

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MORELOS**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES VEGETALES PARA FITORREMIEDIAR
SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS EN JALES MINEROS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA:

M. en C. DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

DIRECTOR: DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ

CODIRECTOR: DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE

CUERNAVACA, MORELOS

Agosto 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de CIENCIAS NATURALES

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez, CIByC-UAEM
Dra. Patricia Mussali Galante, CEIB-UAEM
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, CEIB-UAEM
Dra. Verónica Obregón Barboza, CEIB-UAEM
Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría, CIBIS-IMSS
Dra. Leticia Isabel Valencia Cuevas, FCB-UAEM
Dra. María Luisa Castrejón Godínez, DGDS-UAEM

Tesis: Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros.

Alumno que lo presenta a revisión: DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFRAIN TOVAR SANCHEZ | Fecha:2020-08-26 13:05:27 | Firmante

F38nwKcaqe+Sq3Q+u7e9INnHjZ+fJw+2oeoDkuikubLPAaejcbKz9eSKjUkKtilVIHD6piLxKlj5MwNhRjpJZrBXXNp5X96B8uYVUZRhSL08u8sX8j3rJogNTeGuhUUt36kkhIGNjMg9tFYZ9Y+MPZaYZOwNn+f2PC9+rh7d2NY48P4iqMmJTxqZGZPsO5le1U8o+ywSyOpjkkRTdN6rBZyHWmVFCBO9yTVNJWP9KiYnTEnihf1YeoEhL+ARW/6kmQH52fS4ft+FAVsrWDJaK3vMyvdsswah0mLXbMxh07ZOTP/reE9TI4N/Xh30bhkjPGwiRjndZfmL6LZ2f9lkow==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



o09zKm

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3XQT083PeiaSKSebvIEVGNqsgwDBoqS>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de CIENCIAS NATURALES

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez, CIByC-UAEM
Dra. Patricia Mussali Galante, CEIB-UAEM
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, CEIB-UAEM
Dra. Verónica Obregón Barboza, CEIB-UAEM
Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría, CIBIS-IMSS
Dra. Leticia Isabel Valencia Cuevas, FCB-UAEM
Dra. María Luisa Castrejón Godínez, DGDS-UAEM

Tesis: Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros.

Alumno que lo presenta a revisión: DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha:2020-08-26 13:04:36 | Firmante

rAswTJVRYscRoWRCDZbqfA2HmaHQ9kx3DT9CRbCq2ttceHvxKtyc5Jw7vpt68Blpk6l5pclA1a0N3wYGEt61PD97/ekDxyk7+6hliVpVNNZ12v58HgZJ0q8S/0Y3ePnC/Sq4iRLwsHI7xrO8+XN84Z4dt5h2Std+H04RHIVncn7Zgo6NCAUjpW5Z8fwhNChEeSlvTJ8+XfeXuwUohEdoby/RI64Xbayu05sEICZvJhUmzOoI3Jegw5N3D7P/xla/MdNv+Fbwf2S2MfsTsjCdppfvvrqLm/x+AUfm9XDUqOinBR2AMuT7ikdjAkchBV5SbAkOOjHe/AhOeHor5XUP1A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jXef9v](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/luMTezR7ayYKYsNGKNrzULyKUMPqk3TR>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de CIENCIAS NATURALES

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez, CIByC-UAEM
Dra. Patricia Mussali Galante, CEIB-UAEM
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, CEIB-UAEM
Dra. Verónica Obregón Barboza, CEIB-UAEM
Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría, CIBIS-IMSS
Dra. Leticia Isabel Valencia Cuevas, FCB-UAEM
Dra. María Luisa Castrejón Godínez, DGDS-UAEM

Tesis: Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros.

Alumno que lo presenta a revisión: DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2020-08-26 14:37:06 | Firmante

V+6o1HyOjZCb6zmegYtjPT7sRjZT8gdszKTIpwwplpdT3W2wYJwV1OLXxi04TldVgLX7a1Kju18wvx68ez/Wf7sWQunISlg2NAOIhN1D0GHwgrsF79o6Ae7SSqMlyTrWk/wSHUtZV1rnYwl5ShaDeBuhpGM8lyt3nFHu7ADQykrtVF+XuKpER2BBESYbtM5fsy8lxtM11C8NNvzLOs51FvR+9QtjrxCC87mBfPk4FTu/qmWzDkboGXhM511hDuriApo+hbM2c7RSHk11ps1qta+Jx9eToK/Ce63aVI91cbPluvACxG7NI9IHQuQ+/o0tdsTOvxpPbHbtOCZAnnmQ+A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



VkhI96

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dBSJT5O09VZj1iVU8p0ycURYegtaimIV>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de CIENCIAS NATURALES

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez, CIByC-UAEM
Dra. Patricia Mussali Galante, CEIB-UAEM
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, CEIB-UAEM
Dra. Verónica Obregón Barboza, CEIB-UAEM
Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría, CIBIS-IMSS
Dra. Leticia Isabel Valencia Cuevas, FCB-UAEM
Dra. María Luisa Castrejón Godínez, DGDS-UAEM

Tesis: Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros.

Alumno que lo presenta a revisión: DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2020-08-26 12:43:00 | Firmante

RRgwR90iYjRBgpRlaMEeeOfBqs2EU33pl3NtTHU7jB0W6+m9S+SFyGAiV4pwANJIT/OfgoxVKv5OuCa+zTdnqICrQeSpT9shp6tTg9roKaldi53hhNYM7bSa74TbfypCOh7brRa52S
Bk2f16c6BGEgrxuqgjOGA59Y8dtBDD6T7fBabt4YxqwmJ0k8MRtQns3s5mBG0BZxE1KndatmhrcfBB0upR/6NAaVlx/CnGSI4vmex36fIQsDCE3LJMaPtrOaC9PlrBGHjYLdnTXfq
XA54c2IWUPrjw8LQfXEzHmIW+CGbHrYFt6Urm+6B6H4ucfw3XsulP3d07/adOgxtw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



BZFEQ7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zV6C7scTfXuXPw2KNQjN3fWbTKydXjbm>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de CIENCIAS NATURALES

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez, CIByC-UAEM
Dra. Patricia Mussali Galante, CEIB-UAEM
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, CEIB-UAEM
Dra. Verónica Obregón Barboza, CEIB-UAEM
Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría, CIBIS-IMSS
Dra. Leticia Isabel Valencia Cuevas, FCB-UAEM
Dra. María Luisa Castrejón Godínez, DGDS-UAEM

Tesis: Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros.

Alumno que lo presenta a revisión: DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. LETICIA ISABEL VALENCIA CUEVAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LETICIA ISABEL VALENCIA CUEVAS | Fecha:2020-08-26 13:11:04 | Firmante

qB66LQdG6l+CzO8USp2BST/xx1jxeo5dGT+DH59Unv9AATbk4l1IzWUOuUJq9nlBKDaCb15z3nP1PMbBZEoB8CJchp6KTemnz8mYBqs1690l6fQPfh1sQCR61CueqGHk4hUP46+HJ7Ju7pjNjn4UfJ67/ZOLbrJ1Pd6K9m7l+28DhCBll9H5led89ckhFUy+DUB/kpKDz4aZcTfod5XQA7SrcppoPWBL+ZzJkVV+33BHxolQdXDmb2PBCHJSQlqCBUHaveRcEVIWGeL0JVfJoQTZrVa1iaf1rj7Q82e1eutlohgWbFRdlcLAG9xr2ZtQ3ovV12Cm0GK+8ULVJe7w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[bBdY8H](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/L1MV3XED2RtwcGPUu8IM5BulpUMdRJs>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de CIENCIAS NATURALES

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez, CIByC-UAEM
Dra. Patricia Mussali Galante, CEIB-UAEM
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, CEIB-UAEM
Dra. Verónica Obregón Barboza, CEIB-UAEM
Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría, CIBIS-IMSS
Dra. Leticia Isabel Valencia Cuevas, FCB-UAEM
Dra. María Luisa Castrejón Godínez, DGDS-UAEM

Tesis: Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros.

Alumno que lo presenta a revisión: DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2020-08-26 13:11:22 | Firmante

dnyW9iM60hI/WnZ1r8ECG9fUmMzXmnTHfdJRRsZQfn0Ntu3FnYxfL26FhKJklcJWaaXvZB5Ctv3ptY8HzteyooCrO7s/XD9f7T8FiqecOuUh9kXzRuF3FyrAjr86KF1VAcv4vUCyhpHdj9AI0XEPX0U53jicsTZPoxaCU4XqNPrk+E7NpEi+FzIVRRj+23eSipAKefDHCP0rPYZaVQIFihYL4NwpO8qQK7zxR3F6+Vo4TLMtLq+Ecxm5BKLM9IRyyI581D1v5KivOOwJx8/H9/eD7BC6wqnlpAF8AnnJOpE+V0Nr56T+5ZGVc7B/p4WTCKVv8UeuUHIcjd6cAQm+NQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[sk5Lhg](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cxc07YrvdBEPtm3Amp2xf2dYw5btDfh>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de CIENCIAS NATURALES

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

Cuernavaca, Morelos a 19 de agosto 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez, CIByC-UAEM
Dra. Patricia Mussali Galante, CEIB-UAEM
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, CEIB-UAEM
Dra. Verónica Obregón Barboza, CEIB-UAEM
Dra. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría, CIBIS-IMSS
Dra. Leticia Isabel Valencia Cuevas, FCB-UAEM
Dra. María Luisa Castrejón Godínez, DGDS-UAEM

Tesis: Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros.

Alumno que lo presenta a revisión: DALIA ANGÉLICA MURO GONZÁLEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. LUCIA LOURDES AGUILAR SANTAMARÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUC,A LOURDES AGUILAR SANTAMARÍA | Fecha:2020-08-27 11:09:25 | Firmante

fciaC8/jjWN3RYU3wGKIEUi6eJBQ1M7PSZxAnQm/lKykWRPcRQuCRnfpmlw7A/uQShUYQIM0w6fHRTZj3X/zs3lz6KNPX6ddjn4Thb/uYNZkr4XWjO+1wcJGwJD47ecfgpSHTsnDA6mozNo7CQI3FbCGZJgeLoQZPD6LhZUwTXFqdMX7tn39oFUY71ojSezZ1DfhQptdJtC8MHmftkxzJ8rzYIG+BY3kf17+1mQRCwl96nWVXQRY1r+oMOidVXCUFvQVYIIQgxcgrgJebY8Z/ld0fnCMzxWCR8mKz0yOQjE7x/yRTV3VZsh6ZyuiIGvcH6C6AXXHT8nCPy+whoTg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



sGuByO

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/y1roEiPHgV8Ebn58rmDK5uYeuu3yoVBn>



AGRADECIMIENTOS

Al Doctorado en Ciencias Naturales, a través de la DES de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por la oportunidad de desarrollo profesional otorgada, así como por las facilidades brindadas para poder concluir satisfactoriamente con este proyecto.

Al Laboratorio de Investigaciones Ambientales, del Centro de Investigación en Biotecnología, al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, UAEM, por los espacios y recursos brindados para la realización de este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios (número de becario 429356).

A los miembros de mi comité de evaluación:

Dr. Efraín Tovar Sánchez (tutor): Por ser mi guía en este proyecto, sin todo su apoyo este proyecto no sería posible.

Dra. Patricia Mussali Galante: Por su paciencia, comprensión, por sus valiosas observaciones y aportaciones, gracias por todo.

Dra. Lucia Lourdes Aguilar Santamaría: Por todo el apoyo y disposición, por sus comentarios y observaciones que ayudaron a sacar adelante este proyecto.

Dra. Leticia Valencia Cuevas: Por su valiosa colaboración en la escritura del artículo y revisión de la tesis, muchas gracias por su paciencia y buena disposición siempre.

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís: Por sus inestimables observaciones y consejos a lo largo del proyecto, gracias por su ayuda.

Dra. María Luisa Castrejón Godínez: Sus comentarios y correcciones en la escritura de la tesis, muchas gracias por su apoyo.

Dra. Verónica Obregón Barbosa: Por apoyarme en la revisión de la tesis, sus comentarios fueron muy importantes para su finalización.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi hijo Demian Osvaldo, que además de ayudarme a montar mis experimentos en el invernadero me apoyó siempre con su cariño y abrazos, te amo hijo eres mi motor y todo esto lo he hecho para ti y para mí.

A mi madre Hortencia, por alentarme a seguir adelante y ayudarme en todo siempre, a mi papá Francisco que está en la presencia de Dios, que me alentó a estudiar y siempre me dio su apoyo incondicional, a mis hermanos Laura, Erik y Javier que siempre me han dado su cariño.

A mis tutores, Dr. Efraín y Dra. Paty gracias por aceptarme y apoyarme para sacar adelante este proyecto, gracias por su paciencia y comprensión, gracias por las llamadas de atención que me ubicaron y me ayudaron a seguir con el doctorado.

A mis amigos del lab, Joel, Miriam, Dania, Miguel Ángel, Carlos, Abi, Elgar, Marcos, Miguel, Juan gracias a todos por los buenos momentos, estarán siempre en mi corazón.

A la Dra. Laura Tatiana Cervantes Ramírez por entrenarme en la técnica del Ensayo cometa, su ayuda fue invaluable.

A mis amigos del alma, Raúl, Tatiana y Noelia a quienes admiro profundamente, más que mis amigos son mis hermanos y han estado a mi lado en todo este proceso, me han visto reír y llorar por el doctorado y me han escuchado y dado su apoyo siempre, los amo, gracias por estar.

A Dios, que ha abierto todas las puertas necesarias para que yo tenga este logro, le doy a Él toda la gloria y la honra por siempre.

ÍNDICE

RESUMEN.....	21
INTRODUCCIÓN.....	22
ANTECEDENTES.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
RESULTADOS.....	48
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	61
TABLAS.....	63
LITERATURA CITADA.....	68
ARTÍCULO PUBLICADO.....	80

Muro-González, D.A (2020). Caracterización de especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados en jales mineros. Tesis doctoral. Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

RESUMEN

La industria minera genera grandes volúmenes de residuos conocidos como jales mineros, los cuales contienen metales pesados (MP) que no son biodegradables, se acumulan en el ambiente, en los organismos y como consecuencia contaminan las cadenas tróficas. Esta contaminación genera un riesgo para la salud ambiental. Por lo anterior, la remediación de la contaminación por MP requiere la debida atención. En el presente estudio, la bioacumulación de los MP, el daño genotóxico, y los cambios morfológicos y fisiológicos en la especie arbórea *Prosopis laevigata* fueron evaluados para determinar su potencial para reducción de MP en los jales mineros. Plantas de *P. laevigata* fueron establecidas en dos tratamientos (sustrato testigo y sustrato jal) bajo condiciones de invernadero. Las mediciones de los parámetros se hicieron cada dos meses, se eligieron seis individuos al azar por cada tratamiento durante un año (72 individuos en total fueron evaluados). De cada individuo, seis parámetros macro, micro-morfológicos y fisiológicos (contenido de clorofila) fueron evaluados, así como la concentración de Pb, Fe, Zn y Cu en tejido radicular y foliar, otra medición que se realizó fue el daño genético por medio de la electroforesis unicelular alcalina en tejido foliar. Finalmente, los parámetros mencionados fueron evaluados también en individuos adultos establecidos en jales mineros. Los resultados mostraron que las raíces bioacumulan significativamente más MP en comparación con el tejido foliar. Sin embargo, el patrón de bioacumulación en ambos tejidos fue: Fe > Pb > Zn > Cu. En las plantas establecidas en el sustrato jal, los parámetros morfológicos y fisiológicos se reducen en un 83% a través del tiempo de exposición comparado con los individuos en el sustrato testigo. La bioacumulación de Pb afecta significativamente los niveles de daño genéticos y el número de hojas, mientras que el Zn reduce significativamente la altura de las plantas. El porcentaje de plantas que tienen valores de factor de traslocación mayores a uno es el siguiente: Cu 92.9% > Fe 85.7% > Pb 75.0% > 64.3% Zn. *P. laevigata* es una especie con potencial de fitorremediar ambientes contaminados con Cu y Zn, debido a que presenta una amplia distribución geográfica, su habilidad de establecerse y ser dominante en jales mineros abandonados, su capacidad de bioacumular MP en sus

tejidos y no tener afectaciones en el desarrollo de las plantas, así como sus altos niveles de traslocación de MP.

Palabras clave: Jales, metales pesados, bioacumulación, translocación, biorremediación.

INTRODUCCIÓN

La producción minera en México

En México, la minería es una actividad económica muy importante y ampliamente explotada a través de los años en prácticamente todo el país. Actualmente, México se ubica como el primer productor de plata a nivel mundial, y en menor cantidad también explota barita, bismuto, cadmio, cobre, grafito, molibdeno, oro, plomo, yeso, zinc, entre otros (INEGI, 2016).

Tan solo durante el cuarto trimestre del 2014, la minería aportó el 5.5% del Producto Interno Bruto Nominal (PIBN) del país. En el 2015 para el mes de marzo esta actividad había generado 18, 876 millones de pesos en valor de producción. En particular, en el mes de noviembre del 2016 en México se produjeron 91.8 ton de oro, 3, 926.2 ton de plata, 150, 587 ton de plomo, 504, 941 ton de cobre y 320, 304 ton de zinc (INEGI, 2016).

Las entidades más importantes en términos de productividad de minerales metálicos y no metálicos son: Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, y Zacatecas (INEGI, 2016). Sin embargo, cuando esta actividad tan importante en nuestro país es llevada a cabo se generan miles de toneladas de residuos que contienen altas concentraciones de metales pesados (MP).

Los metales pesados son considerados elementos potencialmente tóxicos (EPT) debido a los efectos negativos que causan sobre los organismos y los ecosistemas, por lo que representan un grave problema de contaminación ambiental (Mussali-Galante et al, 2013).

Características de los metales pesados

Los elementos que son considerados MP, son aquellos metales que se encuentran en la tabla periódica con un número atómico superior a 20 y además tienen un peso específico mayor a 5 g/cm³, excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos (Navarro-Aviño et al, 2007).

Existen elementos como los metaloides, los cuales son considerados como metales pesados por sus efectos tóxicos (P. ej., arsénico), aunque sus propiedades químicas son intermedias entre metales y no metales (Tiller, 1989; Breckle, 1991).

Dentro de los metales pesados, el cobre (Cu), níquel (Ni) y zinc (Zn), son elementos considerados esenciales debido a que son requeridos en cantidades traza y necesarios para el correcto funcionamiento de diversas vías metabólicas. Sin embargo, en el caso de las plantas, si estos metales se encuentran disponibles en alta concentración pueden provocar efectos adversos sobre la capacidad fotosintética, el crecimiento y desarrollo, la adecuación y la reproducción (Bowen, 1979; Brady y Weil, 2002).

Por su parte, antimonio (Sb), arsénico (As), el cadmio (Cd), mercurio (Hg), plata (Ag) y plomo (Pb) son considerados metales no esenciales y son tóxicos incluso cuando son absorbidos en pequeñas cantidades (DalCorso, 2012).

Una fuente importante de contaminación ambiental, son los metales pesados contenidos en los residuos generados por la actividad minera, y debido a los efectos negativos que generan son considerados tóxicos para los organismos que se encuentran expuestos a estos elementos.

Contaminación por metales pesados y toxicidad en los organismos

En algunos sitios donde se ha llevado a cabo la extracción de materiales propios de la minería, se generan desechos mineros o jales, los cuales son residuos sólidos que se producen a partir de las operaciones primarias de separación y concentración de minerales. Los jales se caracterizan por contener Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) como los metales pesados y éstos pueden dispersarse contaminando agua, aire y suelo (Reyes et al, 2008; Espinoza-Reyes, 2013).

Algunos de los desechos mineros son: aguas residuales, emisiones de contaminantes a la atmósfera y suelo, y metales pesados (Tabla 1).

Tabla 1. Etapas del proceso minero que generan problemas ambientales de alto impacto (INE, 2007).

Etapa	Descripción	Impacto ambiental
Exploración: se realiza con el fin de demostrar dimensiones, posición, características mineras, reservar y valorar los yacimientos mineros	Barrenación y perforaciones	Destrucción de la vegetación, alteración del suelo.
Explotación: se extraen los minerales contenidos en un yacimiento	Tiros, socavones, patios para depósito de minerales, zonas para descarga de materiales. Tipos de extracciones: A cielo abierto: el yacimiento es explotado en la superficie Del subsuelo: se extrae a cierta profundidad para obtener el mineral Por cernido: búsqueda de minerales en la tierra o arena, cerniéndola y pasándola por agua al buscar piedras preciosas Por bombeo: remoción de grandes cantidades de arena desde el fondo de los ríos en busca de piedras preciosas	Operación de presas de jales: Arrastre de residuos peligrosos Descarga de aguas residuales que contienen: cianuro, ácidos concentrados, compuestos alcalinos, metales pesados, solventes, lubricantes químicos Destrucción, de playas, ríos
Beneficio: extraer o concentrar la parte valiosa de un agregado de minerales desarraigado Fundición y refinación: mediante procesos físicos y químicos	Concentración Trituración y molienda Tratamientos previos Obtención de metales y sus aleaciones (hornos industriales) Eliminación de impurezas en los metales para aumentar la ley de contenido	Generación de ruido Vibración y emisión de polvo Emisiones a la atmósfera (nitratos, productos de la combustión y concentración de radón en los respiraderos de minas subterráneas) residuos peligrosos y aguas residuales

Cuando los suelos se encuentran contaminados por metales pesados, éstos pueden ser dispersados de manera natural (P. ej., por la lluvia o por el viento) o por actividades humanas, favoreciendo su absorción en la biota circundante.

