon = 22$ mM⁻¹ cm⁻¹ (Juszczuk y col. 2008).

5.10 Actividades enzimáticas

5.10.1 Superóxido dismutasa

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó espectrofotométricamente a 450 nm con un kit comercial (19160, *Sigma*). El ensayo utiliza la sal de tetrasolio soluble en agua (WST-1), que produce formazan soluble en agua después de la reducción del radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). La tasa de reducción del $\bullet\text{O}_2^-$ está relacionada linealmente con la actividad xantina oxidasa, que es inhibida por la SOD. Los resultados se compararon con una curva estándar de SOD realizada bajo las mismas condiciones. Una unidad SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la reducción del $\bullet\text{O}_2^-$ por minuto a 25°C y pH 7.

5.10.2 Peroxidasas totales

La actividad peroxidasa (POD) se midió de acuerdo con el método propuesto por Chance y Maehly (1955), usando guayacol como donador de H⁺. La oxidación del guayacol a tetra-guayacol es catalizada por las POD en presencia de H₂O₂ y se determinó a 450 nm por 4 min en lector de microplacas. La mezcla de reacción contenía 200 μ L de amortiguador de fosfatos de sodio (50 mM, pH 7), 10 μ L de guayacol al 1% y 10 μ L de EC. La actividad POD se calculó considerando un $\epsilon =$

26.6 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance y Maehly 1955). Una unidad de actividad POD se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de tetraguayacol por minuto a 25°C y pH 7.

5.10.3 Glutación S-transferasa

La actividad Glutación S-transferasa (GST) se determinó utilizando un kit comercial (CS0410, *Sigma*). La conjugación del glutatión (GSH) con 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) catalizada por la GST fue espectrofotométricamente monitoreada a 340 nm por 4 min. La mezcla de reacción contenía 10 μL de EC y 180 μL de solución de reacción (GSH 200 mM y CDNB 100 mM en amortiguador Dulbecco a pH 7). La actividad GST se calculó con la tasa de reacción inicial considerando un ε = 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ (Habig y Jakoby 1981). Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de 1 nmol del conjugado GS-DNB por minuto a 25°C y pH 7.

5.10.4 Estimación de índices relativos de actividad enzimática

Con el fin de evaluar el efecto de *Lewia* sp. o la MHC sobre la actividad enzimática de *F. arundinacea*, se estimaron cuatro índices relativos relacionando las actividades enzimáticas obtenidas en cada tratamiento realizado en el suelo modelo.

$$I_1 = ((Fa - L) / Fa) - 1 \quad (3)$$

$$I_2 = ((Fa - L + MHC) / (Fa + MHC)) - 1 \quad (4)$$

$$I_3 = ((Fa + MHC) / Fa) - 1 \quad (5)$$

$$I_4 = ((Fa - L + MHC) / (Fa - L)) - 1 \quad (6)$$

Donde,

Fa, corresponde a la planta sola.

Fa-L, corresponde a la asociación endófito planta-hongo.

Fa + MHC, corresponde a la planta sola expuesta a la mezcla de hidrocarburos, y

Fa-L + MHC, corresponde a la asociación endófito planta-hongo expuesta a la mezcla de hidrocarburos.

Las ecuaciones (3) y (4) estiman el efecto de *Lewia* sp. sobre plantas de *F. arundinacea* cultivadas en ausencia y en presencia de la MHC, respectivamente. Las ecuaciones (5) y (6) son una medida del efecto de la MHC sobre *F. arundinacea* creciendo sin o con *Lewia* sp., respectivamente.

5.11 Extracción y cuantificación de hidrocarburos

Para extraer la MHC residual del soporte modelo, se realizó una extracción con solventes asistida con microondas (*MARS Xpress*, CEM). Para lo anterior, a 5 g de suelo modelo seco se les adicionaron 30 mL de una mezcla diclorometano:acetona (DCM:acetona, 1:1 v/v) y se procesaron a 175-200 psig y 150 °C por 30 min. El volumen se concentró en un rotavapor (*BÜCHI*, V-800) y al volumen obtenido se le adicionó DCM (10 mL), posteriormente, se tomaron 2 mL de la mezcla final para la cuantificación de los hidrocarburos (Cruz-Hernández y col. 2013).

Los hidrocarburos extraídos se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de gases (*Shimadzu GC-2010 Plus*) con un detector de ionización de llama (FID) y una columna DB-H1T (15 m, 0.25 mm de diámetro interno × 0.10 µm de espesor de película, *Agilent*). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador, alimentado a una tasa de 2.0 mL min⁻¹. La inyección de las alícuotas fue de 1 µL en modo splitless con un auto-inyector (*Shimadzu AOC-20i*). El programa usado para la adquisición y tratamiento de datos fue LabSolutions Direct. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: temperatura inicial del horno de 100°C (2 min); la temperatura se aumentó a 200 °C a 20 °C min⁻¹ con un tiempo de permanencia de 1 min a esta temperatura; la temperatura del inyector y detector fue de 300 °C.

5.12 Análisis estadístico

Cada tratamiento se aplicó de manera aleatoria por triplicado. Se determinó normalidad y homocedasticidad de los datos, una vez que se demostró que cumplían los requisitos para realizar pruebas paramétricas, se realizó una prueba t-Student ($P < 0.05$) para comparar las medias de las variables medidas en plantas obtenidas en medio MS donde se indujo la asociación endófito. Los resultados derivados de las plantas que crecieron en suelo modelo durante la cinética fueron analizados usando ANOVA seguido de la comparación de medias usando la prueba Tukey-B ($\alpha = 0.05$). La correlación entre variables se realizó calculando coeficientes de Pearson, para dos variables dependientes. Las diferencias entre las medias se indican con letras diferentes o asteriscos. Los resultados se presentan como las medias con su desviación estándar (DE) correspondiente. Los análisis se realizaron usando el programa SPSS, versión PAWS 18 (IBM SPSS-IBM Corp, Armonk, 2009).

6. RESULTADOS

6.1 Establecimiento de la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp.

Está confirmado que las condiciones de cultivo son determinantes para el crecimiento de plantas y microorganismos en un laboratorio; estas condiciones pueden ser manipuladas y se relacionan con factores internos y externos que permiten el establecimiento y crecimiento controlado de los organismos. Entre los factores internos destacan la viabilidad y el vigor de los organismos. Entre los factores externos la temperatura, así como la disponibilidad de agua y nutrientes (Rai y col. 2008) son relevantes. En el caso de las plantas, las semillas son las estructuras que dan lugar a la propagación sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar la especie (Hardegree y Vactor 1999). Por ello, resulta importante establecer las condiciones de cultivo de semillas para la obtención de plantas sanas y la formación de asociaciones entre plantas y microorganismos.

6.1.1 Efecto de la composición del medio sobre la germinación

Las semillas dan lugar a un nuevo individuo, perpetuando y multiplicando a una especie. Para que una semilla pueda dar lugar a un individuo, las condiciones deben ser adecuadas. Dichas condiciones tienen que ver con factores ecológicos apropiados para la germinación, principalmente luz, humedad, sales minerales y temperatura (Hardegree y Vactor 1999). Con el objetivo de establecer las condiciones para la obtención de plantas sanas en tiempos cortos, las semillas de *F. arundinacea* se sembraron en ocho medios con relación carbono/nitrógeno (C/N) variable, modificando la concentración de sacarosa y sales del medio MS. En la Figura 8 se muestra el índice de germinación de semillas de *F. arundinacea*, con respecto al tiempo, en cada uno de los medios. En los primeros dos días, la germinación varió de 10 a 50%, siendo el medio con C/N de 5 y las sales MS 100% (5-1) donde se alcanzó la mayor germinación. Después de 8 días, el mayor número de semillas germinadas se obtuvo en el medio 5-1 alcanzando el 83%, mientras que, en el resto de los medios, la germinación varió entre 15 y 73% en el mismo periodo. Después de 14 días de cultivo, en ningún tratamiento se alcanzó la germinación obtenida en el medio 5-1 (83%)

Hawker, (1971) obtuvo índices de germinación mayores en semillas de maíz, en un medio con baja relación carbono-nitrógeno (C/N). Dekkers y col. (2004) reportaron mayores índices de germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* en medios con contenido bajo de glucosa. La diferencia en el rango de germinación puede deberse al azúcar utilizado (Rai y col. 2008). Se sabe que algunos genes involucrados en la germinación son regulados por la presencia de azúcares, por lo que concentraciones adecuadas, permiten una germinación de las semillas mayor en tiempos cortos (1-4 días) (Martin y col. 2002; Dekkers y col. 2004). Además de en la germinación, los azúcares afectan todo el metabolismo, así como las rutas de señalización durante la vida de la planta (Dekkers y col. 2004).

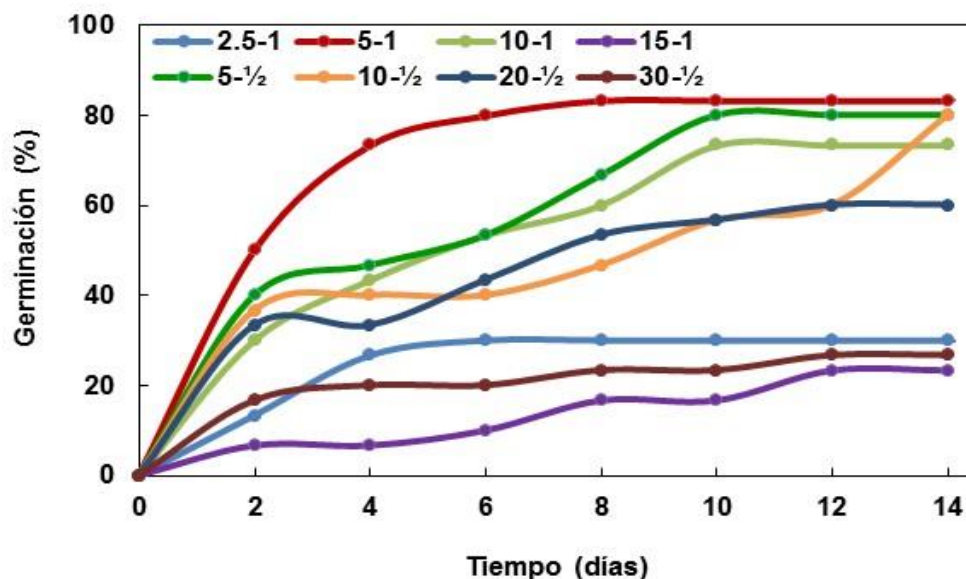


Figura 8. Índice de germinación acumulado de semillas de *F. arundinacea* durante 14 días, en medio con diferente relación de C/N y contenido de sales del medio MS(C/N-MS).

Por otro lado, la limitación de nitrógeno disminuye la germinación, debido a la inhibición en la actividad ureasa, que se coordina con la arginasa para utilizar las proteínas de reserva de las semillas en la germinación; además de ayudar a asimilar el nitrógeno exógeno, evitando la acumulación de urea (Dekkers y col. 2004). Sin embargo, el exceso de nitrógeno excede la actividad ureasa, llevando a una acumulación de urea y provocando necrosis en las plantas.

En este estudio se demostró que la germinación de *F. arundinacea* depende de la concentración de nutrientes, así como de la relación de C/N en el medio de cultivo, encontrando que concentraciones de sacarosa de 10 g L⁻¹ y sales de MS al 100% (5-1) permitieron una germinación máxima de semillas.

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó el medio 5-1 como el más adecuado para la obtención de plantas de *F. arundinacea*, dicho medio se utilizó para la germinación de semillas en los estudios posteriores.

6.1.2 Efecto de la composición del medio sobre la inducción de la asociación endófito

En la naturaleza, los organismos interactúan, dando lugar a muchos tipos de asociaciones. A su vez, la formación de una asociación, depende tanto de factores bióticos (tipo de organismo) (Cheplick y col. 1989) como abióticos (temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes) (Hadacek y Kraus 2002). Con el objetivo de establecer el tiempo y las condiciones que permitieran la formación de la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp., se evaluó el efecto de la concentración de nutrientes sobre el tiempo para inducir la asociación. Para lo anterior, se cultivaron

segmentos de raíces de *F. arundinacea* que estuvieron en contacto con *Lewia* sp. durante periodos variables (hasta 20 días), en los medios de cultivo con relaciones C/N distintas y de sales de MS. Se encontró que la asociación se estableció exitosamente después de cinco días en los medios 2.5-1, 5-1/2, 10-1/2 y 20-1/2, sin embargo, las plantas desarrolladas en estos medios presentaron clorosis (Fig. 9). En los medios 5-1 y 10-1 la asociación se formó después de 15 días de contacto (Fig. 9) y no se observó clorosis en las plantas.

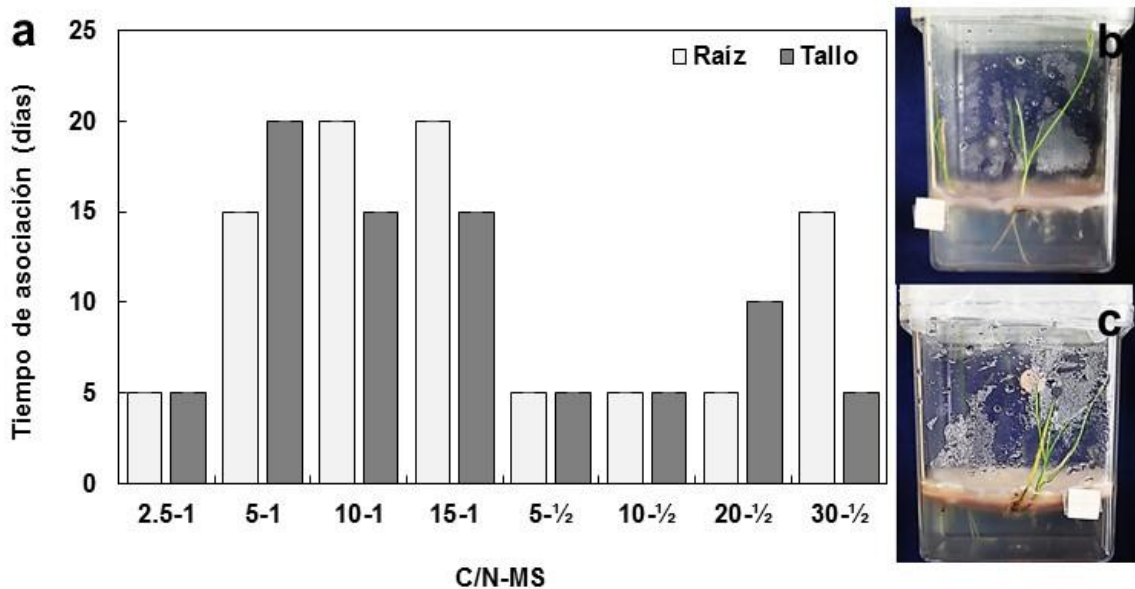


Figura 9. a) Tiempo de formación de la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. respecto a los tratamientos aplicados (C/N-MS) (media \pm DE, n=3). b) Plantas de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. en medio 5-1 (15 días). c) Plantas de *F. arundinacea* en asociación con *Lewia* sp. en medio 5-1/2, (15 días).

Rasmussen y col. (2007) encontraron que un incremento en la concentración de nitrógeno reducía al 60% en la colonización de plantas de *Lolium perenne* por el hongo endófito *Neotyphodium lolii*, esto, con relaciones C/N alrededor de 10. Lo que se atribuyó al aumento en la biomasa foliar y no a la disminución de la biomasa fúngica. Parece ser que los cambios en la C/N, generados por la modificación de la dosis de nitrógeno, afectan la colonización de plantas por endófitos, no por tener un efecto deletéreo en el microorganismo, sino debido a los cambios drásticos que ocasiona en la fisiología de la planta (Rasmussen y col. 2007). Asimismo, los cambios en la composición del medio de desarrollo de las plantas, conducen a cambios en la secreción de metabolitos que pueden funcionar como moléculas de señalización para los microorganismos; por lo que se ha concluido que el comportamiento de un endófito depende tanto del estado nutricional de la planta como de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Hadacek y Kraus 2002).

En el caso particular de la asociación de *F. arundinacea* con *Lewia* sp. la mejor condición para establecer la asociación endófito y para mantener la planta en condiciones saludables, resultó un medio con el 100% de sales de MS con una relación C/N de 5 (5-1), utilizando 10 g L⁻¹ de sacarosa.

En este estudio, también se demostró que la composición del medio, en cuanto a la relación C/N tiene un efecto sobre el tiempo de formación de la asociación endófito entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. Aunque la asociación no se establece en tiempos menores a 10 días, se seleccionó el medio 5-1 como el más adecuado para la inducción de la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. ya que, con estas condiciones, las plantas crecieron saludables hasta el término del tratamiento.

6.2 Efecto de la asociación endófito sobre *F. arundinacea*

La formación de asociaciones planta-hongo endófito puede modificar procesos fisiológicos y bioquímicos en la planta, lo anterior debido al efecto de adaptación entre ambos organismos (Tanaka y col. 2006). En el presente estudio, se encontró que la asociación tiene un efecto positivo sobre el crecimiento vegetal y que también promueve cambios en la respuesta antioxidante y el estrés oxidante de la planta en condiciones de crecimiento controladas.

6.2.1 Crecimiento

Se ha demostrado que los endófitos aumentan el crecimiento de varias especies de plantas (Bailey y col. 2006). Por lo anterior, se evaluó el crecimiento de plantas de *F. arundinacea* cultivadas en medio MS (100% de sales) con una C/N-MS de 5 (medio 5-1), con y sin el endófito *Lewia* sp. Después de 15 días de cultivo en medio semisólido, *Lewia* sp. mejoró significativamente el crecimiento de las raíces (3.4 veces) y los tallos (1.9 veces) con respecto a las plantas no inoculadas (Fig. 10). La modificación de la producción de biomasa vegetal, puede estar acompañada de cambios morfológicos y fisiológicos tanto en raíces como en hojas, lo que a su vez afecta la forma de responder a las condiciones de estrés ambiental (Torres y col. 2012).

En la Fig. 10b se observa que la presencia de *Lewia* sp. provocó la coloración café de las raíces, además de un aumento visible en su grosor. En las hojas, la presencia del hongo incrementó el ancho (Fig. 10c) y el largo. La modificación de los tejidos y las células de las plantas se ha observado en plantas de *Agrostis hyemalis* asociada con el endófito *Epichloë amarillans* (White y col. 1997), así como en *F. arundinacea* asociada con el endófito *Neotyphodium coenophialum* (Soleimani y col. 2010). De hecho, se sabe que los endófitos pueden mejorar el crecimiento de las plantas a través de mecanismos como la regulación de la producción de fitohormonas, cambios morfológicos en la raíz y aumento en la captura de nutrientes (Mei y Flinn 2010; Porrás-Alfaro y Bayman 2011).

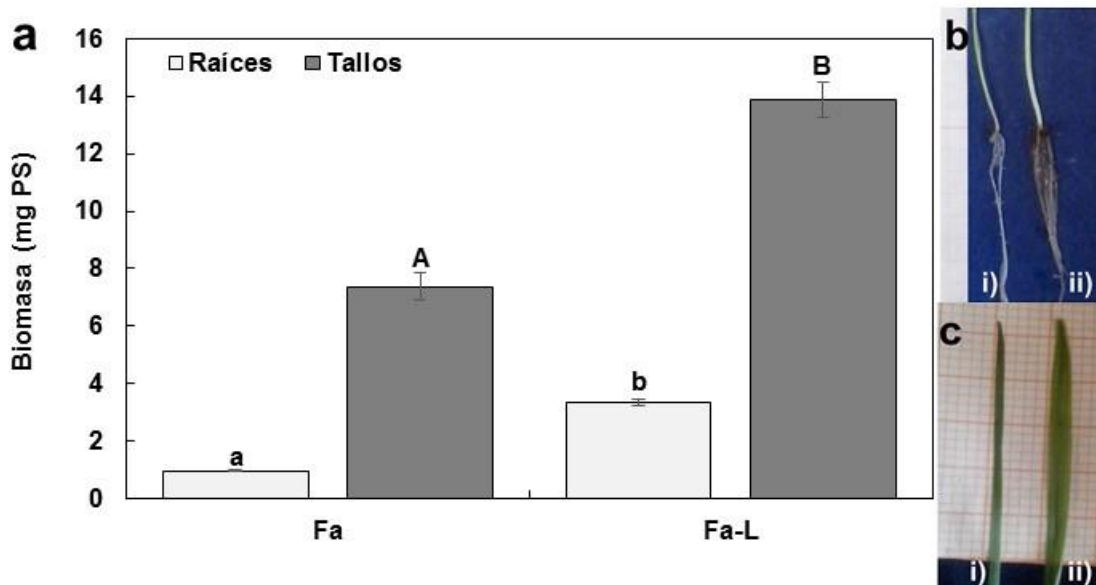


Figura 10. a. Efecto de la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. sobre la producción de biomasa en raíces y tallos después de 15 días de contacto, letras distintas (minúsculas para raíces, mayúsculas para tallos) indican diferencias significativas ($p < 0.01$, $n=12$). b. raíces i) no asociadas (Fa) y ii) asociadas (Fa-L). c. hojas i) no asociadas y ii) asociadas.

Otros mecanismos que inciden en el crecimiento, incluyen la sobreproducción y el control de moléculas de señalización como el H_2O_2 (White y Torres 2010). El H_2O_2 induce la respuesta de enzimas de las vías de señalización, requeridas por las plantas para generar resistencia contra microorganismos. A su vez, las enzimas de estas vías tienen diversas actividades, entre las que se incluyen la degradación de proteínas y la señalización hormonal. Algunas enzimas de señalización inducidas por el H_2O_2 , se encuentran implicadas en la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que controlan la activación de diferentes mecanismos de defensa en respuesta al estrés por ERO (Tripathy y Oelmüller 2012). Sin embargo, el exceso de H_2O_2 podría causar daños en las células vegetales, por lo que resulta importante monitorear este parámetro junto con otros marcadores del estrés oxidante.

6.2.2 Daño oxidante

El H_2O_2 es una ERO producida de manera natural en las plantas, opera como molécula de señalización durante el crecimiento y puede ser producida en exceso durante el establecimiento de asociaciones planta-microorganismo (Cheeseman 2006). Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de la inducción de la asociación endófitas sobre la producción de H_2O_2 en *F. arundinacea*.

La inducción *in vitro* de la asociación endófitas entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. incrementó significativamente la acumulación de H_2O_2 en raíces y tallos (3.4 y 4.8 veces, respectivamente) comparado con las plantas no inoculadas (Tabla 4). Una respuesta similar se registró durante la

simbiosis entre *Gigaspora margarita* y dos leguminosas (Lanfranco y col. 2005), y entre *Pisolithus tinctorius* y *Castanea sativa* (Baptista y col. 2007).

Tabla 4. Efecto de la inducción de la asociación endófito entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. sobre la acumulación de H₂O₂ y el daño oxidante (MDA y CO), después de 15 días de contacto.

Variable respuesta	Raíces		Tallos	
	<i>F. a</i>	<i>F. a-L</i>	<i>F. a</i>	<i>F. a-L</i>
H ₂ O ₂ (nmol g ⁻¹ PF)	92.8 ± 3.0 ^a	313.8 ± 13.6 ^b	94.2 ± 2.9 ^A	466.4 ± 22.2 ^B
MDA (nmol g ⁻¹ PF)	11.4 ± 2.2 ^a	33.9 ± 0.9 ^b	37.8 ± 2.8 ^A	46.3 ± 1.4 ^B
Grupos CO (μmol g ⁻¹ proteína)	461.9 ± 29 ^b	163.6 ± 10 ^a	349.4 ± 9 ^B	193.2 ± 11 ^A

* Medias con letras diferentes (minúsculas para raíces, mayúsculas para tallos) indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05). Tratamientos por órgano (medias ± DE, n = 3 para tallos, n = 2 para raíces).

Este incremento podría deberse a un déficit de nutrientes en el medio debido al crecimiento del hongo o a un aumento en la producción de ERO por *Lewia* sp. El déficit de nutrientes como el K⁺ puede incrementar la acumulación de H₂O₂ y etileno (Shin y Schachtman 2004). Así mismo, se ha demostrado que los endófitos sobreproducen ERO para inactivar la defensa de la planta, manteniendo así el mutualismo (Tanaka y col. 2006). Además, la sobreproducción de ERO durante la simbiosis planta-hongo endófito podría ser una manera de controlar la proliferación del hongo (Nanda y col. 2010). La sobreproducción de ERO conduce a un incremento en la oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos de membrana. El malondialdehído (MDA) es el producto final de la peroxidación lipídica y sus niveles indican el daño en la membrana celular (Hu y col. 2015).

En raíces y tallos de *F. arundinacea*, el contenido total de H₂O₂ y MDA se incrementó significativamente por efecto de *Lewia* sp. (Tabla 4), lo anterior puede atribuirse a la disminución de la defensa antioxidante en la planta para mantener la asociación (Tanaka y col. 2006). En contraste, los grupos carbonilo (grupos CO) disminuyeron (~2 veces) en las plantas asociadas en comparación con las plantas no asociadas. Lo anterior pudo deberse a dos procesos: (i) reparación de las proteínas dañadas por la vía de las chaperonas; y/o (ii) proteólisis de las proteínas oxidadas que no tienen reparación (Vallentine y col. 2014; Pulido y col. 2017). Uno o ambos procesos podrían haberse incrementados por la presencia de *Lewia* sp. Nuestros resultados sugieren que, con el fin de establecer la asociación con *F. arundinacea*, *Lewia* sp. incrementó la producción de ERO y la oxidación de lípidos de membrana, mientras promovió la eliminación de proteínas oxidadas de la planta en cultivo en medio semisólido. Aunado a lo anterior, las asociaciones endófitas también pueden promover cambios en la expresión y actividad de enzimas involucradas en la defensa antioxidante (Dupont y col. 2015).