Los metales pesados al no ser biodegradables, se pueden bioacumular en las plantas y en los animales, por lo que a través del tiempo las cantidades de metales en el interior de los organismos supera a las concentraciones contenidas en el ambiente, generando así efectos tóxicos en la salud de los organismos y de los ecosistemas (Moriarty, 1990; Diez-Lázaro et al, 2010).

Los efectos tóxicos que producen los metales pesados pueden darse no solamente a nivel individual, sino también puede afectar negativamente la salud de las poblaciones, de las comunidades y de los ecosistemas (Mussali-Galante et al, 2013). Estos efectos se dan por etapas, primero el organismo debe estar expuesto a una cantidad considerable de metales biodisponibles. Posteriormente, se dan los primeros efectos biológicos (P. ej., daño al ADN), después hay afectaciones a nivel celular (estructura y función), a nivel fisiológico y en la salud general del organismo (Mussali-Galante et al, 2013).

Mecanismos de toxicidad de los metales pesados en las plantas

La toxicidad de una sustancia está relacionada con los efectos nocivos que ocurren en los organismos como resultado de la acción de un material o de una mezcla de materiales (Posada y Arroyave, 2006). Los efectos de la toxicidad pueden ser variables, por ejemplo, puede generar enfermedades, cambios morfológicos, histológicos, fisiológicos, bioquímicos, etológicos, reproductivos, genéticos, e incluso la muerte (Posada y Arroyave, 2006).

Para que los metales puedan tener efectos tóxicos, éstos deben encontrarse biodisponibles, es decir, los suelos donde las plantas se establecen deben contener metales y poseer ciertas características y propiedades (P. ej., condiciones específicas de pH, materia orgánica y capacidad de intercambio catiónica, entre otros) que faciliten la biodisponibilidad de estos metales para poder ser absorbidos por las plantas a través de sus raíces.

La biodisponibilidad de los metales también depende de la adsorción y desorción de éstos y de los complejos que se formen en la matriz del suelo. Además, la toxicidad de los metales pesados también es considerada especie-dependiente (DalCorso, 2012).

Por ejemplo, cuando los suelos poseen un pH ácido varios de los metales pesados poseen una mayor movilidad, ya que la cantidad de cationes biodisponible aumenta y se encuentran menormente retenidos, ya que son reemplazados por iones hidronio (H_3O^+) y así se liberan los metales del suelo. Cuando el suelo tiene un pH menor a 5, metales como el Cd, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn tienen una biodisponibilidad mayor.

La capacidad de intercambio catiónico es la medida de cantidad de cargas negativas presentes en las superficies de los minerales y componentes orgánicos del suelo (arcilla, materia orgánica o

sustancias húmicas) y representa la cantidad de cationes que las superficies pueden retener, también es considerada como una propiedad que le permite al suelo tener una mayor biodisponibilidad de metales y ser absorbidos por las plantas cuando presentan valores mayores a 1 o 2 dS/meq. Esta propiedad está estrechamente relacionada con el contenido de materia orgánica, que idealmente debe encontrarse entre el 5 y el 15% (Cuesta, 2005). La materia orgánica tiene la capacidad de formar quelatos con los metales y ser movilizados de manera eficaz cuando existen altos porcentajes de materia orgánica, así los metales quedan fuertemente adsorbidos e indisponibles para ser absorbidos. Por ejemplo, metales como el plomo y el zinc forman quelatos solubles muy estables.

Otra propiedad importante en la biodisponibilidad de metales es la cantidad de arcillas contenida en el suelo. Las arcillas son partículas que poseen carga negativa y pueden retener cationes y agua, por lo que pueden inmovilizar metales que han quedado en el suelo, disueltos en la solución o adsorbidos. Los metales pesados tienden a precipitarse al quedar atrapados en complejos, de no ser así, son absorbidos por las raíces y movilizados a las aguas subterráneas y superficiales (Pilon-Smits, 2005).

Los metales pesados también pueden afectar algunas propiedades fisicoquímicas de los sustratos, ya que pueden verse afectadas negativamente al favorecer una reducción en la porosidad, en la conductividad eléctrica y un aumento en la acidez (Hernández-Allica et al, 2007).

Se ha documentado que los jales mineros contienen partículas muy pequeñas ($\leq 50 \mu\text{m}$) que favorecen la dispersión de los metales pesados, los cuales se pueden acumular en la superficie de los suelos y de este modo estar disponibles para la absorción por parte de las plantas y así integrarse a las redes tróficas (Puga et al, 2006). Una vez que los metales se encuentran contenidos en un organismo, como las plantas desarrollan distintos mecanismos de toxicidad.

La toxicidad de un metal depende de características como es el estado de oxidación que tiene al estar biodisponible en los suelos para las plantas. Por ejemplo, el Cr (IV) es más tóxico que el Cr (III), puede formar cromatos (CrO_4^{-2}) o dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$) (Dal Corso, 2012).

Algunos mecanismos de toxicidad que poseen los metales pesados son la inducción de estrés oxidativo y los cambios en la permeabilidad y la integridad de la membrana celular (Bertin y Averbeck, 2006). En general, la mayoría de los metales pesados inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), éstas tienen la capacidad de alterar la fluidez, estabilidad y estructura de la membrana

celular, así como el flujo de electrones en los cloroplastos y mitocondrias. También ocurre interferencia con las enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, generando efectos adversos en el ADN como la alquilación en el ADN, la formación de aductos y entrecruzamientos inter e intracadena (Jacobson y Turner, 1980; Tovar-Sánchez et al, 2012).

Otro mecanismo de toxicidad es la capacidad de reaccionar con grupos sulfhidrilo (-SH), lo que puede intervenir con el plegamiento de proteínas y la actividad catalítica, y así alterar la regulación de enzimas encargadas de las reacciones de oxidación-reducción. También se puede generar una similitud con grupos funcionales importantes, por ejemplo, el As puede desplazar al grupo fosfato en el ATP, lo que afecta el flujo de energía celular (Rascio y Navari-Izzo, 2011).

El desplazamiento de cofactores catiónicos esenciales en enzimas y componentes de señalización es otro mecanismo de toxicidad que genera la pérdida de la actividad enzimática e incluso alteran la expresión genética, y las vías homeostáticas para los iones metálicos esenciales (Dal Corso, 2012).

La toxicidad en plantas causada por la absorción de metales pesados genera efectos negativos como: a) la interferencia en procesos vitales, b) la actividad enzimática fotosintética, c) la absorción en raíz, d) la tasa de germinación, e) la tasa crecimiento, f) la fotosíntesis, g) el balance hídrico, h) el metabolismo primario, e i) la reproducción. Algunos síntomas observables de estos efectos son cambios anatómicos y morfológicos como la clorosis, enrollamiento y necrosis foliar, senescencia, marchitamiento y retraso del crecimiento, incluso disminuir la producción de biomasa y semillas, daño genético, entre otros y finalmente la muerte (Posada y Arroyave, 2006; Dal Corso, 2012).

Cambios morfológicos y daño genético en plantas por efecto de metales pesados

Existen diferentes tipos de daños en plantas causados por la absorción y acumulación de metales pesados, entre ellos se han reportado cambios morfológicos (Tovar-Sánchez et al, 2018), anatómicos (Ruíz y Armienta, 2012; Castañeda-Bautista, 2014; Santoyo-Martínez et al, 2020), fisiológicos (Ruíz y Armienta, 2012) y genéticos (Mussali-Galante, 2013).

En general, los metales pesados tienen efectos negativos en todos los tejidos de las especies vegetales. Por ejemplo, en la raíz, que es el punto de entrada; en las hojas, específicamente en cloroplastos y mitocondrias se promueve un mal funcionamiento de la fotosíntesis y respiración. También se han observado cambios importantes en el metabolismo y regulación celular que conducen a la muerte de la planta (Posada y Arroyave, 2006).

Algunos procesos esenciales para la supervivencia de las plantas se ven afectados. Por ejemplo, el Cr induce alteraciones en la fotosíntesis y respiración celular, en los mecanismos de absorción de agua y minerales, en la actividad enzimática que permite la fijación del nitrógeno (Pal Singh et al, 2013).

Además, genera la producción de especies reactivas de oxígeno, ya que es un fuerte agente oxidante y provoca daño oxidativo al destruir las membranas lipídicas y daño al ADN. También reduce e inhibe la geminación, reduce en gran medida el crecimiento y producción primaria de biomasa, disminuye algunos parámetros morfológicos en las plantas: raíces pobremente desarrolladas, reducción en la elongación, número de hojas, tamaño de la planta, anormalidades estructurales, clorosis, necrosis, caída de las hojas jóvenes, cambios anatómicos y ultraestructurales (Kotás y Stasicka, 2000; Shanker et al, 2005; Zhang et al, 2007; Pal Singh et al, 2013). El plomo, por ejemplo, produce la reducción en la tasa de germinación y el crecimiento radicular, en la tasa fotosintética y por lo tanto un bajo rendimiento en la producción de biomasa (Sharma y Dubey, 2005).

Procesos vitales en las plantas como la fotosíntesis y la respiración celular también se ven negativamente afectados por el Cd, que se acumula en las vacuolas, afecta el transporte de agua y la absorción de nutrientes como potasio, hierro y manganeso (Sharma y Dubey, 2005; Clemens, 2006).

Los metales pesados poseen distintos mecanismos de toxicidad en los organismos. En particular, se han reportado efectos tóxicos del Cd, Cu, Pb y Zn, en jales mineros en la zona de Santa Rosa en Taxco, Guerrero sobre plantas de maíz (*Zea mays*). En este estudio se observó una disminución importante en la tasa de crecimiento y en la cantidad de biomasa (peso húmedo y seco), así como efectos negativos en la viabilidad y germinación de las semillas (Tovar-Sánchez et al, 2018).

En algunos estudios donde se han evaluado los efectos de los metales sobre caracteres morfológicos se ha encontrado que especies como *Pithecellobium dulce* y *Acacia farnesiana* que se establecen en jales mineros, bioacumulan Cu, Zn y Pb en su tejido foliar en mayor concentración que

la que existe en los jales (Castañeda-Bautista, 2016; Martínez-Santoyo, 2016), lo que genera efectos adversos en los caracteres foliares, como es la reducción en la longitud, así como un incremento en los niveles de daño genético (rompimiento de cadena sencilla) en los individuos expuestos en comparación con los individuos de sitios testigo (Santoyo-Martínez, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que el helecho acuático *Azolla pinnata* expuesto a sales de mercurio (concentraciones de 0.01 mg/L y 10.0 mg/L) muestra una disminución en la cantidad de clorofila, proteínas, peso seco de vástago, y también un incremento en la permeabilidad de los tejidos. Sin embargo, se observó que en una concentración de 1 mg/L induce tolerancia a dicho metal (Sarkar y Jana, 1986), probablemente reflejando un efecto de dosis-respuesta muy particular. También se ha documentado que el mercurio en plantas acuáticas genera un aumento en las células meristemáticas con micronúcleos, síntoma de aberraciones cromosómicas producidas por sustancias tóxicas (Panda et al, 1988).

Otro estudio indica que existe una correlación entre el tiempo de exposición a diferentes concentraciones de cadmio y el crecimiento de la raíz de *Allium cepa*. Se ha documentado que disminuye el índice mitótico e induce aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas además de rupturas cromosómicas durante la mitosis (Marcano et al, 1999).

En la especie arbórea *Prosopis laevigata* se ha reportado que individuos expuestos a Cr(VI) y Cd (II) producen semillas viables, pero sus plántulas son más pequeñas, con menor número de hojas y raíces secundarias, así como menor número de brotes y alargamiento de raíz (Buendía-González et al, 2010), reducción de los caracteres morfológico foliares (Hernández-Lorenzo, 2015) y el daño genético provocado por la exposición a metales pesados es aproximadamente 15 veces mayor en esta especie que en poblaciones no expuestas (Murillo-Herrera, 2015).

Es importante medir el daño genético en plantas provocado por la toxicidad de los metales pesados ya que este efecto es considerado de efecto temprano, es decir, se puede predecir el efecto a largo plazo en el organismo a partir de la cuantificación de sus niveles de daño genético, por lo que se recomienda su uso en este tipo de estudios (Mussali-Galante et al, 2013)

Genotoxicidad y el ensayo cometa

Organismos que han estado expuestos a metales pesados, bioacumulando metales en sus tejidos y a su vez metabolizándolos promueven un efecto de activación de promutágenos hacia compuestos genotóxicos (Jiménez y Merchant, 2003) que eventualmente generarán daño al ADN (Brusick, 1987; Rodríguez, 1995).

Una vez que los metales entran a la célula se vuelven altamente reactivos, generando genotoxicidad, es decir causan daño al ADN, estos efectos pueden darse de forma directa o indirecta. Cuando ocurren de forma directa estos daños pueden causar la formación de aductos, entrecruzamientos, alquilaciones, rompimiento de cadena doble y sencilla, alteración de bases, formación de sitios apurínicos y apirimidínicos en el ADN (Mussali-Galante et al, 2013). Cuando los efectos se dan de forma indirecta ocurren procesos oxidativos provocados por las ERO's, enzimas como el citocromo oxidasa, la glucuroniltransferasa y la glutatión-S-transferasa, que son las encargadas de evitar estos procesos de oxidación, aunque su actividad también se ve reducida y afectada por la acción de los metales pesados (King et al, 2000; Sheehan et al, 2001; Koval et al, 2008; Flora et al, 2008), de tal forma que la sobreproducción de ERO'S sobrepasa la capacidad de remoción de oxidantes, induciéndose por lo tanto modificaciones por oxidación en estructuras celulares, membranas, enzimas, material genético, etc.

Se ha documentado que la genotoxicidad de los metales pesados promueve el intercambio de cromátidas hermanas, genera aberraciones cromosómicas y formación de micronúcleos (Hartmann y Speit, 1994; Steinkellner et al, 1998; Mussali-Galante et al, 2013). Para determinar el daño genético es necesario el uso de técnicas que detecten el tipo de daño e intensidad del mismo. Una de las técnicas más utilizadas es la Electroforesis Unicelular Alcalina o Ensayo cometa, que fue propuesta por Ostling y Johanson (1984).

El ensayo cometa, tiene como base la aplicación de electroforesis a microgeles que contienen células con fragmentos de ADN provenientes de rupturas de sus cadenas, estos pueden ser rupturas dobles o sencillas causadas por el daño genotóxico al que han estado expuestas las células. La forma que adquieren los núcleos de estas células parece un cometa cuando se observan al microscopio de fluorescencia (Valverde et al, 2009).

Actualmente, esta técnica puede ser utilizada con distintas soluciones de pH de lisis y del amortiguador que se utiliza en la electroforesis y su tiempo de corrimiento en la etapa de desenrollamiento de ADN, lo cual ha permitido una mayor sensibilidad en la detección de daño genotóxico (Mussali-Galante, 2001; Martínez-Pacheco, 2008; Cervantes-Ramírez, 2009), como la modificación propuesta por Olive et al (1990), que consiste en la utilización de una solución de lisis con pH alcalino y una electroforesis en condiciones neutras, para la observación de rompimientos de cadena doble del ADN.

También es posible hacer esta técnica en condiciones alcalinas (pH 12.3) y se pueden detectar rompimientos de cadena sencilla y sitios retardados de reparación. Otra modificación hecha por Singh et al (1998) es la versión que mayormente se usa en la actualidad ya que permite un panorama más amplio del daño que causado al ADN de una célula (Singh et al, 1988; Nossoni, 2008), en esta versión se utiliza una electroforesis alcalina a un pH 13 que además de permitir la detección de rompimientos de cadena sencilla, también detecta sitios álcali lábiles y sitios retardados de reparación de ADN (Valverde et al 2009, Mussali-Galante, 2001; Martínez-Pacheco, 2008; Cervantes-Ramírez, 2009).

Esta técnica permite de una manera sencilla y rápida utilizar cualquier célula eucarionte, en donde se evalúa el daño genético individualmente, además de la utilización de una cantidad reducida de muestra, debido a sus ventajas ha sido elegida en el presente estudio como biomarcador para evaluar el daño genético producido por efecto de los metales pesados sobre las especies vegetales de estudio. Aunque los metales pesados pueden provocar daño genético a las plantas, también éstas poseen distintos mecanismos de respuesta para enfrentarse a estos efectos adversos.

Mecanismos de respuesta a la toxicidad por metales pesados en plantas

Las plantas tienen diferentes estrategias para contender con los efectos de los metales pesados. A pesar de que necesitan algunos metales esenciales como el Zn y el Cu para llevar a cabo su metabolismo de manera adecuada, deben ser capaces de controlar debidamente la concentración intracelular y biodisponible de cada metal (Mancera-Rodríguez y Álvarez-León, 2006).

En general, se han descrito dos estrategias que utilizan los organismos para tolerar altas concentraciones de metales pesados. La primera, es la acumulación estratégica en compartimentos celulares, como paredes celulares o vacuolas, también se pueden conjugar con algunos ácidos

orgánicos o proteínas, y dependiendo de la especie vegetal esta acumulación puede ser más eficiente en diferentes órganos evitando que la planta muera (Puga et al, 2006; Llugany et al, 2007).

La segunda estrategia es la exclusión, en la que los metales son rápidamente transportados hacia los brotes y las hojas para salir de la planta por volatilización o desprendimiento por senescencia de la hoja. La exclusión también implica la restricción en el transporte de metales pesados hacia la parte aérea, esta estrategia es característica de especies resistentes a los metales, como las que se encuentran en las cercanías a las presas de jales (Puga et al, 2006; Llugany et al, 2007).

Cuando las plantas son tolerantes a los metales, es decir, que pueden tenerlos contenidos en alguna parte de su anatomía (P. ej., raíz, tallo u hojas) se considera que éstas están acumulando los metales, pero en algunas ocasiones esta acumulación puede darse de manera aumentada de tal forma que se les conoce como especies hiperacumuladoras (Llugany et al, 2007).

Bioacumulación e hiperacumulación de metales pesados en plantas

Para que un metal pueda ser absorbido por una planta primero debe encontrarse biodisponible para entonces poder ser bioacumulado en los tejidos de la planta, es decir, que en un determinado momento la concentración del contaminante en un organismo supera a las concentraciones del contaminante en el ambiente (Angelova et al, 2004).

Algunas plantas tienen la capacidad de hiperacumular metales, éstas pertenecen a algunas familias botánicas que comparten características, como: a) capacidad de crecer en suelos metalíferos, b) acumular grandes cantidades de metales pesados en órganos aéreos, c) no sufrir efectos de fitotoxicidad, d) una rápida traslocación de la raíz al tallo, y e) gran capacidad para detoxificar (Nuñez-López et al, 2004).

Raxcio y Navari-Izzo propusieron, en el 2011, que la capacidad de acumular metales pesados en algunas especies vegetales pudiera ser un mecanismo de defensa contra herbívoros, hipótesis referida como “defensa elemental”.

En el proceso de hiperacumulación de metales pesados se han determinado algunos procesos importantes, como: a) la bioacumulación en la rizósfera a través de la interacción raíz-microorganismos, b) absorción mejorada por transportadores en membrana plasmática, c) detoxificación por la distribución al apoplasto a través de la unión a las paredes celulares o la

quelación de metales, d) secuestro en la vacuola por transportadores localizados en el tonoplasto (Yang et al, 2005).

Los procesos antes mencionados les han conferido a las plantas su potencial para biorremediar sitios contaminantes por metales pesados, además de sobrevivir exitosamente en la mayor cantidad de ambientes, incluyendo aquellos contaminados con metales pesados.

En la naturaleza existen especies vegetales conocidas como hiperacumuladoras, las cuales se distinguen por presentar los siguientes atributos: a) una alta tolerancia a los suelos metalíferos sin presentar importantes afectaciones en su viabilidad, crecimiento, desarrollo y reproducción; b) con la capacidad de acumular grandes cantidades de MP en órganos aéreos; c) una rápida translocación de los MP de la raíz al tallo y d) una alta capacidad para detoxificar (Nuñez-López et al, 2004).

Algunas especies de plantas que han sido reportadas como hiperacumuladoras pertenecen a las familias: Brassicaceae, Asteraceae, Fabaceae, entre otras (De la Rosa et al, 2008; Buendía et al, 2010).

Técnicas de remediación de suelos contaminados por metales pesados

Existen diferentes técnicas de remediación que se pueden emplear dentro de sitios contaminados o fuera de éstos, entre las que se incluyen las de extracción, química, física y biológica. López-Martínez et al (2005) describe las técnicas de la siguiente manera: a) las técnicas de extracción consisten en lavado, aplicación de vacío y ventilación de suelo, b) las técnicas químicas son la oxidación y la deshalogenización, c) las técnicas físicas incluyen la fijación o encapsulamiento a través de la vitrificación, la solidificación con cal y tratamiento térmico.

Por último, las técnicas biológicas que se conocen como biorremediación en donde se utilizan distintos organismos vivos, como bacterias, hongos y plantas se realizan a través de distintos instrumentos y técnicas como biofiltros, biorreactores o el compostaje, la bioestimulación, bioamplificación y fitorremediación (Cortón y Viale, 2006).

La fitorremediación como estrategia en la recuperación de suelos contaminados por metales pesados

La fitorremediación, es la técnica en donde se utilizan a las plantas para la eliminación, reducción y retención de contaminantes del suelo, favoreciendo la disminución de su toxicidad (Muruyama-Nakashita et al, 2007). Esta técnica aprovecha el metabolismo propio de las plantas, así como a los microorganismos asociados a ellas para reducir, remover, mineralizar, transformar, estabilizar, degradar o volatilizar compuestos contaminantes. Los mecanismos o procesos utilizados son: fitodegradación, fitoextracción, fitovolatilización, fitoestabilización y rizorremediación (Delgadillo-López et al, 2011).

La fitoestabilización consiste en disminuir la toxicidad de los contaminantes a través de la inmovilización de los metales. Para esta técnica deben elegirse plantas que presenten una baja traslocación desde las raíces hasta la zona aérea, y resistir a condiciones de alta toxicidad (Cunningham y Berti, 1993; Prasad y Freitas, 2003).

La fitoextracción se lleva a cabo a través de la traslocación de los contaminantes contenidos en la matriz del suelo, desde la raíz a la parte aérea de la planta, y una vez que las plantas han crecido, éstas pueden ser cosechadas y de esta forma los metales que se encuentran las zonas hasta donde llegan las raíces son removidos. Para que esta técnica sea efectiva debe considerarse que es de larga duración, es decir, requiere varios ciclos de cultivo y también se debe considerar la capacidad de acumulación de metales de la planta y de la cantidad de biomasa que produzca (Kumar et al, 1995; Alloway, 1995; Chaney et al, 1997; Dahmani-Muller et al, 2000).

La fitorremediación sigue las siguientes etapas: absorción, excreción y desintoxicación de contaminantes (Watt y Evans, 1999; Harvey et al, 2007).

El aplicar esta tecnología sustentable tiene varias ventajas, ya que puede ser llevada a cabo *in situ* y *ex situ*, por lo que, no es necesario transportar el sustrato contaminado. Además, remueve contaminantes de origen orgánico e inorgánico, mejora las propiedades fisicoquímicas del suelo al generar cubierta vegetal y agradable a la vista, se realiza con actividades agronómicas convencionales, se puede llevar a cabo en suelo, agua, sedimentos y aire, además de la obtención de agua, metales y biomasa reciclados (Delgadillo-López et al, 2011).

También se pueden presentar algunas desventajas al realizar esta técnica, por ejemplo, este proceso se alarga considerablemente cuando son utilizados árboles y arbustos, además las plantas no pueden limpiar las zonas que se encuentran más allá de la rizósfera, la toxicidad del suelo por altas concentraciones de los contaminantes puede afectar el crecimiento de las plantas y a su vez la cantidad de contaminantes que tienen capacidad de remover, es por ello que no puede ser utilizada cualquier tipo de planta para fitorremediar. En los casos donde se utiliza la fitovolatilización, o los contaminantes acumulados en madera que tengan un proceso de combustión y ser liberados al ambiente. Algunos contaminantes pueden ser mayormente solubilizados y promover el movimiento de los contaminantes y generar más daño al ambiente (Delgadillo-López et al, 2011).

De acuerdo con su comportamiento al enfrentar la presencia de metales pesados, Olayinka (2008) clasifica a las plantas en:

- Excluyentes: No permiten la entrada de metales pesados o los translocan a partes aéreas y esto les permite vivir en ambientes con una alta concentración de estos contaminantes.
- Indicadoras: Reflejan el incremento de metal producido en su entorno.
- Acumuladoras: Incrementan activamente la cantidad de metales en sus tejidos.

La fitorremediación requiere el uso de plantas que deseablemente produzcan suficiente biomasa en la parte aérea, con una alta capacidad de acumulación de metales pesados, lo que permitiría cosechar las partes donde se acumulan los metales, además de contar con raíces bien desarrolladas, y presenten también una alta tasa de crecimiento (Meagher et al 2000; Barceló et al, 2001).

ANTECEDENTES

Los jales en Huautla, Morelos

En el poblado de Huautla, Morelos existió desde el siglo XVI hasta 1988 una importante actividad minera, principalmente en la extracción de plata, plomo y zinc. En esta región se explotaron las minas de San Francisco, Santa Ana, Plomosa, Reforma, Ánimas y San Esteban, y actualmente esta zona minera se encuentra inactiva, a causa de la caída del precio de la plata en 1992 (Mussali-Galante, 2013).

Después de un largo proceso de extracción y después del abandono de las minas se generaron grandes cantidades de residuos (colas de flotación) y de material no procesado rico en Cd, Mn y Pb solubles, las cuales se encuentran a la intemperie en la actualidad (Velasco et al, 2004; SEMARNAT, 2005; Mussali-Galante, 2008). Al abandonarse las minas, estos residuos (jales) no llevaron un tratamiento adecuado, lo que ha derivado a lo largo del tiempo en un impacto negativo en los organismos y el ecosistema de esta localidad (SEMARNAT, 2005).

Sin embargo, se ha observado que en estas zonas contaminadas con metales pesados se da la presencia y crecimiento de especies vegetales que al parecer no solo resisten las altas concentraciones de estos metales, sino que germinan, se desarrollan y reproducen con semillas viables de manera tal que logran colonizar estas zonas.

Conocer especies vegetales con potencial para biorremediación de suelos contaminados por metales pesados es de suma importancia. En particular, la búsqueda de especies vegetales que se establecen de manera natural en jales mineros, ya que están sometidas a una alta presión selectiva en este medio, generando la selección de genes que les permiten ser no sólo tolerantes, sino resistentes a la presencia de metales (Diez-Lázaro, 2008). Además, es imperativo reconocer los efectos de los metales en estas plantas establecidas en jales, en particular sobre su anatomía, fisiología y daño al ADN (Hernández-Lorenzo, 2013; Castañeda, Bautista, 2014 y Santoyo-Martínez, 2015), para tener un mejor panorama sobre la elección de especies para fitorremediar sitios contaminados.

Efectos de los metales pesados contenidos en jales mineros en distintos organismos en Huautla, Morelos.

En la localidad de Huautla, Morelos, específicamente en los jales de esta zona se han realizado diferentes estudios para evaluar el efecto de los jales sobre diferentes niveles tróficos: en animales (roedores y artrópodos que habitan en estas zonas), población humana, y plantas.

Por su parte, Martínez-Becerril (2009) documentó una disminución en los índices de diversidad vegetal y una reducción en biomasa aérea de las comunidades asociadas a los jales en relación con las comunidades de sitios testigo.

Particularmente para especies arbóreas se ha reportado que individuos de *Pithecellobium dulce* que crecen en jales mineros de esta zona, bioacumulan Cu, Pb y Zn en su tejido foliar. Los valores de enriquecimiento de metales pesados mostraron que el Cu (5.756 ± 3.027), el Pb (8.689 ± 4.654) y el Zn (6.306 ± 7.103) están en mayores cantidades de concentración en el tejido foliar de *P. dulce* en relación con el detectado en los jales (Castañeda-Bautista, 2016).

También para esta zona, se documenta una tendencia en la reducción de los caracteres morfológico foliares (Hernández-Lorenzo, 2013) y un daño genético aproximadamente 15 veces mayor en las poblaciones de *P. laevigata* expuestas a jales en comparación con los sitios testigo (Murillo-Herrera, 2015).

Para *Acacia farnesiana* también se observaron afectaciones causadas por la acumulación de metales (Cu y Pb), en la morfología foliar se encontró que se presenta una reducción en los caracteres macro y micromorfológicos, y fisiológicos, también se determinó que existe un daño genético aproximadamente 17 veces mayor en el tejido foliar de los individuos expuestos a los jales, en comparación con los individuos testigo (Santoyo-Martínez, 2016).

En poblaciones de animales, se han reportado distintos efectos adversos sobre poblaciones de roedores, por ejemplo, el daño genotóxico en *Baiomys musculus*, una especie de roedores en la que los individuos expuestos a estos suelos contaminados con metales pesados presentan un mayor número de rompimientos de cadena sencilla de ADN, tanto en machos como en hembras, siendo éstas últimas las que presentan mayores niveles de daño al ADN (Tovar-Sánchez et al, 2012).

En poblaciones del roedor *Peromyscus melanophrys* determinaron que hay un efecto negativo de la bioacumulación de metales pesados sobre los niveles de diversidad genética en comparación con poblaciones establecidas en sitios testigo (Mussali-Galante et al, 2013).

Por su parte, Hernández-Plata et al (2020) documentó que la bioacumulación de metales pesados en cerebro de la especie *Liomys irroratus* modifica significativamente la conducta de los individuos expuestos en comparación con los individuos testigo.

Galván-Ramírez (2020) analizó la estructura de la comunidad de roedores asociados a los jales. El autor documenta, que la composición de la comunidad de roedores (*Baiomys musculus*, *Liomys irroratus*, *Peromyscus melanophrys* y *Reithrodontomys fulvescens*) cambia significativamente entre

sitios de estudio (jales vs sitios control), y que estos cambios en la composición están determinados por la mezcla de metales pesados bioacumulados por sitio de estudio.

Otros estudios han evaluado el efecto de metales pesados en un gradiente de contaminación en Huautla, Morelos sobre la estructura de la comunidad de microartrópodos, en cual se encontró una relación negativa entre el incremento en la concentración de Pb y Cd y la riqueza de colémbolos y ácaros, en suelos contaminados se reduce significativamente la diversidad de microartrópodos (Hernández-Gómez, 2015).

También se reportó el efecto en las comunidades de artrópodos asociados a la vegetación en un gradiente de contaminación por metales pesados en jales mineros, en el cual se encontró que estas comunidades expuestas a contaminantes presentan una respuesta ante el estrés a los metales pesados que afectan la riqueza, abundancia y diversidad (González-Brito, 2015).

En pobladores que habitan en la cercanía de los jales de esta misma zona, se evaluaron cambios en células del epitelio bucal de individuos expuestos a metales pesados en el agua para beber de esta zona, y encontró que el As presente en el agua se encuentra en cantidades que rebasan hasta nueve veces los límites permisibles nacionales, revelando una gran problemática por contaminación de As en el agua, que está generando alteraciones nucleares (daño genético) en epitelios bucales de los pobladores (Reyna-Rosas, 2009). Asimismo, se ha determinado el daño genético en linfocitos de sangre periférica y aberraciones cromosómicas en los pobladores de esta zona expuesta a metales pesados (Tovar-Sánchez et al, 2016).

Acumulación de metales pesados y efectos anatómicos, morfológicos y daño genético en especies de las familias Fabaceae

Existe una gran variedad de especies vegetales con la capacidad de acumular distintos metales, por ejemplo, en estructuras radiculares *Fuertesimalva echinata* bioacumula Pb y Zn; y *Lupinus ballianus* bioacumula Cd (Jara-Peña et al, 2014), *Heliantus annus* es capaz de absorber grandes cantidades de uranio (U) depositado en el suelo (Marrero-Coto et al, 2012) y el maíz *Sea mays* con un gran potencial para la acumulación de Cd y Pb (Mojiri, 2011).

La capacidad de absorción, hiperacumulación y tolerancia a uno o más metales varía dependiendo de la especie y el tipo de contaminante, esto permite una elección más flexible del

cultivo a utilizar para llevar a cabo la fitorremediación de acuerdo con el grado y tipo de contaminación de los suelos (Meagher et al 2000; Barceló et al, 2001,2003).

En algunas zonas de México como Guanajuato, Guanajuato se han reportado otras especies capaces de bioacumular metales pesados como *Baccharis salicifolia*, *Schinus molle* e *Ipomoea murucoides* en una antigua zona minera (Mendoza-Benítez et al, 2008). También para esta zona se han reportado especies como *Acacia farnesiana* y *Dodonea viscosa* como hiperacumuladoras de Pb (hasta 5000 mg/kg en raíz, tallo y hojas) (Salas-Salmeron, 2007).

Se han reportado especies que se consideran acumuladoras e hiperacumuladoras de metales, además de encontrarse presentes en jales mineros donde germinan, crecen y se desarrollan sobreviviendo a la toxicidad causada por la presencia de metales pesados, otra especie perteneciente a esta familia (*Tithonia diversifolia*) se ha reportado como hiperacumuladora de Cu, Pb y Zn (Kayode-Adesodun et al, 2009; Adewole et al, 2010).

Para el presente proyecto se eligió a la especie arbórea *Prosopis laevigata* perteneciente a la familia Fabaceae (Audet y Charest, 2008; Simoes-Menezes et al, 2013) para evaluar su desempeño como biocumuladora de metales pesados además de determinar el efecto genotóxico de los metales en estas plantas. Esta especie fue elegida porque se distribuye ampliamente en el país, y crece naturalmente en jales mineros; además *P. laevigata* es una especie vegetal con abundante biomasa.

En particular, se ha documentado que *P. laevigata* es una planta útil para fitorremediar ya que existen reportes que indican que es una planta que tiene la capacidad de bioacumular metales como Ni y Pb (Buendía-González et al, 2010). También se ha reportado que es útil para remover Cr en cultivos *in vitro* detectando altos niveles de este metal en tallo y raíz (Quezada et al, 2012), además bioacumula Pb, Ni y Cd en tallo y raíces principalmente (Santiago-Cruz et al, 2009).

Para *P. laevigata* se ha determinado que bioacumula metales como Cu, Cd, Ni, Pb y Zn (Santiago-Cruz et al, 2009; Buendía-González et al, 2010), así como Cr y Cd (Buendía González, 2010) en distintos tejidos, al ser perteneciente a la familia Fabaceae, posee mecanismos de adaptación para hacer frente a las elevadas concentraciones de metales en los suelos, ya que esta familia es reconocida por esta característica (Mehrag, 1994).

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, es reconocida la problemática ambiental generada por la contaminación de metales pesados contenidos en los jales mineros depositados en la mayoría de los estados del país. En particular, Huautla, Morelos es un ejemplo de ello, donde se han reportado efectos nocivos en una gran variedad de organismos silvestres y en humanos. Por lo anterior, es necesario buscar alternativas de remediación de suelos contaminados por metales pesados. En este sentido la biorremediación, específicamente, la fitorremediación, con plantas nativas hiperacumuladoras, puede ser una alternativa viable, efectiva y económica.

La información que se genere en este estudio ayudará a determinar el potencial fitorremediador de *P. laevigata* y podrá ser utilizada en futuros proyectos de remediación en zonas con jales mineros de la República Mexicana. Al ser una especie que se desarrolla naturalmente en los jales de Huautla, Morelos y se conocen algunos de los metales que bioacumula, se desconocen los efectos de los MP sobre otros marcadores morfológicos y fisiológicos, como el contenido de clorofila, así como la bioacumulación en distintos tejidos vegetales (raíz y hoja) de MP presentes en jales bajo diferentes tiempos de exposición.

En este estudio se realiza un diseño mixto (in situ y ex situ) que combina diseños experimentales bajo condiciones de invernadero y en condiciones naturales (jales mineros), lo que ofrece la oportunidad de obtener resultados más apegados a la realidad sobre los efectos del tiempo de exposición a MP en la especie *P. laevigata*. Determinar la capacidad de bioacumulación MP de *P. laevigata* a diferentes tiempos de exposición (corto y largo plazo) en presencia de una mezcla de metales y evaluar los efectos de dicha exposición en marcadores fisiológicos, morfológicos y genotóxicos son poco explorados, por lo que la información generada puede ser de utilidad para determinar el potencial fitorremediador de esta especie en suelos contaminados con jales mineros.

HIPÓTESIS

- Si en los jales de Huautla, Morelos hay presencia de metales pesados biodisponibles, entonces se espera que las plantas expuestas al sustrato jal bioacumulen metales en sus tejidos.
- Si los metales pesados bioacumulados producen cambios fisiológicos, micro y macro morfológicos, entonces se espera que las plantas expuestas al sustrato jal presenten

alteraciones sobre estos caracteres en comparación con las plantas creciendo en sustrato testigo.

- Si los metales pesados son agentes genotóxicos, entonces se espera una relación positiva entre los niveles de bioacumulación de metales en los tejidos foliares y los niveles de daño genético.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el potencial de biocumulación y fitorremediación de *Prosopis laevigata* en los jales de Huautla, Morelos, así como evaluar el daño genético y los efectos morfológicos, dichas especies bajo condiciones de invernadero.

Objetivos particulares

- Determinar la concentración de metales pesados en hojas de individuos creciendo en jal y sustrato testigo.
- Determinar los niveles de daño genético foliar en individuos de *Prosopis laevigata* creciendo en los tratamientos (sustrato jal y testigo) y en los sitios de estudios (jales y sitios control).
- Determinar el efecto de los metales sobre cambios anatómicos en individuos creciendo en jal y sustrato testigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio

Sitio expuesto

Este estudio se llevó a cabo en el poblado de Huautla, el cual se localiza en el municipio de Tlalquitenango, en el estado de Morelos y forma parte de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) (Dorado et al, 2005). En este poblado existió un distrito minero que tuvo una actividad importante, sin embargo, después de un largo proceso de extracción las minas fueron abandonadas,

dejando grandes cantidades de residuos (jales), los cuales se encuentran a la intemperie en la actualidad (Velasco et al, 2004; SEMARNAT, 2005; Mussali-Galante, 2008). A la fecha, existen tres jales que no tuvieron un tratamiento adecuado, con el riesgo de lixiviarse o presentar escurrimiento hacia otras zonas durante la época de lluvias, lo que potencialmente podría contaminar el ambiente y a la biota circundante (SEMARNAT, 2005).

Los jales 1 y 2 son los más conservados, se encuentran en los paralelos 18°26'36.37''N-99°01'26.71''O y 18°26'22.62''N-99°01'51.71''O, a 500 y 100 m respectivamente, del poblado de Huautla (Velasco et al, 2004). Estos dos jales tienen una composición química semejante: pH de 7.85 a 8.37, conductividad eléctrica de 0.2 a 0.4 dS/m, porcentaje de materia orgánica de 0.52 a 0.84 %, tamaño de partícula <45 micras. Además, estudios previos han evidenciado el siguiente patrón en términos de concentración de MP: Fe > Zn > Pb > Mn > Cu > Cd (Solís-Miranda, 2016), es decir, esta zona está contaminada con una mezcla de metales.

Sitio control

El sitio control está localizado en Quilamula, Morelos poblado que se ubica al sur-oeste del municipio de Tlalquitenango, Morelos en los paralelos 18°30'52''N y 98°59'59''O. Este sitio fue elegido porque no existen registros de contaminación por actividad minera. Además, las características geográficas, climáticas y edáficas de la zona son similares a las del sitio expuesto.

Especie de estudio

Prosopis laevigata es un árbol perteneciente a la familia Fabaceae y es conocida comúnmente como Mezquite, puede llegar a medir hasta 13 m de altura y tener un diámetro normal de hasta 80 cm. Sus hojas son brevidecíduas o perennifolias, y caen en invierno. Florece de febrero a marzo y termina de abril a mayo. Fructifica de junio a julio. Tiene una amplia distribución geográfica en México (Rodríguez Saucedo et al, 2014). Además, esta especie crece de forma natural y abundante en los jales mineros de Huautla, Morelos.

Colecta de semillas y germinación de P. laevigata

La colecta de las semillas de *P. laevigata* se realizó en dos de los jales de Huautla, Morelos. Se eligieron al azar frutos de los individuos establecidos en el jal que presentaran vainas completas, sin evidencia de la presencia de hongos o parásitos. Posteriormente, las semillas se sacaron de las vainas y se corroboró que no estuvieran parasitadas. Finalmente, fueron sometidas a un proceso de escarificación mecánica para obtener una germinación más eficiente. Para su germinación, se colocaron 100 semillas en cinco cajas de Petri (20 semillas por caja) sobre algodón humedecido con agua destilada. Una vez que se germinaron las semillas, éstas fueron colocadas en charolas con sustrato peat moss hasta que la planta alcanzó un tamaño de entre 4 y 5 cm. Posteriormente, 72 plántulas fueron trasplantados a bolsas los sustratos de los tratamientos (36 en sustrato jal y 36 en sustrato testigo).

Colecta del sustrato jal y el sustrato testigo

Para llevar a cabo el experimento bajo condiciones de invernadero, se realizaron colectas de sustrato jal a través de un muestreo superficial, simple y aleatorio en dos de los jales ubicados en Huautla, Morelos. Posteriormente, el material colectado de ambos jales se homogenizó con una pala y se retiraron piedras y restos de raíces para obtener el sustrato que fue utilizado para llenar bolsas con una capacidad de 4 L para trasplantar a los individuos de *P. laevigata* que estarían en el experimento bajo condiciones de invernadero. El sustrato testigo fue colectado en Quilamula, en donde no hay reportes de la presencia de metales provenientes de actividad minera. Este sustrato fue sometido a un proceso de tamizado con un tamiz de 3 mm para obtener una textura similar al sustrato jal, y fue usado para trasplantar las semillas de *P. laevigata* para el tratamiento en sustrato testigo.