6.2.3 Defensa antioxidante

Varias enzimas actúan en la defensa antioxidante de las plantas y su actividad puede ser modificada por la presencia de microorganismos endófitos (Tanaka y col. 2006). La superóxido dismutasa (SOD) es la primera defensa enzimática antioxidante e interviene en la detoxificación de ERO mediante la catálisis de la conversión de $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 , este último es degradado por catalasas y peroxidasas (Becerra-Castro y col. 2013). Las peroxidasas (POD) tienen más afinidad por el H_2O_2 que las CAT, y se consideran un marcador del estrés (Kvesitadze y col. 2009). Por lo tanto, se evaluó el efecto de la inducción de la asociación endófito sobre la defensa enzimática antioxidante en plantas de *F. arundinacea*.

La actividad SOD en raíces de *F. arundinacea* disminuyó (1.5 veces) después de 15 días de contacto con el hongo, mientras que, en tallos la asociación no modificó esta actividad (Tabla 5). Las raíces son el primer punto de contacto entre el hongo y la planta y, por lo tanto, son el primer punto de supresión en la defensa antioxidante para facilitar la formación de la asociación (Bailey y col. 2006). La actividad POD, por otra parte, fue dos veces menor en los tallos que en las raíces, particularmente en las plantas asociadas (Tabla 5). Mientras que *Lewia* sp. no modificó de manera significativa esta actividad en las raíces, el hongo causó una disminución (1.5 veces) en los tallos. Lo anterior pudo deberse a la presencia de enzimas como las catalasas que contribuyen a contrarrestar la acumulación de H_2O_2 (Mhamdi y col. 2010).

Tabla 5. Efecto de la inducción de la asociación endófito entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. sobre la defensa antioxidante (SOD, POD y GST)*.

Actividad enzimática (U g ⁻¹ proteína)	Raíces		Tallos	
	<i>F. a</i>	<i>F. a-L</i>	<i>F. a</i>	<i>F. a-L</i>
SOD	1280 ± 168 ^b	811 ± 93 ^a	3990 ± 271 ^A	3732 ± 572 ^A
POD	1022 ± 100 ^a	1174 ± 62 ^a	821 ± 113 ^B	552 ± 39 ^A
GST	84.8 ± 4.6 ^b	11.0 ± 1.2 ^a	135.6 ± 6.3 ^B	40.2 ± 3.9 ^A

* Medias con diferentes letras (minúsculas para raíces, mayúsculas para tallos) indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05). Los valores son las medias ± DE (n = 3 para tallos, n = 2 para raíces).

Otro grupo de enzimas que contribuye de forma importante en la defensa antioxidante y en procesos de detoxificación de xenobióticos, son las GST. Éstas, catalizan la conjugación de compuestos endógenos y exógenos con el glutatión (GSH) y tienen un papel importante en el desarrollo de las plantas y su respuesta a condiciones de estrés abiótico y biótico (Dixit y col. 2011; Kumar y col.

2013). Se ha encontrado que la expresión génica de las GST se relaciona con la tolerancia y susceptibilidad de las plantas a hongos (Kumar y col. 2013). Los microorganismos endófitos pueden modificar su actividad y expresión (Zhang y col. 2010), lo que puede cambiar la producción de hormonas y/o ERO. Comparado con las plantas no inoculadas, la actividad GST de raíces y tallos fue significativamente menor (7.7 y 3.4 veces, respectivamente) en respuesta a la inducción de la asociación. Contrario a lo anterior, Bailey y col. (2006) encontraron un incremento en la actividad GST de plantas de *Theobroma cacao* en asociación con *Trichoderma hamatum*-DIS 219b. El decremento en la actividad GST, en las plantas asociadas, sugiere que esta actividad es reprimida durante el establecimiento y mantenimiento de la asociación.

Factores bioquímicos, además de la producción de ERO y la acción del sistema antioxidante, están involucrados en la señalización del estrés (Baxter y col. 2013) y pueden facilitar la interacción planta-endófito a nivel bioquímico (Tanaka y col. 2006). Se ha reportado que los cambios bioquímicos debidos a la formación de asociaciones pueden contribuir al aumento en la tolerancia y crecimiento de las plantas expuestas a estresores como HAP (Debiane y col. 2009), metales pesados (Ahmad 2011) y sequías (Tiwari y col. 2016). Como se observa en la Tablas 5, los resultados del presente estudio sugieren que, con el fin de establecer la asociación con *F. arundinacea*, *Lewia* sp. promueve la reducción de la actividad de enzimas involucradas en la defensa antioxidante de la planta en cultivo semisólido.

El uso de cultivo semisólido para este tipo de estudios, permite eliminar la complejidad del uso de suelos, sin embargo, se aleja de lo que sucede realmente en la naturaleza. Con el propósito de aproximarse a las condiciones físicas de un suelo, pero evitando la interferencia de otros organismos o sustancias diferentes a las utilizadas en el estudio, en el presente se empleó un suelo modelo. El uso de los suelos modelo permiten este tipo de acercamiento, ya que su modificación en el transcurso de los experimentos es mínima y pueden retener agua y nutrientes (Alkan y col. 2005). Con base en lo anterior, para evaluar la tolerancia de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. a una mezcla de hidrocarburos, se utilizó un suelo modelo como soporte de crecimiento.

6.3 Evaluación de la tolerancia a hidrocarburos en un suelo modelo

Se ha demostrado que contaminantes orgánicos como los HAP afectan el metabolismo de las plantas, alterando su crecimiento y supervivencia (Lin y col. 2002). El efecto adverso de ambos factores puede modificarse a través de asociaciones endófitas particulares (Porrás-Alfaro y Bayman 2011).

6.3.1 Supervivencia de *F. arundinacea* y la asociación endófito

El éxito de una planta para la fitorremediación depende de factores como la concentración y naturaleza de los contaminantes, así como de las condiciones del suelo y de su tolerancia a los contaminantes, lo anterior permitirá o no, el establecimiento de la planta en un sitio contaminado (Debiane y col. 2009). Por lo anterior, resulta importante determinar la tolerancia de una planta a un contaminante en particular. En este estudio, se evaluó la tolerancia, medida a través de la supervivencia y el crecimiento, de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. a concentraciones crecientes de una mezcla de hidrocarburos (MHC) en un suelo modelo.

En ausencia de la MHC se observó una disminución (50%) en la supervivencia de las plantas no asociadas, después de 45 días de cultivo. Al aumentar la concentración de la MHC la supervivencia disminuyó hasta ser nula en la concentración más alta de la MHC (Fig. 11). La baja supervivencia de *F. arundinacea* en el suelo modelo sin la MHC se atribuyó a una baja disponibilidad de nutrientes. Se sabe que la supervivencia de las plantas en un suelo depende de la disponibilidad de nutrientes, lo cual repercute en su salud (Andersson y Milberg 1998). Los procesos de desarrollo de las plantas están controlados por señalizaciones moleculares que dependen del suministro adecuado de nutrientes minerales (Dakora y Phillips 2002). En contraste, se encontró un 97.9% de supervivencia en las plantas asociadas con *Lewia* sp. cultivadas en el suelo modelo sin contaminantes (Fig. 11). Sin embargo, la supervivencia también disminuyó al aumentar la concentración de hidrocarburos, encontrando que el 25% de las plantas asociadas sobreviven en la concentración más alta de la MHC (1276 mg kg⁻¹). A pesar de esta disminución, la asociación de *F. arundinacea* con *Lewia* sp. incrementó (~2 veces) la supervivencia de las plantas en el suelo modelo sin contaminantes con respecto a las plantas no asociadas.

Reynoso-Cuevas y col. (2008), encontraron 100% de supervivencia de *F. arundinacea* en un medio semisólido contaminado con una mezcla de hidrocarburos (pireno, fenantreno, benzo[a]pireno y petróleo crudo maya), en un intervalo de concentraciones de 500 a 4000 mg kg⁻¹. La diferencia en la supervivencia de las plantas entre ambos estudios puede atribuirse al soporte de crecimiento que, el medio semisólido utilizado, permite la disponibilidad total de los nutrientes. En el presente estudio se evaluó el efecto de dos factores estresantes sobre las plantas, la baja disponibilidad de nutrientes y la presencia de hidrocarburos en el suelo modelo. De hecho, se ha demostrado que hidrocarburos como el fenantreno y el pireno pueden quedar adsorbidos o acumulados en las células de la raíz, impidiendo el paso del agua y los nutrientes (Gao y Zhu 2004), lo que puede causar la baja supervivencia de las plantas de *F. arundinacea*.

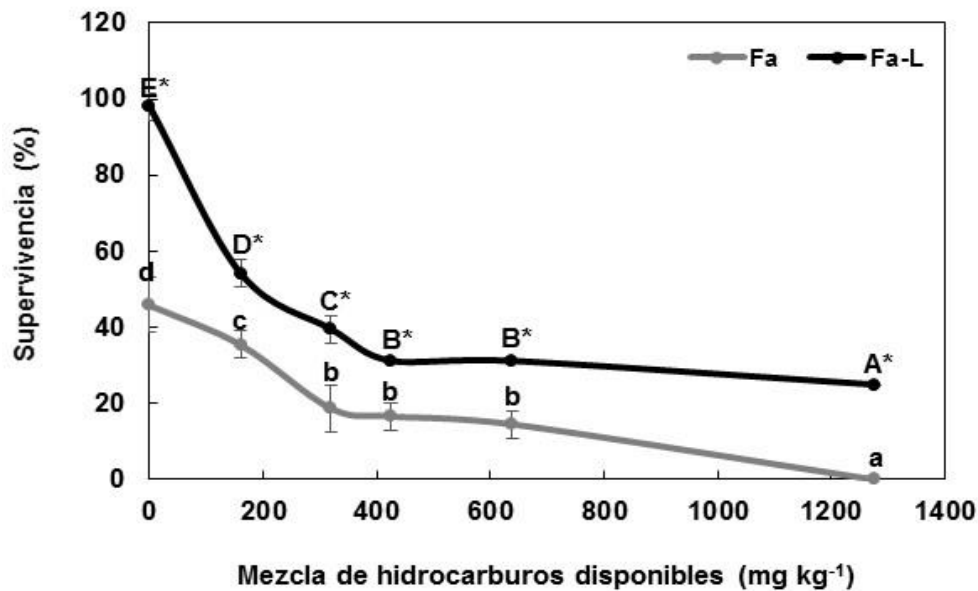


Figura 11. Supervivencia de *F. arundinacea* (Fa) y la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. (Fa-L) después de 45 días de exposición a concentraciones crecientes de la MHC. Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de concentración, los asteriscos indican diferencias significativas entre plantas no asociadas (Fa) y asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n \geq 3$ cajas con 16 plantas cada una).

La presencia de hongos endófitos, como *Chaetomium globosum* (Schulz y col. 2002) y *Penicillium janthinellum* (Khan y col. 2011), beneficia a las plantas por la producción de metabolitos (alcaloides, antibióticos o reguladores de crecimiento) y por cambios en la composición de exudados radiculares que modifican físicamente el suelo, aumentando la disponibilidad de nutrientes. Así, nuestros resultados (Fig. 11), indican que la asociación de *F. arundinacea* con *Lewia* sp. promueve la supervivencia de las plantas en el suelo modelo sin y con contaminantes. Lo anterior, podría atribuirse a una modificación en el metabolismo de la planta, además de que *Lewia* sp. incrementa la disponibilidad de nutrientes del suelo modelo.

6.3.2 Crecimiento de *F. arundinacea* y la asociación endófito

Uno de los parámetros usados para determinar la tolerancia de las plantas a los contaminantes es la cuantificación del crecimiento. Una manera de evaluarlo, es la medición de la biomasa y la elongación de las raíces y tallos (Lin y col. 2002). En este estudio, se evaluó el efecto de la concentración de la MHC sobre la producción de biomasa vegetal y la elongación de raíces y tallo de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea*-*Lewia* sp. durante 45 días en el suelo modelo (Fig. 12).

6.3.2.1 Elongación de raíces y tallos

El análisis realizado en las plantas no asociada mostró que, después de 45 días de cultivo, no hubo un efecto significativo en la elongación de las raíces por efecto de la MHC. En contraste, en las raíces

asociadas, los contaminantes provocaron un aumento significativo (20%) con respecto al control. La comparación entre las plantas asociadas y no asociadas permite observar que *Lewia* sp. provocó una disminución significativa (~1.5 veces) en la longitud de las raíces de *F. arundinacea* en comparación con las plantas no asociadas (Fig. 12a). Para el caso de los tallos, la elongación de las plantas no asociadas expuestas a 319 mg kg⁻¹ de la MHC inicial disponible disminuyó significativamente. En las plantas asociadas, la disminución se registró a partir de la exposición a 160 mg kg⁻¹ de la MHC inicial disponible (Fig. 12b). Sin embargo, la longitud de los tallos de *F. arundinacea* fue significativamente mayor (~1.6 veces) en las plantas asociadas con *Lewia* sp. respecto de las no asociadas (Fig. 12b).

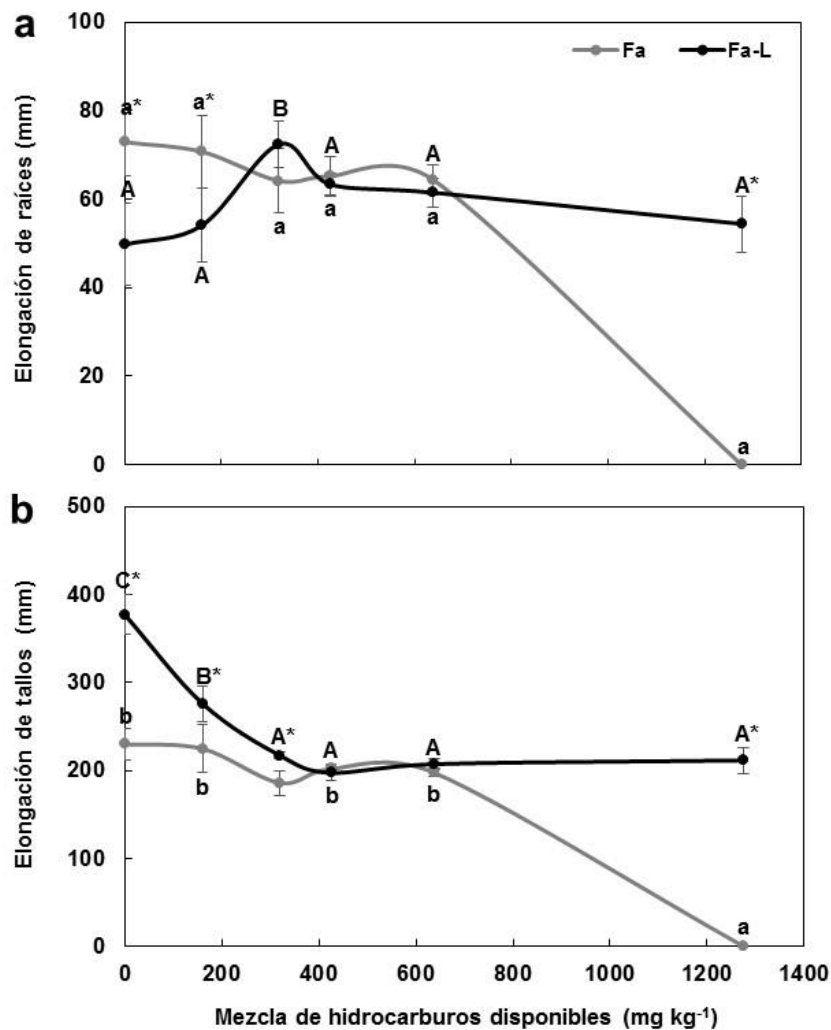


Figura 12. Elongación de a) raíces y b) tallos de *F. arundinacea* (Fa) y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. (Fa-L) después de 45 días de exposición a concentraciones crecientes de la MHC. Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de concentración, los asteriscos indican diferencias significativas entre plantas no asociadas (Fa) y asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n \geq 12$).

Las gramíneas como *F. arundinacea* son especies comúnmente seleccionadas para su uso en la fitorremediación de suelos contaminados con herbicidas, metales pesados e hidrocarburos por su extenso crecimiento radicular (Zhao y col. 2013). Sin embargo, esta característica puede modificarse por la presencia de los contaminantes, así como se observa en los resultados mostrados en la Figura 12. Al respecto, Reynoso-Cuevas y col. (2008) reportaron una reducción del 50% en la elongación de raíces de cinco gramíneas (*F. arundinacea*, *Cenchrus ciliaris*, *Bouteloua curtipendula*, *Echinochloa crusgalli* y *Rhynchelytrum repens*) expuestas por 40 días a 1000 mg kg⁻¹ de una MHC compuesta por fenantreno, pireno, benzo[a]pireno y petróleo crudo maya. La diferencia en el efecto de la MHC en el estudio de Reynoso-Cuevas y col. (2008) y el presente trabajo, podría deberse a la composición de la MHC, ya que, en dicho estudio, la mezcla contiene compuestos con mayor disponibilidad y toxicidad para las plantas (benzo[a]pireno y petróleo crudo maya).

En plantas sometidas a estrés, la respuesta morfológica también depende del tipo de contaminantes y del órgano en estudio (Gao y Zhu 2004). Por ejemplo, Lin y col. (2002) demostraron que concentraciones de 14000 y 29000 mg kg⁻¹ de aceite combustible provocaron aumento significativo en la elongación de tallos de *Spartina alterniflora*. Sin embargo, una concentración mayor (171000 mg kg⁻¹) del contaminante disminuyó de forma importante la elongación. Reynoso-Cuevas y col. (2008) observaron una disminución en la elongación de tallos de cinco gramíneas expuestas a 500 mg kg⁻¹ de una MHC (fenantreno, pireno, BaP y petróleo crudo maya). La alteración en la elongación de los tallos puede atribuirse a alteraciones fisiológicas en la raíz, las cuales modifican el transporte de agua y nutrientes a través del xilema de un órgano a otro (Gao y Zhu 2004). Cruz-Hernández y col. (2013), también encontraron una reducción significativa (31%) en la elongación de tallos de plantas de *F. arundinacea* asociadas con *Lewia* sp. expuestas a 1500 mg kg⁻¹ de una MHC (hexadecano, fenantreno y pireno) por 45 días. La diferencia entre los resultados del trabajo mencionado y el nuestro, se puede deber a que en su estudio las plantas se regaban dos veces por semana con una solución de nutrientes (Long-Ashton) y en nuestro estudio los riegos fueron con agua cada cinco días.

De acuerdo con los resultados (Fig. 12), la elongación de raíces y tallos no resultó ser una variable sensible a cambios en la concentración de una MHC, tal que permita cuantificar la tolerancia de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. Por lo anterior, y con el fin de cuantificar la tolerancia para esta planta y esta asociación en particular, se determinó el crecimiento a través de la producción de biomasa y el contenido de clorofilas.

6.3.2.2 Producción de biomasa

La biomasa vegetal es uno de los parámetros más utilizados para determinar los efectos fitotóxicos de contaminantes como los hidrocarburos (Lin y col. 2002). La MHC redujo significativamente (desde 15 y hasta 47%) la biomasa de las raíces de plantas de *F. arundinacea* no asociadas desde la dosis

más baja estudiada. En las plantas asociadas la biomasa de las raíces disminuyó, pero a partir de una concentración de 319 mg kg⁻¹ de la MHC inicial disponible. La biomasa de las raíces asociadas fue significativamente mayor (~2 veces) que, en las no asociadas, tanto en ausencia como en presencia de la MHC (Fig. 13a).

En el caso de los tallos, se observó que concentraciones de la MHC mayores a 319 mg kg⁻¹, causaron una disminución significativa (32-45%) en la biomasa de plantas no asociadas. En la concentración máxima ensayada, las plantas se encontraron totalmente cloróticas, y, por lo tanto, se consideraron muertas, por lo que la producción de biomasa fue considerada como nula (Fig. 11-13). En los tallos de plantas asociadas con *Lewia* sp. la biomasa disminuyó (15%) por efecto de la MHC. Sin embargo, la biomasa de los tallos en las plantas asociadas fue significativamente mayor (1.5-2.2 veces) que la obtenida en los tallos de las plantas no asociadas, sin importar la concentración de la MHC (Fig. 13b).

Similar a nuestros resultados, se ha observado el efecto de reducción en la biomasa de raíces y tallos de *F. arundinacea* sola (Cheema y col. 2009) y en asociación con *Lewia* sp. (Cruz-Hernández y col. 2013) por exposición a HAP. Lo anterior, puede atribuirse a una reducción en la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo modelo contaminado (Cheema y col. 2009) y a la toxicidad de los hidrocarburos (Gao y Zhu 2004). Otra posibilidad podría ser la translocación y el metabolismo de los hidrocarburos en los tallos (Gao y Zhu 2004). De hecho, se sabe que la acumulación de compuestos tóxicos en los tallos causa alteraciones en los sistemas fotosintéticos, provocando un déficit en la nutrición de las plantas y con ello en su crecimiento (Wei y col. 2014), lo cual podría estar sucediendo en el caso de *F. arundinacea*.

A pesar de que el efecto de los contaminantes en ambos grupos de plantas es similar, la presencia del endófito provocó que la biomasa vegetal siempre fuera mayor que en las plantas no asociadas. Al respecto, Soleimani y col. (2010), observaron que la biomasa de raíces y tallos de *F. arundinacea* y *F. pratensis* era significativamente mayor (~1.5 veces) al asociar las plantas con los endófitos *Neotyphodium coenophialum* y *N. uncinatum* crecidas en un suelo contaminado con 8.5 ± 0.9 mg kg⁻¹ de HAP. Cruz-Hernández y col. (2013) también observaron que la biomasa de raíces de *F. arundinacea* era significativamente mayor (~1.7 veces) que en plantas no asociadas y expuestas a una MHC en un suelo modelo contaminado.

El aumento en la biomasa de gramíneas como *F. arundinacea* podría deberse a cambios en la respuesta fisiológica, que incluyen aumentos en los niveles de fitohormonas de crecimiento (Kuldaua y Bacon 2008) y mejora en el transporte de nutrientes (Mei y Flinn 2010). De hecho, uno de los

efectos positivos de las asociaciones endófitas, es el aumento en la tolerancia y crecimiento de las plantas expuestas a agentes estresores (Debiane y col. 2009; Ahmad 2011; Tiwari y col. 2016).

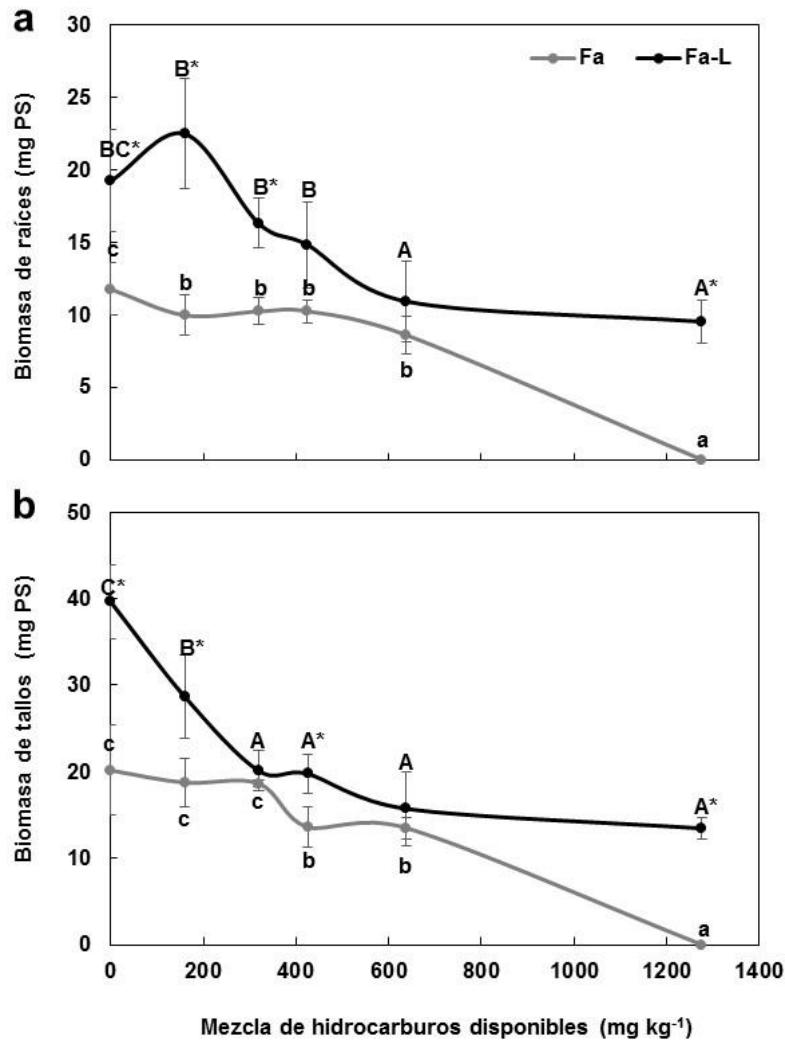


Figura 13. Producción de biomasa de a) raíces y b) tallos de *F. arundinacea* (Fa) y la asociación endófitas *F. arundinacea-Lewia* sp. (Fa-L) expuestas a concentraciones crecientes de la MHC durante 45 días. Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de un mismo factor. Asteriscos indican diferencias significativas entre plantas no asociadas (Fa) y asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n \geq 8$).

6.3.2.3 Contenido de clorofilas

Las modificaciones en la biomasa de tallos de plantas de *F. arundinacea* asociadas y no asociadas son el resultado de un conjunto de variaciones bioquímicas relacionadas con el estado nutricional de las plantas; esto, a su vez, puede relacionarse con los niveles de clorofila en los tallos, ya que se consideran un indicador sensible, tanto al estrés abiótico (Yang y col. 2010) como al biótico (Li y col. 2014). En el presente trabajo, después de 45 días de crecimiento, el contenido de ambas clorofilas en plantas expuestas o no a la MHC aumentó significativamente (2-4 veces) en respuesta a la

presencia de *Lewia* sp. (Fig. 14). En las plantas expuestas a la MHC, el contenido de ambas clorofilas decreció, siendo mayor la pérdida en la clorofila *a* (Fig. 14b).