Concentración de MP en el tejido vegetal

Para los individuos crecidos en invernadero en ambos tratamientos (jal y testigo) la determinación de la bioacumulación de metales se hizo en raíz y hojas, mientras que para los individuos que crecen de forma natural en los jales sólo se midió en hojas. Se tomaron muestras de tejido vegetal de raíz y hoja de seis individuos crecidos bajo condiciones de invernadero. Mientras que para los árboles de *P. laevigata* establecidos en los jales solo se analizó tejido foliar. El tejido de raíz fue lavado con agua

destilada para eliminar los residuos de los sustratos. Todos los tejidos fueron llevados a una estufa de sacado a 60 °C hasta alcanzar un peso constante. Cada estructura vegetal (0.25 g) fue colocada y pulverizada en un contenedor lavado previamente con HNO₃. Las muestras fueron sometidas a una digestión ácida utilizando 10 ml ácido nítrico concentrado (70%).

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una digestión ácida usando un Microondas de Sistema de Reacción Acelerada (CEM® MARS-5), usando 10 mL de HNO al 70% en bombas de Teflón cerradas. Las muestras fueron disueltas y filtradas en agua destilada; esta solución fue disuelta a un volumen final de 50 mL hasta realizar el análisis. Una muestra sin tejido fue procesada simultáneamente y fue usada como control. Después los metales fueron analizados por Espectrofotometría de absorción atómica, que permite determinar la concentración de un elemento metálico determinado en una muestra, calibrando el espectrofotómetro con soluciones estándar que contienen concentraciones conocidas de cada elemento analizado. Los límites de detección para todos los elementos son mostrados en las tablas 1 y 2. Para cada medición, se hicieron tres réplicas de los valores promedio. Todos los valores de las concentraciones son reportados en ppm peso seco. Para este estudio se analizaron las concentraciones de tres metales no esenciales (Cd, Cr y Pb) y de tres esenciales (Cu, Fe y Zn). Se utilizaron 0.25 g de hoja y raíz por muestra.

Daño genético

La determinación del daño genético fue realizado a través de la técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina o Ensayo Cometa, ya que esta técnica presenta un alto grado de sensibilidad, sencillez y rapidez para analizar el rompimiento de cadenas simple del ADN en células individuales (Rojas *et al*, 1999). Las muestras vegetales fueron enjuagadas con agua destilada y secadas delicadamente, e inmersas en cajas Petri de con 20 mL de buffer salino de fosfato (PBS 1X) con un pH de 7.4 y una concentración final de 10 mM PO₄³⁻, 137 mM NaCl y 2.7 mM KCl. Para el aislamiento de los núcleos, posteriormente, 50 µL de suspensión e células fue tomada e incorporada en un tubo eppendorf con 50 µL de agarosa de bajo punto de fusión (1% LMPA). Después 80 µL de la suspensión de núcleos vegetales fue puesta en una laminilla en la que se había puesto con anterioridad una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMA 1.0% Gibco). Luego se cubrió con un cubreobjetos y se dejó enfriar

en hielo por 5 minutos. Los cubreobjetos fueron removidos y se les colocó una capa final de LMPA (0.5%) a 4°C por 5 minutos. Por cada muestra, fueron preparadas 2 laminillas (Tice et al, 2000).

Los geles fueron puestos en una solución de lisis fría (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trisma-base pH 10) at 100mL with 1% Triton-X y 10% de Dimetil sulfoxido (DMSO) 10% en vasos Koplring a 4°C por una hora. Subsecuentemente los geles fueron puestos en una cámara de electroforesis y cubiertos con un buffer alcalino frío [NaOH (300 mM) +1 mM EDTA] a un pH 13.0 por 20 minutos para un proceso de desenrollamiento del ADN. La electroforesis fue llevada a cabo a 300 mA y 25 V por 20 minutos para en condiciones de oscuridad.

Finalmente, los geles fueron lavados tres veces con un buffer neutral de Tris (0.4 M pH=7.5) por 5 minutos (Tice et al, 2000) y fijados con etanol absoluto frío por 10 minutos para leerlos más tarde con el software Comet IV integrado a un microscopio de fluorescencia con filtros de excitación de 515 a 560 nm, y una barrera filtro de 590 nm. Para su lectura, se hizo una tinción con fluorocromo que permite la observación de una figura parecida a un cometa con cabeza y cola y dependiendo del pH en que se encuentre la solución se puede determinar el origen de diferentes rompimientos de cadena de ADN (Mussali-Galante et al, 2005). Se cuantificaron 100 núcleos por individuo. En cada núcleo se evaluó la longitud de la cauda del cometa (migración del ADN).

Caracteres morfológicos

Los caracteres morfológicos solo fueron medidos en seis plantas tomadas al azar en los individuos de invernadero por tratamiento (sustrato jal y sustrato testigo) en cada corte bimestral por un año (seis cortes). Los caracteres macromorfológicos evaluados fueron: la altura de la planta (cm), el diámetro del tallo (cm) y el número de hojas. En cuanto a los caracteres micromorfológicos, se midieron el largo de la estoma (μ), ancho de la estoma (μ), cobertura de la estoma (mm^2) y se calculó el índice estomático. Lo anterior se realizó a través de la técnica de réplica con pegamento de cianoacrilato en tres hojas de tres individuos por tratamiento (jal y testigo) de *P. laevigata*. Por cada hoja se contaron las células estomáticas y epidérmicas en tres campos.

Tres hojas fueron seleccionadas de cada individuo, se midió: longitud del estoma (μ), ancho del estoma (μ) para obtener la cobertura estomática (mm^2). La longitud y la anchura fueron medidos,

calculando la cobertura de seis estomas por individuo. La cobertura estomática fue calculada usando la siguiente fórmula:

$$[(Q1+ Q2)/4]^2 \times \pi$$

Donde:

Q1: diámetro menor

Q2: diámetro mayor

El índice estomático fue calculado contando el número de estomas y de células epidérmicas en los campos observados. El número de estomas por campo fue cuantificado tomado en cuenta sólo aquellos estomas en los que se pudieran observar sus células guarda completas y el número de células epidérmicas estuvieran al menos el 60% en el campo de visión (Paniagua, 2010). Con los datos obtenidos, la fórmula de Salisbury (1968) fue aplicada.

$$IE = (N.E. / N.E. + N.C.E.) \times 100$$

Donde:

I.E: Índice estomático

N.E: Número de células estomáticas (células guarda) por unidad de área foliar.

N.C.E: Número de células epidérmicas ordinarias por unidad de área foliar.

Determinación del contenido de clorofila

El contenido de clorofila (mg/m^2) se midió en seis individuos (tres hojas por individuo) de *P. laevigata* por tratamiento (jal y testigo) cada dos meses por un año, con un aparato de medición de clorofila (Minota SPAD 502). Las mediciones se realizaron también en seis árboles adultos de *P. laevigata* expuestos a metales pesados, establecidos en los jales de Huautla, y seis árboles establecidos en el poblado de Quilamula como árboles en sustrato testigo. Las mediciones se realizan con sólo insertar la hoja que se quiere medir en la cabeza de medición y presionando la cabeza del SPAD cerrándola. Puesto que no hay necesidad de cortar las hojas, las medidas se pueden tomar sin dañarlas, lo que permite que la misma hoja que sea medida varias veces a medida que continúa creciendo y desarrollándose.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software STATISTICA versión 8.0 (STAT Soft Inc. USA). Se usó la prueba de Shapiro-Wilk “W” que es usada para probar normalidad (Zar, 2010). Se realizaron análisis de varianza de dos vías (Model I fixed effects, Zar 2010) para evaluar el efecto del tiempo de exposición (t), tratamiento (T) [sustrato testigo y sustrato jal], y Txt que es la interacción entre tiempo y tratamiento, todo esto en la bioacumulación de MP de la raíz y hojas de individuos de *P. laevigata*. Posteriormente, una prueba post-hoc (Tukey, $P < 0.05$) fue realizada para establecer el nivel de significancia entre pares de promedios (Zar, 2010).

También se realizó un análisis de varianza de dos factores para determinar el efecto del tiempo de exposición (t), el tratamiento (T) (testigo y expuesto) y la interacción Txt en los niveles de daño genético foliar en individuos de *P. laevigata*. Posteriormente, una prueba de Tukey ($P < 0.05$) fue llevada a cabo para determinar las diferencias significativas entre pares de promedios de los niveles de daño genético entre tiempos de exposición (Zar, 2010). Además, un análisis de regresión múltiple fue hecho para evaluar la influencia de la bioacumulación del plomo, hierro, zinc y cobre sobre los niveles de daño genético (rompimiento de cadena sencilla del ADN) en *P. laevigata* (Zar, 2010).

Para evaluar el efecto del tiempo de exposición (t), tratamiento (T) [testigo y expuesto] y la interacción Txt en la variación en tres parámetros macromorfológicos (altura, diámetro basal y número de hojas), dos parámetros micromorfológicos (índice estomático y cobertura estomática) y un parámetro fisiológico (concentración de clorofila) se realizó un análisis de varianza de dos vías. Posteriormente, una prueba de Tukey ($P < 0.05$) fue realizada para determinar el nivel de significancia entre los pares de promedios de los valores de los parámetros evaluados sobre el tiempo, en ambos tratamientos (Zar, 2010). Un análisis de regresión múltiple fue usado para evaluar la influencia de la bioacumulación de Cu, Fe, Pb y Zn sobre la variación de los parámetros en *P. laevigata*: tres macromorfológicos (altura, diámetro basal, número de hojas), dos micromorfológicos (índice estomático y cobertura estomática) y un fisiológico (concentración de clorofila) (Zar, 2010). Posteriormente, una prueba de Tukey ($P < 0.05$) fue realizada para determinar las diferencias

significativas entre los pares de los valores promedio a través del tiempo de exposición a los MP (Zar, 2010).

RESULTADOS

Concentración de metales pesados en raíz y hojas de *Prosopis leavigata*

Raíz

La presencia de Cu, Fe, Pb y Zn fue detectada en la raíz de plantas de *P. leavigata* creciendo en invernadero, mientras que el Cd y el Cr no fueron detectados (Tabla1). El patrón de biocumulación de metales fue el siguiente: Fe > Pb > Zn > Cu. El análisis de varianza de dos vías mostró un efecto significativo del Tiempo (t), Tratamiento (T) e Interacción (Ttx) sobre la bioacumulación de los cuatro metales detectados en la raíz de plantas de *P. leavigata*. La única excepción fue el Fe en donde su concentración no se vio afectada por el tratamiento ni la interacción.

La biocumulación de los cuatro metales detectados en la raíz de plantas creciendo en el sustrato testigo se mantuvo constante a través del tiempo. Asimismo, el Cu, Fe, y Zn presentaron una mayor concentración en plantas creciendo en el sustrato testigo en comparación con las plantas del sustrato jal. En contraste, la concentración de metales en raíz de plantas creciendo en sustrato jal presentó un aumento en la concentración de Pb, pero una disminución en la concentración de Cu, Fe y Zn a través del tiempo (Tabla 1). Finalmente, se observó que el Fe es el metal que se acumula en mayor concentración en raíz en ambos tratamientos.

Hoja

La presencia de Cu, Fe, Pb y Zn fue detectada en las hojas de plantas de *P. leavigata*, creciendo en condiciones de invernadero, así como en individuos adultos creciendo de manera natural en los jales. En contraste el Cr y el Cd no fueron detectados (Tabla1). El patrón de biocumulación de metales en hoja fue el siguientes: Fe > Pb > Zn > Cu. El análisis de varianza de dos vías mostró un efecto significativo del tiempo (t), tratamiento (T) e interacción (Ttx) sobre los niveles de bioacumulación de cuatro metales (Cu, Fe, Pb y Zn) en hojas de plantas de *P. leavigata*. La excepción fue el Fe que su concentración no fue afectada por el tiempo y la interacción.

La biocumulación de los cuatro metales detectados en el tejido foliar de plantas creciendo en el sustrato testigo se mantuvo constante a través del tiempo. Sin embargo, el Cu, Fe y Zn presentaron

mayores concentraciones en el tejido foliar de plantas creciendo en el sustrato testigo que en el sustrato jal. Por su parte en las plantas creciendo en sustrato jal, la concentración Fe en hoja se mantiene constante a través del tiempo, mientras que la concentración de Cu, Pb y Zn aumenta a través del tiempo (Tabla 1). En particular, se observó que el Fe fue el metal que presentó mayor concentración en las plantas creciendo en el sustrato testigo en comparación con el Cu, Pb y Zn presentaron menores concentraciones en el tejido foliar de plantas creciendo en sustrato testigo. Finalmente, los resultados muestran que el Fe, Pb y Zn se bioacumulan en mayor concentración en raíz que en hoja en ambos tratamientos (Tabla 1), no siendo así para el Cu.

Daño genético en individuos de *Prosopis leavigata* creciendo en sustrato jal y sustrato testigo

Los resultados muestran que existe un efecto significativo del tiempo (t), tratamiento (T) e interacción (T_{xt}) sobre el daño genético en los individuos de *P. leavigata* (Tabla 2). En general, se observó un incremento estadísticamente significativo del daño genético a través del tiempo en plantas creciendo en ambos tratamientos (sustrato testigo y sustrato jal). Sin embargo, el daño fue significativamente mayor en plantas creciendo en el sustrato jal.

Por otro lado, los resultados indican que el Pb es el único metal que presentó una relación positiva y significativa con los niveles de daño genético (rompimiento de cadena sencilla del ADN) en tejido foliar de individuos de *P. leavigata*, explicando el 19% del daño genético encontrado en los individuos en ambos tratamientos (Tabla 3).

Cambios morfológicos y fisiológicos en individuos de *Prosopis leavigata* creciendo en sustrato jal y testigo a través del tiempo

En general, los resultados muestran que todos los caracteres macro y micromorfológicos, así como el fisiológico (concentración de clorofila) de plantas de *P. leavigata* creciendo durante 12 meses en invernadero en ambos tratamientos (sustrato jal y sustrato testigo) tuvieron un efecto significativo del tiempo (t), del tratamiento (T) e interacción (T_{xt}). Las únicas excepciones fueron: 1) el número de hojas en donde no hubo un efecto del tratamiento e interacción, y 2) la cobertura estomática en donde no hubo efecto del tiempo, tratamiento e interacción.

Parámetros macro-morfológicos

En términos de la talla de la planta se encontró que en el sustrato testigo hubo un incremento en la altura de la planta a través del tiempo, mientras que en el sustrato jal las diferencias en talla no fueron estadísticamente significativas (Tabla 4). El mismo patrón se observó para el diámetro basal del tallo. Con respecto al número de hojas, se observó que no hubo un efecto significativo a través del tiempo en las plantas de *P. leavigata* creciendo en el sustrato testigo, sin embargo, para los individuos creciendo en el sustrato jal hubo una reducción significativa en este carácter (Tabla 4).

Un análisis de regresión múltiple fue realizado para determinar cuáles metales están generando la mayor variación en los parámetros macromorfológicos evaluados, y fue encontrado que en general los MP afectan solo dos estructuras de las plantas: el Zn afecta la altura con un 10.7% y el Pb afecta el número de hojas con un 8.1%.

Caracteres micro-morfológicos

En particular se observó un incremento en el índice estomático a través del tiempo en las plantas que se en el sustrato testigo, mientras que en aquellas que se encuentran creciendo en sustrato jal hubo una reducción. Para el caso de la cobertura estomática no se detectaron diferencias significativas a través del tiempo y entre tratamientos (Tabla 4).

Parámetros fisiológicos

En general, se observó un aumento en la concentración de clorofila a través del tiempo en las plantas de *P. leavigata* creciendo en ambos tratamientos (sustrato jal y testigo) (Tabla 4). Sin embargo, al tiempo seis, diez y doce meses hubo una reducción significativa del contenido de clorofila en las plantas creciendo en el sustrato jal con respecto a las que crecieron en el sustrato testigo.

En cuanto al contenido de clorofila de árboles adultos, el análisis de varianza indicó que no hay un efecto del sitio (sitio testigo y expuesto) sobre los niveles de clorofila ($F_{1,70} = 0.2989$, $P > 0.05$).

Enriquecimiento de metales pesados en raíz y hojas y factor de translocación en individuos de *Prosopis laevigata* creciendo en sustrato expuesto a metales

En raíz y hoja de plantas de *P. laevigata* creciendo en sustrato jal solo se registró enriquecimiento del Zn, que se calculó a través del Factor de bioconcentración (FBC). En contraste, no se detectó enriquecimiento de Pb, Fe y Cu en ninguna de las estructuras analizadas (Tabla 5). Por otra parte, el patrón de los valores promedio del Factor de Translocación (FT) fue el siguiente: Zn > Cu > Fe > Pb (Tabla 5 del artículo). Sin embargo, el patrón obtenido de acuerdo al porcentaje de plantas que presentan valores de FT mayor a uno es el siguiente (en paréntesis se presentan los valores máximos y mínimos de FT): Cu 92.9% (0.75 – 7.44) > Fe 85.7% (0.62 – 2.69) > Pb 75.0% (0.71 a 1.98) > 64.3% Zn (0.29 – 8.10).

Efecto de los metales pesados sobre los parámetros macro, micromorfológicos y fisiológicos de *Prosopis laevigata*

En general, se observa que de los cuatro metales detectados en tejido de *P. laevigata* sólo dos, el Zn y el Pb, afectan a dos estructuras de la planta. En particular, se observó que el Zn explicó el 10.7% de la variación detectada en el carácter altura de la planta. Por su parte, el Pb explicó el 8.1% de la variación en el número de hojas (Tabla 6).

DISCUSIÓN

Los estudios en especies de plantas silvestres que abordan el transporte o acumulación de metales en diferentes estructuras bajo un enfoque que combine un diseño experimental bajo condiciones de invernadero y en condiciones naturales (jales mineros) con el fin de evaluar su potencial para fitorremediar ambientes contaminados por metales son escasos. Desde nuestro conocimiento este es el primer estudio que aborda de manera simultánea el efecto de la exposición a metales a través del tiempo sobre una combinación de biomarcadores (bioacumulación, daño genético, morfología y fisiología) para evaluar los efectos de la bioacumulación por metales y el potencial de *P. laevigata* como especie útil con fines de fitorremediación bajo este enfoque combinado: *in situ* - *ex situ*.

Bioacumulación de metales pesados en P. laevigata.

En este trabajo se encontró que los individuos de *P. laevigata* que crecieron bajo condiciones de invernadero en dos tratamientos (sustrato testigo y sustrato jal) e individuos adultos creciendo de manera natural en los jales mineros bioacumulan Cu, Fe, Pb y Zn en raíz y tejido foliar.

En general, el metal que más se acumuló en plantas de *P. laevigata* en ambas estructuras y tratamientos fue el Fe, aunque su concentración se mantuvo constante a través del tiempo. Además, este es el primer estudio en donde se reporta la biocumulación de Fe en esta especie. En la literatura se ha reportado que otras especies vegetales que biocumulan Fe son *Sanvitalia procumben* (Rosas Ramírez, 2018), *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea*, *Daucus carota* y *Raphanus sativus* (Casana, 2017). Una posible explicación a las altas concentraciones de este metal en plantas es que el Fe es un metal esencial y un componente estructural de las moléculas de porfirina como, por ejemplo, los citocromos (Mendoza, 1999). Además, este metal está involucrado en reacciones de óxido-reducción en la respiración y la fotosíntesis, jugando un papel importante en sistemas enzimáticos relacionados a la síntesis de clorofila (Mendoza, 1999).

Específicamente, en este trabajo se encontró que la mayor concentración de este metal está en raíz. Resultados similares se han reportado en plantas de soya (*Glycine max*) en donde se detectó Fe en las zonas de alargamiento de la raíz durante el proceso de maduración, así como en las raíces laterales jóvenes (Ambler et al, 1971). También se ha detectado este metal en *R. sativus* (Casana, 2017) y en la planta acuática macrófita *Phragmites australis* (Batty y Younger, 2003). Se ha sugerido que la concentración de metales en raíz es un mecanismo de protección contra la toxicidad de estos elementos, evitando que se transloquen cantidades importantes a las partes aéreas (Batty y Younger, 2003).

Por su parte, la concentración del Pb aumentó de los dos a los cuatro meses, manteniéndose constante a partir de los cuatro meses en la raíz de plantas de *P. laevigata* creciendo en ambos tratamientos. Sin embargo, en hojas del sustrato jal se puede observar que la concentración aumenta a través del tiempo lo que sugiere que este metal está siendo translocado a la parte aérea de la planta. En la literatura existen reportes de otras especies vegetales que acumulan Pb en tejido foliar. Por ejemplo, *Brickellia veronicifolia* acumula Cd, Cu, Ni y Pb (Hernández-Acosta et al, 2009) en su tejido foliar. Igualmente, en otro estudio se encontraron elevadas concentraciones de Pb en tejido

foliar de *Buddleja scordioides*, *Mimosa aculeaticarpa* y *Acacia schaffneri* (Salas-Luévano et al 2009). Esto podría deberse a que el Pb inhibe el transporte de metales esenciales como el Cu, Fe y Zn (Patra et al, 2004), incrementando su concentración a través del tiempo y con ello su translocación a la parte aérea de la planta. Incluso, una rápida traslocación de la raíz para detoxificar y secuestrar metales pesados en las hojas es un posible mecanismo de defensa contra herbívoros (Rascio y Navari-Izzo, 2011).

En contraste, el Zn se bioacumula mayormente en la raíz de *P. leavigata* en comparación con la hoja. Lo anterior coincide con resultados encontrados en un estudio con *Zea mays* expuesto a MP en jales mineros, donde se da una mayor bioacumulación de Zn en raíz que en hoja (Tovar-Sánchez et al, 2018). Esto podría ocurrir porque las raíces son el primer órgano con el que los metales del suelo tienen contacto y pueden restringir la traslocación de estos metales a las hojas y frutos, secuestrando e inactivando los metales y así estabilizar la toxicidad de estos (Ouzounidou, 1994).

Para el caso del Cu su concentración se incrementa a través del tiempo en ambos tratamientos, sin embargo, en general se acumulan más en hoja que en raíz. La mayor concentración de Cu en las hojas sugiere que este metal también podría estar siendo traslocado de las raíces a las partes aéreas a través del tiempo. Este resultado coincide con los reportado en hojas de *Zea mays* en donde se encontró que las hojas de individuos de esta especie bioacumulan este metal en mayor cantidad en comparación con las raíces (Benimeli et al, 2010). Estos resultados podrían explicarse considerando que al ser el Cu un metal esencial también podría estar translocándose a las partes aéreas de la planta debido a que es un componente importante en proteínas reguladoras, participa en el transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias de células foliares, además de actuar como un cofactor de enzimas como la Cu-Super Óxido Dismutasa y la citocromo oxidasa, además participar en distintos procesos metabólicos como la señalización hormonal, metabolismo de la pared celular y respuesta al estrés (DalCorso, 2012).

Daño genético en individuos de P. leavigata creciendo en invernadero y en jales mineros

Los resultados obtenidos en los individuos creciendo bajo condiciones de invernadero en ambos tratamientos (sustrato jal y testigo) indican un incremento significativo del daño genético a través del tiempo de exposición. Sin embargo, éste fue significativamente mayor en plantas creciendo en el

sustrato jal. Este mismo patrón se documentó en las plantas adultas que crecen de forma natural en los jales en comparación con los que están en el sitio testigo (Murillo-Herrera, 2015). El incremento en el daño genético a través del tiempo puede deberse a que conforme las plantas van creciendo, también aumenta la cantidad de MP que absorben y se traslocan a las partes aéreas, como se pudo observar en este estudio para el caso del Pb. Un aumento en el daño genético a través del tiempo fue detectado en hojas de plantas de tabaco creciendo en un sustrato proveniente de un suelo contaminado con metales pesados (Gichner et al, 2006). En general, a través del tiempo los metales pueden ir saturando las zonas de secuestro de estos elementos en las células (vacuolas y paredes celulares), hecho que puede afectar al citoplasma y al núcleo promoviendo el daño genético (García Vargas, 2006; Navarro Áviño, 2007).

Con respecto al daño genético presente en los individuos creciendo en el sustrato testigo en invernadero y en el suelo del sitio testigo (Quilamula) podría deberse a que, de manera natural, la zona de Huautla es rica en minerales (Solís Miranda, 2016) y en estudios previos se ha reportado la presencia de metales en su forma biodisponible en el suelo de la zona, como es el caso del Cu, Fe, Pb y Zn (Solís Miranda, 2016). Asimismo, se ha reportado bioacumulación y daño genético en individuos de *Acacia farnesiana* (Santoyo Martínez, 2017) y *Pithecellobium dulce* (Castañeda Bautista, 2016) creciendo en esta misma zona en donde no hay registro de actividad minera.

Por otro lado, los resultados indicaron que el daño genético fue significativamente mayor en plantas de *P. leavigata* expuestas a MP creciendo bajo condiciones de invernadero y en individuos adultos que crecen de manera natural en la zona de estudio (jales de Huautla).

En particular, estudios previos en individuos de *P. laevigata* que crecen en los jales mineros de Huautla, Morelos indican que existen bioacumulación Pb, Zn y Cu (Murillo Herrera, 2015; Fuentes Reza, 2017) y daño genético significativamente mayor en individuos creciendo en sustrato con metales, además de una relación positiva y significativa entre la concentración del Cu y el Pb (acumulado en tejido foliar) y el daño genético encontrado en individuos de esta especie (Murillo-Herrera, 2015). Estos resultados coinciden con lo encontrado en este estudio, sin embargo, en este caso se encontró que de los cuatro metales detectados en el tejido de individuos de *P. leavigata*, sólo el Pb tuvo relación con los niveles de daño genético detectado en ambos tratamientos. Resultados similares fueron reportados en plantas de tabaco expuestas a Pb en diferentes concentraciones y

tiempos de exposición, pues se encontró un mayor daño genético en los individuos expuestos en comparación con los controles (Gichner et al, 2006).

En este sentido se ha documentado que el Pb es capaz de inducir aberraciones cromosómicas debido a que se une a los componentes de la pared celular o a las membranas, mineralizando así la pared, cambiando sus propiedades fisicoquímicas y desorganizando los microtúbulos, lo que conlleva a un desbalance cromosómico y a un proceso mitótico aberrante, el cual resulta en la generación de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales (Eun et al, 2000). También se ha reportado que este metal produce daño a nivel de la molécula del ADN, causando rupturas de cadena doble y sencilla, y es capaz de reemplazar al Zn en enzimas de reparación y replicación con dedos de zinc, así como por estrés oxidante (Pourrout et al, 2013). Finalmente, se ha propuesto que el Pb está involucrado en la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando daño genético (Ercal et al, 2001). Además, se ha reportado que es un comutageno, es decir que cuando se encuentra en mezcla con otros metales, puede ser un mutágeno. Esta información muestra los posibles mecanismos de acción a través de los cuales el Pb detectado en los individuos de *P. leavigata* expuestos a este metal pueden estar provocando el daño genotóxico observado.

Cambios morfológicos y fisiológicos en individuos de P. leavigata creciendo en sustrato jal y testigo través del tiempo

En general, los resultados mostraron una reducción en los caracteres macro y micromorfológicos analizados en plantas de *P. leavigata* creciendo en sustrato jal a través del tiempo en comparación a los individuos creciendo en el sustrato testigo. Una respuesta similar se detectó con los parámetros fisiológicos (concentración de clorofila).

Parámetros macromorfológicos

Los resultados obtenidos muestran que la bioacumulación de metales tiene un efecto en la talla de la planta, ya que los individuos de *P. leavigata* creciendo en invernadero que estuvieron expuestos a metales tienen valores menores en comparación a las que crecieron en el sustrato testigo. Esto coincide con los resultados de otros estudios en donde se ha detectado una reducción en la altura de plantas expuesta a suelos contaminados con metales.

Por ejemplo, en *Arundo donax* (Poaecaeae) creciendo en suelos contaminados por Pb se encontró una mayor concentración de este metal en sus partes aéreas, además de que se observó una reducción significativa de la talla, así como un engrosamiento del tallo, (Sharma y Agrawall, 2005; Guo y Miao, 2010; Nagajyoti, 2010) y en el proceso de expansión celular incrementando la lignificación y rigidez de la pared celular (Chaoui y El Ferjani, 2005). En este sentido, se ha documentado que el Pb influye fuertemente en la elasticidad y plasticidad de la pared celular, incrementando la rigidez del tejido y retardando el crecimiento vegetal (Kabata-Pendias y Pendias, 1984), lo cual puede afectar el crecimiento de estructuras como las hojas y generar una reducción sobre las mismas. Esta información es relevante pues nos permite explicar que en este estudio el número de hojas de *P. leavigata* se vio afectado de manera significativa por la presencia de Pb.

Por otro lado, los análisis de regresión múltiple mostraron que el Zn tiene influencia en la altura de la planta. Este resultado se puede explicar considerando que uno de los efectos tóxicos del Zn es inhibir el crecimiento de raíces y la emergencia de raíces laterales (DalCorso, 2012). Se ha documentado que el crecimiento y número de raíces es fundamental para la absorción de nutrientes, equilibrio hídrico y para darle sostén a las plantas (Bidwell, 1979). Por lo que, si estos procesos se ven afectados, la presencia de Zn podría comprometer la talla de las plantas. En este sentido, los resultados también indican que el Zn se biocumula en la raíz de *P. leavigata*. Resultados similares se han reportado en *Zea mays* (Tovar Sánchez et al, 2018) y en la planta acuática macrófita *Phragmites australis* (Bonano y Giudice, 2010).

El zinc es un micronutriente esencial que afecta a varios procesos metabólicos de las plantas (Cakmak y Marschner, 1993) su fitotoxicidad causa disminución en el crecimiento y desarrollo, metabolismo y una inducción de daño oxidativo en diversas especies de plantas como *Phaseolus vulgaris* (Cakmak y Marschner, 1993) y *Brassica juncea* (Prasad et al, 1999). Causa alteraciones en la eficacia del catalizador de las enzimas en *Phaseolus vulgaris* (Van Assche y Clijsters, 1988; Somashekaraiah et al, 1992). También se ha documentado que la translocación de MP a la parte aérea de las plantas promueve una ruptura en el balance de nutrientes en la raíz, lo que afecta el proceso de expansión celular incrementando la lignificación y rigidez de la pared celular afectando el crecimiento de las plantas y por lo tanto su tamaño (Chaoui y El Ferjani, 2005).

Parámetros micromorfológicos

Los estomas son células especializadas por las cuales las plantas hacen el intercambio gaseoso y entra el CO₂ necesario para la fotosíntesis. Además de realizar la transpiración, permiten una pérdida de vapor de agua perteneciente a las células foliares y a su vez difunden rápidamente aire más seco proveniente del exterior de la hoja (Ray, 1979). Los resultados de este estudio muestran que hay una reducción en el índice estomático en los individuos de *P. laevigata* expuestos al sustrato jal. Resultados similares fueron previamente reportados en individuos de esta especie expuestos a metales pesados (Baryla *et al*, 2001; Hernández-Lorenzo, 2015). Esta disminución en la cantidad de estomas por unidad de área (mm²) evita un exceso de transpiración de las plantas, es decir, aumenta la resistencia estomática (Thakur, 1990). La literatura indica que este parámetro se puede ver reducido por la exposición a metales pesados, ya que las células oclusivas son muy sensibles al estrés químico y se pueden generar cambios de posición y número de estomas y las hojas pueden caer anticipadamente a manera de defensa contra los efectos de los metales (Zimmermann, 2001).

Por ejemplo, se ha documentado que metales como el Pb afectan las paredes celulares de los estomas y cambian la elasticidad tisular (Kabata-Pendias y Pendias, 1984), lo que podría generar una disminución en la cobertura estomática. Cuando las plantas están expuestas a concentraciones altas de metales pesados hay afectaciones directamente sobre las células guarda generando un cierre hidroactivo (Barceló y Poschenrieder, 1992). Sin embargo, en este estudio los individuos expuestos a metales no mostraron diferencias significativas en la cobertura estomática con respecto a plantas creciendo en el sustrato testigo. En general, esto puede ocurrir debido a que las plantas expuestas a metales pueden presentar cambios anatómicos y fisiológicos como una respuesta adaptativa a estas condiciones ambientales (Pedrosa-Gomes *et al*, 2011).

Bajo esta perspectiva, hay que considerar el hecho de que *P. laevigata* es una especie que pertenece a la familia Fabaceae, cuya mayoría de representantes presentan mecanismos de adaptación para hacer frente a las elevadas concentraciones de metales en los suelos (Mehrag, 1994).

Parámetros fisiológicos

Al evaluar el contenido de clorofila en los árboles adultos establecidos de manera natural en los jales mineros y compararlo con los árboles en el sitio control, se encontró que no hay diferencias significativas. Sin embargo, en los individuos creciendo bajo condiciones de invernadero si se observó

un efecto del tratamiento (sustrato jal) sobre la concentración de clorofila, pues se observó una reducción de ésta en individuos de *P. laevigata* expuestos a MP. Estos resultados coinciden con un estudio realizado en la misma zona de estudio donde se observó una reducción de la concentración de clorofila en *Sanvitalia procumbens* al estar expuesta al Pb contenido en sustrato jal (Rosas-Ramírez, 2018).

De manera similar se documentó una reducción de la concentración de clorofila en plantas de maíz expuestas a Pb (Yllanes et al, 2014), además de una disminución de pigmentos fotosintéticos en plantas expuestas a altas concentraciones de este metal (Gupta et al, 2009).

Se ha documentado que la acumulación de metales pesados en concentraciones tóxicas genera distintos efectos adversos en la fisiología de las plantas como: inactivación de enzimas, clorosis, crecimiento débil y el bloqueo de grupos metabólicamente importantes como la clorofila (Küpper et al, 1996; Prasad y Strzalka, 1999). Lo anterior puede desestabilizar la pared celular y generar alteraciones en el metabolismo de las plantas, afectando la actividad fotosintética de las mismas (Rascio y Navari-Izzo, 2011; Ruiz y Armienta, 2012), por daño a los tilacoides y modificando el ciclo de Calvin, así como alteraciones en la pigmentación que generan clorosis y necrosis celular (Prieto et al, 2009).

Por ejemplo, se ha documentado que el Pb desplaza al Mg en la clorofila afectando la fotosíntesis y el transporte de electrones (Patra et al, 2004). Incluso, los metales pesados afectan las funciones fotosintéticas de las plantas al punto de inhibir la biosíntesis de clorofila (Díaz-Aguilar et al, 2001), disminuyendo la proporción total de clorofila a y b, lo que puede provocar un descenso en la tasa fotosintética (Küpper et al, 1996; Prasad y Strzalka, 1999). Sin embargo, al medir la clorofila en árboles adultos establecidos en los jales y en el suelo del sitio control, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, al igual que en la cobertura estomática, esto podría indicar que a través del tiempo los individuos adultos generan adaptaciones fisiológicas en respuesta a diferentes condiciones ambientales, lo cual les permite tolerar los efectos de los MP (Pedrosa-Gomes et al, 2011).

En este caso en particular, estas adaptaciones podrían estar ocurriendo en los individuos adultos de *P. laevigata* generando tolerancia a los efectos de los metales en la concentración de clorofila y la cobertura estomática como estrategia de protección al estrés producido por la

exposición a MP (Barceló y Poschenrieder, 1992). Este resultado es comparable con un estudio en cual se midió con un aparato SPAD el contenido de clorofila en hojas de árboles de 3 años de edad de la especie *Olea europea* expuestos a metales pesados y los resultados indicaron la ausencia en la pérdida del contenido de clorofila (Wilson y Pyatt, 2007).

Potencial de Prosopis leavigata como especie útil para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados

Prosopis leavigata es una especie arbórea de amplia distribución geográfica en México y que es común en lugares perturbados como es el caso de los sitios contaminados por metales. Con frecuencia esta especie habita en zonas áridas y semiáridas y se establece junto a otras especies de la misma familia (Fabaceae) como *Pithecellobium dulce* (Castañeda Bautista, 2016) y *Vachelia farnesiana* (Santoyo Martínez, 2016). Estas especies están cercanamente relacionadas y existen reportes de que también bioacumulan metales pesados como el Cu, Pb y Zn (Fuentes Reza, 2017). Sin embargo, este es el primer reporte que indica que *P. leavigata* bioacumula Fe tanto en raíz como en hoja en individuos creciendo en invernadero y en los jales. En general, se ha documentado que las especies de plantas utilizadas para fitorremediar ambientes contaminados por metales pertenecen a las siguientes familias: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae y Euphorbiaceae (Prasad 2005; Mahar et al, 2016), siendo éstas en su mayoría, especies de forma de vida herbácea.

Los resultados obtenidos en el presente estudio proponen a *P. leavigata* como una especie arbórea con potencial uso para para fitorremediar sitios contaminados por las siguientes razones:

1) *P. laevigata* es una especie acumuladora de los cuatro metales analizados (Cu, Fe, y Zn) pues de acuerdo con distintos autores, una planta puede considerarse acumuladora si su Factor de translocación (FT) es igual o mayor a 1 e hiperacumuladora si los valores son > 5 (Olguín y Sánchez-Galván, 2012 y Ali et al, 2013). En este estudio *P. leavigata* mostró los siguientes valores promedio de FT: Pb (1.119), Fe (1.487), Cu (2.10), Zn (2.798). Considerando estos valores, *P. leavigata* puede ser considerada acumuladora de los cuatro metales analizados. Sin embargo, al evaluarlo a nivel individual se observan los siguientes intervalos: Cu 92.9% (0.75 – 7.44) $>$ Fe 85.7% (0.62 – 2.69) $>$ Pb 75.0% (0.71 a 1.98) $>$ 64.3% Zn (0.29 – 8.10). Estos datos sugieren que puede haber diferencias en la

capacidad de los individuos para llevar a cabo este proceso y que incluso algunas plantas pueden ser hiperacumuladoras pues presentaron valores de FT > 5. Además, el factor de bioacumulación para el Zn, tanto en hoja como en raíz de individuos de *P. laevigata* fue de 8.662 y 14.598, respectivamente. Considerando los valores del FT se observa que existen individuos de *P. laevigata* que pueden ser plantas acumuladoras de Pb y Fe, pero también hiperacumuladoras de Zn y Cu, lo cual es de interés para fitorremediar suelos contaminados con estos metales.

2) Aunque se pudo observar una reducción en los parámetros morfológicos (macro y micro) y fisiológicos (contenido de clorofila), así como daño genético en plantas expuestas a metales pesados, las plantas expuestas a MP no presentaron mortalidad. Incluso los individuos adultos que crecen en los jales, al parecer han logrado adaptarse a la presencia de metales sin presentar alteraciones en sus niveles de clorofila. Lo anterior sugiere que las plantas sobreviven y pueden sobrevivir en este tipo de ambientes (Buendía-González, 2010; Murillo-Herrera, 2015; Fuentes-Reza, 2017) lo que indica que los individuos de esta especie pueden ser tolerantes a los efectos de los MP (Buendía- González, 2010).

3) *P. laevigata* es una planta fijadora de nitrógeno con el potencial de enriquecer al suelo a su alrededor, promueve el crecimiento de matorrales asociados a ella y previene la erosión del suelo. Además, es una planta hospedera de especies de aves y roedores, por lo tanto, tiene gran importancia ecológica (Golubov et al, 2001). Estas características también la hacen una buena candidata para ser utilizada en procesos de fitorremediación, pues ofrece otros servicios ambientales además de la bioacumulación de MP. 4) Al ser una planta que se distribuye ampliamente en zonas árida y semiáridas de México (Dorado et al, 2005), y crecer de forma natural en jales mineros, es una especie candidata para ser utilizada en procesos de fitorremediación en distintas zonas contaminadas por actividad minera en México (Buendía-González et al, 2010).

CONCLUSIONES

- *P. laevigata* es una especie acumuladora de Zn, Pb, Fe y Cu, así hiperacumuladora de Zn y Cu, lo que la posiciona como una especie de interés para fitorremediar suelos contaminados con estos metales.
- *P. laevigata* es una especie con potencial para fitorremediar zonas contaminadas con metales pesados, debido a: su capacidad de acumulación e hiperacumulación de metales, presentar una amplia distribución geográfica y crecer naturalmente en estas zonas.
- La reducción de caracteres morfológicos, fisiológicos e incremento en los niveles de daño genético, no es un factor que afecte la adecuación de los individuos de *P. laevigata* creciendo en jales, probablemente por su capacidad de tolerar los efectos de los metales pesados.

PERSPECTIVAS

Debido a que se encontraron mayores cantidades de metales en raíz en comparación con las hojas y al observar que metales no esenciales como el Pb, que son de interés para fitorremediar, aumentan a través del tiempo y que al tiempo de 6 meses de exposición las plantas de *P. laevigata* ya no bioacumulan más de este metal, se generaron dos propuestas para fitorremediar jales mineros con esta especie: la primera es cosechar las plantas completas a las edad de 6 meses de exposición durante un proceso de fitorremediación, ya que esta especie bioacumula una mayor cantidad de Pb en la raíz, pero también acumula Fe, Zn y Cu en esta estructura.

La segunda propuesta es que, si se pretende dejar que las plantas crezcan hasta ser adultos, se puede cosechar periódicamente la parte aérea de los árboles, ya que todos los metales analizados están siendo traslocados a las partes aéreas, por lo tanto, el cosechar las hojas periódicamente permitiría estar removiendo metales provenientes de los jales.