En general, la MHC provocó una reducción (~40-90%) en el contenido de clorofila *a* y *b*, en las plantas no asociadas. En las plantas asociadas, ambas clorofilas fueron entre ~70 y 80% menores que en las plantas control (Fig. 14).

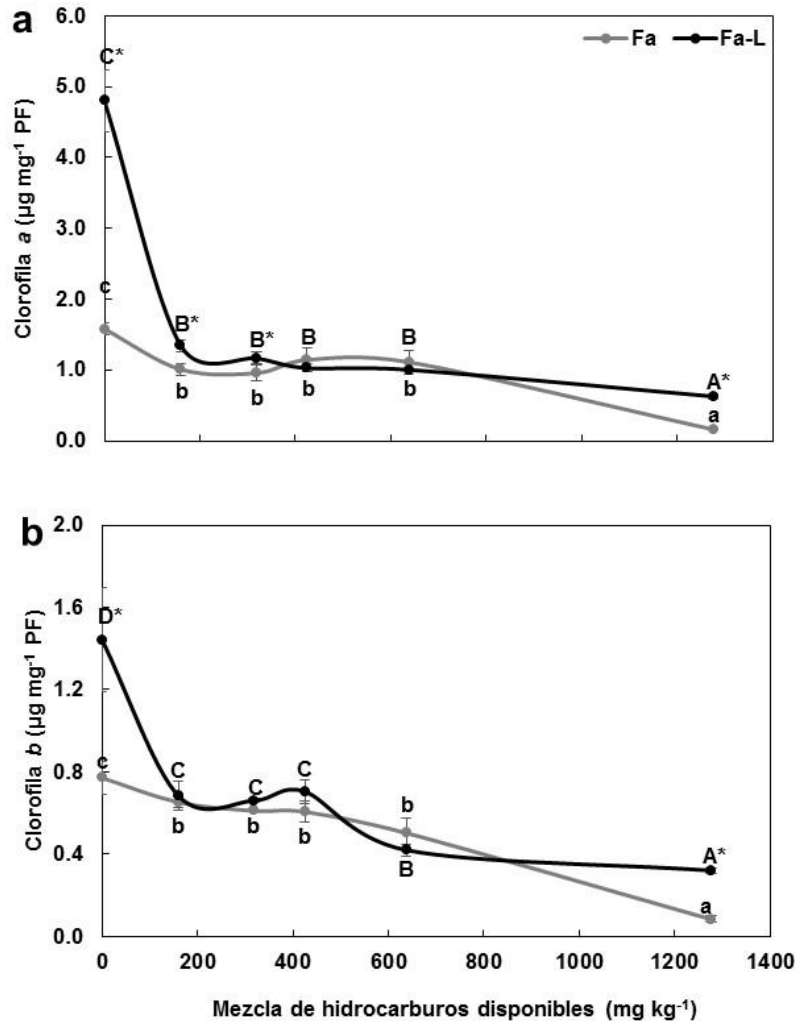


Figura 14. Concentración de a) clorofila *a* y b) clorofila *b* ($\mu\text{g mg}^{-1} \text{PF}^{-1}$) *F. arundinacea* (Fa) y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. (Fa-L) después de 45 días de exposición a concentraciones crecientes de la MHC. Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de un mismo factor. Asteriscos indican diferencias significativas entre plantas no asociadas (Fa) y asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n \geq 3$).

La concentración de clorofilas en plantas expuestas a hidrocarburos ha sido utilizada como una medida del estrés oxidante. Al respecto, Wei y col. (2014) reportaron una disminución (56%) en la concentración de clorofilas *a* y *b* en plantas de trigo expuestas a 200 mg kg^{-1} de fenantreno. Lo que fue atribuido a una ineficiente transferencia de energía, que resulta en la generación del estado de

tripleto de las clorofilas, las que reaccionan con tripletes de oxígeno produciendo el altamente reactivo oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) muy reactivo; esto conduce a la generación de estrés oxidante en las plantas (Wei y col. 2014). La generación de estrés por hidrocarburos en las plantas provoca cambios morfológicos, lo que podría relacionarse con el descenso en la biomasa y la elongación observadas en las raíces y tallos (Fig. 12 y 13).

Se sabe que la asociación entre plantas y endófitos modifica la producción de clorofilas. Similar al presente trabajo, Waqas y col. (2012) encontraron un aumento en el contenido de clorofilas *a* y *b* en plantas de *Cucumis sativus* asociadas con *Phoma glomerata* y *Penicillium* sp. no sometidas a estrés. El aumento en la concentración de clorofilas en las plantas control asociadas, puede relacionarse con un aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en el ciclo de Calvin y en la ruta de tetrapirrol, donde se producen clorofilas (Dupont y col. 2015). La fotosíntesis es un proceso modificado por la presencia de endófitos (Tripathy y Oelmüller 2012) que durante el metabolismo de los hidrocarburos modifican la estructura de los cloroplastos y el cierre de los estomas. En el caso particular de la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. crecida en ausencia de hidrocarburos, el aumento en el contenido de clorofilas se conserva aún bajo condiciones de estrés por falta de nutrientes y por exposición a los contaminantes.

Comparando todas las variables utilizadas para cuantificar el crecimiento, la producción de biomasa de los tallos de plantas no asociadas, fue la más sensible a la MHC, ya que disminuyó más con respecto a las plantas control y con las plantas asociadas. Por lo que, la biomasa de tallos se utilizó para estimar el índice de tolerancia (IT) a la presencia de concentraciones crecientes de la MHC (Fig. 15).

Con base en los datos calculados para el IT, se encontró una Cl_{50} cercana a 757 mg kg^{-1} para *F. arundinacea* y de 1100 mg kg^{-1} para las plantas asociadas, lo que muestra que *Lewia* sp. provoca un incremento en la tolerancia de *F. arundinacea* (Fig. 15). El IT obtenido para las plantas no asociadas se usó como referencia para definir una concentración sub-inhibitoria (sub- Cl_{50}) de la MHC, tal que estimulara los mecanismos de defensa antioxidante sin alterar la producción de biomasa en tallos. Por lo anterior, para los estudios cinéticos, se seleccionó una sub- Cl_{50} de 800 mg kg^{-1} de la MHC, lo que corresponde a $275.72 \text{ mg kg}^{-1}$ disponibles de la MHC.

Nuestros resultados difieren de los reportados por Cheema y col. (2009), quienes encontraron una inhibición del ~50% en la producción de biomasa de tallos de *F. arundinacea* por exposición a concentraciones de hidrocarburos menores que las usadas en nuestro estudio (680 mg kg^{-1}), sugiriendo que esta reducción es inherente a la toxicidad de los hidrocarburos. Por otro lado, Soleimani y col. (2010) encontraron que la biomasa de tallos de *F. arundinacea* y *F. pratensis*

asociadas con *N. coenophialum* y *N. uncinatum* se reducía en un 50% por exposición a 8.5 ± 0.9 mg kg^{-1} de una mezcla de HAP.

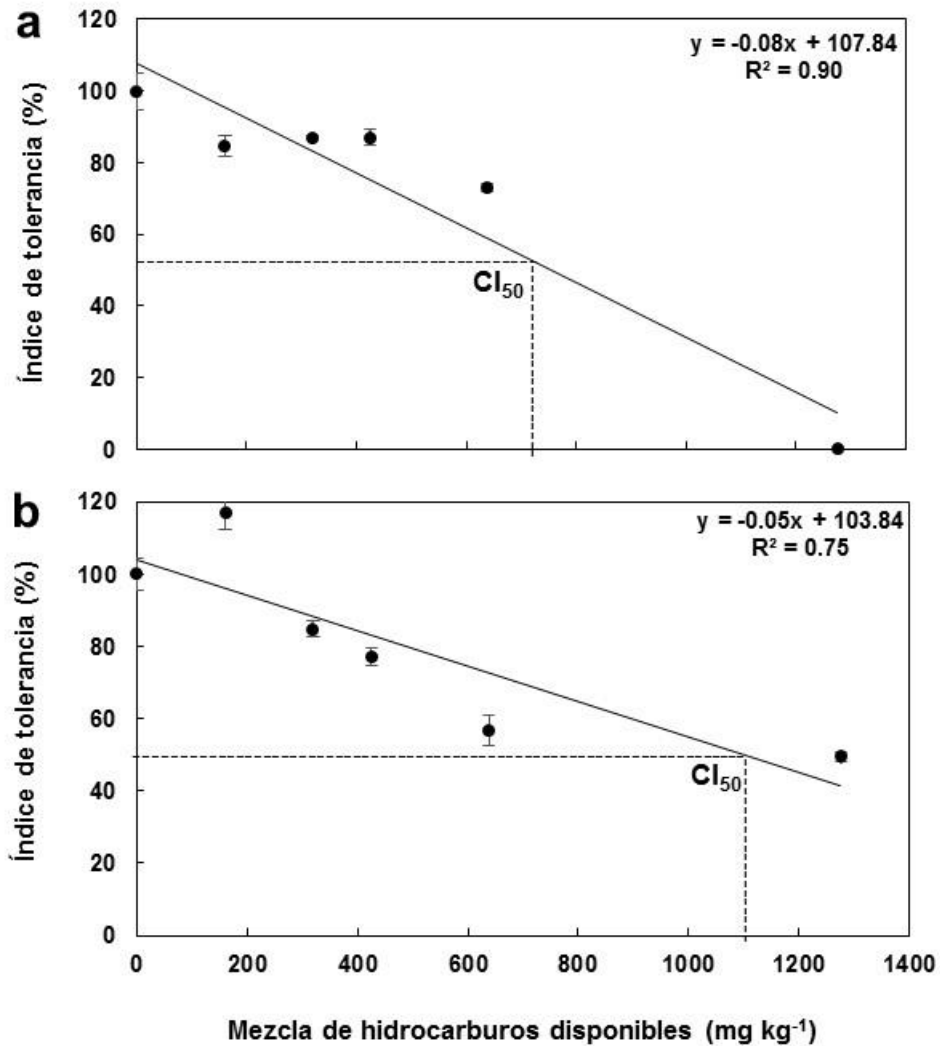


Figura 15. Índices de tolerancia de a) *F. arundinacea* y b) *F. arundinacea-Lewia* sp. expuestas a concentraciones crecientes de una mezcla de hidrocarburos durante 45 días. La línea punteada indica el valor considerado para la estimación de la CI_{50} ($p < 0.001$, $n = 3$)

La inhibición en el crecimiento de los tallos podría atribuirse al metabolismo del fenantreno y el pireno en este tejido, ya que implica la formación de compuestos tóxicos en la planta (Narro y col. 1992), lo anterior podría estar provocando modificaciones en la expresión de proteínas implicadas en la defensa antioxidante y la actividad fotosintética, afectando su crecimiento. Aunado al estrés causado por los contaminantes, la falta de nutrientes que se observó (Fig. 11-14) en el suelo modelo disminuyó la supervivencia de las plantas, este resultado nos llevó a modificar la concentración de los nutrientes para asegurar que el estrés generado en las plantas solas o asociadas se debía a la MHC, los resultados se muestran a continuación.

6.3.3 Efecto de la concentración de nutrientes

Debido a la baja supervivencia registrada en los experimentos en suelo modelo en ausencia de contaminantes (Fig. 11), se evaluó el efecto de la concentración de nutrientes sobre la supervivencia y la incidencia de clorosis visual de las plantas no asociadas crecidas por 45 días (Fig. 16). Las unidades experimentales contenían suelo modelo humectado (30%) con medio MS concentrado 3, 4, 5 y 6 veces (3X, 4X, 5X y 6X, respectivamente). En los medios concentrados 3 y 6 veces (3X y 6X), la supervivencia de las plantas disminuyó 20 y 25%, respectivamente. Mientras que en los medios concentrados 4 y 5 veces (4X y 5X) la supervivencia fue del 100% (Fig. 16). Del total de plantas al final del ensayo en cada medio, el 25% presentó clorosis en hojas en los medios 3X y 4X, mientras que en los medios 5X y 6X, el 100 y 80% (respectivamente) de las plantas presentó clorosis (Fig. 16).

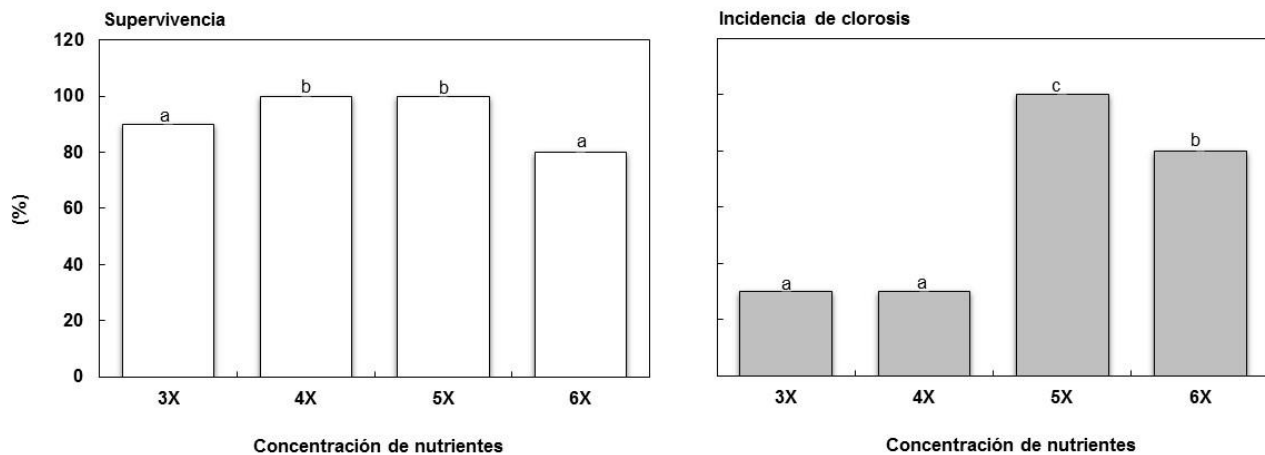


Figura 16. Supervivencia e incidencia de clorosis de plantas de *F. arundinacea* en medios de cultivo concentrados 3, 4, 5 y 6 veces (3X, 4X, 5X y 6X, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.001$, $n = 3$).

Concentrar el medio 4 veces (4X) permitió que el 100% de plantas supervivieran, así como presentaran una menor incidencia de clorosis. Varios estudios demuestran que los azúcares, incluida la sacarosa, son esenciales en las plantas como substratos en la cadena respiratoria para la generación de energía e intermediarios metabólicos que son usados para la síntesis de macromoléculas. Además, los carbohidratos son moléculas de señalización para la producción de hormonas de crecimiento en plantas (Morkunas y col. 2012), además de que están asociados a la captación de otros nutrientes esenciales. Asimismo, concentraciones de azúcares altas, generalmente, reprimen la fotosíntesis y promueven el almacenamiento de carbohidratos; por el contrario, concentraciones bajas incrementan la fotosíntesis y la secreción de carbohidratos (Nicolai y col. 2006). Lo anterior podría explicar la clorosis observada en los medios concentrados 5 y 6 veces (5X y 6X, respectivamente).

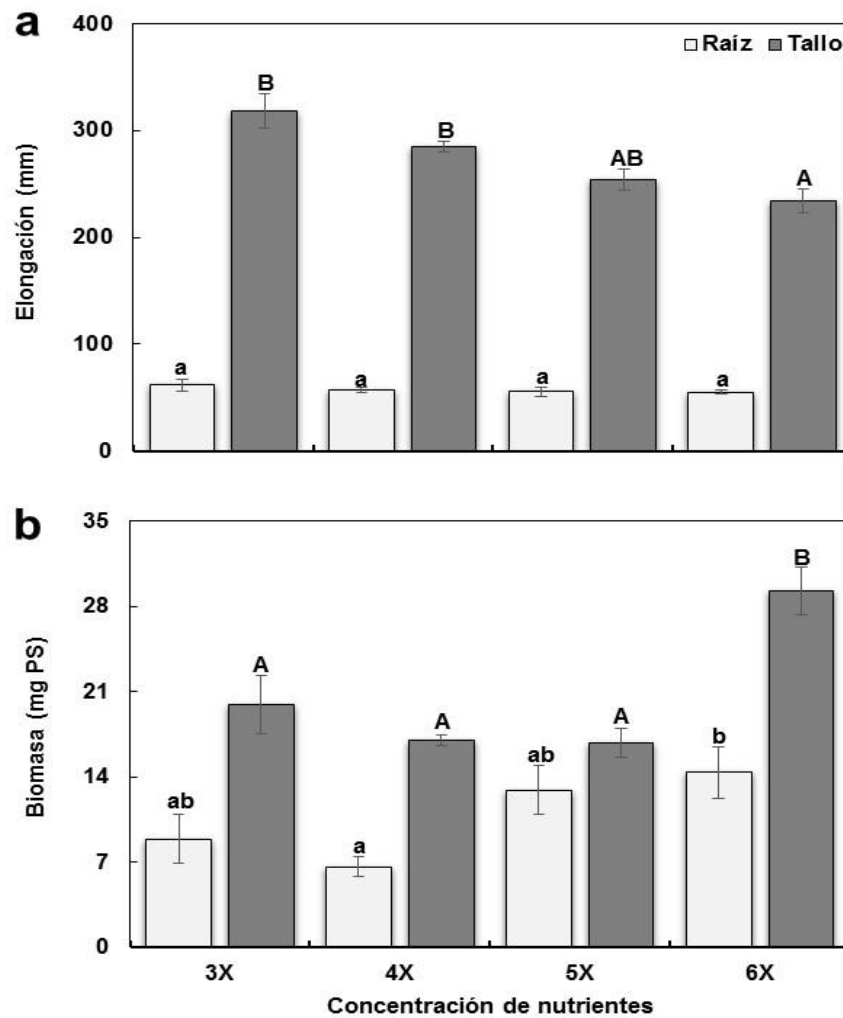


Figura 17. a) Elongación y b) producción de biomasa de raíces y tallos de *F. arundinacea* en medio de cultivo MS con las sales concentradas 3, 4, 5 y 6 veces (3X, 4X, 5X y 6X, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas entre concentración de nutrientes ($p < 0.001$, $n = 3$).

Además de la supervivencia y la clorosis, la concentración de nutrientes afecta el crecimiento de las plantas. Por lo anterior, se evaluó el efecto de la concentración de nutrientes en el suelo modelo, sobre la elongación y la biomasa de tallos y raíces de plantas no asociadas (Fig. 17). Después de 45 días, la concentración de nutrientes no tuvo efecto significativo sobre la elongación de las raíces. En el caso de los tallos, con la mayor concentración utilizada (6X), se observó una disminución del 36% (Fig. 17a). La biomasa de tallos en las plantas crecidas en el medio 6X fue mayor que en el resto de los medios (Fig. 17b); sin embargo, el 80% de las plantas presentó clorosis (Fig. 16).

Con base en los resultados mostrados en la Figura 16 y 17, se escogió la formulación del medio con nutrientes 4 veces mayor ya que se obtuvo el 100% de supervivencia de las plantas y la menor incidencia de clorosis en las plantas. Lo que resulta importante para asegurar que en los

experimentos siguientes los efectos observados se deban sólo a la presencia de los contaminantes (800 mg kg⁻¹ de la MHC al suelo modelo) y no al del déficit de nutrientes.

6.4 Efecto de una mezcla de hidrocarburos sobre *F. arundinacea* y la asociación endófito

Con el objetivo de evaluar la influencia de la asociación inducida entre *Lewia* sp. y *F. arundinacea* al estrés por la MHC, se expuso a plantas no asociadas y asociadas a 800 mg kg⁻¹ de la MHC en el suelo modelo durante 0, 7, 14, 21, 28 y 45 días. Para lo anterior, se cuantificó el crecimiento, el daño oxidante y la defensa antioxidante.

6.4.1 Crecimiento

El crecimiento se determinó a través de la biomasa vegetal, esto, debido a que resultó ser la variable más sensible a la presencia de hidrocarburos. Se encontró que la biomasa de las raíces no asociadas aumentó significativamente entre los 7 y 14 días, mientras que en las raíces asociadas con *Lewia* sp. la biomasa aumentó desde los 7 y hasta los 28 días (Fig. 18). En plantas asociadas, la biomasa de las raíces aumentó (~3 a 4 veces) con respecto a las plantas no asociadas (Fig. 18). Respecto a los tallos, no se observó efecto significativo de la MHC en ningún grupo de plantas (Fig. 18). La biomasa de los tallos en las plantas asociadas fue significativamente mayor (~0.9 veces) que la de las plantas no asociadas, tanto en ausencia como en presencia de la MHC (Fig. 18). Los resultados (Fig. 18) demuestran que *Lewia* sp. promueve el incremento de la biomasa de *F. arundinacea* expuesta a 800 mg kg⁻¹ de una MHC durante 45 días.

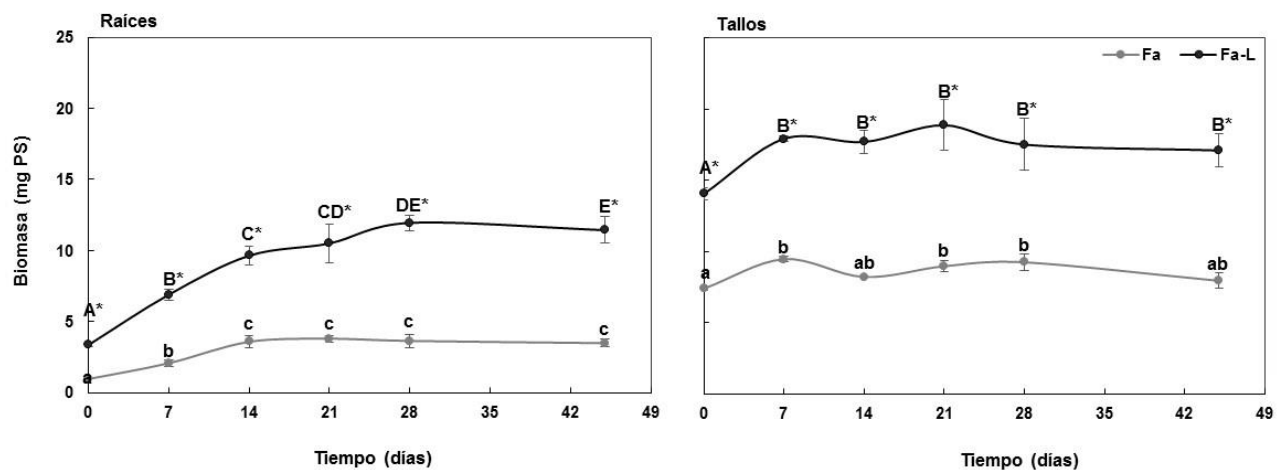


Figura 18. Producción de biomasa en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* (Fa) y la asociación endófito entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. (Fa-L) expuestas a 800 mg kg⁻¹ de la MHC en el suelo modelo durante 45 días. Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de concentración. Asteriscos indican diferencias significativas entre plantas solas (Fa) o asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n \geq 8$).

La capacidad de las plantas para tolerar a los contaminantes está determinada por varias vías metabólicas que protegen las funciones de los organelos celulares, manteniendo así la homeostasis. La función de estas vías se modifica constantemente, en especial cuando las plantas se asocian con microorganismos endófitos, por lo que el monitoreo constante de las rutas involucradas en la defensa antioxidante, puede generar información valiosa acerca de asociaciones endófitas y la exposición a condiciones de estrés como la contaminación por hidrocarburos.

6.4.2 Daño oxidante

Para evaluar la influencia de la asociación endófitica entre *Lewia* sp. y *F. arundinacea* en el estrés por la MHC en función del tiempo de exposición, se cuantificó el contenido de malondialdehído (MDA) en raíces y tallos de plantas no asociadas y asociadas (Fig. 19). La peroxidación de lípidos es comúnmente considerada como un proceso perjudicial que conduce a modificaciones estructurales de los lípidos de membrana, así como en lipoproteínas. Las ERO se introducen en las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos insaturados para producir los hidroperóxidos lípidos (Yoshimura y col. 2004). En la peroxidación de los lípidos de membrana insaturados, el MDA es el producto final en la descomposición, así, el MDA puede reflejar el daño celular ocasionado por la sobreproducción de ERO (Hu y col. 2015).

De manera general, se encontró que el tiempo de exposición a la MHC tiene un efecto sobre el contenido de MDA en raíces y tallos de plantas no asociadas y asociadas (Fig. 19). En raíces y tallos de las plantas no asociadas, el contenido de MDA aumentó con el tiempo de exposición a la MHC, encontrando niveles hasta ~5 veces mayores con respecto al inicio (Fig. 19). En las raíces de las plantas asociadas, el contenido de MDA disminuyó con el tiempo de exposición, encontrando concentraciones hasta ~2 veces menores que al inicio (Fig. 19a), sin embargo, para los tallos, el contenido de MDA aumentó desde los 7 días (Fig. 19).

Durante 45 días, el contenido de MDA en las raíces fue reducido por la presencia del hongo (Fig. 19). No ocurrió lo mismo para los tallos, en donde el contenido de MDA en los tallos de las plantas asociadas fue ligeramente mayor que en las plantas no asociadas (Fig. 19). Varios estudios han demostrado que la exposición a HAP como el fenantreno, inducen la producción de MDA en plantas como *Solanum lycopersicum* (Ahammed y col. 2012), así como en *Cucumis sativus*, *Brassica rapa*, *B. campestris* y *Lactuca sativa* (Ahammed y col. 2012). El aumento en la producción de MDA por la exposición a hidrocarburos, sugiere un incremento en la producción de ERO y por consiguiente, en el estrés oxidante. Sin embargo, los resultados sugieren que el hongo controla la sobreproducción de ERO, al menos en las raíces, protegiendo a la planta expuesta a la MHC.