La información generada en este estudio sugiere que *P. laevigata* es una especie con potencial para fines de fitorremediación de suelos contaminados por Fe, Pb, Zn y Cu. Estudios como estos son necesarios para la implementación de procesos de fitorremediación integrales que incluyan el uso de especies vegetales que bioacumulen distintos metales en suelos que están contaminados con diferentes mezclas de metales.

Se recomienda investigar el potencial fitorremediador de otras especies con distinta forma de crecimiento (arbustos y herbáceas de la misma zona) para evaluar su desempeño como biocumuladoras de metales pesados además de determinar el efecto genotóxico de los metales sobre sus caracteres morfológicos y fisiológicos y comparar la cantidad de metales pesados bioacumulados en cada una de las especies vegetales para determinar cuál estrato de la vegetación es el que bioacumula una mayor cantidad. Además de incluir durante el proceso de fitorremediación un abanico de especies con diferentes formas de vida para un proceso más integral.

Las especies seleccionadas deben presentar amplia distribución geográfica en el país y crecen naturalmente en jales mineros, abundante biomasa (en el caso del arbusto) y rápido crecimiento (en el caso de la herbácea).

La información que se genere sobre el potencial fitorremediador de especies con diferente forma de vida podrá ser de gran utilidad para futuros proyectos de remediación en zonas con jales mineros, ya que podrá ser aplicable y reproducible en la mayoría de los estados de nuestro país que también comparten esta problemática ambiental.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al Doctorado en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas, al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC), al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) ambos centros pertenecientes a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto. Así como al apoyo financiero provisto por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la asignación de la beca de doctorado a DAMG (295409).

TABLAS

Table 1 Average values \pm standard error and ANOVA of heavy metals concentrations (mg/Kg) in roots and leaves of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions (treatments: tailing and reference substrates) and adult trees established in the mining tailings.

Metal	D.L. mg/L	Time (months)	Root			Leaf					
			Reference-substrate Average \pm S.E.	Tailing-substrate Average \pm S.E.		Reference-substrate Average \pm S.E.	Tailing-substrate Average \pm S.E.				
Pb	0.01	2	0.07 \pm 0.006	1.36 \pm 0.06	a *	2	0.06 \pm 0.003	1.44 \pm 0.056	a *		
			0.07 \pm 0.004	1.68 \pm 0.07	b *		4	0.05 \pm 0.002	1.53 \pm 0.098	a *	
			0.08 \pm 0.064	2.22 \pm 0.21	b *		6	0.07 \pm 0.003	1.70 \pm 0.061	b *	
					Adults	0.07 \pm 0.004	1.62 \pm 0.061	ab *			
		Anova			Anova						
		Treatment (T)	$F_{1,36}=463.820$ ***		Treatment (T)	$F_{1,73}=1494.978$ ***					
		Time (t)	$F_{2,48}=10.443$ ***		Time (t)	$F_{3,73}=1.950$ n.s.					
		T \times t	$F_{2,48}=10.030$ ***		T \times t	$F_{3,73}=1.892$ n.s.					
		Fe	0.005	2	89.54 \pm 0.36	4.48 \pm 0.36	a *	2	5.13 \pm 0.188	2.466 \pm 0.188	a *
					90.45 \pm 0.07	3.07 \pm 0.07	a *		4	5.35 \pm 0.137	2.186 \pm 0.137
90.43 \pm 0.33	3.29 \pm 0.33				a *	6	4.72 \pm 0.185		2.671 \pm 0.185	a *	
					Adults	4.01 \pm 0.063	2.606 \pm 0.063	a *			
Anova					Anova						
Treatment (T)	$F_{1,36}=3917.023$ ***				Treatment (T)	$F_{1,73}=299.212$ ***					
Time (t)	$F_{2,48}=0.202$ n.s.				Time (t)	$F_{3,73}=2.436$ n.s.					
T \times t	$F_{2,48}=0.097$ n.s.				T \times t	$F_{3,73}=2.329$ n.s.					
Zn	0.0005			2	1.14 \pm 0.08	0.45 \pm 0.02	a *	2	0.76 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	a *
					1.02 \pm 0.05	0.63 \pm 0.02	a *		4	0.79 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
		0.08 \pm 0.08	0.12 \pm 0.02		b *	6	0.86 \pm 0.03		0.17 \pm 0.03	a *	
					Adults	0.95 \pm 0.03	0.65 \pm 0.03	b n.s.			
		Anova			Anova						
		Treatment (T)	$F_{1,36}=246.684$ ***		Treatment (T)	$F_{1,73}=90.188$ ***					
		Time (t)	$F_{2,48}=11.042$ ***		Time (t)	$F_{3,73}=8.996$ ***					
		T \times t	$F_{2,48}=14.910$ ***		T \times t	$F_{3,73}=3.036$ ***					
		Cu	0.001	2	0.28 \pm 0.03	0.33 \pm 0.05	a n.s.	2	0.43 \pm 0.17	0.22 \pm 0.04	a n.s.
					0.26 \pm 0.02	0.14 \pm 0.006	b *		4	0.68 \pm 0.13	0.37 \pm 0.03
0.31 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01				b *	6	0.67 \pm 0.13		0.45 \pm 0.02	a *	
					Adults	0.59 \pm 0.14	0.93 \pm 0.06	b n.s.			
Anova					Anova						
Tratamiento (T)	$F_{1,36}=19.338$ ***				Treatment (T)	$F_{1,73}=16.245$ ***					
Time (t)	$F_{2,48}=10.079$ ***				Time (t)	$F_{3,73}=9.957$ ***					
T \times t	$F_{2,48}=13.054$ ***				T \times t	$F_{3,73}=11.745$ ***					

ifferent uppercase letters show significant differences in individuals growing in reference-substrate through time (Tukey $P < 0.05$). Different lowercase letters show significant differences in individuals growing in exposed-substrate to heavy metals through time (Tukey $P < 0.05$). Asterisks denote significant differences between treatments for each exposure time (Tukey $P < 0.05$) ns= no significant differences *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$. Cd and Cr were found in undetectable concentrations.

Table 2 Average values \pm standard error (S.E.) and ANOVA of genetic damage (tail length in micrometers) in leaves of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions (treatments: tailing and reference substrates) and adult trees established in the mine tailing.

Time (months)	Genetic damage		
	Reference-substrate Average \pm S.E.	Tailing-substrate Average \pm S.E.	
2	27.24 \pm 0.658 A	33.32 \pm 0.660 a	*
4	59.45 \pm 1.026 B	76.22 \pm 1.266 b	*
6	67.91 \pm 1.645 C	98.84 \pm 1.910 c	*
Adults	42.22 \pm 0.346 D	88.42 \pm 1.902 d	*
Anova			
Treatment (T)	$F_{1,52}=704.88$ ***		
Time (t)	$F_{3,50}=520.93$ ***		
T \times t	$F_{3,50}=95.78$ ***		

Different uppercase letters show significant differences in individuals growing in reference-substrate through time (Tukey $P<0.05$). Different lowercase letters show significant differences in individuals growing in exposed-substrate to heavy metals through time (Tukey $P<0.05$). Asterisks denote significant differences between treatments for each exposure time (Tukey $P<0.05$) ns= no significative differences *= $P<0.05$, **= $P<0.01$, ***= $P<0.001$.

Table 3 Multiple regression analysis to determine the factors that can influence genetic damage within populations of *Prosopis laevigata*.

Source of variation	d.f.	SS	F	Total variation (%)
Pb	1	16275.43	16.344 ***	19.4
Fe	1	648.79	0.651 n.s.	0.8
Zn	1	932.66	0.338 n.s.	1.1
Cu	1	868.01	0.355 ns	1.0

Asterisks denote significant differences between metals and their effect on genetic damage n.s.= no significative differences, ***= $P<0.001$. d.f.= degrees of freedom, SS = sum of square.

Table 4 Average \pm standard error and Two-way ANOVA, to evaluate the effect of time (one year) and treatment (substrate-exposed to heavy metals and substrate-reference) macro-morphological, micro-morphological and physiological parameters of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions.

Macro-morphology								
	Time(months)	Treatment					ANOVA	
		Reference-substrate	Tailing-substrate					
Height (cm)	2	35.50 \pm 2.68	A	44.33 \pm 3.82	a	ns	Time (T)	$F_{1,70}=71.54$, ***
	4	50.00 \pm 2.04	AB	59.16 \pm 7.04	b	ns	Treatment (t)	$F_{3,70}=14.84$, ***
	6	78.16 \pm 5.43	BC	53.00 \pm 3.10	b	ns	T \times t	$F_{3,70}=16.50$, ***
	8	95.82 \pm 8.77	C	49.66 \pm 2.87	ab	*		
	10	99.82 \pm 8.95	C	51.16 \pm 5.14	ab	*		
	12	134.16 \pm 13.20	D	47.16 \pm 4.92	ab	*		
Stem diameter (mm)	2	7.55 \pm 0.18	A	9.00 \pm 0.78	ab	ns	Time (T)	$F_{5,70}=27.39$, ***
	4	8.00 \pm 0.21	A	12.45 \pm 0.79	c	*	Treatment (t)	$F_{1,70}=16.39$, ***
	6	11.08 \pm 0.90	B	8.94 \pm 0.35	a	*	T \times t	$F_{5,70}=24.19$, ***
	8	12.61 \pm 0.82	C	9.80 \pm 0.30	b	*		
	10	14.07 \pm 0.68	D	9.54 \pm 0.59	b	*		
	12	17.25 \pm 0.50	E	9.66 \pm 0.63	b	*		
Number of leaves	2	133.16 \pm 19.64	A	328.66 \pm 66.75	a	*	Time (T)	$F_{5,70}=24.87$, ***
	4	143.00 \pm 8.93	A	228.50 \pm 62.64	a	*	Treatment (t)	$F_{1,70}=1.66$, n.s.
	6	116.33 \pm 24.77	A	198.66 \pm 45.05	ab	ns	T \times t	$F_{5,70}=2.20$, *
	8	154.66 \pm 27.35	A	136.16 \pm 15.07	b	ns		
	10	115.66 \pm 13.90	A	216.00 \pm 15.62	ab	ns		
	12	94.83 \pm 10.57	A	228.66 \pm 15.62	a	*		
Stomatic index	2	11.49 \pm 0.57	AB	11.64 \pm 0.36	ab	ns	Time (T)	$F_{5,106}=3.92$, **
	4	11.83 \pm 0.54	AB	11.99 \pm 0.81	a	ns	Treatment (t)	$F_{1,106}=5.93$, *
	6	11.88 \pm 0.82	AB	16.68 \pm 0.71	c	*	T \times t	$F_{5,106}=18.93$, ***
	8	10.65 \pm 0.46	B	9.50 \pm 1.01	b	ns		
	10	16.67 \pm 0.46	C	9.14 \pm 0.32	b	*		
	12	14.75 \pm 0.51	BC	9.35 \pm 0.46	b	*		
Stomatic coverage (μ m)	2	82.11 \pm 1.80	A	58.04 \pm 2.10	a	ns	Time (T)	$F_{5,214}=2.99$, n.s.
	4	68.25 \pm 2.37	A	69.84 \pm 1.74	a	ns	Treatment (t)	$F_{1,214}=6.50$, n.s.

Micromorphology									
Treatment									
	Time(months)	Reference-substrate			Tailing-substrate			ANOVA	
	6	49.69±2.87	A		66.70±1.89	a	ns	T × t	$F_{3,214}=0.72$, n.s.
	8	82.14±2.04	A		58.04±2.11	a	ns		
	10	67.25±2.39	A		69.14±1.75	a	ns		
	12	48.69±2.90	A		69.71±1.85	a	ns		
Physiology									
Chlorophyll concentration (mg/m ²)	2	24.46±1.36	AB		19.90±1.52	a	ns	Time (T)	$F_{3,24}= 40.4$, ***
	4	27.78±0.74	BC		25.21±1.02	ab	ns	Treatment (t)	$F_{3,24}= 10.5$, ***
	6	28.01±1.23	C		19.33±1.09	a	*	T × t	$F_{3,208}= 2.37$, *
	8	26.76±0.85	BC		22.83±1.36	ab	ns		
	10	29.03±0.98	C		26.76±1.07	b	*		
	12	30.10±0.86	C		27.59±0.99	b	*		

Different uppercase letters show significant differences in individuals growing in reference-substrate through time (Tukey $P < 0.05$). Different lowercase letters show significant differences in individuals growing in exposed-substrate to heavy metals through time (Tukey $P < 0.05$). Asterisks denote significant differences between treatments for each exposure time (Tukey $P < 0.05$), n.s.= no significant differences *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$.

Table 5. Enrichment (bioconcentration factor) and translocation factor of heavy metals in *Prosopis laevigata* plants.

Metal	Time (months)	Concentration (mg/Kg)						S.D.
		Tailing substrate	Root	Leaf	BCF(root)	BCF(leaf)	TF	
Pb	2	0.23	1.36	1.44	0.17	0.16	0.94	0.19
	4	0.23	1.68	1.53	0.14	0.15	1.10	
	6	0.23	2.22	1.69	0.10	0.14	1.31	
	Average				0.14	0.15	1.12	
Fe	2	0.4	4.48	2.46	0.09	0.16	1.82	0.30
	4	0.4	3.07	2.18	0.13	0.18	1.41	
	6	0.4	3.29	2.67	0.12	0.15	1.23	
	Average				0.11	0.17	1.49	
Zn	2	2.14	0.45	0.12	4.76	17.83	3.75	1.81
	4	2.14	0.63	0.16	3.40	13.38	3.94	
	6	2.14	0.12	0.17	17.83	12.59	0.71	
	Average				8.66	14.60	2.80	
Cu	2	0.04	0.33	0.12	0.12	0.33	2.75	0.56
	4	0.04	0.14	0.08	0.29	0.50	1.75	
	6	0.04	0.09	0.05	0.44	0.80	1.80	
	Average				0.28	0.54	2.10	

BCF= bioconcentration factor, TF= translocation factor, S.D.= standard deviation

Table 6 Heavy metals effects over morphological parameters of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions.

Metal	SS	d.f	F	P	%variance
Height					
Pb	811.48	1	0.948830	0.335465	1.6
Fe	2219.36	1	2.594996	0.114519	4.4
Zn	5466.44	1	6.391652	0.015219	10.7
Cu	440.90	1	0.515526	0.476639	0.9
Stem diameter					
Pb	2.5983	1	0.236555	0.629175	0.5
Fe	1.2988	1	0.118245	0.732621	0.3
Zn	23.0340	1	2.097073	0.154834	4.5
Cu	0.1089	1	0.009914	0.921150	0.0
Number of leaves					
Pb	47604.7	1	4.475572	0.040214	8.1
Fe	7864.0	1	0.739334	0.394643	1.3
Zn	987.8	1	0.092868	0.762032	0.2
Cu	853.7	1	0.080260	0.778305	0.1
Chlorophyll content					
Pb	8.1255	1	0.38349	0.539085	0.7
Fe	19.8734	1	0.93795	0.338349	1.8
Zn	59.2309	1	2.79549	0.101965	5.3
Cu	18.1247	1	0.85542	0.360307	1.6
Stomatic coverage					
Pb	1.6188	1	0.26796	0.607357	0.5
Fe	12.8497	1	2.12703	0.151987	4.1
Zn	1.5881	1	0.26287	0.610776	0.5
Cu	0.1426	1	0.02361	0.878601	0.0

d.f= degrees of freedom, SS = sum of square.

LITERATURA CITADA

- Adewole MB, Sridhar MKC, Adeoye GO (2010) Removal of heavy metals from soil polluted with effluents from a paint industry using *Helianthus annuus* L. and *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) as influenced fertilizer applications. *Bioremediation Journal* 14(4): 169-179.
- Ali H, Khan E and Sjad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *Chemosphere* 91: 869–881. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.
- Alloway BJ (1995) *Heavy Metals in Soils*, second ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Ambler JE, Brown JC and Gauch HG (1971) Sites of Iron reduction in soybean plants. *Agron J* 63:95–97.
- Angelova V, Ivanova R, Delibaltova V, Ivanov K (2004) Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*. 19(3), 197-205.
- Armienta M, Villaseñor G, Romero F (2005) Propuesta de estrategia metodológica para la evaluación de la peligrosidad de jales mineros en México. In: XXVI Convención Internacional de Minería. Veracruz, Ver. México pp 215–235.
- Audet P, Chares C (2008) Allocation plasticity and plant-metal partitioning: Metal-analytical perspectives in phytoremediation. *Environmental Pollution* 156: 290-296.
- Barceló J, Poschenrieder Ch (1992) Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y planta* 2:345–361.
- Barceló J, Poschenrieder C (2000) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*. 48: 75-92.
- Barceló J, Poschenrieder C, Lombini A, Llugany M, Bech J, Dinelli E (2001) Mediterranean plant species for phytoremediation. En: Abstracts Cost Action 837 WG2 workshop on Phytoremediation of Trace Elements in Contaminated Soils and Waters with Special Emphasis on Zn, Cd, Pb and As. Ed. Universidad Complutense Madrid, Faculty of Chemistry, Madrid pp.23
- Baryla A, Carrier P, Franck F, Coulomb C, Sahut C, Havaux M (2001) Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212(5-6): 696–709. doi.org/10.1007/s004250000439.
- Batty LC, Younger PL (2003) Effects of external iron concentration upon seedling growth and uptake of Fe and phosphate by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. *Ann Bot-London* 92(6), 801–806. doi.org/10.1093/aob/mcg205.
- Benimeli CS, Medina A, Navarro CM, Medina RB, Amoroso MJ, Gómez MI (2010) Bioaccumulation of copper by *Zea mays*: impact on root, shoot and leaf growth. *Water Air Soil Poll* 210(1–4): 365-370. doi.org/10.1007/s11270-009-0259-6.
- Bertin G, Averbeck D (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. *Biochimie* 88: 1549–1559.
- Bidwell RGS (1979) *Fisiología vegetal*. AGT, SA. México pp 624.

- Bonanno G, Giudice RL (2010) Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecol Indic.* 10(3), 639–645. doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.11.002.
- Bowen HJM (1979) "Environmental Chemistry of the Elements". Academic Press, London. pp 333.
- Brady NC, Weil RR (2002) "The Nature and Properties of Soils". 13th Edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, Inc. pp 598.
- Breckle S (1991) "Growth under stress: heavy metals". En: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkaffi, V., (eds.), "Plant roots: the hidden half". Marcel Dekker, Inc., New York pp 351-373.
- Brusick D (1987) *Principles of genetic toxicology*. Plenum Press. EUA pp 284.
- Buendía González L, Orozco Villafuerte B, Cruz Sosa F, Barrera Díaz CE, Vernon Carte EJ (2010) *Prosopis laevigata*, a potencial Chromium (VI) and Cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Biosource Technology* 101: 5862–5867. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.027.
- Cakmak I, Marschner H (1993) Effect of zinc nutritional status on activities of superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves. In: *Plant Nutrition—from Genetic Engineering to Field Practice*. Springer, Dordrecht, Australia pp 133–136. doi.org/10.1007/978-94-011-1880-4_21.
- Casana Ackarley MM, Beltrán Orbegoso RA (2017) Bioacumulación de cobre, plomo, hierro y zinc en *Lactuca sativa* "lechuga", *Brassica oleracea* "repollo", *Daucus carota* "zanahoria" y *Raphanus sativus* "rabanito". *Conocimiento para el desarrollo* 4(2).
- Castañeda Bautista JA (2014) Cambios macro y micromorfológicos en *Zea mays* L. (POACEAE) por contaminación de metales pesados en Santa Rosa, Taxco, Guerrero. Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Castañeda Bautista JA (2016) Estudio ecotoxicológico de los jales mineros en Huautla, Morelos: El caso de *Pithecellobium dulce* (Roxb) Beth. (Fabaceae). Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Cervantes Ramírez LT (2009) Daño genotóxico en *Baiomys musculus* (RODENTIA: MURIDAE) por efecto de los jales mineros de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Estado Morelos. Morelos. México. 65 p.
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, J Angle SJ, Baker A (1997) Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8 (3): 279-284.
- Chan Quijano J, Ochoa Gaona S, Pérez Hernández I, Gutiérrez Aguirre M, Saragos Méndez J (2012) Germinación y sobrevivencia de especies arbóreas que crecen en suelos contaminados por hidrocarburos. *Teoría y praxis*. 12: 102-119.
- Chaoui A, El Ferjani E (2005) Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *C R Biol* 328(1): 23–31. doi.org/10.1016/j.crv.2004.10.001.
- Clemens S (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707–1719.