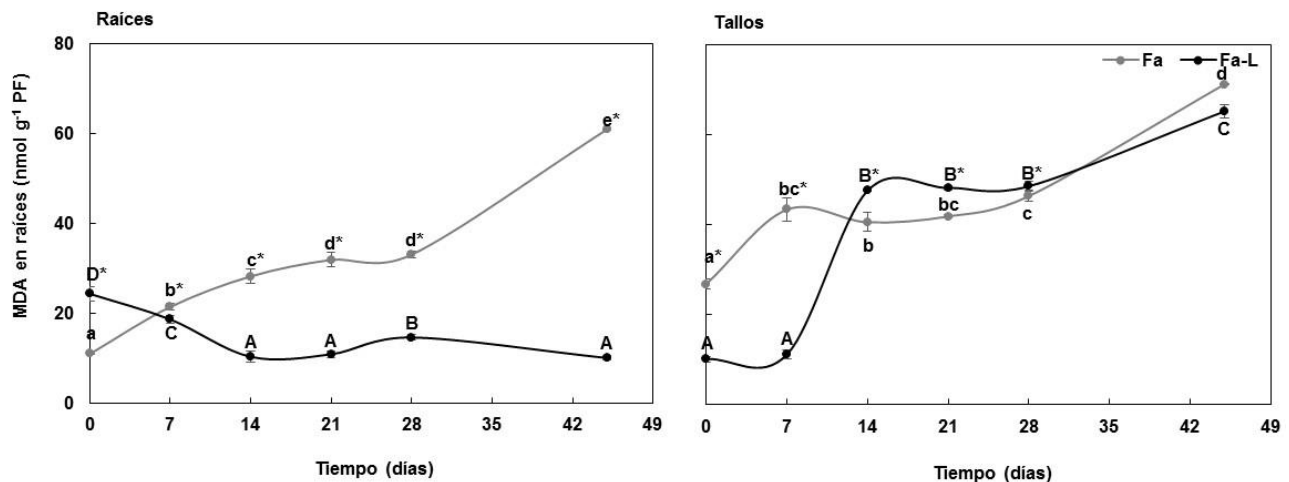


Figura 19. Efecto del tiempo de exposición a 800 mg kg^{-1} de la MHC sobre el contenido de malondialdehído en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* (Fa) y *F. arundinacea* asociada con *Lewia* sp. (Fa-L). Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de concentración. Asteriscos indican diferencias significativas entre plantas solas (Fa) o asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n = 3$).

HAP como el fenantreno, provocan niveles de oxidación diferentes en las membranas de diversas plantas (Ahammed y col. 2012). El nivel de daño oxidante en las células expuestas a una condición de estrés como un contaminante, depende de su concentración, estructura y del tiempo de exposición. La asociación de plantas con hongos, ya sea micorrízicos arbusculares (Debiane y col. 2009) o endófitos (Li y col. 2014), ayuda a atenuar el daño oxidante provocado por diversos tipos de estrés. Debiane y col. (2009) reportan menores niveles de MDA en raíces de *Cichorium intybus* asociadas con *Glomus intraradices* expuestas a BaP en una concentración menor a la utilizada en este estudio (70 mg L^{-1}). La contribución de los hongos en el control del estrés oxidante a nivel de membrana puede relacionarse con la actividad de enzimas antioxidantes que participan en la degradación de las ERO o la detoxificación directa de los hidrocarburos (Kvesitadze y col. 2009).

6.4.3 Defensa antioxidante

La influencia de la asociación endófito entre *Lewia* sp. y *F. arundinacea* sobre la respuesta de la defensa antioxidante de las plantas expuestas a la MHC se evaluó en función del tiempo, cuantificando la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas (POD) y glutatión-S-transferasas (GST). La defensa antioxidante, que incluye la acción de enzimas y moléculas, alivia o atenúa el daño oxidante causado por la sobreproducción de ERO en las células de las plantas (Hu y col. 2015). La defensa antioxidante enzimática está constituida por enzimas como las SOD, POD y GST, entre otras, que degradan ERO, evitando la oxidación en cadena de diversas biomoléculas y por consiguiente reduciendo el daño oxidante (Debiane y col. 2009).

La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno y, por lo tanto, constituye la primera línea de defensa celular contra las ERO en condiciones de estrés durante periodos largos (Ming Xu y col. 2010). El tiempo de exposición a la MHC disminuyó significativamente la actividad SOD en las raíces de plantas no asociadas y asociadas (Fig. 20). Sin embargo, en las plantas asociadas, a los 7 días se observó un incremento significativo en la actividad, en comparación con las plantas control. En los tallos de plantas asociadas, la actividad SOD se mantuvo sin cambios significativos hasta los 14 días; posteriormente, aumentó (~2 veces) y se mantuvo alrededor de 1147 U g proteína⁻¹ hasta los 45 días. En el caso de las plantas no asociadas, se registró un incremento significativo en la actividad SOD con respecto al inicio desde los 7 hasta los 21 días de exposición a la MHC. Después de 21 días, la actividad de ambos grupos de plantas se mantuvo sin cambios significativos entre sí (Fig. 20).

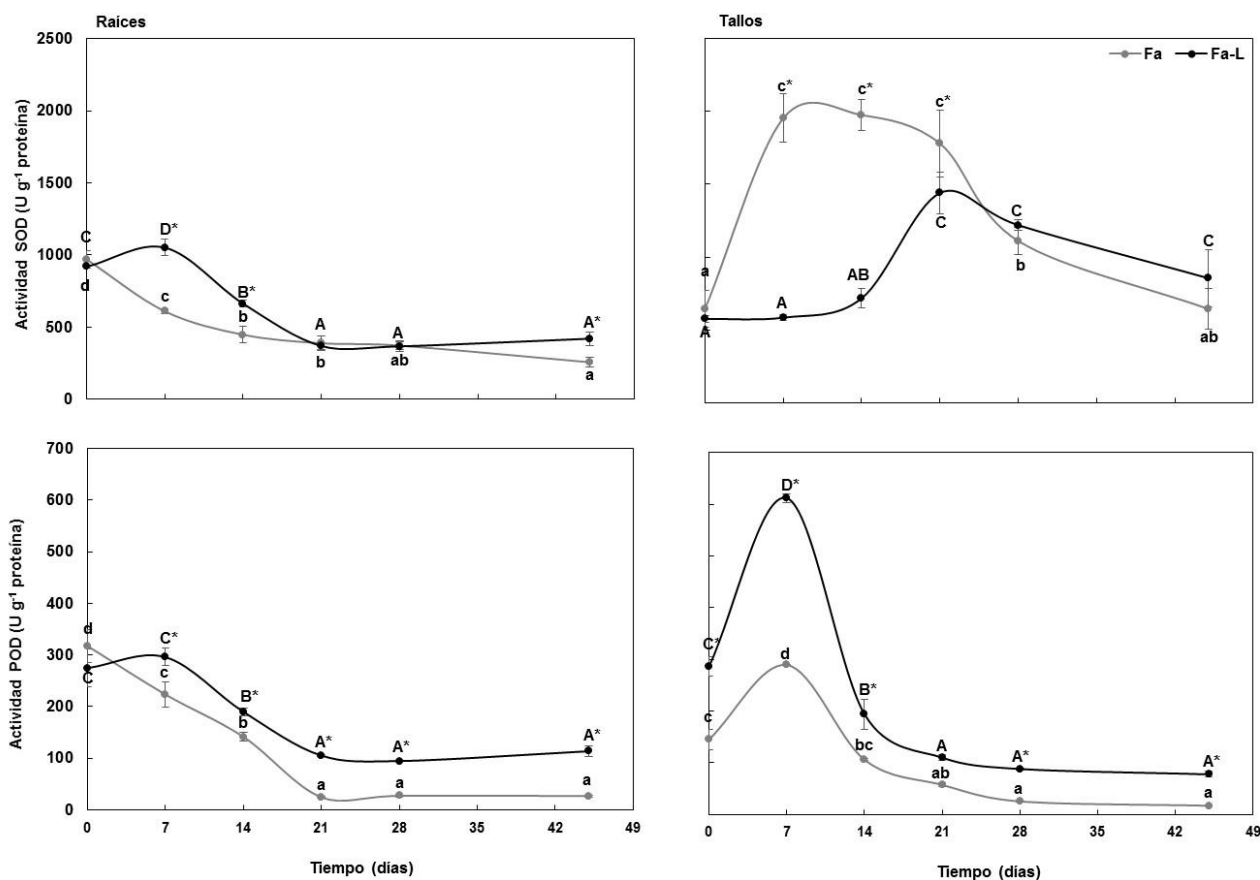


Figura 20. Efecto del tiempo de exposición a 800 mg kg⁻¹ de la MHC sobre la actividad SOD y POD en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* (Fa) y *F. arundinacea* asociada con *Lewia* sp. (Fa-L). Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de concentración. Asteriscos indican diferencias significativas entre plantas solas (Fa) o asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n = 3$).

La actividad SOD podría estar coordinada con otras enzimas antioxidantes como las POD durante la detoxificación de las ERO, ya que las POD se encargan de oxidar el peróxido de hidrógeno

resultante de la actividad de la SOD, a agua. De manera similar que en la actividad SOD, el tiempo de exposición a la MHC modificó la actividad POD (Fig. 20). En este caso, la actividad en las plantas inoculadas con *Lewia* sp. resultó mayor (2-3 veces) que en las plantas control y en ambos grupos de plantas se observó la misma tendencia. (Fig. 20). En los tallos, la actividad POD disminuyó significativamente durante los primeros 7 días y, a partir de los 14 días, disminuyó a niveles cercanos a los iniciales, manteniéndose así hasta los 45 días de exposición a la MHC (Fig. 20). En las raíces, la actividad de esta enzima disminuyó (4-12 veces) hasta los 21 días y se mantuvo en niveles de 26.2 U g proteína⁻¹ (plantas no asociadas) y 104.5 U g proteína⁻¹ (plantas asociadas) hasta los 45 días. A pesar de que la respuesta en la actividad POD fue similar en ambos grupos de plantas, la asociación mostró mayor actividad que las plantas no asociadas.

Además de las actividades SOD y POD en la defensa antioxidante de plantas, destacan las GST, que representan un grupo complejo de proteínas que se localizan en varios compartimentos de la célula, incluso, asociadas a proteínas de la membrana (Sherratt y Hayes 2001). Las GST son una familia de enzimas diméricas que catalizan la conjugación de la forma reducida del glutatión (GSH) con compuestos xenobióticos; son un grupo de enzimas multifuncionales y versátiles involucradas en muchos procesos bioquímicos en todas las células y, en especial, en las vegetales (Moons 2005). En plantas, las GST pueden usar GSH, ya sea como sustrato o como coenzima y catalizar una variedad de reacciones de conjugación, como isomerizaciones dependientes del GSH, además de participar con peroxidasas, tioltransferasa y dehidroascorbato reductasa dependientes del GSH. También, pueden tener funciones no catalíticas como proteínas de unión de compuestos fitoquímicos entre compartimentos celulares. Algunas GST tienen funciones catalíticas y no catalíticas en el desarrollo normal, así como durante diversas condiciones de estrés biótico o abiótico (Sherratt y Hayes 2001).

La MHC provocó un incremento en la actividad GST de raíces de *F. arundinacea* no asociadas y asociadas con *Lewia* sp. a los 7 días con respecto al valor inicial (Fig. 21). En las raíces no asociadas, la actividad GST disminuyó a los 14 días de exposición a la MHC, manteniéndose en valores cercanos a 7.5 U g proteína⁻¹ hasta los 45 días, mientras que, en las raíces asociadas, la actividad se mantuvo alrededor de 10.1 U g proteína⁻¹ hasta los 45 días. En los tallos, la MHC provocó un aumento en la actividad en plantas no asociadas entre los 7 y los 21 días y, a partir de ahí, la actividad disminuyó a niveles basales (Fig. 21). Contrario a lo observado en las actividades SOD y POD, la actividad GST en los tallos de las plantas asociadas fue menor que en las plantas no asociadas durante los primeros 21 días de exposición a la MHC (Fig. 21).

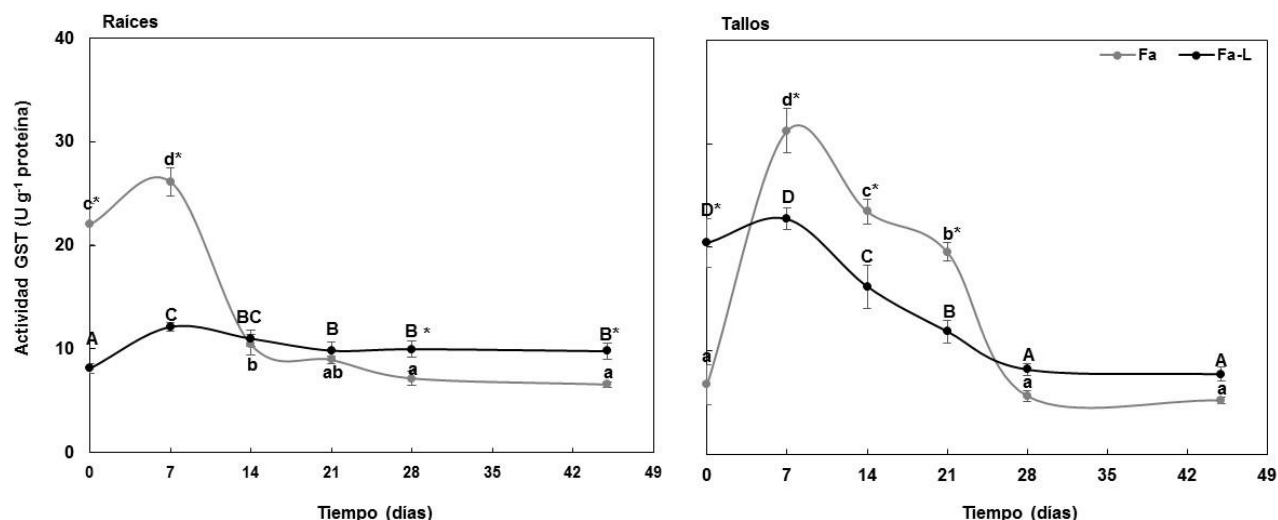


Figura 21. Efecto del tiempo de exposición a 800 mg kg⁻¹ de la MHC sobre la actividad GST en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* (Fa) y *F. arundinacea* asociada con *Lewia* sp. (Fa-L). Letras distintas indican diferencias significativas entre los niveles de concentración. Asteriscos indican diferencias significativas entre plantas solas (Fa) o asociadas (Fa-L) ($p < 0.001$, $n = 3$).

La disminución de la actividad de las enzimas SOD y POD observada en las raíces de *F. arundinacea* no asociadas podría estar relacionada con el aumento de MDA observado en este grupo de plantas (Fig. 19). Lo anterior, debido a que el radical $\cdot\text{O}_2^-$, podría estar reaccionando con el H_2O_2 (Reacciones 1 y 3), produciendo el radical $\cdot\text{OH}$ que puede oxidar los lípidos de membrana (Minotti y Aust 1987). Sin embargo, la presencia de *Lewia* sp. incrementa la actividad de las enzimas SOD y POD, ayudando a disminuir el contenido de MDA. Por lo anterior, se propone que *Lewia* sp. controla el daño oxidante a nivel de membrana en plantas de *F. arundinacea* a través del aumento en las actividades SOD y POD y, por consiguiente, el control de la sobreproducción de ERO. Los resultados expuestos en la Figura 21 sugieren que *Lewia* sp. promueve la disminución de la actividad GST en plantas de *F. arundinacea* para mantener la asociación endófito.

Es importante mencionar que las actividades enzimáticas antioxidantes también participan en la degradación de los contaminantes, en especial las POD (Kvesitadze y col. 2009). Se ha reportado que las POD de plantas catalizan varias reacciones químicas (oxidación, oxigenación, peroxidación, halogenación, deshalogenación, deshidrogenación, N-desalquilación, entre otras) y además, tienen gran afinidad por compuestos xenobióticos, incluidos los HAP (Stiborová y Anzenbachl 1991). Por lo anterior, se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de las actividades antioxidante asociadas a la cinética de remoción de la MHC por *F. arundinacea* y la asociación endófito inducida entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.

6.4.4 Remoción de hidrocarburos

Durante la fitorremediación de compuestos orgánicos, las plantas pueden ser beneficiadas por la presencia de microorganismos endófitos, que poseen sus propias vías de degradación de contaminantes, así como capacidades metabólicas diferentes, provocando una mejora en la eficiencia de degradación de los contaminantes y reduciendo la fitotoxicidad y la evapotranspiración de los contaminantes volátiles (Soleimani y col. 2010). Por lo tanto, bajo la hipótesis de que en las plantas asociadas con *Lewia* sp. aumenta la remoción de los hidrocarburos, se evaluó la influencia de la asociación inducida entre *Lewia* sp. y *F. arundinacea* sobre la remoción de hidrocarburos en el suelo modelo en el tiempo. Los hidrocarburos fueron removidos por la planta y la asociación siguiendo diferentes patrones a lo largo del tiempo (Fig. 22).

Después de 45 días, la remoción de hexadecano y pireno fue significativamente mayor en el suelo donde creció la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. que en el suelo en donde crecieron las plantas no asociadas. Sin embargo, en el caso del fenantreno no hubo diferencias significativas debido a la asociación con *Lewia* sp. Después de 45 días, en el suelo donde crecieron las plantas asociadas con *Lewia* sp. se alcanzó una remoción máxima para el hexadecano de 95%, 83% para el fenantreno y 91% para el pireno. En contraste, en el suelo donde creció sólo *F. arundinacea*, se alcanzó una remoción (a los 45 días) de 51, 76 y 80% para hexadecano, fenantreno y pireno, respectivamente.

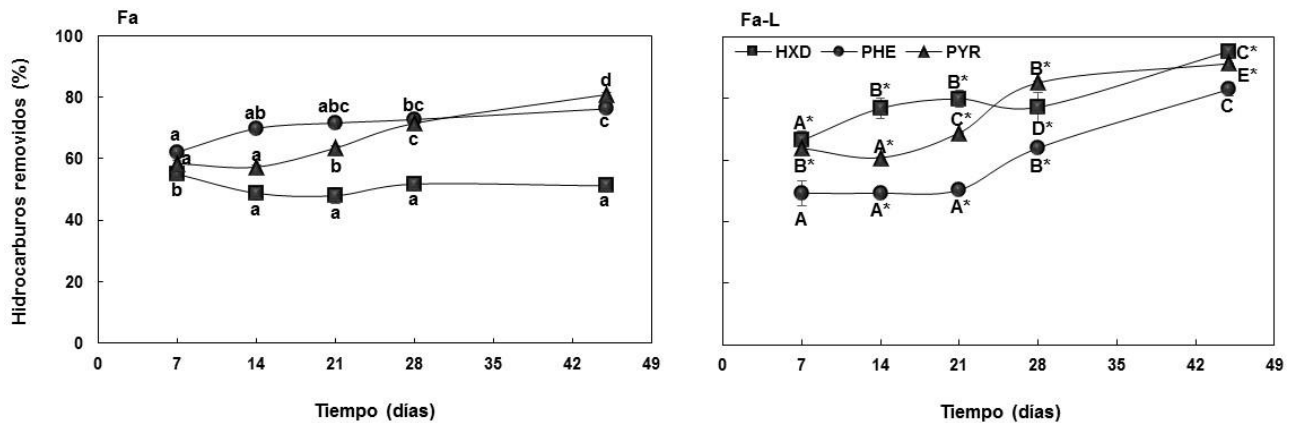


Figura 22. Remoción de hexadecano (HXD), fenantreno (PHE) y pireno (PYR) por a) *F. arundinacea* (Fa) o b) *F. arundinacea* asociada con *Lewia* sp. (Fa-L) durante el tiempo de muestreo en el suelo modelo. Letras iguales por serie indican que no hay diferencias significativas en la remoción por efecto del tiempo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los hidrocarburos removidos por la planta sola (Fa) o asociada (Fa-L).

Contrario a nuestros resultados, Cheema y col. (2009) reportaron una remoción mayor de fenantreno y pireno (87 y 97%, respectivamente) después de 65 días de cultivo de *F. arundinacea* en un suelo no estéril. La diferencia en los resultados podría atribuirse a la presencia de microorganismos nativos del suelo contaminado, que promovieron la degradación de los contaminantes en la rizósfera de la

planta (Cheema y col. 2009). Cruz-Hernández y col. (2013) observaron una remoción de 91% para el hexadecano, 100% para fenantreno y 70% para pireno después de 45 días de cultivo en un suelo modelo no estéril. Esta diferencia puede atribuirse, también, al efecto adicional de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el sistema abierto que se utilizó. Soleimani y col. (2010) no observaron diferencias significativas en la remoción de fenantreno y pireno en suelos cultivados por 7 meses con *F. arundinacea* y *F. arundinacea* asociada con *Neotyphodium coenophialum* en condiciones de invernadero.

La remoción tan alta de los hidrocarburos, observada en los primeros siete días de cultivo pueden deberse a un fenómeno de sorción de contaminantes en las raíces de las plantas, tanto asociadas como no asociadas. Varios estudios han demostrado que la mayoría de los compuestos orgánicos lipofílicos como fenantreno y pireno, son afines a la epidermis de las raíces. Lo anterior, generalmente depende del coeficiente de partición (K_{ow}) de los compuestos orgánicos lipofílicos, en el suelo y en las membranas de las células vegetales, así como del contenido lipídico en las raíces (Gao y Zhu 2004). El contenido lipídico en las raíces puede modificarse por la presencia de microorganismos como los hongos endófitos, lo que podría modificar la sorción de los contaminantes en plantas asociadas con endófitos. Así, nuestros resultados muestran que *Lewia* sp. es un hongo endófito que estimula la remoción de hidrocarburos alifáticos e HAP. Lo que podría estar relacionado con los cambios bioquímicos registrados en *F. arundinacea* asociada con el hongo, especialmente con una modificación de la cantidad de lípidos en las raíces, variable que no se determinó en este estudio.

6.4.5 Correlación entre las variables de respuesta en estudio

Con el objetivo de correlacionar la defensa antioxidante con la remoción de hidrocarburos por *F. arundinacea* y la asociación entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. se realizó un análisis de correlación entre los parámetros bioquímicos y la remoción de la MHC observada durante los 45 días (Tabla 6). La remoción de los tres hidrocarburos correlacionó de forma positiva (>80%) y significativa con el aumento en la biomasa, tanto de las plantas asociadas como no asociadas. También se observó una correlación significativa positiva (>70%) entre la producción de MDA y la remoción de pireno en el suelo, siendo más importante en la planta sola que en la asociación, lo que sugiere que la remoción de pireno pudiera provocar la oxidación de los lípidos de membrana en *F. arundinacea* no asociada. La actividad POD fue la única variable relacionada con la defensa de la planta que mostró correlación significativa negativa (-71%) con la remoción de pireno en la planta sola. Lo anterior sugiere que la actividad POD es insuficiente para oxidar el pireno que está siendo removido.

Tabla 6. Análisis de correlación de Pearson entre la remoción de hexadecano (HXD), fenantreno (PHE) y pireno (PYR) y la biomasa (BM), malondialdehído (MDA), actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y glutatión-S-transferasa (GST) en *F. arundinacea* o *F. arundinacea* inoculada con *Lewia* sp. durante 45 días¹.

Parámetros	HXD	PHE	PYR
<i>F. arundinacea</i>			
BM	0.85**	0.86**	0.81**
MDA	0.60	0.70*	0.80**
SOD	0.20	0.05	-0.12
POD	-0.49	-0.67	-0.71**
GST	0.06	-0.15	-0.25
<i>F. arundinacea-Lewia</i> sp.			
BM	0.92**	0.84**	0.89**
MDA	0.72**	0.75**	0.71**
SOD	-0.01	-0.11	0.00
POD	-0.45	-0.46	-0.46
GST	-0.46	-0.55	-0.54

* Confianza a $P < 0.001$; ** Confianza a $P < 0.0001$.

Una vez que los HAP son absorbidos por la superficie radicular, pueden moverse a través del apoplasto (entre los espacios intercelulares o alrededor de la pared celular) o a través del simplasto (atravesando la pared y membrana celular y pasando por el citoplasma). En el primer caso, los HAP podrían quedar acumulados en la pared celular, en el segundo, además de acumularse en la pared celular podrían acumularse en las vacuolas (Wild y col. 2005). La absorción depende, principalmente, del contenido de lípidos en las raíces, donde las lipoproteínas, los fosfolípidos, las grasas y los tejidos de celulosa contienen componentes lipofílicos que parecen ser los dominios primarios donde los HAP se acumulan una vez que penetran en las células de las raíces (Gao y Zhu 2004). Lo anterior puede conducir a un aumento en la oxidación de los lípidos de membrana (MDA) observado a lo largo de la cinética en los dos grupos de plantas (Fig. 19), o deberse al incremento de ERO por efecto de la presencia de la MHC.

Además de lo anterior, el metabolismo de los HAP puede producir moléculas más fitotóxicas, conduciendo al aumento en el daño oxidante (Gao y Zhu 2004). El metabolismo del fenantreno produce moléculas como la 9,10-fenantrenoquinona (Narro y col. 1992), una quinona con un potencial de reducción que le permite interactuar con biomoléculas tiólicas, reduciendo el potencial reductor en la célula que conduce al aumento en la producción de ERO y, por consiguiente, causando daño oxidante (Rodríguez y col. 2005; Wang y col. 2007). El pireno puede ser acumulado en las raíces de *F. arundinacea* para metabolizarlo posteriormente (Pan y col. 2016). Además, la

distribución de los contaminantes dentro de las células puede variar según la planta y el contaminante (Kang y col. 2010). La acumulación de hidrocarburos y la formación de los productos mencionados implican la actividad de las enzimas antioxidantes como las polifenol oxidasas (PPO), las peroxidasas (POD) y las glutatión S-transferasas (GST), que contribuyen al metabolismo de compuestos químicos aromáticos (Gao y col. 2013). Sin embargo, se requiere de más estudios para proponer certeramente los mecanismos a través de los cuales los hidrocarburos presentes en la MHC, son removidos por *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp.

Es importante destacar que, durante la cinética, se observó una remoción de hidrocarburos alta en los primeros 7 días de exposición a los contaminantes (Tabla 5). Además, en este periodo, se observó un incremento en el crecimiento (Fig. 18) y las actividades SOD y POD (Fig.20), así como una disminución del MDA (Fig. 19) y la actividad GST (Fig. 21) en *F. arundinacea* solas y asociadas con *Lewia* sp., sin embargo, hasta este momento se desconoce si el efecto se debía a los hidrocarburos o a la presencia de *Lewia* sp. Por lo anterior, se realizó un análisis detallado en este día. El análisis se muestra enseguida.

6.5 Influencia de *Lewia* sp. sobre plantas de *F. arundinacea* expuestas a hidrocarburos

6.5.1 Crecimiento

De acuerdo con los resultados anteriores (apartado 6.4.1) se observó que la producción de biomasa en raíces y tallos de *F. arundinacea* se modificó después de 7 días de contacto con la MHC, sin embargo, se desconocía si el efecto se debía a los hidrocarburos o a la presencia de *Lewia* sp. Por lo anterior, y con el objetivo de distinguir el efecto de *Lewia* sp. del efecto de la MHC, se añadieron dos puntos, los correspondientes a *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp. en el suelo modelo, pero en ausencia de la MHC (Fig. 23). Después de 7 días de exposición a la MHC, el hongo estimuló la producción de biomasa, particularmente de raíces, 3.8 veces más que en las plantas no asociadas (Fig. 23). Se sabe que los microorganismos endófitos aumentan el crecimiento de las plantas expuestas a agentes estresores (Soleimani y col. 2010). Estos resultados confirman que la asociación endófito entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. estimula el crecimiento de las plantas aún bajo condiciones de estrés generado por la MHC en un periodo de 7 días.

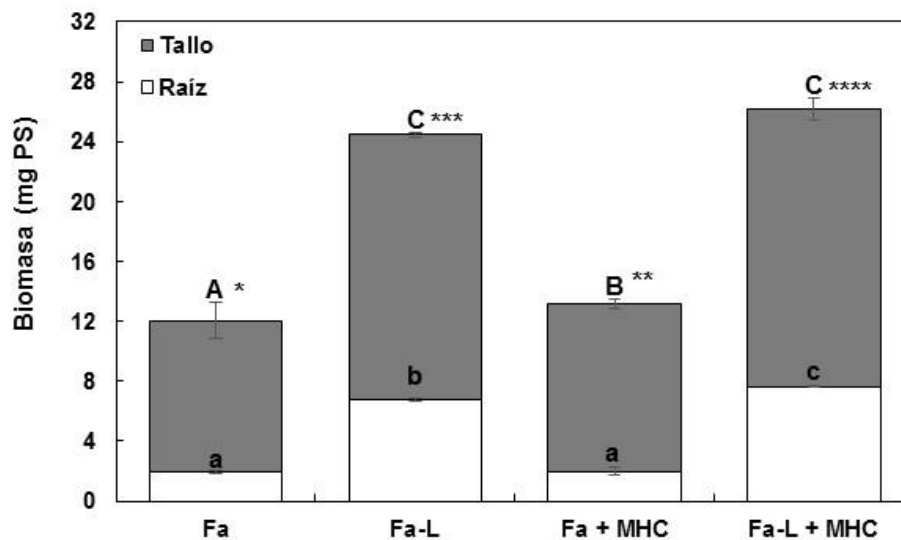


Figura 23. Producción de biomasa de *F. arundinacea* (Fa) y *F. arundinacea* asociada con *Lewia* sp. (Fa-L) expuesta o no a 800 mg kg⁻¹ de hidrocarburos (MHC) por 7 días en suelo modelo. Asteriscos indican diferencias significativas en la comparación de la biomasa total (raíz + tallo), letras diferentes (minúscula para raíz y mayúsculas para tallo) ($p < 0.001$).

La biomasa vegetal es una variable de respuesta comúnmente utilizada como indicador de rendimiento en plantas expuestas a xenobióticos como los HAP (Soleimani y col. 2010). Un resultado similar al presentado aquí se observó en *F. arundinacea* expuesta a hidrocarburos cuando la planta creció en asociación con el endófito *Neotyphodium coenophialum* (Soleimani y col. 2010) y *Lewia* sp. (Cruz-Hernández y col. 2013). Los hongos endófitos pueden incrementar el crecimiento de las plantas a través de la producción de fitohormonas, cambios morfológicos en la raíz, el aumento en la solubilización y captura de nutrientes (Porrás-Alfaro y Bayman 2011) o mediante la sobreproducción y el control de moléculas de señalización como el H₂O₂ (White y Torres 2010). El H₂O₂ induce la respuesta de enzimas de señalización con diversas actividades, incluidas la degradación de proteínas y la señalización hormonal. Algunas de estas enzimas de señalización se encuentran implicadas en la cascada de las MAPK que controlan la activación de varios mecanismos de defensa en respuesta al estrés por ERO (Tripathy y Oelmüller 2012).

6.5.2 Daño oxidante

Con base en lo anterior, se analizó el contenido de H₂O₂ en las plantas asociadas o no asociadas y expuestas o no a la MHC (Tabla 7). Se encontró un incremento (1.3 veces) en el contenido de H₂O₂ de las raíces de *F. arundinacea* no asociadas por efecto de la MHC. En contraste, la concentración de H₂O₂ no se modificó en raíces y tallos de las plantas asociadas expuestas a la MHC. Independientemente de la MHC, la concentración de H₂O₂ en las raíces de las plantas asociadas fue menor (~35%) que en las plantas no asociadas (Tabla 7).

Es importante examinar la concentración de H₂O₂ en conjunto con otros marcadores de estrés en las plantas ya que, si los niveles de H₂O₂ no son controlados, esta ERO puede ser transformada en el radical hidroxilo y oxidar proteínas y lípidos de membrana, causando un incremento en el contenido de grupos CO y MDA, respectivamente (Kreslavski y col. 2014; Hu y col. 2015). Por lo anterior, se analizó el daño oxidante, medido como contenido de MDA y proteínas oxidadas (grupos CO), en raíces y tallos de *F. arundinacea* y la asociación endófito entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. en exposición o no a la MHC durante 0 y 7 días (Tabla 8).

Tabla 7. Contenido de H₂O₂ en raíces y tallos de *F. arundinacea* (Fa) y la asociación endófito *F. arundinacea-Lewia* sp. (Fa-L) después de 7 días de crecimiento con y sin 800 mg kg⁻¹ de la MHC en suelo modelo*.

Tratamiento	H ₂ O ₂ (nmol g ⁻¹ PF)	
	Raíces	Tallos
Fa	450.1±49.7 ^{ab}	480.9±38.8 ^B
Fa-L	427.4±24.7 ^{ab}	308.5±28.1 ^A
Fa + MHC	583.1±52.3 ^c	489.2±12.3 ^B
Fa-L + MHC	377.6±17.4 ^a	338.6±37.5 ^A

* Datos con letras diferentes por columna indican diferencias significativas entre tratamiento ($p < 0.001$). Los valores son la media de 3 réplicas (4 plantas por réplica). Mayúsculas y minúsculas indican análisis diferente para cada órgano.

Tabla 8. Daño oxidante medido como contenido de malondialdehído (MDA) y proteínas oxidadas (grupos CO) en raíces y tallos de *F. arundinacea* (Fa) y la asociación endófito *F. arundinacea-Lewia* sp. (Fa-L) creciendo con y sin 800 mg kg⁻¹ de la MHC durante 7 días en suelo modelo*.

Tratamiento	Raíces		Tallos	
	MDA (nmol g ⁻¹ PF)	CO (μmol g ⁻¹ proteína)	MDA (nmol g ⁻¹ PF)	CO (μmol g ⁻¹ proteína)
Fa	28.1±0.3 ^b	157.2±6.8 ^a	53.1±3.1 ^{BC}	330.3±1.1 ^C
Fa-L	28.3±0.2 ^b	196.0±2.4 ^a	58.2±10.0 ^B	265.3±10.0 ^B
Fa + MHC	48.6±1.4 ^c	909.5±21.2 ^c	58.6±2.4 ^B	167.2±2.0 ^A
Fa-L + MHC	25.4±0.9 ^a	368.1±14.5 ^b	27.5±2.0 ^A	573.3±13.2 ^D

* Datos con diferentes letras por columna indican diferencias significativas entre tratamiento ($p < 0.001$). Los valores son la media de 3 réplicas (4 plantas por réplica). Mayúsculas y minúsculas indican análisis diferente para cada órgano.

El contenido de MDA en raíces de plantas no asociadas y expuestas a la MHC fue 1.7 veces mayor que en las plantas crecidas sin la MHC (Tabla 8). Sin embargo, el contenido de MDA en las raíces de las plantas asociadas no se modificó significativamente por la MHC, comparado con su respectivo control. El MDA en los tallos de plantas asociadas y expuestas a los hidrocarburos, se redujo significativa (53%) en comparación con las plantas no asociadas. Por otro lado, la concentración de los grupos CO en las raíces de las plantas asociadas y expuestas a la MHC fue menor (2.5 veces) que en las plantas no asociadas. En contraste, la presencia de la MHC incrementó significativamente la concentración de los grupos CO (3.4 veces) en los tallos de las plantas asociadas que en las plantas no asociadas (Tabla 8).

Se ha observado que los hongos micorrízicos (Debiane y col. 2009) y los endófitos (Mirzahosseini y col. 2014, 2015), pueden aliviar el daño oxidante producido por la acumulación de ERO en las células de plantas como *F. arundinacea*. De hecho, se registró un incremento en el contenido de MDA, particularmente en las raíces de las plantas expuestas a la MHC, el cual fue significativamente reducido tanto en raíces como en tallos por efecto de *Lewia* sp. Esta reducción en la peroxidación de lípidos podría deberse a un incremento en la actividad de enzimas como las peroxidasas (POD) por efecto de *Lewia* sp. Las POD son las enzimas responsables de degradar los hidroperóxidos lipídicos, utilizando GSH u otra molécula de poder reductor equivalente, evitando así su acumulación (Pryor y Castle 1984). Otra consecuencia de la sobreproducción de las ERO generada por estrés abiótico es la oxidación de proteínas (Cvjetko y col. 2010). Sin embargo, en raíces de *F. arundinacea* expuestas a la MHC, la concentración de proteínas oxidadas se redujo en presencia de *Lewia* sp. Se ha demostrado que los organismos tolerantes al estrés, son capaces de aumentar la actividad de enzimas antioxidantes con el fin de atenuar la sobreproducción de ERO debida a la acumulación de hidrocarburos (Balasubramanlyam y col. 2015). Lo anterior, podría conducir a un decremento en la concentración de los dos marcadores del estrés oxidante estudiados en este periodo.

6.5.3 Defensa antioxidante

El análisis de las actividades enzimáticas antioxidantes (SOD, POD y GST) después de 7 días de exposición a la MHC (Fig. 24 y 26) se utilizó para determinar la actividad enzimática relativa (Fig. 25 y 27), con el fin de identificar el efecto de la MHC o del hongo sobre la actividad enzimática de las plantas expuestas a la MHC durante 7 días. Independientemente de la exposición a la MHC, las actividades SOD y POD fueron estimuladas en las raíces de las plantas asociadas (Fig. 24 y 25). En presencia de hidrocarburos, la actividad SOD en las raíces no asociadas fue menor (5.6 veces) que la registrada en las asociadas (Fig. 24a y 25a). En los tallos, la actividad SOD disminuyó por efecto de la MHC tanto en las plantas no asociadas (50%) como en las asociadas (60%), ambas comparadas con las plantas cultivadas en ausencia de la MHC.

La disminución de las actividades SOD y POD se ha observado en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Liu y col. 2009) y *Triticum aestivum* (Tomar y Jajoo 2015) durante la exposición a HAP. Esta disminución se relaciona con el aumento desproporcionado de ERO que supera la capacidad antioxidante de las plantas (Cvjetko y col. 2010). La disminución de la actividad SOD en los tallos y raíces de *F. arundinacea* se podría considerar como una evidencia indirecta de la acumulación de $\bullet\text{O}_2^-$ en respuesta a la MCH (Debiane y col. 2008). Comparado con los controles, el aumento en la actividad SOD en las raíces de plantas asociadas indica que *Lewia* sp. ayuda a regular la concentración de $\bullet\text{O}_2^-$ en presencia de hidrocarburos. Becerra-Castro y col. (2013) demostraron que la actividad de SOD, es comúnmente mayor en las plantas expuestas a un contaminante cuando se asocian con endófitos.

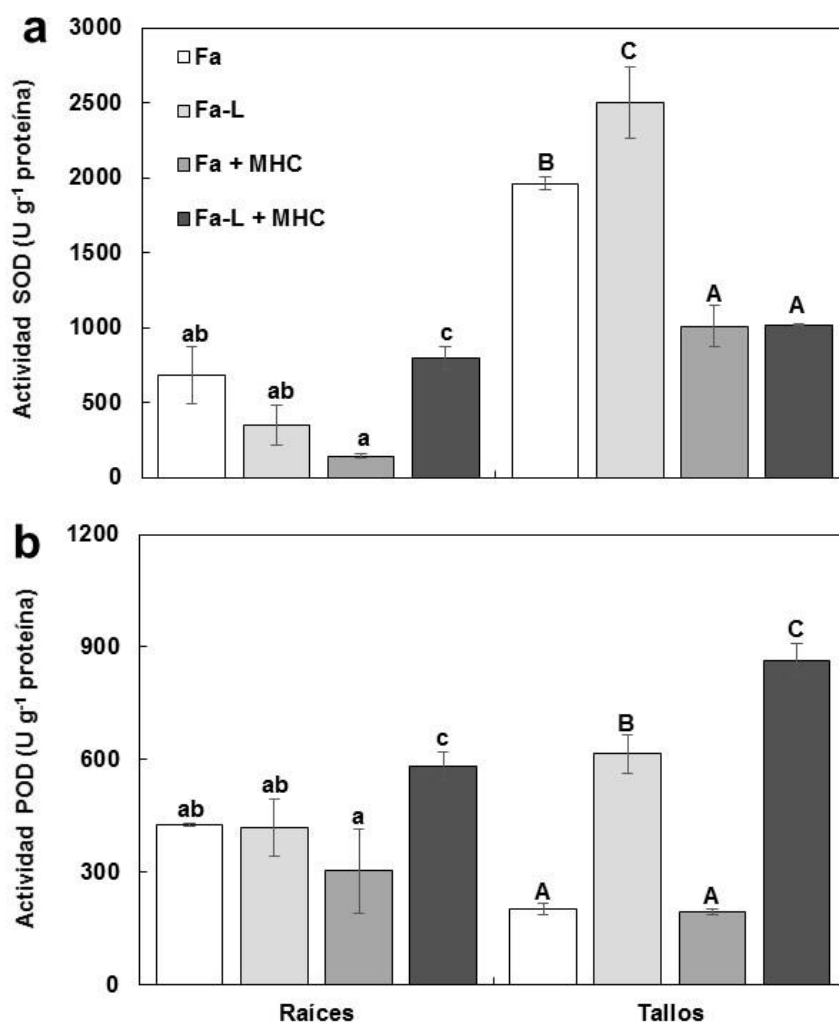


Figura 24. Actividades SOD (a) y POD (b) en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* creciendo por 7 días no asociadas (Fa) o asociadas con *Lewia* sp. (Fa-L) en un suelo modelo conteniendo o no 800 mg kg⁻¹ de una mezcla de hidrocarburos (MHC).

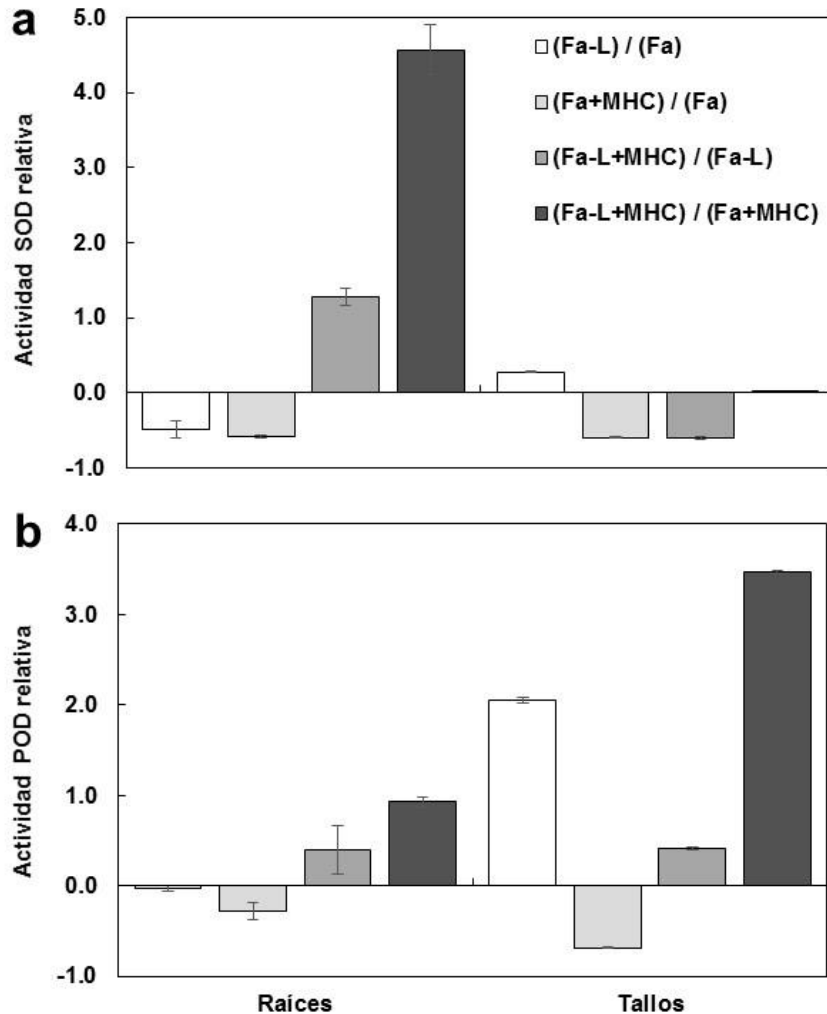


Figura 25. Actividad relativa de SOD (a) y POD (b) en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* creciendo por 7 días solas (Fa) o asociadas con *Lewia* sp. (Fa-L) en un suelo modelo contaminado con una mezcla de hidrocarburos (MHC).

El aumento de la actividad POD independientemente de la presencia de la MHC, especialmente en los tallos de plantas asociadas (Fig. 24b y 25b), indica que *Lewia* sp. estimula la defensa de la planta mediante el control del nivel de H_2O_2 . De hecho, se registró una menor concentración de H_2O_2 en las plantas asociadas, en particular en las que crecieron en presencia de hidrocarburos (Tabla 7). En estas mismas plantas, también se registró un contenido menor de MDA (Tabla 8). Las POD pueden reducir los hidroperóxidos al alcohol correspondiente, evitando así que los hidroperóxidos de lípidos se acumulen y mejorando el crecimiento vegetal (Pryor y Castillo 1984). Kawaoka y col. (2003) demostraron que la actividad POD tiene un papel en el crecimiento de *F. arundinacea* a través de la modificación de funciones tales como el control de la producción de hormonas de senescencia. El aumento en las actividades SOD y POD en las raíces de *F. arundinacea* asociadas con *Lewia* sp. y cultivadas en la MHC sugieren que el hongo ayuda a controlar la sobreproducción de ERO inducida

por la presencia de la MHC. Estos resultados se confirman por el hecho de que el contenido de MDA y los grupos CO se redujeron significativamente por efecto de *Lewia* sp. Lo anterior, podría contribuir al mejor crecimiento registrado en la planta (Fig. 23).

En cuanto a la actividad GST, esta fue mayor en los tallos que en las raíces de las plantas no asociadas (Fig. 26 y 27) y en las raíces fue significativamente estimulada por la presencia de la MHC. Esta actividad se redujo fuertemente tanto en tallos como en raíces de las plantas asociadas con *Lewia* sp., especialmente en plantas expuestas a la MHC.

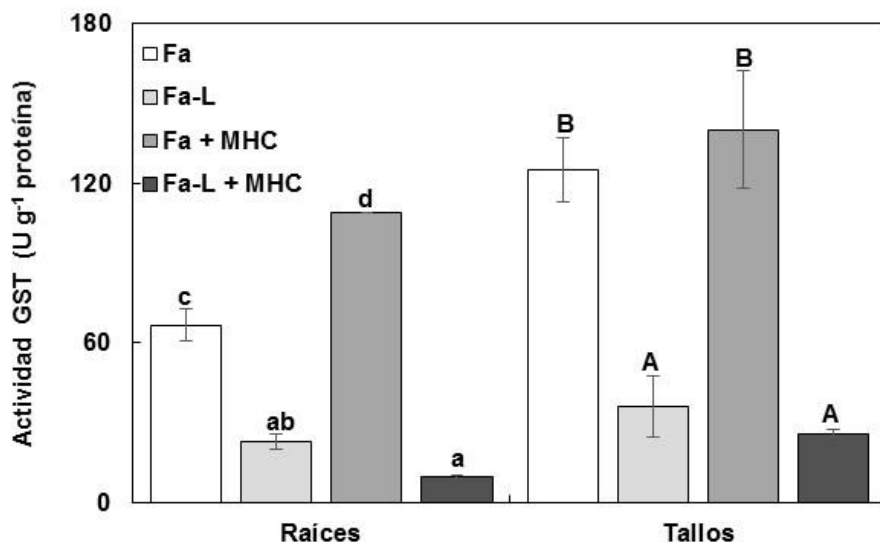


Figura 26. Actividad GST en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* creciendo por 7 días solas (Fa) o asociadas con *Lewia* sp. (Fa-L) en un suelo modelo conteniendo o no 800 mg kg⁻¹ de una mezcla de hidrocarburos (MHC).

Contrario a lo observado en las actividades SOD y POD en este mismo periodo de exposición a la MHC, la actividad GST disminuyó en las plantas asociadas con el hongo y expuestas a la MHC, lo que podría atribuirse a cambios en los niveles de las fitohormonas en las plantas por efecto de *Lewia* sp. Ya que se ha demostrado que la actividad de esta enzima es modulada por estos compuestos (Kumar y col. 2013). Este hecho también puede contribuir a la mejora del crecimiento registrado en las plantas asociadas (Fig. 23). Hasta ahora, la mayoría de los estudios relacionados con la actividad GST en plantas se ha centrado en las respuestas a la presencia de metales pesados (Mirzahassemi y col. 2014; Rojas-Loria y col. 2014). Similar a nuestros resultados, la actividad GST en los tallos de *F. arundinacea* expuestos a concentraciones bajas (30 mg kg⁻¹) de níquel, disminuyó en plantas asociadas con el hongo *Neotyphodium coenophialum* (Mirzahassemi y col. 2014).

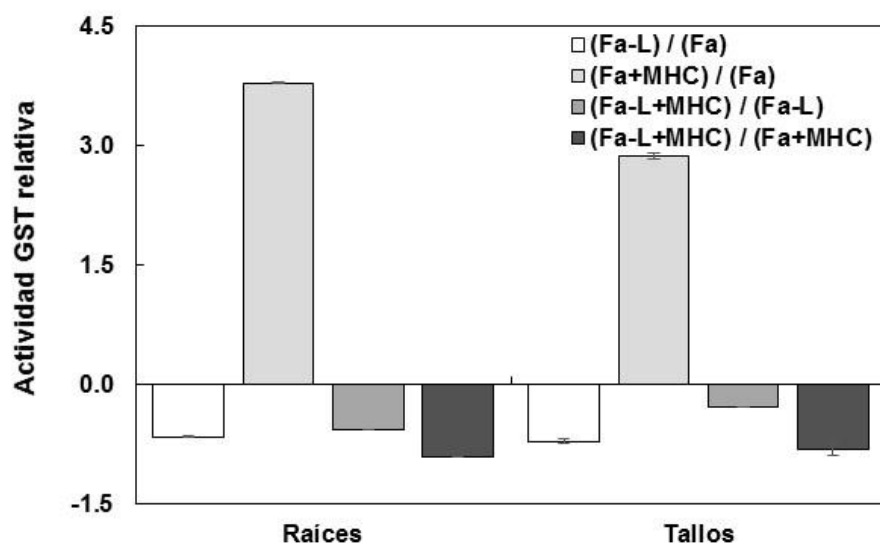


Figura 27. Actividad relativa GST en raíces y tallos de plantas de *F. arundinacea* creciendo por 7 días solas (Fa) o asociadas con *Lewia* sp. (Fa-L) en un suelo modelo contaminado con una mezcla de hidrocarburos (MHC).

La estimación de actividades relativas tanto SOD como POD y GST (Fig. 21-26), ayudó a distinguir claramente el efecto ya sea de los hidrocarburos o del hongo en las plantas en un periodo de 7 días. La disminución de las actividades SOD y POD y el aumento de la actividad GST por efecto de la MHC en las plantas de *F. arundinacea* no asociadas, sugieren que las GST de la planta pueden estar relacionadas con la detoxificación de los hidrocarburos, mientras que las SOD y POD parecen no estar involucradas en este tipo de procesos. Contrario a lo anterior, en las plantas asociadas y expuestas a la MHC, el aumento de las actividades SOD y POD, particularmente en las raíces, indica que *Lewia* sp. estimula la actividad de ambas enzimas, contribuyendo a un incremento en el sistema de defensa antioxidante bajo condiciones de estrés por hidrocarburos. La disminución de la actividad GST por influencia de *Lewia* sp., incluso en presencia de hidrocarburos, sugiere que podría estar relacionada con el mantenimiento de la asociación endófito. Estos resultados demuestran que los mecanismos de defensa de la planta contra los efectos adversos de los hidrocarburos están influenciados por la asociación endófito con *Lewia* sp.

7.CONCLUSIONES

Se logró inducir la asociación endófitra entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp., después de 15 días de contacto, en un medio con relación C/N de 5 y concentración de sales completas de MS

La asociación planta-endófito promovió el crecimiento de la planta, así como el contenido de H₂O₂ y MDA, y disminuyó el contenido de proteínas oxidadas y la actividad enzimática GST en condiciones *in vitro*.