- Comisión Nacional de la Biodiversidad (CONABIO). <https://www.gob.mx/conabio>
- Cortón E, Viale A (2006) Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: Técnicas de biorremediación. *Ecosistemas* 3:147-156.
- Cuesta PA (Ed) (2005) Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las Regiones Caribe y Valles interandinos. Manual Técnico. Corporación Colombiana de Investigación Agrícola CORPOICA. ISBN 958-810-79-8. Bogotá, Colombia 97 pp.
- Cunningham SD, Berti WR (1993) Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cellular and Development Biology* 29(4): 207-212.
- Dahmani Muller H, van Oort F, Gélie B, Balabane M (2000) Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental pollution*, 109(2), 231-238.
- DalCorso G (2012) Heavy metal toxicity in plants. In: Furini A, editor. *Plants and heavy metals*. Springer, Dordrecht pp 1–25. doi.org/10.1007/978-94-007-4441-7_1.
- De la Rosa G, Cruz G, Cano I, Fuentes R, Gardea JL (2008) Efecto de la edad de la planta y presencia de SS-EDDS en la tolerancia y absorción de Cr (III) por *Helianthus annuus*. *Rev Mex Ing Quim* 7: 243–251.
- Delgadillo López AE, González Ramírez CA, Prieto García F, Villagómez Ibarra JR, Acevedo Sandoval, O (2011) Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropic Subtropic Agroecosyst* 14: 597–612.
- Díaz Aguilar I, Larqué Saavedra MU, Alcántar González G, Vázquez Alarcón A, González Cossio FV, Carrillo González R (2001) Acumulaciones tóxicas de níquel en el crecimiento y la nutrición de trigo. *Terra Latinoamer* 19(3).
- Diez Lázaro FJ (2008) Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. Tesis Doctoral. Universidad del Valle de Compostela. Galicia, España. pp 344.
- Diez Lázaro FJ, Kidd P, Monterroso C (2010) Biodisponibilidad de metales en suelos y acumulación en plantas en el área de Trás-Os-Montes (Portugal): influencia del material original. *Edafología*. 9:313-328.
- Dorado O, Arias D, Ramírez R, Sousa M (2005) Leguminosas de la Sierra de Huautla. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla. pp 176.
- Eleftheriou E, Michalopoulou V, Adamakis I (2015) Aberration of mitosis by hexavalent chromium in some Fabaceae members is mediated by species-specific microtubule disruption. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 7590-7599.
- Ercal N, Gurer Orhan H, Aykin Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1(6): 529–539. doi.org/10.2174/1568026013394831.

- Espinoza Reyes G, González Mille DJ, Ilizaliturri Hernández CA, Mejía Saavedra J, Cilia López VG, Costilla-Salazar, R, Díaz Barriga F (2014) Effect of mining activities in biotic communities of Villa de la Paz, San Luis Potosí, Mexico. *BioMed Research International* pp 1-13.
- Eun SO, Youn HS, Lee Y (2000) Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiol Plant* 110:357–365. doi.org/10.1111/j.1399-3054.2000.1100310.x
- Flora SJS, Mittal M, Mehta A, Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. 2008. *Indian Journal of Medical Research* 128:501-23.
- Fuentes Reza A (2017) Bioacumulación y análisis de la estructura y diversidad genética de *Prosopis laevigata* por exposición a metales, en Huautla, Morelos. Dissertation, Universidad Autónoma del estado de Morelos.
- Galván Ramírez, M (2020) Estructura de la comunidad de roedores silvestres asociados a jales de Huautla, Morelos. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.
- García Vargas D (2006) Efectos fisiológicos y compartamentalización radicular en plantas de *Zea mays* L. expuestas a la toxicidad por plomo. Dissertation, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K (2006) Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotox Environ Safe* 65(3): 420–426. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.08.006.
- Golubov J, Mandujano, MC, Eguiarte LE (2001) The paradox of mesquites (*Prosopis spp.*): invading species or biodiversity enhancers? *Bot Sci* 69: 23–30. doi.org/10.17129/botsci.1644.
- González Brito WA (2015) Efecto de un gradiente de contaminación por jales mineros sobre las comunidades de artrópodos asociados a la vegetación y con énfasis en el orden ARANEAE en Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Guo Z, Miao X (2010) Growth changes and tissues anatomical characteristics of giant reed (*Arundo donax* L.) in soil contaminated with arsenic, cadmium and lead. *J Cent South Univ T* 17: 770–777. doi: 10.1007/s11771-010-0555-8.
- Gupta D, Nicoloso F, Schetinger M, Rossato L, Pereira L, Castro G, Srivastava S, Tripathi R (2009) Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *J Hazard Mater* 172: 479–484. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.141.
- Hartmann A, Plappert U, Raddata K, Grünert Fuchs M, Speit G (1994) Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9(3), 269-272.
- Harvey AJ, Leontien M, Witjes M, Benkirane M, Duyts H, Wagenaar R (2007) Nutritional suitability and ecological relevance of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* as foodplants for the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Plants Ecology*. 189: 117-126.
- Hernández Acosta E, Mondragón Romero E, Cristobal Acevedo D, Rubiños Panta JE, Robledo Santoyo E (2009) Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Rev Chapingo Ser Cie* 15(2), 109–114.

- Hernández Allica J, Garbisu C, Barrutia O, Becerril JM (2007) EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. *Environmental Exper Botany*. 60 (1): 26-32.
- Hernández Gómez MA (2015) Estructura de la comunidad de microartrópodos a través de un gradiente de contaminación por metales pesados en Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Hernández Lorenzo B (2013) Análisis de la anatomía y morfología de *Prosopis laevigata*, por acumulación de metales pesados en la Sierra de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. Morelos, México.
- Hernández Sosa MS (2015) Biomarcadores permanentes para evaluar la salud de ecosistemas contaminados por metales pesados: el caso de *Liomys irroratus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Hernández Plata I, Rodríguez VM, Tovar Sánchez E, Carrizalez L, Villalobos P, Mendoza Trejo MS, Mussali Galante, P (2020) Metal brain bioaccumulation and neurobehavioral effects on the wild rodent *Liomys irroratus* inhabiting mine tailing areas. *Environmental Science and Pollution Research* 1-20.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) (2016) Estadística de la industria minerometalúrgica. Cifras durante noviembre de 2015. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/notasinformativas/2016/ind_miner/ind_miner2016_02.pdf
- Jacobson K, Turner J (1980) The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* 16: 1-37.
- Jara Peña E, Gómez J, Montoya H, Chanco M, Mariano M, Cano N (2014) Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados. *Revista peruana de biología* 21(2), 145-154.
- Jiménez LF, Merchant H (2003) *Biología celular y molecular*. Pearson Education. México pp 912.
- Kabata Pendias A, Pendias H (1984) Trace elements in soil and plants 38: 800–817.
- Kayode Adesodun J, Atayese MO, Agbaje TA, Osadiaye BA, Mafe OF, Soretire AA (2009) Phytoremediation potencial of sunflower (*Thitonia diversifolia* and *Heliantus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates. *Water Air Soil Pollution* 207: 195-201.
- Kim J, Kim K, Ahn J, Ko I, Lee CH (2005) Investigation and risk assessment modeling of As and other heavy metals contamination around five abandoned metal mines in Korea. *Environmental Geochemical Health* 27: 193-203.
- King C, Rios G, Green M, Tephly T (2000) UDP-glucuronosyltransferases. *Current Drug Metabolism* 1: 143-61.
- Kotaś J, Stasicka Z (2000) Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution* 107: 263–283.

- Koval AB, Bezejl M, Hovart M, Krsnik M, Gibicar D, Osredrkar J (2008) Glutathione level after long term occupational elemental mercury exposure. *Environmental Restoration* 107: 115-123.
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto Raskin H (1995) Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29(5): 1232-1238.
- Küpper H, Küpper F, Spiller M (1996) Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot* 47(2): 259–266. doi.org/10.1093/jxb/47.2.259.
- Lázaro JD (2009) Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. Dissertation, Universidad de Santiago de Compostela; 2009.
- Lázaro JD, Kidd P, Monterroso C (2002) Biodisponibilidad de metales en suelos y acumulación en plantas en el área de Trás-os-Montes (NE Portugal): influencia del material original. *Edafología* 9(3): 313–328.
- Llugany M, Tolrá R, Poschrieder C, Barceló J (2007) Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? *Ecosistemas* 16(2): 4-9.
- López Martínez SM, Gallegos Martínez L, Flores JP, Rojas MG (2005) Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional Contaminación Ambiental* 21(2): 91-100.
- Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi MK, Lahori AH, Wang Q, Li R, Zhang Z (2015) Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 126: 111–121. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023.
- Mancera Rodríguez JN, Álvarez León R (2006) Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 11(1), 3-23.
- Marcano L, Carruyo X, Montiel M, Bracho L, Soto M (1999) Valoración del efecto tóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. *Revista de la Facultad de Agronomía. (LUZ)* 16: 476-487.
- Marrero Coto J, Amores Sánchez I, Coto Pérez O (2012) Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 46(3): 52-61.
- Martínez Becerril C (2009) Efecto de los Metales Pesados en Jales Mineros sobre la Comunidad Vegetal de la Microcuenca Huautla y el Daño Genotóxico en su Herbívoro Dominante *Peromyscus levipes* (Rodentia: Muridae). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Martínez Pacheco (2008) Evaluación de los efectos genotóxicos de metales presentes en el agua de bebida de la población de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México pp 77.
- Meagher RB, Rugh CL, Kandasamy MK, Gragson G, Wang NJ (2000) Engineered phytoremediation of mercury pollution in soil and water using bacterial genes. En: *Phytoremediation of*

- Contaminated Soil and Water (eds. Terry, N. y Bañuelos, G.). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA pp 201-220.
- Mehrag A (1994) Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Environ* 17: 989–993. doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb02032.x.
- Mendoza DAB (1999) Absorción y asimilación de hierro en las plantas. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro pp 1–18.
- Mendoza Benítez I, De la Rosa Álvarez MG, Cruz Jiménez G (2008) Identificación de especies vegetales relacionadas con jales mineros del Distrito minero de Guanajuato. *Biológicas* 10: 94-99.
- Mojiri A (2011) The Potential of Corn (*Zea mays*) for Phytoremediation of Soil Contaminated with Cadmium and Lead *J Biol Environ Sci* 5: 17-22.
- Moriarty F (1999) *Ecotoxicology: The study of pollutants in ecosystems*. Academic Press. Reino Unido.
- Murillo Herrera AI (2015) Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevigata* de los jales de Sierra de Huautla, Morelos, México provocado por metales pesados. Dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Muruyama Nakashita A, Inoue E, Saito K, Takahashi H (2007) Sulphur-responsive promoter of sulphate transporter genes potentially useful to detect and quantify selenate and chromate. *Plant Biotechnol* 24: 261–263.
- Mussali Galante P, Ávila Costa MR, Piñón Zarate G, Martínez Levy G, Rodríguez Lara V, Rojas Lemus M, Fortoul TI (2005) DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicol Ind Health* 21(5–6): 155-166. doi.org/10.1191/0748233705th224oa.
- Mussali Galante P, Tovar Sánchez E, Valverde M, Rojas del Castillo E (2013) Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Rev Int Contam Ambie* 29, 117–140.
- Mussali-Galante (2001) ¿Es la técnica de electrophoresis celular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción de daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México pp 113.
- Mussali Galante P (2008) Estudio sobre la inducción de daño al ADN en sangre periférica de individuos expuestos a metales en el agua de bebida, en la población de Huautla, Morelos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México 74 pp.
- Mussali Galante P (2013) Análisis de poblaciones de *Peromyscus sp.* (RODENTIA: MURIDAE), asociadas a jales dentro de la Reserva de Biósfera de Huautla, Morelos, México: Un enfoque ecotoxicogenómico. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de México. México.
- Mussali Galante P, Tovar Sánchez E, Rojas Del Castillo E (2014) Genetic structure and diversity of animal populations exposed to metal pollution *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 227: 79-106.

- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8(3):199-216. doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8.
- Navarro Aviño JP, Aguilar Alonso I, López Moya JR (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16(2): 10-25.
- Nossoni F (2008) Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay): Methodology, potencial applications and limitations in cancer research. *Basic Biotechnology eJournal* 4:30-35.
- Nuñez López RA, Meas Vong Y, Ortega Borges RO, Olgúin EJ (2004) Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia* 69-82.
- Olayinka IN (2008) Contaminant source as factor of soil heavy metals toxicity and bioavailability to plants. *Environmental Research Journal* 2(6): 322-326.
- Olgúin E, Sánchez Galván G (2012) Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *N. Biotechnol* 30: 3–8. doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.020.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the " comet " assay. *Radiation research* 122(1), 86-94.
- Ostling 65O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123(1), 291-298.
- Ouzounidou G (1994) Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environ Exp Bot* 34(2): 165–172. doi.org/10.1016/0098-8472(94)90035-3.
- Pal Singh H, Mahajan P, Kaur S, Batish DR, Kohli RK (2013) Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters* 11:229-254.
- Panda BB, Das BL, Lenka M, Panda KK (1988) Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to biomonitor genotoxicity of low levels of mercury in aquatic environment. *Mutation Research* 206 (2): 275-279.
- Paniagua Ibáñez M (2010) Variación morfológica de *Cosmos bipinnatus* Cav. (Asteraceae) en el Eje Neovolcánico Transversal. Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* 52(3): 199–223. doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.009.
- Pedrosa Gomes M, Lara Lanza T, Marques D, de Oliveira Gonçalves M, de Castro E, Soares A (2011) Accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. *Sci Agr* 68: 566–573. dx.doi.org/10.1590/S0103-90162011000500009.
- Pilon Smits, E (2005) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56, 15-39.
- Posada MI, Arroyave MP (2006) Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales. *EIA* 6: 57-67.

- Pourrout B, Shahid M, Douay F, Dumat C, Pinelli E (2013) Molecular mechanisms involved in lead uptake, toxicity and detoxification in higher plants. In: Heavy Metal Stress in Plants. Springer, Heidelberg, Berlin pp 121–147. doi.org/10.1007/978-3-642-38469-1_7.
- Prasad MNV (2005) Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies. Brazilian Journal of Plant Physiol 17(1): 113–128.
- Prasad MNV, Strzałka K (1999) Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Heavy metal stress in plants. Springer, Heidelberg, Berlin pp 117–138. doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0_6.
- Prasad MNV, Freitas H (2003) Metal hyperaccumulation in plants. Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electronic Journal of Biotechnology 6, 3 <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/6>>, Consultado en enero de 2018.
- Prieto MJ, Ramírez CAG, Gutiérrez ADR, García FP (2009) Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropic Subtropic Agroecosyst 10(1): 29–44.
- Puga S, Sosa M, de la Mora A, Pinedo C, Jiménez J (2006) Concentraciones de As y Zn en vegetación nativa cercana una presa de jales. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 22: 75-82.
- Quezada R, Varela E, Rosa MA (2012) Remediación natural para completar la depuración del cromo (VI) en efluentes de curtiembres. Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Villa María – Córdoba, Argentina.
- Rascio N, Navari Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? Plant Sci 180(2): 169–181. doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016.
- Ray PM (1979) La Planta Viviente. Compañía Editorial Continental, S. A. México pp 272.
- Reyes R, Pierre G, Guridi F, Valdés R (2014) Disponibilidad de metales pesados en suelos Ferralíticos con baja actividad antrópica en San José de las Lajas, Mayabeque. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias 23: 37–40.
- Reyes V, Urbano G, Veloz M, González I (2008) Caracterización electroquímica de suelos contaminados por residuos mineros del distrito minero de Zimapán, Hgo. Boletín de Mineralogía 18: 53-54.
- Reyna-Rosas, E. 2009. Evaluación de cambios nucleares en el epitelio bucal de individuos expuestos a metales en el agua de bebida de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Rodríguez Saucedo EN, Rojo Martínez GE, Valverde Ramírez B, Martínez Ruíz R, Cong Hermida MC, Medina Torres SM, Piña Ruíz HH (2014) Análisis técnico del árbol del Mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) En México. Ra Ximhai 10 (3): 173-193.
- Rodríguez R (1995) *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos*. Fondo de Cultura Económica. México 226 p.

- Rojas E, Lopez MC, Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogra; B, Biomed Sci Appl* 722(1-2): 225–254. doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00313-2.
- Rosas Ramírez ME (2018) Relación entre la bioacumulación de metales pesados y la concentración de clorofila en *Sanvitalia procumbens*. Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Ruiz Huerta EA, Armienta Hernández MA (2012) Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev Int Contam Ambie* 103–117.
- Salas Luevano MA, Manzanares Acuña E, Letechipía de León C, Vega Carrillo HR (2009) Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian J Exp Sci* 23(1): 27–32.
- Salas Salmeron FK (2007) Selección in vitro de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediación. Tesis de Especialidad. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Distrito Federal, México.
- Salisbury FT (1968) Las plantas vasculares: forma y función. México: Herrero Hermanos Sucesores pp 598.
- Santiago Cruz M, Estrada Zúñiga ME, Orozco Villafuerte J, Cruz Sosa J, Vernon Carter E, Buendía González L (2009) Acumulación simultánea de diferentes metales pesados en cultivos in vitro de *Prosopis laevigata*. In: XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Santoyo Martínez M (2016) Bioacumulación, daño genotóxico y cambios en la morfología foliar de *Acacia farnesiana* en los jales de Huautla, Morelos. Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Sarkar A, Jana S (1986) Heavy metal pollutant tolerance of *Azolla pinnata*. *Water, Air, & Soil Pollution* 27 (1-2): 15-18.
- SEMARNAT, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2005) Dirección de Investigación en Residuos y Sitios Contaminados Subdirección de Investigación en Sitios Contaminados y Sustancias Tóxicas. Informe 42 anual de actividades. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II. [Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2016]. http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgcnica/metales_eii2005.pdf.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza Tavera H, Avudainayagam S (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31, 739– 753.
- Sharma RK, Agrawal M (2005) Biological effects of heavy metals: An overview. *J Environ Biol* 26 (2): 301–313.
- Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:35–52
- Sheehan D, Meade G, Foley V, Dowd C (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360: 1-16.

- Simoes Menezes AP, Da Silva J, Roloff J, Reyes J, Debastiani R, Dias JF, Rohr P, De Barros Falcao Ferraz A (2013) *Baccharis trimera* (Less.) DC as Genotoxicity Indicator of Exposure to Coal and Emissions from a Thermal Power Plant. Arch. Environmental Contamination Toxicology 65: 434-441.
- Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175: 184-191.
- Solís Miranda BA (2016) Aislamiento de bacterias de jales mineros y análisis de su potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Dissertation, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinated seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxide in chlorophyll degradation. Plant Physiol 85: 85–89. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb05267.x.
- Somohano Gamboa RE (2013) Evaluación de la fitotoxicidad en suelos contaminados por metales pesados en pasivos ambientales minero-metalúrgicos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México.
- StatSoft (2000) Correspondence Analysis. Tulsa, StatSoft Inc. 2000. <http://www.statsoftinc.com/textbook/stcoran.html>.
- Steinkellner H, Mun Sik K, Helma C, Eck S., Ma, T. H., Horak, O., ... & Knasmüller, S. (1998). Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. Environmental and molecular mutagenesis, 31(2), 183-191.
- Thakur PS (1990) Different physiological responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars to drought. Acta Physiol Plant 12: 175–182.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 35(3), 206–221. doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
- Tiller, K.G., 1989. "Heavy metals in soils and their environmental significance". Advances in Soil Science. 9: 113-141.
- Tovar Sánchez E, Cervantes LT, Martínez C, Rojas E, Valverde M, Ortiz Hernández ML, Mussali Galante P (2012) Comparison of two wild rodent species as sentinels of environmental contamination by mine tailings. Environ Sci Pollut R 19:1677–1686. doi 10.1007/s11356-011-0680-4.
- Tovar Sánchez E, Cervantes Ramírez T, Castañeda Bautista J, Gómez Arroyo S, Ortiz Hernández L, Sánchez Salinas E, Mussali Galante P (2018) Response of *Zea mays* to multimetal contaminated soils: a multibiomarker approach. Ecotoxicology 27(8): 1161–1177. doi.org/10.1007/s10646-018-1974-9.
- Tovar Sánchez E, Mussali Galante P, Pacheco MM, Hernández M, Salinas O, Velona AO (2016). Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in an arsenic contaminated area in Morelos, Mexico. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 32(1), 101-117.

- Valverde M, Rojas E (2009) Environmental and occupational biomonitoring using the comet assay. *Mutation Research* 681: 93-109.
- Van Assche F, Clijsters H (1986) Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J Plant Physiol* 125(3-4): 355-360.
- Velasco J, De la Rosa D, Ramírez M, Volke T (2004) Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales Etapa II. SEMARNAT-INE, México pp 46.
- Watt M, Evans J (1999) Proteoid roots physiology and development. *Plant Physiology*. 121 317-323.
- Wilson B, Pyatt FB (2007) Heavy metal bioaccumulation by the important food plant, *Olea europaea* L., in an ancient metalliferous polluted area of Cyprus. *B Environ Contam Tox* 78(5): 390-394. doi.org/10.1007/s00128-007-9162-2.
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem Med Biol* 18: 339-353. doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.007.
- Yllanes P, Vélez A, Lozano S (2014) Efectos fitotóxicos del plomo en maíz híbrido Dekalb (*Zea mays* L.) en suelo arenoso y limoso. *The Biologist* 12: 337-248.
- Zar JH (2010) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhang XH, Liu J, Huang HT, Chen J, Nian ZY, Wang DQ (2007) Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere* 67: 1138-1143.
- Zimmermann M (2001) Adaptaciones de plantas a estrés abiótico que les permiten vivir y prosperar en diferentes condiciones ambientales. *Revista Creces*.