La asociación endófitra entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. incrementó la tolerancia a una mezcla de hidrocarburos después de 45 días de exposición, encontrando una CI₅₀ de 757 mg kg⁻¹ para *F. arundinacea* y de 1100 mg kg⁻¹ para la asociación endófitra inducida entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp. en un suelo modelo con déficit de nutrientes.

Después de 45 días de exposición a la mezcla de hidrocarburos *Lewia* sp. promovió la remoción de hexadecano y pireno, alcanzando remociones del 95 y 91%, respectivamente.

Lewia sp. promueve el crecimiento de *F. arundinacea* a través del control en el contenido de H₂O₂ y MDA, lo anterior se puede relacionar con el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y POD de la planta expuesta a hidrocarburos.

La disminución de la actividad GST por influencia de *Lewia* sp. en la asociación expuesta o no a la mezcla de hidrocarburos, sugiere que esta actividad enzimática podría estar relacionada con el mantenimiento de la asociación endófitra.

Se observó un incremento entre el daño oxidante de las plantas y la asociación, con la remoción de los hidrocarburos. De la defensa antioxidante, la actividad POD de *F. arundinacea* no asociada se disminuyó al incrementar la remoción de los hidrocarburos, en especial el pireno, lo que sugiere una inhibición en la actividad.

Este estudio demuestra el rol positivo de *Lewia* sp. en la promoción del crecimiento y el alivio del estrés oxidante en *F. arundinacea* expuesta a una mezcla de hidrocarburos.

La asociación endófitra *F. arundinacea*-*Lewia* sp. es una alternativa promisoriosa para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

8.RECOMENDACIONES

Con base en el trabajo realizado y los resultados obtenidos, se recomiendan los siguientes estudios con *F. arundinacea* y la asociación inducida entre *F. arundinacea* y *Lewia* sp.

Para proponer el mecanismo de remoción de los hidrocarburos, analizar las actividades enzimáticas polifenol oxidasas, ascorbato peroxidasas, glutatión peroxidasas, glucuronil transferasas, y proteínas de choque térmico, así como moléculas antioxidantes glutatión y ascorbato.

Para identificar las modificaciones a la expresión genética que permiten la asociación y la respuesta a las condiciones de estrés, realizar una comparación de los perfiles en la expresión genética de *F. arundinacea* y la asociación *F. arundinacea-Lewia* sp.

Para mejorar el entendimiento de los mecanismos de degradación y detoxificación de los hidrocarburos en este sistema, cuantificar los hidrocarburos acumulados en raíz y translocados a tallos, así como la distribución de los contaminantes en los organelos celulares

Para determinar la toxicidad del cultivo, investigar el metabolismo de los hidrocarburos y su distribución celular en la planta y la asociación.

9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón A, Delgadillo-Martínez J, Franco-Ramírez A, Davies F, Ferrera-Cerrato R (2006) Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita*-*Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22: 39-47.
- Alkan M, Demirbas Ö, Doğan M (2005) Zeta potential of unexpanded and expanded perlite simple in various electrolyte media. *Micropor. Mesopor. Mater.* 84: 192-200.
- Alkio M, Tabuchi TM, Wang XC, Colón-Carmona A (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.* 56: 2983–2994.
- Almroth BC, Albertsson E, Sturve J, Forlin L (2008) Oxidative stress, evident in antioxidant defenses and damage products in rainbow trout cabbage outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70: 370-378.
- Ahmad P, Nabi G, Ashraf M (2011) Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *S. Afr. J. Bot.* 77: 36-44.
- Ahammed GJ, Gao C-J, Ogwen JO, Zhou Y.H, Xia X-J, Mao W-H, Shi K, Yu J-Q (2012) Brassinosteroids induce plant tolerance against phenanthrene by enhancing degradation and detoxification in *Solanum lycopersicum* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80: 28-36.
- Ahammed GJ, Wang M-M, Zhou Y-H, Xia X-J, Mao W-H, Shi K, Yu J-Q. (2012b) The growth, photosynthesis and antioxidant defense response of five vegetable crops to phenanthrene stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80. 132-139.
- Andersson L, Milberg P (1998) Variation in seed dormancy among mother plants, populations and years of seed collection. *Seed Sci. Res.* 8: 29-38.
- Aprill W, Sims RC (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere.* 20: 253–265.
- Badu ST, Tripuranthakam S, Greenberg BM (2005) Biochemical responses of the aquatic higher plant *Lemna gibba* to a mixture of copper and 1,2-dihydroxyanthraquinone: synergistic toxicity via reactive oxygen species. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 3030-3036
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Roberts DP, Thomas SE, Crozier J, Samuels GJ, Choi I-Y, Holmes KA (2006) Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta.* 224: 1449-1464.

- Balasubramanlyam A, Chapman MM, Harvey JP (2015) Responses of tall fescue (*Festuca arundinacea*) to growth in naphthalene-contaminated sand: xenobiotic stress versus water stress. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22: 7495-7507.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2013) ROS as key players in plant stress signaling. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jbx/ert375.
- Baptista P, Martins A, Pais MS, Tavares RM, Lino-Neto T (2007) Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhizal establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tictorius*. *Mycorrhiza*. 17: 185-193.
- Becerra-Castro C, Prieto-Fernández Á, Kidd SP, Weyens N, Rodríguez-Garrido B, Touceda-González M, Acea MJ, Vangronsveld J (2013) Improving performance of *Cytisus striatus* on substrates contaminated with hexachlorocyclohexane (HCH) isomers using bacterial inoculants: developing a phytoremediation strategy. *Plant Soil*. 362: 247-260.
- Baud-Grasset F, Baud-Grasset S, Safferman SI (1993) Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*. 26: 1365-1374.
- Bressano M, Curetti M, Giachero L, Vargas GS, Cabello M, March G, Ducasse DA, Luna MC (2010) Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *J. Plant Physiol*. 167: 1622-1626.
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol*. 52: 302-310.
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalase and peroxidases. *Method. Enzymol*. 2: 764-755.
- Cheeseman JM (2006) Hydrogen peroxide concentration in leaves under natural conditions. *J. Exp. Bot.* 57: 2435-2444.
- Cheema SA, Khan MI, Tang X, Zhang C, Shen C, Zaffar M, Ali S, Yang J, Shen K, Chen X, Chen Y (2009) Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *J. Hazard. Mat.* 166: 1226-1231.
- Cheplick G.P., Clay K. y Marks S (1989) Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytologist*. 111:89-97.
- Chrikishvili DI, Zaalishvili GV, Mitaishvili TI, Lomidze EP (2006) Peptide conjugates of benzene and toluene metabolites in English Ryegrass. *Russ. J. Plant Physiol*. 53: 511-517.

- Cruz-Hernández A, Tomasini-Campocosio A, Pérez-Flores LJ, Fernández-Perrino FJ, Gutiérrez-Rojas M (2013) Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots. *Plant Soil*. 362: 261-270.
- Cuyeu R, Rosso B, Pagano E, Soto G, Fox R, Ayub ND (2013) Genetic diversity in a world germplasm collection of tall fescue. *Genet Mol Biol*. 36: 237-242.
- Cvjetko P, Tolić S, Šikić S, Balen B, Tkalec M, Vidaković-Cifrek Ž, Pavlica M (2010) Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). *Arh Hig. Rada. Toksikol*. 61: 287-296.
- Dakora FD, Phillips DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil*. 245: 35-47.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Fermani A, Shirali P, Sahraoui AL (2008) *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ. Exp. Bot*. 64: 120-127.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Fermani A, Sahraoui AL (2009) Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry*. 70: 1421-1427.
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM (2004) Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant*. 218: 579-588.
- Dixit P, Mukherjee PK, Sherkhane PD, Kale SP, Eapen S (2011) Enhanced tolerance and remediation of anthracene by transgenic tobacco plants expressing a fungal glutathione transferase gene. *J. Hazard. Mat*. 192: 270-276.
- Dufernez F, Derelle E, Noël C, Sancier G, Mantini C, Dive D, Soyer-Gobillard M, Capron M, Pierce JR, Wintjens R, Guillebault D, Viscogliosi E (2008) Molecular characterization of iron-containing superoxide dismutase in the heterotrophic dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Protists*. 159: 223-238.
- Dupont P-Y, Eaton CJ, Wargent JJ, Fechtner S, Solomon P, Schmid J, Day RC, Scott B, Cox MP (2015) Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development. *New Phytologist*. 208: 1227-1240.

- Ferrera-Cerrato R, Rojas-Avelizapa NG, Poggi-Varaldo HM, Alarcón A., Cañizares-Villanueva RO (2006) Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminada con hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev. Latinoam Microbiol.* 48: 179-187.
- Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Mendoza-López MR, Sangabriel W, Trejo-Aguilar D, Cruz-Sánchez JS, López-Ortiz C, Delgadillo-Martínez J (2007) Phytoremediation of fuel oil-polluted soil with *Phaseolus coccineus* using organic or inorganic fertilization. *Agrociencia.* 41: 817-826.
- Gao Y, Zhu L (2004) Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere.* 55: 1169-1178.
- Gao Y, Li Q, Ling W, Zhu X (2011) Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soil contaminated with phenanthrene and pyrene. *J Hazard Mater.* 185: 703-709.
- Gao Y, Li H, Gong S (2012) Ascorbic acid enhances the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in roots of Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *PLoS ONE* 7(11): e 50467.doi:10.1371/journal.pone.0050467.
- Gao Y, Zhang Y, Liu J, Kong H (2013) Metabolism and subcellular distribution of anthracene in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Soil.* 365: 171-182.
- Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 111: 3-49.
- García-Gómez RS, Pandiyan T, Aguilar-Iris V, Ruiz-Figueroa M, Durán-de-Bazúa C (2004) Identificación y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos usando métodos espectroscópicos. *Tecnol. Ciencia Ed.* 19: 69-82.
- Ghosh M, Singh SP (2005) A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its products. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 3: 1-18.
- Glick BR (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28: 367-374.
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferases. En: (Ed). Jacoby W. B. *Method. Enzymol.* 77: 398-405.
- Hadacek F, Kraus FG (2002) Plant root carbohydrates affect growth behavior of endophytic microfungi. *FEMS Microbiology Ecology.* 41: 161-170.

- Hardegree SP, Van Vactor SS (1999) Predicting germination response of four cool-season range grasses to field-variable temperature regimes. *Environ. Exp. Bot.* 41: 209-217.
- Hawker SJ (1971) Enzymes concerned with sucrose synthesis and transformations in seeds of maize broad bean and castor bean. *Photochemistry.* 10: 2313-2322.
- Hernández-Ortega HA, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Zavaleta-Mancera HA, López- Delgado HA, Mendoza-López MR (2012) Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Mellilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *J. Environ. Manage.* 95: S319-S324.
- Hu Z, Xie Y, Jin G., Fu J, Li H (2015) Growth responses of two tall fescue cultivars to Pb stress and their metal accumulation characteristics. *Ecotoxicology.* 24: 563-572.
- Huang XD, El-Alawi Y, Gurska J, Glick BR, Greenberg BM (2004) A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from contaminated soil. *Environ. Pollut.* 130: 465-476.
- Juszczuk IM, Tybura A, Rychter AM (2008) Protein oxidation in the leaves and roots of cucumber plants (*Cucumis sativa* L.), mutant MSC16 and wild type. *J. Plant Physiol.* 165: 355-365.
- Kang K, Chen D, Gao Y, Zhang Y (2010) Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC Plant Biology.* 10: 210-216.
- Kawaoka A, Matsunaga E, Endo S, Kondo S, Yoshida K, Shinmyo A, Ebinuma H (2003) Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *J. Plant Physiol.* 132: 1177-1185.
- Krummenacher JJ, West KN, Schmidt LD (2003) Catalytic partial oxidation of higher hydrocarbons at millisecond contact times: decane, hexadecane, and diesel fuel. *J Catalysis.* 21: 332-343.
- Kwasna H, Bateman GL, Ward E (2008) Determining species diversity of microfungi communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Appl Soil Ecol.* 40: 44–56.
- Kwasna H, Ward E, Kosiak B (2006) *Lewia ordeicola* sp. nov. from barley grain. *Mycologia.* 98: 662–668.
- Khalmuratova I, Kim H, Nam Y-J, Oh Y, Jeong M-J, Choi H-R, You Y-H, Choo Y-S, Lee I-J, Shin J-H, Yoon H, Kim J-G (2015) Diversity and plant growth promoting capacity of endophytic fungi associated with halophytic plants from the west coast of Korea. *Mycobiol* 43: 373-383.

- Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee JH, Lee IJ (2011) Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochemistry*. 46: 440-447.
- Kreslavski VD, Lankin AV, Vasilyeva GK, Luybimov VY, Semenova GN, Schmitt F-J, Friedrich T, Allakhverdiev SI (2014) Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves. *Plant. Physiol. Bioch.* 81: 135-142.
- Kuldau G, Bacon C (2008) Claviciotaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*. 46: 57-71.
- Kumar S, Hasan AM, Chkrabry D, Deo TR, Shanker DR, Kumar TP (2013) Differential expression of rice Lambda class GST gene family members during plant growth, development, and response to stress conditions. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 31: 569-580.
- Kvesitadze E, Sadunishvili T, Kvesitadze GK (2009) Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants. *World Acad Sci Eng Technol* 55: 458-468.
- Lanfranco L, Novero M, Bonfante P (2005) The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume host. *Plant. Physiol.* 137: 1319-1330.
- Lee SH, Ahsan N, Lee KW, Kim DH, Lee DG, Kwak SS, Kwon SY (2007) Simultaneous overexpression of both Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stress. *J. Plant Physiol.* 164: 1626-1638.
- Lee SH, Lee WS, Lee CH, Kim JG (2008) Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *J. Hazard. Mat.* 153: 892-898.
- Li L, Moore PK (2007) An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 1138-1141.
- Li XM, Chen MJ, Li J, Ma LJ, Bu N, Li YY, Zhang LH (2014) Effect of endophyte infection on chlorophyll *a* fluorescence in salinity stressed rice. *Biologia Plantarum*. 58: 589-594.
- Lin Q, Mendelssohn IA, Suidan MT, Lee K, Venosa AD (2002) The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 897-902.

- Liu SL, Luo YM, Ho ZH, Wu LH, Ding KQ, Christie P (2004) Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environ. Geochem. Health*. 26: 285-293.
- Liu H, Weisman D, Ye Y, Cui, Huang Y, Colón-Carmona A, Wang Z (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*. 176: 375-382.
- Liu R, Xiao N, Wei S, Zhao L, An J (2014) Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using special plant named Fire Phoenix. *Sci. Total Environ*. 473-474: 350-358.
- Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265–275.
- Lucero ME, Barrow JR, Osuna P, Reyes I (2006) Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes. *J. Arid Environ*. 65: 276-284.
- Lucho-Constantino CA, Álvarez-Suárez M, Beltrán-Hernández RI, Prieto-García F, Poggi-Varaldo HM (2005) A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in the agricultural soil in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environ. International*. 31: 313-323.
- Martí MC, Camejo D, Fernández-García N, Rellán-Álvarez R, Marques S, Sevilla F, Jiménez A (2009) Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *J. Hazard. Mat*. 171: 879-885.
- Martin T, Oswald O, Graham IA (2002) *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiology*. 128: 472-481.
- Mei C, Flinn BS (2010) The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Pat Biotechnol* 4: 81-95.
- Mendarte-Alquisira C (2013) Aclimatación de la asociación planta-hongo filamentoso a un suelo contaminado artificialmente con hidrocarburos. *Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*. Posgrado en Biotecnología. Tesis de Maestría en Biotecnología.
- Merkl N, Schultze-Kraft R, Infante C (2005) Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environ. Pollut*. 138: 86–91.

- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp. Bot.* 61: 4197-4220.
- Mika A, Lühje S (2002) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology.* 132: 1489-1498.
- Ming Xu X, Lin H, Maple J, Björkblom B, Alves G, Larsen JP, Møller SG (2010) The *Arabidopsis* DJ-1a protein confers stress protection through cytosolic SOD activation. *J. Cell Sci.* 123: 1644-1651.
- Minotti G, Aust SD (1987) The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44: 191-208.
- Mirzahosseini Z, Shabani L, Sabzalian MR, Sharifi-Tehrani M (2014) *Neotyphodium* endophytes may increase tolerance to Ni in tall fescue. *Eur. J. Soil Biol.* 63: 33-40.
- Mirzahosseini Z, Shabani L, Sabzalian MR, Sharifi-Tehrani M (2015) ABC transporter and metallothionein expression affected by Ni and *Epichloe* endophyte infection in tall fescue. *Ecotox Environ Safe* 120: 13-19.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annua. Rev. Plant Biol.* 58: 459-481.
- Moons A (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam Horm* 72:155–202.
- Morkunas I, Boker S, Formela M, Ratajczak L (2012) Plant responses to sugar starvation. Chapter 19. pp. 409-438.
- Murashige T, Skoog F (1926) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology.* 473-497.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C (2010) Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol* 52: 195-204.
- Narro ML, Cerniglia CE, Baalen CV, Gibson DT (1992) Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1351-1359.
- Navarro BS, Navarro GG (2003) Química Agrícola. Ediciones Mundi-Prensa Madrid 2ª Edición pp. 15.

- Newsham KK (1999) *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliate* ssp. *Ambigua*. *New Phytol.* 144: 517-524.
- Nicolai M, Roncato MA, Canoy AS, Rouquié D, Sarda X, Freyssinet G, Robaglia C (2006) Large-scale analysis of mRNA translocation states during sucrose starvation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiol.* 141: 663-673.
- Pan S, He M, Lei Z, Yuan X (2016) Influence of inoculating earthworm on removal of pyrene in soil growing *Festuca arundinacea*. *Toxicol. Environ. Chem.* 98: 601-610.
- Pannangpetch P, Laupattarakasem P, Kukongviriyapan V, Kukongiriyapan U, Kongyingyoes B, Aromdee C (2007) Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 29: 1-9.
- Parrish ZD, Banks MK, Schwab AP (2004) Effectiveness of phytoremediation as a secondary treatment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in composted soil. *Int. J. Phytoremediation.* 6:119–137.
- Petróleos Mexicanos (PEMEX) (2016) Informe anual 2015.
- Pilon-Smiths E (2005) Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 975: 385-394.
- Porrás-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 291-315.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (2015) Informe de actividades 2015. PROFEPA, 2015. pp. 32
- Pryor W.A, Castle L (1984) Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Method. Enzymol.* 105: 293-299.
- Pulido P, Llamas E, Rodríguez-Concepción M (2017) Both Hsp 70 chaperone and Clp protease plastidial system are required for protection against oxidative stress. *Plant Signaling & Behavior.* doi.org/10.1080/15592324.2017.1290039
- Rai MK, Jaiswal VS, Jaiswal U (2008) Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae.* 117: 302-305.

- Rasmussen S, Parsons AJ, Bassett S, Christensen MJ, Hume DE, Johnson LJ, Johnson RD, Simpson WR, Stacke C, Voisey CR, Xue H, Newman J (2007) High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytologist*. 173: 787-797.
- Reynoso-Cuevas L, Gallegos-Martínez ME, Cruz-Sosa F, Gurierrez-Rojas M (2008) *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresour. Technol.* 99: 6379–6385
- Rodríguez CE, Fukuto JM, Taguchi K, Froines J, Cho AK (2005) The interaction of 9,10-phenanthrenequinone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a potential site for toxic actions. *Chem. Biol. Interact.* 155: 97-110.
- Rodríguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional role. *New Phytologist*. 182: 314-330.
- Rojas-Loria CC, Peralta-Perez MR, Buendia-Gonzalez L, Volke-Sepulveda TL (2011) Effect of a saprophytic fungus on the growth and the lead uptake, translocation and immobilization in *Dodonaea viscosa*. *Int. J. Phytoremediation*. 14: 518-529.
- Rojas-Loria CC, Favela-Torres E, González-Márquez H, Volke-Sepúlveda TL (2014) Role of glutathione and glutathione S-transferase in lead tolerance and bioaccumulation by *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. *Acta Physiol Plant* 36: 2501-2510.
- Roy S, Pellinen J, Sen CK, Häenine O (1994) Benzo[a]anthracene and benzo[a]pyrene exposure in the aquatic plant *Fontinalis antipyretica*: Uptake, elimination and the responses of biotransformation and antioxidant enzymes. *Chemosphere*. 29: 1301–1311.
- Roy S, Sen CK, Hännine O (1996) Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using “moss bags”. Bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*. 32: 2305–2315.
- Schnoor J, Licht L, McCutcheon S, Wolfe N, Carreira L (1995) Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29: 318A- 323A.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Romert A-K, Krohn K (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res* 106, 996–1004.

- Sherratt JP, Hayes DJ (2001) Enzyme systems that metabolize drugs and other xenobiotics. Reino Unido. *Jhon Wiley & Sons Ltd.* pp. 319-352.
- SEMARNAT (2013) Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales. Indicadores clave y de desempeño ambiental. Edición 2012. México.
- Shahrtash M (2013) Plant glutathione S-transferases function during environmental stresses: a review article. *Rom J Biol.* 58: 19-25.
- Shin R, Schachtman DP (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Plant Biology.* 101: 8827-8832
- Singh VP, Sirvastava PK, Prasad SM (2012) Differential effect of UV-B radiation on growth, oxidative stress and ascorbate-glutathione cycle in two cyanobacteria under copper toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 61: 61-70.
- Soleimani M, Afyni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR, Christensen JH (2010) Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere.* 81: 1084-1090.
- Starkov AA (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147: 37–52.
- Stiborová M, Anzenbachlr P (1991) What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants: cytochrome P-450 or peroxidase? (A hypothesis). *Gen. Physiol. Biophys.* 10: 209–216.
- Tanaka A, Christensen MJ, Takemoto D, Park P, Scott B (2006) Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell.* 18: 1052-1066.
- Tiwari S, Lata C, Singh CP, Shekhar NC (2016) *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* 99: 108-117.
- Tomar RS, Jajoo A (2015) Photomodified fluoranthene exerts more harmful effects as compared to intact fluoranthene by inhibiting growth and photosynthetic processes in wheat. *Ecotox. Environ. Safe.* 122: 31-36.
- Thomas SE, Crozier J, Aime MC, Evans HC, Holmes KA (2008) Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycol Res.* 112(7):852–860.

- Torres MS, White Jr. JF, Zhang X, Hinton DM, Bacon C (2012) Endophyte-mediated adjustments in host morphology and physiology and effects on host fitness traits in grasses. *Fungal Ecology*. 5: 322-330
- Tripathy BC, Oelmüller R (2012) Reactive oxygen species generating and signaling in plants. *Plant Signal Behav*. 7: 1621-1633.
- Vallentine P, Hung C-Y, Xie J, Hoewyk DV (2014) The ubiquitin-proteasome pathway protects *Chlamydomonas reinhardtii* against selenite toxicity, but is impaired as reactive oxygen species accumulate. *AoB Plants*. 6: plu062; doi:10.1093/aobpla/plu062.
- Walsh RA (1995). *Schenonorus arundinaceus*. In: Fire Effects Information System, (Online). U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, *Fire Sciences Laboratory* (Producer) (<http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/graminoid/scharu/all.html>)
- Waqas M, Khan AL, Kamran M, Hamayun M, Kang S-M, Kim Y-H, Lee I-J (2012) Endophytic fungi produce gibberellins and indolacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*. 17: 10754-10773.
- Wei H, Song S, Tian H, Liu T (2014) Effects of phenanthrene on seed germination and some physiological activities of wheat seedling. *C. R. Biol*. 337: 95-100.
- White Jr JF, Bacon CW, Hinton DH (1997) Modifications of host cells and tissues by the biotrophic endophyte *Epichloë amarillans* (Clavicipitaceae; Ascomycotina). *Canadian Journal of Botany*. 75: 1061-1069.
- White Jr. JF, Torres SM (2010) Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol. Plant*. 138:440-446.
- Wild E, Dent J, Thomas GO, Jones KC (2006) Visualizing the air-to-leaf transfer and within-leaf movement and distribution of phenanthrene: further studies utilizing tow-photon excitation microscopy. *Environ. Sci. Technol*. 40: 907-916.
- Yang F, Li J, Gan X, Qian Y, Wu X, Yang Q. 2010. Assessing nutritional status of *Festuca arundinacea* by monitoring photosynthetic pigments from hyperspectral data. *Comput. Electron. Agric*. 70: 52-59.
- Yankova PV, Rasheva TV, Kujumdzieva VA (2002) Catalase enzyme in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic J*. 5: 29-41.

- Yoshimura K, Miyao K, Gaber A, Takeda T, Kanaboshi H, Miyasaka H, Shigeoka S (2004) Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *Plant J.* 37: 21-33.
- Zhang X, Fan X, Li C, Nan Z (2010) Effects of cadmium stress and seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a *Neotyphodium* endophyte. *Plant Growth Regul* 60: 91-97.
- Zhao S, Jia L, Duo L (2013) The use of a biodegradable chelator for enhanced phytoextraction of heavy metals by *F. arundinacea* from municipal soil waste compost and associated heavy metal leaching. *Biores. Technol.* 129: 249-255.
- Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z (2007) New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Int.* 33: 406–413.

ANEXO I

COMPONENTES DEL MEDIO MURASHIG AND SKOOG

Componentes del medio Murashige and Skoog adquirido en *Sigma-Adrich** y utilizado en este proyecto

Componente	(mg/L)
Nitrato de amonio	1650.0
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio (anhidro)	332.2
Cloruro de cobalto • 6H ₂ O	0.025
Sulfato cúprico • 5H ₂ O	0.025
Disodio-EDTA • 2H ₂ O	37.26
Sulfato ferroso • 7H ₂ O	27.8
Sulfato de magnesio (anhidro)	180.7
Sulfato de manganeso • H ₂ O	16.9
Ácido de molibdeno (sodio sal) • 2H ₂ O	0.25
Ioduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato de potasio monobásico	170.0
Sulfato de zinc • 7H ₂ O	8.6
Glicina (base libre)	2.0
Mio-Inositol	100.0
Ácido nicotínico (ácido libre)	0.5
Piridoxina • HCl	0.5
Tiamina • HCl	0.1

* Número de catálogo M5519, 4.4 g de la preparación son requeridos para preparar 1 L de solución.

ANEXO II

Improved growth and control of oxidative stress in plants of *Festuca arundinacea* exposed to hydrocarbons by the endophytic fungus *Lewia* sp.

Calliope Mendarte-Alquisira ·
Mariano Gutiérrez-Rojas ·
Humberto González-Márquez ·
Tania Volke-Sepúlveda

Received: 17 May 2016 / Accepted: 22 August 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2016

Abstract

Aims The protective role of fungal endophytes in plants under stress by hydrocarbons is yet poorly understood. The influence of the endophytic fungus *Lewia* sp. on growth and oxidative stress control in plants of *Festuca arundinacea* exposed to a hydrocarbon mixture (HCM) was evaluated.

Methods Plants of *F. arundinacea* were inoculated or not with *Lewia* sp. to establish endophytic association. After 15 days, the plant growth, oxidative stress, and activity of antioxidant enzymes were analyzed in associated and unassociated plants. Then, both groups of plants were exposed for 7 days to a HCM (800 mg kg⁻¹) in a model soil. The effect of the HCM was

assessed in the plants through the same variables as mentioned above.

Results Endophytic association was established after 15 days. The fungus enhanced plant growth, as well as H₂O₂ and malondialdehyde concentration, and decreased glutathione S-transferase (GST) activity. *Lewia* sp. decreased the H₂O₂ concentration in plants exposed to the HCM and increased the activity of superoxide dismutase and peroxidases, while significantly decreasing GST activity.

Conclusions This study demonstrates the positive role of *Lewia* sp. in promoting growth and alleviating oxidative stress in *F. arundinacea* exposed to hydrocarbons.

Keywords Endophytic association ·
Festuca arundinacea · Hydrocarbons · *Lewia* sp. ·
Oxidative stress

Responsible Editor: Alain Pierret.

C. Mendarte-Alquisira · M. Gutiérrez-Rojas ·
T. Volke-Sepúlveda (✉)
Biotechnology Department, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina,
Iztapalapa 09340 D.F., Mexico
e-mail: tvs@xanum.uam.mx

C. Mendarte-Alquisira
e-mail: cma@xanum.uam.mx

M. Gutiérrez-Rojas
e-mail: mgr@xanum.uam.mx

H. González-Márquez
Health Sciences Department, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina,
Iztapalapa 09340 D.F., Mexico
e-mail: hgm@xanum.uam.mx

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are compounds widely spread in aquatic and terrestrial ecosystems (Liu et al. 2009); among these, phenanthrene, and pyrene are classified as carcinogenic and mutagenic by the U.S. Environmental Protection Agency (Debiane et al. 2009). Plants have defense mechanisms against the adverse effects caused by these compounds, which enables them to survive under such abiotic stress (Kvesitadze et al. 2009). In plants under biotic and abiotic stress conditions, reactive oxygen species

Published online: 29 August 2016

 Springer

(ROS) are produced in excess amounts. These reactive molecules, which comprise radical and non-radical species, react with biomolecules causing chemical changes in proteins, lipids, and even DNA, which results in oxidative stress (Cvjetko et al. 2010). Thus, the intracellular ROS concentration has to be tightly controlled through the antioxidant defense system, which consists of enzymatic – including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POD), and glutathione S-transferases (GST) – and nonenzymatic antioxidants, mainly ascorbate and glutathione (GSH) (Debiane et al. 2009). GSH is also a cosubstrate for GSTs, which in plants participate in various functions such as phytohormone homeostasis, hydroxyperoxide detoxification, and apoptosis regulation (Shahrtash 2013), and also have key roles in response to biotic and abiotic stresses (Kumar et al. 2013). Nevertheless, high ROS production is also necessary for plant defense. Currently, the involvement of ROS as signal molecules during cellular growth, plant-pathogen interactions, and stress responses has been demonstrated (Nanda et al. 2010).

A successful plant strategy to adapt to a wide range of stressors is the formation of mutualistic symbiotic associations with microorganisms (Tanaka et al. 2006). Plant-fungi symbiotic associations are ubiquitous in natural plant communities. Besides the well-studied symbiosis with mycorrhizal fungi, mutual relationships among plants and endophytes have had increasing attention (Mei and Flinn 2010). Endophytic microorganisms live within plant tissues without causing symptoms of disease (Porras-Alfaro and Bayman 2011). Several studies have shown that endophytes can benefit plants growing under stress conditions, such as the presence of pollutants – heavy metals (Ahmad et al. 2011) and organochlorines (Becerra-Castro et al. 2013) – or high salt concentrations and drought (Tiwari et al. 2016), by controlling oxidative stress. Plant colonization by endophytes causes biochemical changes during establishment of the association. A common response is an increased production of ROS (oxidative burst), which is thought to be required to inactivate the plant's defense response against the fungus, thereby maintaining a mutualistic relationship (Tanaka et al. 2006; Nanda et al. 2010). Most studies have been focused on the association of plants with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. or the endophytic fungus *Neotyphodium coenophialum* under stress by heavy metals and pesticides (Debiane et al. 2009). Nevertheless, it

was recently reported that an endophytic fungus in the genus *Lewia* increased the tolerance of *Festuca arundinacea* against a hydrocarbon mixture (Cruz-Hernández et al. 2013). *Lewia* sp. is an ascomycete fungus in the *Pleosporaceae* family, which was also identified as an endophyte of halophytic plant species such as *Limonium tetragonum* and *Phragmites australis* (Khalmuratova et al. 2015).

Although the ecological significance of endophytic fungi has been shown, their role in controlling oxidative stress in plants exposed to hydrocarbons is not yet fully understood. To date, the particular mechanisms influencing the tolerance and growth of *F. arundinacea* plants exposed to hydrocarbons in an endophytic association with *Lewia* sp. have not been reported. This led us to hypothesize that *Lewia* sp. modifies the activity of antioxidant enzymes of *F. arundinacea* under in vitro conditions, which consequently can improve growth and control of oxidative stress in plants exposed to a hydrocarbon mixture (HCM). Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of *Lewia* sp. on growth and oxidative stress control in plants of *F. arundinacea* exposed to a HCM in a model soil.

Materials and methods

Plant material

This study was done with plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) produced from seeds obtained in the central food market in Mexico City. Seeds were placed into a filter paper (Whatman 40) and submerged in a commercial detergent solution (2 % w/v) for 20 min with agitation, then they were thoroughly washed with tap water. Seeds were then surface-sterilized by soaking in 70 % ethanol (30 s), followed by 1.8 % NaClO containing 0.01 % Tween-20 (30 min). Afterwards, seeds were thoroughly rinsed with deionized sterile water.

The treated seeds were aseptically sown in Magenta® boxes (Sigma) containing sterile Murashige-Skoog (MS, Murashige and Skoog 1962) medium (Sigma) with sucrose (10 g L⁻¹, Sigma) and Phytigel (1.8 g L⁻¹, Sigma) added. The pH of the medium was adjusted to 5.7 before autoclaving (121 °C, 15 min). Sixteen seeds per box were grown for 15 days at 25 ± 2 °C under a 16 h photoperiod (light intensity of 50 μmol m⁻² s⁻¹).

Fungal inoculum

Lewia sp. was isolated from surface-sterilized seeds of *F. arundinacea* germinated under in vitro conditions (Cruz-Hernández et al. 2013). The strain was identified by comparing the nucleotide sequence (GenBank GU296022, taxid: 708157) with fungal sequences through standard nucleotide–nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). The fungus was maintained (4 °C) on potato dextrose agar (PDA) medium after 7 days of growth at 30 °C. The fungal inoculum was prepared by inoculating mycelium discs (5 mm) on Petri dishes containing MS medium with sucrose (10 g L⁻¹) and Phytigel, and incubated at 30 °C for 15 days. Sixty-five discs of peripheral mycelium were cut and the MS medium adhered was removed from each disk with a sterile scalpel. The free-medium biomass disks obtained were aseptically disaggregated by agitation in tubes containing glass beads (3 mm) and isotonic solution (0.9 % NaCl). The obtained fungal biomass suspension (10.1 ± 0.1 mg mL⁻¹) was used as inoculum.

Induction of the endophytic association

In order to establish endophytic association, 15-day-old plants of *F. arundinacea* were inoculated with 2 mL of the fungal biomass suspension around the roots. Plants inoculated or not were grown for 15 days more at 25 ± 2 °C (16 h photoperiod). Then, plants were harvested either for analysis or for their transplant to flasks with model soil added.

The presence of *Lewia* sp. within root tissues was verified by treating the roots as follows: cubes (1 cm³) of MS medium containing root segments were submerged in 70 % ethanol (48 h). The gel cubes were washed with deionized water and treated sequentially at 5 °C by immersion in the following solutions: once in 320 mM sucrose (48 h), three times in 420 mM sucrose (48 h), once in 420 mM sucrose (24 h). The cubes were stored at -20 °C for 24 h and then defrosted to release the roots. The root was cut into smaller segments, which were placed in a concave microscope slide and stained with Calcofluor White Stain (Sigma) and 10 % KOH for 7 min. The root images were obtained in a spectral confocal microscopy system (LSM780-NLO, Carl Zeiss). The track used was 410–579 nm beam splitters.

Culture conditions

The assay was done in glass flasks (experimental units, EU) containing a model soil polluted or not with 800 mg HCM kg⁻¹ of dry model soil. A mixture (1:1, w/v) of perlite (Dicalite, Mexico) and silica sand was used as model soil. Perlite was sieved (0.4–2.8 mm) and washed with hot water to remove impurities. Silica sand (0.4–2.0 mm) was treated with 10 % HCl (24 h) to remove organic matter and carbonates, and then thoroughly washed with distilled water. Both materials were dried (60 °C, 72 h) and then mixed into EU. Each EU contained 84 g (dry weight, DW) of model soil, which was moistened with 40 mL of MS medium with sucrose (16 g kg⁻¹ DW) at pH 5.7. Before sterilization (121 °C, 15 min), the HCM, consisting of hexadecane, phenanthrene and pyrene (Sigma-Aldrich) in a ratio of 2:1:0.5 (w/w), was added to each flask. The HCM was dissolved in acetone, which was completely evaporated for 24 h.

Twelve 30-day-old plants of *F. arundinacea*, associated or not with *Lewia* sp., were transferred per EU containing the model soil polluted or not with the HCM. Four treatments were done: (i) *F. arundinacea* (Fa); (ii) *F. arundinacea* exposed to the HCM (Fa + HCM); (iii) *F. arundinacea* associated with *Lewia* sp. (Fa-L); (iv) *F. arundinacea*–*Lewia* sp. with HCM (Fa-L + HCM). EU were incubated for 7 days at 25 ± 2 °C under a 16 h photoperiod. A total of five EU were assayed to obtain 60 plants per treatment. After treatment period, 60 plants were separated into roots and shoots to be destructively analyzed as follows: (i) 12 were used for biomass determination and (ii) 48 were separated into four groups to determine (by triplicate) the content of H₂O₂, malondialdehyde (MDA), and oxidized proteins, as well as the enzyme activity in fresh tissues. For analyzes in fresh tissues, a replicate was the biomass obtained from 4 plants. These same analyzes were performed in plants obtained from MS medium.

Plant growth determination

Plant growth was quantified by measuring separately the biomass of shoots and roots on a DW basis, after oven-drying (60 °C, 48 h).

Preparation of crude extracts

Fresh tissues (~100 mg) of roots and shoots obtained from each treatment were separately pulverized in liquid

N_2 . Tissues were homogenized in cold sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7) with 1 % polyvinylpyrrolidone and protease inhibitor (P8215, Sigma, 5 μ L for 100 mg of fresh tissue) added. Homogenates were treated in a cell disruptor (Mikro-Dismembrator U, Sartorius) for 2 min at 2000 rpm and then centrifuged (4 °C, 10 min, 10629 g). The resultant supernatants (crude extracts, CE) were used to measure the protein content in a microplate spectrophotometer (ELx808, BioTek) by the method of Lowry et al. (1951), using a commercial kit (Bio-Rad) and BSA as standard.

Oxidative stress quantification

Hydrogen peroxide (H_2O_2)

The CE was mixed with 5 mM KCN to inhibit the CAT and POD activity, and then with a reaction solution containing ammonium ferrous sulfate (250 μ M), sorbitol (100 μ M), and xylenol orange (100 μ M) in 25 mM H_2SO_4 and 1 % ethanol. The mixture was incubated at room temperature for 30 min, and the complex formed between Fe^{2+} and xylenol orange was spectrophotometrically measured at 560 nm (50 Conc, Varian). The standard curve of H_2O_2 was prepared in distilled water in a concentration range of 0.5 to 80 μ M (Cheeseman 2006).

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was quantified by measuring the MDA concentration in the CE, which was prepared by homogenizing fresh tissues in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with 10 μ L of 500 mM butylated hydroxytoluene, and centrifuged (4 °C, 15 min, 20817 g). The reaction mixture contained 100 μ L of CE in 200 μ L of the reaction solution (15 % trichloroacetic acid, 0.5 % thiobarbituric acid and 0.25 N HCl). The mixture was incubated at 90 °C for 25 min. The chromogen produced was measured at 535 nm, and the MDA concentration was estimated with an extinction coefficient (ϵ) of 155 $mM^{-1} cm^{-1}$ (Buege and Aust 1978).

Oxidized proteins

The content of oxidized proteins was measured by quantifying the carbonyl (CO) groups in proteins. CO groups react with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), generating a hydrazone protein conjugate

which has a maximum absorbance at 375 nm. The reaction mixture contained the required amount of CE for 20 μ g of protein and 750 μ L of 10 mM DNPH in 2 M HCl. The CO group content was estimated with an $\epsilon = 22 mM^{-1} cm^{-1}$ (Juszczak et al. 2008).

Enzyme activity

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity was spectrophotometrically determined at 450 nm with a commercial kit (19160, Sigma). The assay utilizes a water-soluble tetrazolium salt that produces a formazan dye after reduction by the superoxide ($\bullet O_2^-$) radical. The rate of reduction with $\bullet O_2^-$ is linearly related to xanthine oxidase activity, which is inhibited by SOD. The result is compared with a standard curve of SOD. One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme that inhibits in 50 % of the reduction of $\bullet O_2^-$ per minute at 25 °C and pH 7.

Non-specific peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) activity was assayed by measuring the oxidation of guaiacol to tetraguaiacol catalyzed by POD in the presence of H_2O_2 , which was monitored in a microplate spectrophotometer at 450 nm for 4 min. The reaction mixture contained 200 μ L of sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7), 10 μ L of 1 % of guaiacol and 10 μ L of CE. The activity was calculated from the initial rate of the reaction considering $\epsilon = 26.6 mM^{-1} cm^{-1}$ (Chance and Maehly 1955). One unit of POD activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of tetraguaiacol per minute at 25 °C and pH 7.

Glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) activity was measured using a commercial kit (CS0410, Sigma). The conjugation of GSH to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) catalyzed by GST was monitored at 340 nm for 4 min. The reaction mixture contained 20 μ L of CE and 180 μ L of reaction solution (200 mM GSH and 100 mM CDNB in Dulbecco's buffer at pH 7). The activity was calculated with $\epsilon = 9.6 mM^{-1} cm^{-1}$ (Habig and Jakoby 1981). A GST unit is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of the GS-DNB conjugate per minute at 25 °C and pH 7.

In order to assess the effect of either the HCM or *Lewia* sp. on *F. arundinacea*, we used the enzyme

activity obtained in treatments performed in model soil, to obtain four relative enzyme activity indexes.

$$\left(\frac{Fa-L}{Fa}\right)^{-1} \quad (1)$$

$$\left(\frac{Fa-L+HCM}{Fa+HCM}\right)^{-1} \quad (2)$$

$$\left(\frac{Fa+HCM}{Fa}\right)^{-1} \quad (3)$$

$$\left(\frac{Fa-L+HCM}{Fa-L}\right)^{-1} \quad (4)$$

Where Eqs. (1) and (2) estimate the effect of *Lewia* sp. on *F. arundinacea* grown in the absence and presence of the HCM, respectively. Equations (3) and (4) are a measure of the effect of the HCM on *F. arundinacea* grown without or with *Lewia* sp., respectively.

Statistical analysis

Treatments were applied in a randomized design with three replicates per analysis, where one EU consisted of 12 plants. A Student's t-test ($\alpha = 0.05$) was used to determine significant differences among inoculated and non-inoculated plants during association induction. Data obtained from assays in the model soil were tested by one-way ANOVA and the means comparison was done using a Tukey-B test ($\alpha = 0.05$). Statistical differences between means are indicated with different letters. Results are expressed as means with their corresponding standard deviation. Analysis was performed using SPSS software, version PASW 18 (IBM SPSS-IBM Corp).

Results

Plant growth and biochemical responses by induction of endophytic association

It has been demonstrated that some fungi can be established as endophytes in plants by using different methods of inoculation or induction. Endophytic association between *F. arundinacea* and *Lewia* sp. was

established in MS medium, after 15 days of inoculating a suspension of biomass in the roots of 15-day-old plants. The endophytic nature of this association was confirmed by confocal microscopy; we observed fungal hyphae compartmentalized into epidermal root cells (Fig. 1). After 15 days, this particular association significantly enhanced (1.9- and 3.5-fold, respectively) the biomass production of shoots and roots, regarding to endophyte-free plants (Table 1).

After the period of association induction, increased levels of both H_2O_2 (up to 5-fold) and MDA (up to 3-fold) in roots and shoots of *F. arundinacea*-*Lewia* sp. were found compared to control plants (Table 1). The concentration of CO groups decreased (~2 times) in the associated plants compared to those unassociated, while in shoots, association induction did not modify SOD activity, down-regulation (1.6 times) was registered in the roots (Table 1). POD activity was found to be ~2 times higher in roots compared to shoots, particularly in associated plants. Activity in the roots was not significantly modified by the presence of *Lewia* sp., but the fungus caused a significant decrease (1.5 times) in the shoots. Also, a significant down-regulation in GST activity in roots and shoots (7.7

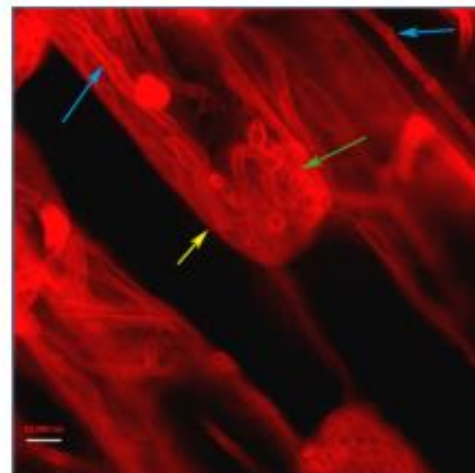


Fig. 1 Confocal microscopy image of roots of *F. arundinacea* endophytically associated with *Lewia* sp. after 15 days of growth in MS medium. Yellow arrow shows cellulose in the cell wall of roots; blue arrows show septate hyphae of *Lewia* sp.; green arrow shows hyphae compartmentalized within cells of the root

Table 1 Influence of the induction of endophytic association between *F. arundinacea* and *Lewia* sp. on plant growth, oxidative stress (content of H₂O₂, MDA and CO groups), and antioxidant enzymes activity (SOD, POD and GST)*

Response variable	Roots		Shoots	
	Fa	Fa-L	Fa	Fa-L
Growth (mg DW)	0.96 ± 0.03 ^a	3.34 ± 0.12 ^b	7.36 ± 0.48 ^A	13.87 ± 0.62 ^B
H ₂ O ₂ (nmol g ⁻¹ FW)	92.8 ± 3.0 ^a	313.8 ± 13.6 ^b	94.2 ± 2.9 ^A	466.4 ± 22.2 ^B
MDA (nmol g ⁻¹ FW)	11.4 ± 2.2 ^a	33.9 ± 0.9 ^b	37.8 ± 2.8 ^A	46.3 ± 1.4 ^B
CO (μmol g ⁻¹ protein)	461.9 ± 29 ^b	163.6 ± 10 ^a	349.4 ± 9 ^B	193.2 ± 11 ^A
SOD (U g ⁻¹ protein)	1280 ± 168 ^a	811 ± 93 ^b	3990 ± 271 ^A	3732.0 ± 572 ^A
POD (U g ⁻¹ protein)	1022 ± 100 ^a	1174 ± 62 ^a	821 ± 113 ^B	552.3 ± 39 ^A
GST (U g ⁻¹ protein)	84.8 ± 4.6 ^b	11.0 ± 1.2 ^a	135.6 ± 6.25 ^B	40.2 ± 3.9 ^A

*Data with different letter by row indicate significant differences between treatments ($p < 0.001$). In growth variables, each value is the mean of at least 8 plants. In biochemical parameters, each value corresponds to the mean of 3 replicates (4 plants per replicate). Lowercase and uppercase indicate independent testing per organ

and 3.4 times, respectively) was registered in response to the endophytic fungus.

Influence of endophytic association in plants exposed to hydrocarbons

Plant growth

We evaluated the influence of the induced association between *Lewia* sp. and *F. arundinacea* on plant growth and some biochemical responses during the exposure to a HCM. After 7 days of exposure to the HCM, the fungus significantly stimulated biomass production, particularly in roots (3.8-fold), compared to unassociated plants (Fig. 2).

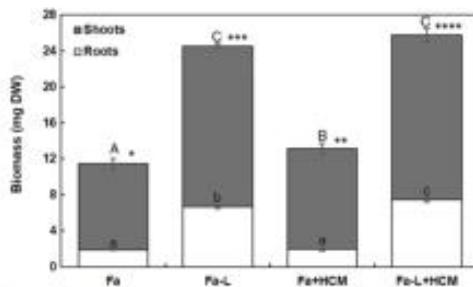


Fig. 2 Biomass production by *F. arundinacea* (Fa) and *F. arundinacea* associated with *Lewia* sp. (Fa-L) exposed or not to 800 mg kg⁻¹ of hydrocarbons (HCM) for 7 days in a model soil. Significant differences are indicated either with asterisks when compared the total plant biomass (roots + shoots), or with different letters (lowercase for roots and uppercase for shoots) ($P < 0.001$)

H₂O₂ accumulation and oxidative damage

We found a significant increase (1.3-fold) in the H₂O₂ content of unassociated roots of *F. arundinacea* by effect of hydrocarbons (Table 2). In contrast, the H₂O₂ concentration was not modified in shoots or roots due to exposure to the HCM in associated plants compared to control plants without the HCM. The H₂O₂ concentration in the roots of associated plants was lower (~35 %) than that of unassociated plants, regardless of HCM presence.

MDA in unassociated roots exposed to the HCM was 1.7-fold higher than that recorded in plants grown without the HCM (Table 2). However, the MDA content in the associated roots was not significantly modified by the effect of the HCM compared to the respective control. Regarding the MDA content in shoots exposed to hydrocarbons, a significant reduction (53 %) was registered in associated plants with respect to those unassociated. On the other hand, the concentration of CO groups in the associated roots exposed to the HCM was significantly lower (2.5-fold) than that in unassociated plants. In contrast, the content of CO groups in shoots of associated plants significantly increased (3.4-fold) in the presence of the HCM compared to unassociated plants (Table 2).

Antioxidant enzyme activity

SOD and POD activity was stimulated in the roots of associated plants regardless of exposure to the HCM

Table 2 Biochemical parameters quantified as a measure of oxidative stress in roots and shoots of *F. arundinacea* (Fa) and endophytic association *F. arundinacea-Lewia* sp. (Fa-L) grown

Treatment	Roots			Shoots		
	H ₂ O ₂ (nmol g ⁻¹ FW)	MDA (nmol g ⁻¹ FW)	CO (μmol g ⁻¹ protein)	H ₂ O ₂ (nmol g ⁻¹ FW)	MDA (nmol g ⁻¹ FW)	CO (μmol g ⁻¹ protein)
Fa	450.1 ± 49.7 ^{ab}	28.1 ± 0.3 ^b	157.2 ± 6.8 ^a	480.9 ± 38.8 ^B	53.1 ± 3.1 ^{BC}	330.3 ± 1.1 ^C
Fa-L	427.4 ± 24.7 ^{ab}	28.3 ± 0.2 ^b	196.0 ± 2.4 ^a	308.5 ± 28.1 ^A	58.2 ± 10.0 ^B	265.3 ± 10.0 ^B
Fa + HCM	583.1 ± 52.3 ^c	48.6 ± 1.4 ^c	909.5 ± 21.2 ^c	489.2 ± 12.3 ^B	58.6 ± 2.4 ^B	167.2 ± 22.0 ^A
Fa-L + HCM	377.6 ± 17.4 ^a	25.4 ± 0.9 ^a	368.1 ± 14.5 ^b	338.6 ± 37.5 ^A	27.5 ± 2.0 ^A	573.3 ± 13.2 ^D

*Data with different letter by column indicate significant differences between treatments ($p < 0.001$). Each value corresponds to the mean of 3 replicates (4 plants per replicate). Lowercase and uppercase indicate independent testing per organ

(Figs. 3 and 4). In the presence of hydrocarbons, the SOD activity in unassociated roots was lower (5.6-fold) than that registered in associated plants (Figs. 3a and 4a). In shoots, SOD activity decreased by effect of the HCM in both unassociated (50 %) and associated (60 %) plants compared to plants grown without the HCM. In general, GST activity was higher in shoots than in roots of endophyte-free plants (Figs. 3c and 4c). This activity was strongly down-regulated in shoots and roots of associated plants, while in the roots of unassociated plants, GST activity was stimulated (63 %) in the presence of the HCM; in associated plants it was significantly reduced (61 %).

Discussion

Plant growth and biochemical responses by induction of endophytic association

A successful plant-endophyte association requires the colonization of plant cells by the endophyte, which occurs through the physical penetration of hyphae into the cells of the plant host. Similar to our findings, two unknown ascomycetous endophytes were observed compartmentalized into the root cells of *Triticum turgidum* (Abdellatif et al. 2009). Colonization of the host cells by the endophyte causes modifications that can improve plant growth through mechanisms such as regulation of the production and activity of plant hormones, morphological changes, and increased nutrient capture and solubilization (Mei and Flinn 2010). In fact, enhanced plant growth by endophytes in various plant

without and with 800 mg kg⁻¹ of a HCM for 7 days in a model soil. Biochemical parameters include concentration of H₂O₂, malondialdehyde (MDA) and carbonyl (CO) groups in proteins*

species has been demonstrated (Bailey et al. 2006). Another way that endophytes can contribute to enhance plant growth is the overproduction and control of ROS such as H₂O₂ (White and Torres 2010), which operates as a signaling molecule for growth (Cheeseman 2006).

Thus, the improved growth in plants of *F. arundinacea* after 15 days of inoculation with *Lewia* sp. could be attributed to biochemical changes such as increased H₂O₂ production. A similar response was registered during the early stages of the symbiosis between *Gigaspora margarita* and two legumes (Lanfranco et al. 2005), and between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* (Baptista et al. 2007). Furthermore, CAT appears to be down-regulated and SOD to be up-regulated during these early stages. This could explain the H₂O₂ accumulation, since SOD catalyzes the conversion of •O₂⁻ to H₂O₂, which is then converted to water by CAT and POD (Nanda et al. 2010). The oxidative burst during early stages of symbiotic interactions suggests a key role in the control of the fungus proliferation (Nanda et al. 2010), which could be related to the suppression of plant defense responses against the fungus (Tanaka et al. 2006). This ROS overproduction can also lead to lipid peroxidation and protein oxidation. In fact, the enhanced MDA concentration in tissues of *F. arundinacea* by effect of *Lewia* sp. indicates that the oxidative burst led to increased lipid peroxidation. In contrast, the decreased level of CO groups in the associated plants might be explained by the proteolysis of irreparable proteins via lysosome or the ubiquitin-proteasome pathway (Tiwari et al. 2016); one or both of these processes could be improved due to the presence of *Lewia* sp.

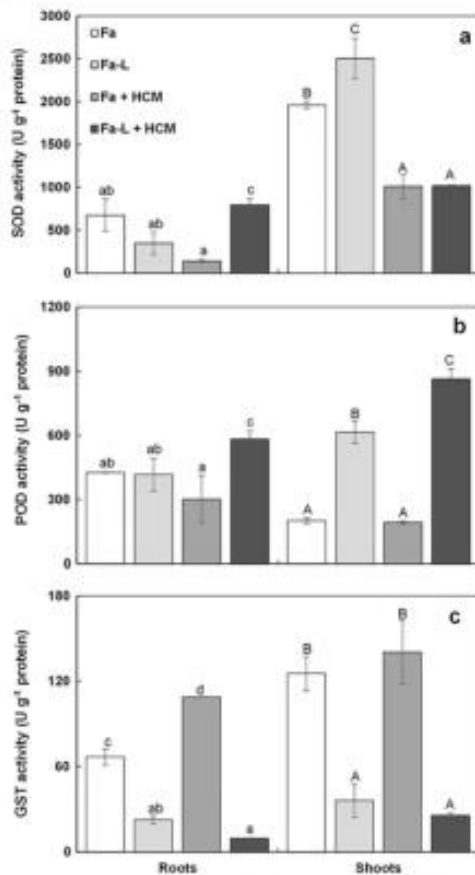


Fig. 3 SOD (a), POD (b) and GST (c) activity in roots and shoots of plants of *F. arundinacea* grown for 7 days unassociated (Fa) or associated with *Lewia* sp. (Fa-L) in a model soil containing 800 mg kg⁻¹ of a hydrocarbon mixture (HCM). Different letters indicate significant differences ($P < 0.001$)

The significant decrease in SOD activity in roots of *F. arundinacea* after association induction suggests a suppression of the antioxidant defense to form the association (Bailey et al. 2006) with *Lewia* sp., since roots are the first contact between the organisms. In contrast, the significant down-regulation of POD activity in the shoots by effect of *Lewia* sp. could be attributed to H₂O₂ degradation by catalases (Mhamdi et al. 2010). Meanwhile, plant GST are multifunctional proteins that selectively bind GSH and have key roles in plant development and response to stress conditions (Kumar et al.

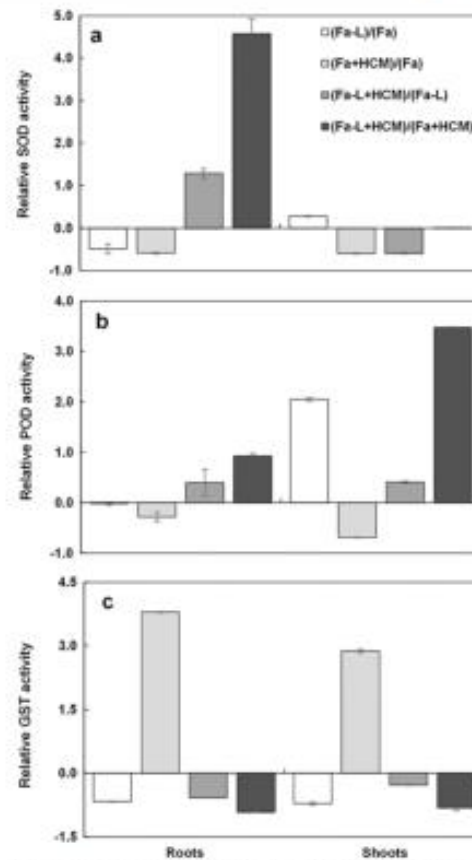


Fig. 4 Relative enzyme activity indexes of SOD (a), POD (b) and GST (c) in roots and shoots of plants of *F. arundinacea* grown for 7 days unassociated (Fa) or associated with *Lewia* sp. (Fa-L) in a model soil containing a hydrocarbon mixture (HCM)

2013). Besides their function in the detoxification of xenobiotics and natural products, GST also catalyze GSH-dependent peroxidase reactions that scavenge organic hydroperoxides and protect against oxidative damage. In fact, ROS intermediates are known to be important regulators of GST gene expression (Moons 2005). Expression analysis of the Lambda class GST (particularly sensitive to redox perturbations) gene family in rice suggested that different members of this family are differently expressed during plant growth and development, during biotic and abiotic stress, as well as in response to plant hormones. The gene expression was also found to be dependent on the tolerance

and susceptibility of seedlings to a hemiparasite fungus (Kumar et al. 2013). It has been found that endophytes can modify the activity of GST (Zhang et al. 2010), which could be a result of changes in intracellular concentrations of plant hormones and/or ROS. The down-regulation of GST activity in roots and shoots of *F. arundinacea* in response to the endophytic fungus suggests that this enzyme could be repressed during the establishment and maintenance of this particular association. In contrast, increased GST activity was found in plants of *Theobroma cacao* endophytically associated with *Trichoderma hamatum* (Bailey et al. 2006).

This series of results suggests that in order to establish the association with *F. arundinacea*, *Lewia* sp. promotes increased ROS production, besides a reduction in the activity of enzymes involved in antioxidant defense, at least under in vitro conditions. Several biochemical factors, besides ROS production and the antioxidant system, are involved in stress signaling (Baxter et al. 2013) and can facilitate plant–endophyte interaction at a biochemical level (Tanaka et al. 2006). Indeed, it has been reported that biochemical changes due to the formation of an association can contribute to greater tolerance and growth in plants exposed to stressors such as PAH (Debiane et al. 2009), heavy metals (Ahmad et al. 2011) and drought (Tiwari et al. 2016).

Influence of the endophytic association in plants exposed to hydrocarbons

Plant growth

Endophytic microorganisms can enhance plant growth and the antioxidant system response in plants exposed to several stressors (Soleimani et al. 2010). Our results confirm that the endophytic association between *F. arundinacea* and *Lewia* sp. stimulates plant growth even under the abiotic stress generated by the HCM. Plant biomass is a response variable usually used as an indicator of growth performance in plants exposed to xenobiotics such as PAH (Soleimani et al. 2010). Increased biomass production was also registered in plants of *F. arundinacea* exposed to hydrocarbons when grown in the presence of the endophytes *Neotyphodium coenophialum* (Soleimani et al. 2010) and *Lewia* sp. (Cruz-Hernández et al. 2013). Endophytic fungi may increase the growth of grasses through mechanisms such as the production of plant hormones and morphological changes, as well as by enhanced solubilization

and uptake of nutrients (Porras-Alfaro and Bayman 2011).

H₂O₂ accumulation and oxidative damage

An increased level of H_2O_2 is a common response in plants grown under abiotic stress conditions such as the presence of PAH, such as phenanthrene (Alkio et al. 2005; Kreslavski et al. 2014). The fact that the HCM caused an increased H_2O_2 content in the roots of unassociated plants, while its content was reduced by effect of the fungus, indicates that *Lewia* sp. has a role in ROS control when a stressor such as the HCM is present. Similar to our results, a reduction (10 %) in the H_2O_2 concentration in plants of *F. arundinacea* associated with *Epichloë coenophiala* exposed to nickel (180 mg kg^{-1}) was registered compared to the level in endophyte-free plants (Mirzahosseini et al. 2015).

If H_2O_2 is not controlled, it can be transformed into the hydroxyl radical and oxidize proteins and unsaturated membrane phospholipids, leading to increased content of CO groups and MDA, respectively (Kreslavski et al. 2014; Hu et al. 2015). However, it has been shown that both mycorrhizal (Debiane et al. 2009) and endophytic fungi (Mirzahosseini et al. 2014, 2015), can alleviate the oxidative damage produced by ROS accumulation in cells of plants such as *F. arundinacea*. In fact, we registered an increased MDA content, particularly in the roots of plants exposed to the HCM, which was significantly reduced in both shoots and roots by effect of *Lewia* sp. This response might be the result of decreased lipid peroxidation due to an increase in POD activity by effect of *Lewia* sp. Peroxidases are enzymes responsible for degrading lipid hydroperoxides, by utilizing GSH and/or other reducing equivalents, thus preventing their accumulation (Pryor and Castle 1984). Another consequence of the ROS overproduction generated by abiotic stress is protein oxidation (Cvjetko et al. 2010). However, in the roots of *F. arundinacea* exposed to the HCM, the concentration of oxidized proteins was significantly reduced in the presence of *Lewia* sp. It has been demonstrated that tolerant organisms are able to increase the activity of antioxidant enzymes in order to alleviate or attenuate ROS overproduction by the accumulation of hydrocarbons (Balasubramanyam et al. 2015), which could result in decreased concentrations of the two oxidative stress markers here studied.

Antioxidant enzyme activity

Down-regulated SOD and POD activity has been observed in plants of *Arabidopsis thaliana* (Liu et al. 2009) and *Triticum aestivum* (Tomar and Jajoo 2015) during exposure to PAH. This decrease was related to increased ROS production that exceeded the plant antioxidant capacity (Cvjetko et al. 2010). The down-regulation of SOD activity in shoots and roots of unassociated plants of *F. arundinacea* could be considered as indirect evidence of the increased accumulation of $\bullet\text{O}_2^-$ in response to the HCM (Debiane et al. 2008). Compared with controls, the higher SOD activity in the roots of associated plants indicates that *Lewia* sp. helps to control the $\bullet\text{O}_2^-$ concentration in the presence of hydrocarbons. Various studies have shown that the activity of antioxidant enzymes such as SOD is commonly higher in plants exposed to pollutants when they are associated with endophytes (Becerra-Castro et al. 2013).

The up-regulation in POD activity, particularly in shoots of associated plants regardless of the HCM presence (Figs. 3b and 4b), indicates that *Lewia* sp. plays a role in stimulating the plant oxidative defense by controlling the H_2O_2 level. Indeed, a reduced H_2O_2 concentration was registered in the associated plants, particularly in those exposed to hydrocarbons (Table 2). Furthermore, in these same plants, a decreased content of MDA was also registered (Table 2). Peroxidases reduce hydroperoxides to the corresponding alcohol, thus preventing the accumulation H_2O_2 and lipid hydroperoxides (Pryor and Castle 1984). In fact, it was found that POD activity plays a role in the growth of *F. arundinacea* through the modification of functions such as the control of senescence hormone production (Kawaoka et al. 2003). The up-regulation of SOD and POD in the associated roots of *F. arundinacea* grown with the HCM suggests that *Lewia* sp. improves the control of ROS overproduction induced by the presence of the HCM. These results are confirmed by the fact that the content of MDA and CO was significantly reduced by the effect of *Lewia* sp. The above facts could consequently contribute to the enhanced plant growth registered.

Otherwise, the down-regulation in GST activity in associated plants of *F. arundinacea* exposed to the HCM could be attributed to changes in the plant hormone levels by effect of *Lewia* sp., since it has been shown that the activity of this enzyme is modulated by these compounds (Kumar et al. 2013). This fact may

also contribute to the improved plant growth registered in associated plants. Until now, most studies related to GST in plants have focused on responses to the presence of heavy metals (Mirzahosseini et al. 2014; Rojas-Loria et al. 2014). Similar to our results, GST activity was enhanced in shoots of *F. arundinacea* exposed to low concentrations (30 mg kg^{-1}) of nickel. However, reduced activity was recorded in plants associated with *Neotyphodium coenophialum* (Mirzahosseini et al. 2014).

Relative enzyme activity (Fig. 4) helps to clearly distinguish the effect of either hydrocarbons or the fungus in the plant SOD, POD, and GST activity. The down-regulation of SOD and POD activity and up-regulation of GST by effect of the HCM in unassociated plants of *F. arundinacea* suggest that plant GST are related to hydrocarbon detoxification, while SOD and POD appear not to be involved in such a process. On the contrary, in the associated plants exposed to the HCM, the up-regulation of SOD and POD activity, particularly in roots, indicates the involvement of both enzymes in improving the plant defense system against ROS accumulation under hydrocarbon stress, which was stimulated by *Lewia* sp. Meanwhile, the down-regulation of GST activity by influence of *Lewia* sp., even in the presence of hydrocarbons, suggests that these enzymes could be related to maintenance of the endophytic association. These results demonstrate that the plant's defense mechanisms against the adverse effect of hydrocarbons are influenced by the endophytic association with *Lewia* sp.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study analyzing the influence of the endophytic association between *F. arundinacea* and *Lewia* sp. on oxidative stress and antioxidant response in the presence of a HCM. The endophytic association between the organisms could be established after 15 days under in vitro conditions, and *Lewia* sp. significantly improved plant growth. Establishment of the association caused a significant increase in the production of H_2O_2 and lipid peroxides as well as a reduction of oxidized proteins and GST activity. After 7 days of exposure to hydrocarbons in a model soil, *Lewia* sp. improved plant growth by controlling the content of H_2O_2 and MDA, which was in turn related to an increase in antioxidant enzyme activity. This study demonstrates the positive role

of *Lewia* sp. in promoting growth and alleviating oxidative stress in *F. arundinacea* exposed to a HCM. Although more research is still required to examine the relationship between the detoxification and degradation of hydrocarbons by this specific endophytic association, it could potentially be used in remediation of hydrocarbons-contaminated soils.

Acknowledgments This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico. The authors acknowledge Dr. David M. Diaz-Pontones for the support in confocal microscopy analysis. C. Mendarte-Alquisim thanks CONACyT for the financial support (grant number 35330).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdellatif L, Bouzid S, Kaminskyj S, Vujanovic V (2009) Endophytic hyphal compartmentalization is required for successful symbiotic Ascomycota association with root cells. *Mycol Res* 113:782–791
- Ahmad P, Nabi G, Ashraf M (2011) Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *S Afr J Bot* 77:36–44
- Alkio M, Tabuchi TM, Wang X, Col n-Carmona A (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J Exp Bot* 56:2983–2994
- Bailey BA, Bae H, Strem MD, Roberts DP, Thomas SE, Crozier J, Samuels GJ, Choi I-Y, Holmes KA (2006) Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224:1449–1464
- Balasubramanlyam A, Chapman MM, Harvey JP (2015) Responses of tall fescue (*Festuca arundinacea*) to growth in naphthalene-contaminated sand: xenobiotic stress versus water stress. *Environ Sci Pollut Res* 22:7495–7507
- Baptista P, Martins A, Pais MS, Tavares RM, Lino-Neto T (2007) Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhizal establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tictorius*. *Mycorrhiza* 17:185–193
- Baxter A, Mittle R, Suzuki N (2013) ROS as key players in plant stress signaling. *J Exp Bot*. doi:10.1093/jxb/ert375
- Becerra-Castro C, Prieto-Fernández Á, Kidd SP, Weyens N, Rodríguez-Garrido B, Touceda-González M, Acea MJ, Vangronsveld J (2013) Improving performance of *Cytinus striatus* on substrates contaminated with hexachlorocyclohexane (HCH) isomers using bacterial inoculants: developing a phytoremediation strategy. *Plant Soil* 362:247–260
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2:764–775
- Cheeseman JM (2006) Hydrogen peroxide concentration in leaves under natural conditions. *J Exp Bot* 57:2435–2444
- Cruz-Hernández A, Tomasini-Campocoso A, Pérez-Flores LJ, Fernández-Perrino FJ, Gutiérrez-Rojas M (2013) Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots. *Plant Soil* 362:261–270
- Cvijetko P, Tolić S, Šikić S, Balen B, Tkalec M, Vidaković-Cifrek Ž, Pavlić M (2010) Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). *Arch Hig Rada Toksikol* 61:287–296
- Debiane D, Garçon G, Verdín A, Fontaine J, Durand R, Grandmougin-Ferjani A, Shirali P, Sahaoui AL-H (2008) *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ Exp Bot* 64:120–127
- Debiane D, Garçon G, Verdín A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A, Sahaoui AL-H (2009) Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* 70:1421–1427
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferases. In: Jacoby WB (ed) *Method Enzymol* 77: 398–405
- Hu Z, Xie Y, Jin G, Fu J, Li H (2015) Growth responses of two tall fescue cultivars to Pb stress and their metal accumulation characteristics. *Ecotoxicology* 24:563–572
- Juszczak IM, Tybura A, Rychter AM (2008) Protein oxidation in leaves and roots of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) mutant MSC16 and wild type. *J Plant Physiol* 165:355–365
- Kawaoka A, Matsunaga E, Endo S, Kondo S, Yoshida K, Shinmyo A, Ebinuma H (2003) Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiol* 132:1177–1185
- Khalmuratova I, Kim H, Nam Y-J, Oh Y, Jeong M-J, Choi H-R, You Y-H, Choo Y-S, Lee I-J, Shin J-H, Yoon H, Kim J-G (2015) Diversity and plant growth promoting capacity of endophytic fungi associated with halophytic plants from the west coast of Korea. *Mycobiology* 43:373–383
- Kreslavski VD, Lankin AV, Vasilyeva GK, Luybimov VY, Semenova GN, Schmitt F-J, Friedrich T, Allakhverdiev SI (2014) Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves. *Plant Physiol Biochem* 81:135–142
- Kumar S, Hasan AM, Chakraborty D, Deo TR, Shanker DR, Kumar TP (2013) Differential expression of rice Lambda class GST gene family members during plant growth, development, and response to stress conditions. *Plant Mol Biol Report* 31:569–580
- Kvesitadze E, Sadunishvili T, Kvesitadze GK (2009) Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants. *World Acad Sci Eng Technol* 55:458–468
- Lanfranco L, Novero M, Bonfante P (2005) The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume host. *Plant Physiol* 137:1319–1330
- Liu H, Weisman D, Ye Y, Cui B, Huang Y, Colón-Carmona A, Wang Z (2009) An oxidative stress response to polycyclic

- aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 176:375–382
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–273
- Mei C, Flinn BS (2010) The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Pat Biotechnol* 4:81–95
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61:4197–4220
- Mirzahosseini Z, Shabani L, Sabzalim MR, Sharifi-Tehrani M (2014) *Neotyphodium* endophytes may increase tolerance to Ni in tall fescue. *Eur J Soil Biol* 63:33–40
- Mirzahosseini Z, Shabani L, Sabzalim MR, Sharifi-Tehrani M (2015) ABC transporter and metallothionein expression affected by Ni and *Epichloe* endophyte infection in tall fescue. *Ecotoxicol Environ Saf* 120:13–19
- Moons A (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam Horm* 72:155–202
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C (2010) Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol* 52:195–204
- Porras-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 49:291–315
- Pryor WA, Castle L (1984) Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol* 105:293–299
- Rojas-Loria CC, Favela-Torres E, González-Márquez H, Volke-Septúlveda TL (2014) Role of glutathione and glutathione S-transferase in lead tolerance and bioaccumulation by *Dioscorea viscosa* (L.) Jacq. *Acta Physiol Plant* 36:2501–2510
- Shahdash M (2013) Plant glutathione S-transferases function during environmental stresses: a review article. *Rom J Biol* 58:19–25
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalim MR, Christensen JH (2010) Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81:1084–1090
- Tanaka A, Christensen MJ, Takemoto D, Park P, Scott B (2006) Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell* 18:1052–1066
- Tiwari S, Lata C, Singh CP, Shekhar NC (2016) *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiol Biochem* 99:108–117
- Tomar RS, Jajoo A (2015) Photomodified fluoranthene exerts more harmful effects as compared to intact fluoranthene by inhibiting growth and photosynthetic processes in wheat. *Ecotoxicol Environ Saf* 122:31–36
- White JF Jr, Torres SM (2010) Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol Plant* 138:440–446
- Zhang X, Fan X, Li C, Nan Z (2010) Effects of cadmium stress and seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a *Neotyphodium* endophyte. *Plant Growth Regul* 60:91–97

ANEXO III



CERTIFICATE OF PRESENTATION

We hereby certify that

Callope Mendarte Alquisira, Araceli Tomasini Camposio, David Manuel Díaz Pontones,
Mariano Gutiérrez Rojas

Delivered the Poster presentation

ACCLIMATIZATION OF ASSOCIATION BETWEEN *Festuca arundinacea* AND *Lewia* sp. (endophyte) ENHANCES
PHYTOREMEDIATION OF PYRENE CONTAMINATED SOIL

XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and
12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.
June 23rd - 28th, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.

Dr. Gerardo Saucedo Castraneda President of SMBB	Dr. Crisobal Nolasco Aguilar González President of the Organizing Committee SMBB	Dra. Romina Rodríguez Sarraga President of the Scientific Committee SMBB/GIM	Dr. Sergio Sánchez Esquivel President of the Organizing Committee GIM	Dr. Stefano Donadio President of GIM



National Congress of
**Biotechnology and
Bioengineering**



GIM2013
12th International Symposium on the
**GENETICS OF INDUSTRIAL
MICROORGANISMS**

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

We hereby certify that

Mendarte Alquisira Caliope

Attended the XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and
12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.
June 23rd - 28th, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.


Dr. Gerardo Scaucedo Castañeda
President of SWBB


Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
President of the Organizing Committee
SWBB


Dra. Romina Rodríguez Sonaja
President of the Scientific
Committee SIBB/GIM


Dr. Sergio Sánchez Esquivel
President of the Organizing
Committee GIM


Dr. Stefano Donadio
President of CIM

Elsevier Publishing Campus

Certificate of completion

CALIOPE MENDARTE ALQUISIRA

Has successfully completed a

Publishing Connect Author workshop presented by
Monique Lamine, Director Contract Publishing

24th November, 2014 | Universidad Autónoma Metropolitana

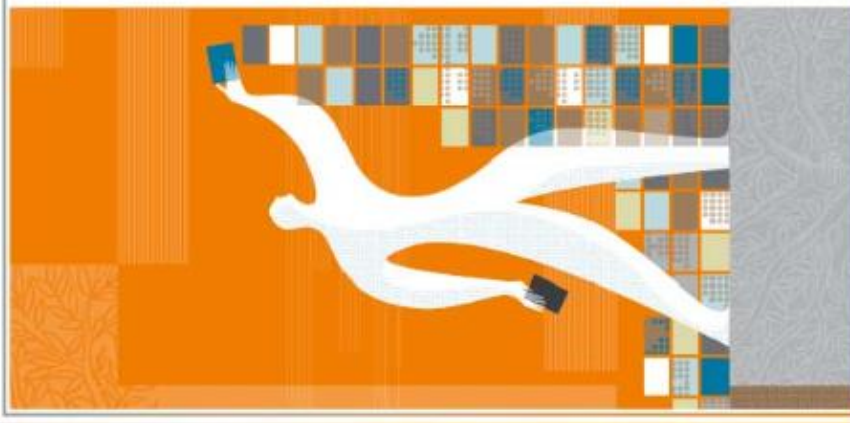


PHILIPPE TERHEGGEN
Managing Director
Science, Technology and Medical Journals



SUZANNE BEVELL
Managing Director,
Science and Technology Books

www.elsevier.com/earlycareer



10^{mo} Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal

Se le Otorga el Presente

Certificación

A: Caliope Mendarte Alquisira, Tania L. Volke Sepúlveda, David Manuel Díaz Pontones, Mariano Gutiérrez Rojas.

Por su participación como:

Ponente

En la Décima Edición del Congreso Internacional Bioveg 2015,

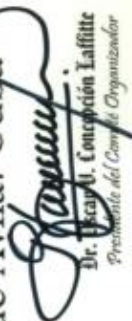
Realizado del 11 al 15 de mayo, en la Ciudad de Ciego de Avila. Cuba



<http://www.bioplantas.cu>



<http://bioveg.bioplantas.cu>


Dr. Escaró Concepción Laflitte
Presidente del Comité Organizador



Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. otorga la presente.

Constancia

A: Caliope Mendarte Alquisira, Tania L. Volke Sepúlveda, Mariano
Gutiérrez Rojas

Por su participación con la Presentación en Cartel

"TOLERANCIA Y REMOCIÓN DE UNA MEZCLA DE HIDROCARBUROS POR LA ASOCIACIÓN ENDÓFITA *Festuca arundinacea-Lewia sp.*"

en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
realizado del 21 al 26 de Junio de 2015, en Guadalajara, Jalisco, México.

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Presidente de la SMBB

Dr. Carlos Regalado González
Presidente del Comité Organizador

Dr. José Adolfo Escalante Lozada
Presidente del Comité Científico