Morphological, physiological, and genotoxic effects of heavy metal bioaccumulation in *Prosopis laevigata* reveal its potential for phytoremediation

Dalia A. Muro-González¹ Patricia Mussali-Galante² Leticia Valencia-Cuevas³ Karen Flores-Trujillo² Efraín Tovar-Sánchez[✉]

Received: 2 April 2020 / Accepted: 6 July 2020
Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Mining industry generates large volumes of waste known as mine tailings, which contain heavy metals (HMs) that generate a risk to environmental health. Thus, remediation of HM pollution requires attention. In this study, HM bioaccumulation, genotoxic damage, and morphological and physiological changes in the tree species *Prosopis laevigata* were evaluated in order to assess its potential for remediation of mine tailings. *P. laevigata* plants were established in two treatments (reference substrate and tailing substrate) under greenhouse conditions. Every 2 months, six individuals were selected per treatment for 1 year. From each individual, macromorphological (height, stem diameter, and number of leaves), micromorphological (stomatal coverage and stomatal index), and physiological parameters (chlorophyll content) were evaluated, as well as the concentration of Pb, Cu, Cd, Cr, Fe, and Zn in root and foliar tissue. Genetic damage was assessed by the comet assay in foliar tissue. These parameters were evaluated in adult individuals established in mine tailings. Roots bioaccumulated significantly more HM compared to foliar tissue. However, the bioaccumulation pattern in both tissues was Fe > Pb > Zn > Cu. The plants in tailing substrate reduced significantly the morphological and physiological characters throughout the experiment. Only the bioaccumulation of Pb affected significantly the levels of genetic damage and the number of leaves, while Zn reduced plant height. The percentage of plants that have translocation factor values greater than 1 are Cu (92.9) > Fe (85.7) > Pb (75.0) > Zn (64.3). *P. laevigata* has potential to phytoremediate environments contaminated with metals, due to its dominance and establishment in abandoned mine tailings, and its ability to bioaccumulate HM unaffacting plant development, as well as their high levels of HM translocation.

Keywords Mine tailings · Bioaccumulation · Phytoremediation · Morphological parameters · Genotoxic damage · Translocation factor · Bioaccumulation factor · Comet assay

Responsible Editor: Elena Maestri

*✉ Efraín Tovar-Sánchez
efrain_tovar@uaem.mx

¹ Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

² Laboratorio de Investigaciones Ambientales, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

³ Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Introduction

Mining is a very important traditional and economic activity in Mexico, contributing 5% to the nominal gross domestic product (INEGI 2016). Currently, Mexico stands out as the leading silver producer worldwide. However, when this activity is carried out, thousands of tons of waste are generated, known as mine tailings, that contain high concentrations of heavy metals (HMs) (Salas-Luévano et al. 2017).

Mine wastes containing HMs are an important source of environmental pollution (Ibarra-García et al. 2017). In addition, due to their characteristics and properties, they are considered potentially toxic elements for organisms exposed to them (Salas-Luévano et al. 2017), causing negative effects in all levels of biological organization (Mussali-Galante et al. 2013).

When HMs are bioavailable in the soil, they can be absorbed by plant roots and be bioaccumulated in different plant tissues (Talavera et al. 2005; Dinu et al. 2020; Mei et al. 2020). Subsequently, when these plant tissues are consumed by different herbivores, HM enters into the trophic networks and the quantities of HM within organisms increase. Later, these metals can be found in higher concentrations than those registered in the environment (Mussali-Galante et al. 2013), affecting human health negatively (DalCorso 2012; Tovar-Sánchez et al. 2016; Tovar-Sánchez et al. 2018).

It has been documented for plants that the bioaccumulation of HM promotes cytotoxic and genotoxic damage, which generates cellular, physiological, and morphological alterations (Nagajyoti et al. 2010). These effects have been detected through the use of biomarkers that are tools for measuring the effects of HM exposure in exposed organisms (Gold-Bouchot and Zapata-Pérez 2004; Ayeni et al. 2010).

Some of the effects that have already been reported using biomarkers in plants are the following: the generation of oxidative stress by the production of reactive oxygen species (Ercal et al. 2001), also for the double and single breaking strand of DNA, which can generate genetic damage (Sharma and Agrawal 2005; DalCorso 2012, Tovar-Sánchez et al. 2018). For example, it is common to employ genotoxic techniques such as alkaline single-cell electrophoresis or comet assay to evidence the genetic damage as a biomarker of early effects due to HM exposure. This is a widely accepted technique due to its sensitivity, simplicity, and speed to analyze the breaking of single strands of DNA in individual cells (Tovar-Sánchez et al. 2018). Similarly, the reduction of macromorphological (plant height, stem diameter, and the number of leaves (Kabata-Pendias 2011; Tovar-Sánchez et al. 2018)) and micromorphological characters (stomatal coverage and stomatal index (Tovar-Sánchez et al. 2018; Santoyo-Martínez et al. 2020)) and alterations in chloroplasts with implications in the photosynthetic process (Arena et al. 2017; Gonçalves Jr. et al. 2020) have been useful biomarkers for showing the adverse effects of HM exposition on the development, growth, and physiology of plants exposed (Gonçalves Jr. et al. 2020; Santoyo-Martínez et al. 2020). For example, it has been documented that *Zea mays* plants growing in mine tailings in Mexico bioaccumulate HM, which promotes changes in macro- and micromorphological characters and leaf structure form, causing loss of plant biomass and alterations in coloration pattern, also DNA damage (Tovar-Sánchez et al. 2018).

In nature, there are plant species known as hyperaccumulators, which are distinguished by presenting the following attributes: (a) high tolerance to metalliferous soils without presenting important effects on their viability, growth, development, and reproduction; (b) ability to accumulate large amounts of HM in aerial organs; (c) fast HM translocation from roots to stems; (d) high detoxification capacity (Rascio and Navari-Izzo 2011; Shiqi et al. 2018).

Some plant species that have been reported as hyperaccumulators belong to the Brassicaceae, Asteraceae, Fabaceae families, among others (De la Rosa et al. 2008; Buendía-González et al. 2010; Navarrete Gutierrez et al. 2018). This hyperaccumulation ability and HM tolerance by plants is an attribute that can be used for bioremediation techniques (Mousavi Kouhi and Moudi 2020). Within these techniques, phytoremediation uses plant species for the elimination, reduction, and retention of soil pollutants, favoring the reduction of their toxicity (Sharma and Pandey 2014; Mousavi Kouhi and Moudi 2020). The phytoremediation process has different stages: one is phytoextraction, which consists of the translocation of pollutants contained in the soil matrix, from roots to the plant's aerial parts where they are accumulated. Subsequently, aerial parts can be harvested and in this way the metals can be removed from the soil (Suman et al. 2018; Mousavi Kouhi and Moudi 2020).

Some advantages of using phytoremediation as a remediation strategy for soils polluted with HM are that it can be carried out in situ, so it is not necessary to transport the polluted substrate to a specialized facility to be decontaminated. Phytoremediation also removes organic and inorganic pollutants from soil. It improves physicochemical soil properties when vegetation cover is generated, or carried out with conventional agronomic activities. It can also be carried out in soil, water, sediments, and air obtaining recycled water, metals, and biomass. It is also considered a low-cost technique and environmentally friendly (Delgadillo-López et al. 2011; Capozzi et al. 2020; Chaudhry et al. 2020).

In order to carry out phytoremediation processes, it is necessary to use plant species that have the appropriate characteristics to survive in metalliferous soils and with the metabolic mechanisms that are able to deal with the exposure to HM, that is, a species with attributes of hyperaccumulation (Suman et al. 2018).

To determine if a species has a phytoremediation potential, it is necessary to evaluate how plants respond to HM when exposed to them. This can be implemented with experiments under greenhouse conditions and in natural systems. The first studies have the advantage that the environmental variation can be minimized, and the HM effects on organisms exposed to different exposure times can be measured more accurately (De la Cruz-Landero et al. 2010). On the other hand, studies in natural systems are very relevant because they permit the evaluation of HM on individuals affected by mine tailings in a more real way (Murillo-Herrera 2015); also, it allows knowing the long-term effects of exposure to HM on the parameters evaluated. Therefore, research that combines both study approaches offer the opportunity to obtain results based on reality as well as the effects of exposure time to metals on plant species.

Prosopis laevigata (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C.Johnst. (Fabaceae) is a tree species that develops naturally in mine tailings and has been reported to bioaccumulate metals such as Al, As, Cu, Cd, Ni, Pb, V, Mg, Zn, Cr, and

Cd in different tissues (Alcalá-Jáuregui et al. 2018; Ibarra-García et al. 2017; Buendía-González et al. 2019; Ramírez et al. 2019). Also, genetic damage has been documented in *P. laevigata* populations exposed to MP in field (Murillo-Herrera 2015). Despite this, the HM effects on macro- and micromorphological and physiological characters (chlorophyll concentration), as well as bioaccumulation in different plant tissues (root and leaf) to different exposure times, are unknown.

In the present study, experimental designs were carried out in situ and ex situ, in natural conditions (mine tailings) and under greenhouse conditions, with the objective of obtaining results more related to reality. Determining the HM bioaccumulation capacity of *P. laevigata* at different exposure times (short and long term) in the presence of a mixture of metals and evaluating the effects of such exposure on physiological, morphological, and genotoxic markers are poorly explored, so information generated in this study can be useful to determine the phytoremediation potential of this species in soils contaminated with mine tailings.

The following questions were asked: (1) What is the effect of the exposure time to mining waste on the kind and concentration of HM bioaccumulated in plant tissues of *P. laevigata*? (2) What effect does HM bioaccumulation have on morphological, physiological, and genotoxic parameters in individuals of *P. laevigata*? (3) Is the exposure time to HM a variable that modifies the levels of genetic damage? (4) What is the relative contribution that each HM has on the morphological, physiological, and genotoxic parameters in individuals of *P. laevigata*?

Material and methods

Study area

Exposed site

This study was carried out in Huautla, which is located in Tlalquitenango, in the state of Morelos, Mexico. It is part of the Sierra de Huautla Biosphere Reserve (REBIOSH) (Dorado et al. 2005). This town was an important mining district. However, after a long extraction process, the mines were abandoned leaving large amounts of waste or mine tailings, which are now in the open air (Velasco et al. 2004; SEMARNAT 2005; Mussali-Galante et al. 2013).

At present, there are three mine tailings that did not receive adequate treatment, with the risk of leaching or presenting runoff to other areas during the rainy season, which potentially pollutes the environment and the surrounding biota (SEMARNAT 2005).

There are two better conserved mine tailings; one is located in parallels 18° 26' 36.37" N–99° 01' 26.71" W and the other one is 18° 26' 22.62" N–99° 01' 51.71" W (Fig. 1); they are separated 500 and 100 m respectively from Huautla (Velasco et al. 2004). They have a similar chemical composition: pH from 7.85 to 8.37, electrical conductivity from 0.2 to 0.4 dS/m, percentage of organic matter from 0.52 to 0.84%, particle size < 45 µm. In addition, previous studies have shown the following pattern in terms of HM concentration: Fe > Zn > Pb > Mn > Cu > Cd (Solís-Miranda 2016); therefore, this area is contaminated with a mixture of metals.

Control site

The control site is in Quilamula, Morelos, a town located to the south-west of Tlalquitenango, Morelos, in parallel 18° 30' 52" N and 98° 59' 59" W (Fig. 1). This site was chosen because there are no records of contamination by mining activity. In addition, the geographical, climatic, and edaphic characteristics of the area are similar to the exposed sites.

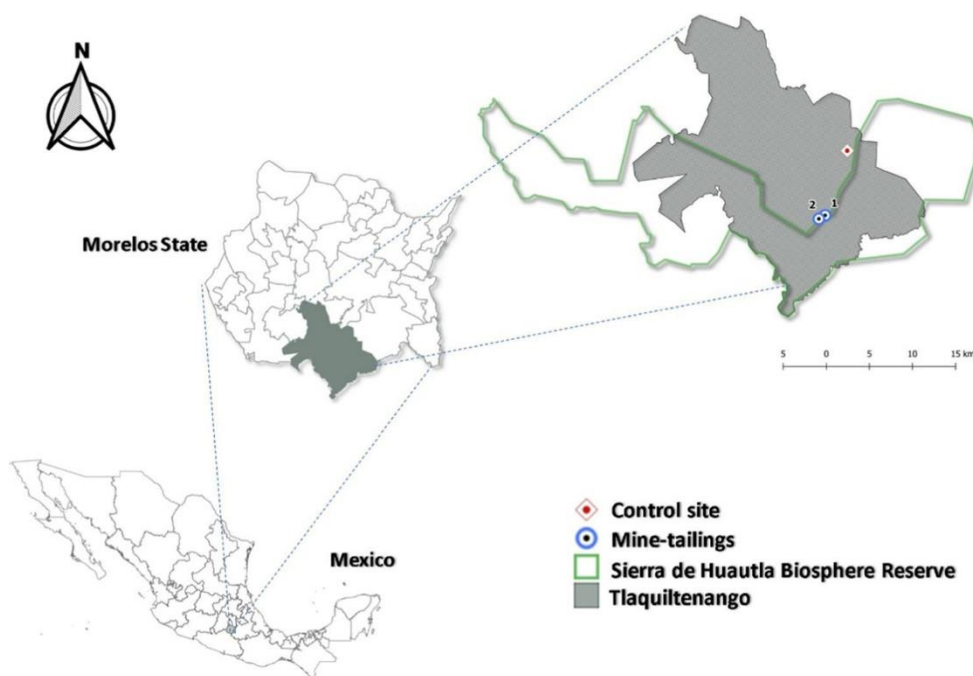
Study species

Prosopis laevigata is a tree that belongs to the Fabaceae family and is commonly known as mezquite. It can reach up to 13 m high and has a diameter of 80 cm; it sheds its leaves in winter, and it blooms from February to May and fruits from June to July. It has a wide geographical distribution in Mexico (Rodríguez-Sauceda et al. 2014). It also grows naturally and abundantly in the mine tailings of Huautla, Morelos.

Seed sampling and germination of *P. laevigata*

Seeds were sampled in the two most preserved mine tailings of Huautla, Morelos. Fruits of established trees in tailings that presented complete pods were randomly selected, with no evidence of the presence of fungi or parasites. After that, seeds were removed from pods and confirmed that they were not parasitized. Finally, they underwent a mechanical scarification process to obtain more efficient germination. For germination, 100 seeds were placed in five Petri dishes (20 seeds per box) on cotton wool moistened with distilled water. Once seeds were germinated, they were placed in trays with peat moss substrate until plants reached a size between 4 and 5 cm. Later, 80 seedlings were transplanted into individual nursery polyethylene bags with treatment substrates (40 plants in tailing substrate and 40 in reference substrate). As control substrate, soil from Quilamula was used; it was filtered with a stainless steel sieve number 35 (Fiicsa), with a 0.5-mm mesh, in order to obtain a particle size similar to that of the mine tailing. As exposed substrate, the mixture of residues from tailings 1 and 2 was used. All the plants were kept under greenhouse conditions; they were watered twice a day, three

Fig. 1 Geographical distribution of the two study sites at the Sierra de Huautla Biosphere Reserve, Morelos, Mexico. Control site (red-filled up-pointing diamond). Exposed site (blue-filled circle)



times a week, and the temperature ranged from 32 to 35 °C. To evaluate HM bioaccumulation in plants (roots and leaves), the genetic damage, and the macro- and micromorphological characters of interest, the plants obtained were measured every 2 months until a year old. On each occasion, six individuals of *P. laevigata* growing in tailing substrate and six in the reference substrate were randomly taken for collecting data. Once all data were collected, statistical analysis was performed to evaluate each parameter.

Tailing substrate and reference substrate sampling

To carry out the experiment under greenhouse conditions, tailing substrate and reference substrate were collected through a superficial, simple, and random sampling in the two most preserved tailings located in Huautla, Morelos. After that, the material collected from both tailings was homogenized with a shovel, removing stones and root debris to obtain the substrate that was used to fill bags with a capacity of 4 L to transplant the *P. laevigata* seedlings exposed to HM. Reference substrate was sampled in Quilamula, where there are no reports of HM exposure from mining activity. This substrate was sieved to 3 mm to obtain a similar texture to mining substrate and it was used to transplant the reference seedlings of *P. laevigata*.

Selection of adult trees of *P. laevigata* established in mine tailings and control site

Six adult trees of *P. laevigata* established in the mine tailings were considered individuals exposed to HM. Also, six other

trees growing in the control site (Quilamula) were considered the reference individuals. In both cases, trees with approximately the same height and diameter at chest height were selected randomly (individuals' age is 25 years old, pers. obs.). Leaf samples were taken to measure chlorophyll content and bioaccumulation of heavy metals and to perform genotoxicity test (comet assay). It is worth mentioning that measurements made on naturally established trees in mine tailings were done to complement the data obtained in greenhouse conditions, that is, how *P. laevigata* seedlings exposed to HM develop over time from early age to adulthood.

Heavy metals' concentration in plant tissue

Samples of root and leaf plant tissue were taken from six individual *P. laevigata* growing under greenhouse conditions in both treatments (tailing substrate and reference substrate). For individual plants that grow naturally in the mine tailings, only the foliar tissue of six plants was measured. The root tissue was washed with distilled water to remove the residue from the substrates. All the tissues were taken to a drying oven at 60 °C until they reached a constant weight. Each plant structure (0.25 g) was placed and pulverized in a container previously washed with HNO₃. The samples were subjected to acid digestion using 10 ml of concentrated HNO₃ (70%).

The samples were subjected to acid digestion using an accelerated reaction system microwave (CEM® MARS-5), using 10 mL of 70% HNO₃ in closed Teflon pumps. Samples were dissolved and filtered in distilled water; this solution was dissolved at a final volume of 50 mL until

analysis. A sample without tissue was processed simultaneously and was used as a control. The metals were then analyzed by atomic absorption spectrophotometry, a technique that determines the concentration of a metallic element in a sample, calibrating the spectrophotometer with standard solutions containing known concentrations of each analyzed element. The detection limits for all the elements analyzed in this work are shown in Table 1. For each measurement, the average value of three replicates was reported. All concentration values are reported in milligrams/kilogram in dry weight. For this study, the concentrations of three nonessential metals (Pb, Cd, and Cr) and three essentials (Fe, Zn, Cu) in foliar and root tissue of *P. laevigata* were analyzed.

Genetic damage in leaf tissue

The determination of genetic damage was performed in six individuals randomly chosen for each exposure time (2, 4, and 6 months) in both the tailing and reference substrates. We used the alkaline unicellular electrophoresis or comet assay technique, since this technique has a high degree of sensitivity, simplicity, and speed to analyze the breaking of single strands of DNA in individual cells (Rojas et al. 1999). Foliar tissue was used, which was rinsed with distilled water, dried and immersed in a glass petri dish with 20 mL phosphate-buffered saline ($1 \times$ PBS) for the isolation of the nuclei, which was performed by cutting the leaves immersed in PBS with a sharp razor, until the PBS turned greenish. Subsequently, 50 μ L of cell suspension was taken and incorporated into an Eppendorf tube with 50 μ L of low melting point agarose (1% LMPA). Then, 80 μ L of the plant nucleus suspension was placed in a slide covered with a preformed monolayer of normal fusion agarose (NMA 1.0% Gibco). It was then covered with a coverslip and placed to cool on ice for 5 min. The coverslip was removed from the foil and a final layer of LMPA (0.5%) was placed at 4 °C for 5 min (Guo et al. 2020).

The gels were placed in a cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-base pH 10) at 45 mL with 1% Triton-X and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in Koplting vessels at 4 °C for 1 h. Subsequently, gels were placed in an electrophoresis chamber and covered with a cold alkaline buffer (NaOH (300 mM) + 1 mM EDTA) at pH 13.0 for 20 min for a DNA unwinding process. The electrophoresis was carried out at 300 mA and 25 V for 20 min under dark conditions.

Finally, the gels were washed three times with neutralizing buffer Tris (0.4 M pH=7.5) for 5 min (Guo et al. 2020) and fixed with cold absolute ethanol for 10 min. For later reading of slides with the isolated nuclei, a staining with fluorochrome was made allowing the observation of individual cells (Mussali-Galante et al. 2005). The reading was done with the Comet IV software integrated in a fluorescence microscope with

excitation filters from 515 to 560 nm, and a 590-nm filter barrier. Tree slides were made per individual, and 100 cells per sample were evaluated. For the naturally grown adult trees in the mine tailings, six individuals were randomly chosen for treatment (exposed to HM and control) and similarly, tree slides were made per individual, and 100 cells per sample were evaluated (Tice et al. 2000). In each nucleus, the length of the comet tail (DNA migration) was evaluated.

Micro- and macromorphometric procedure

Morphological characters were measured in six plants taken randomly from the greenhouse. These individuals were under two treatments (tailing substrate and reference substrate) and their data were registered every 2 months throughout 1 year (six data collection). The macromorphological characters evaluated were the height of the plant (cm), the diameter of the stem (cm), and the number of leaves. The micromorphological characters were stoma coverage (mm^2) and the stomatal index. This was done through the replication technique with cyanoacrylate glue on three leaves belonging to three individuals per treatment (tailing substrate and reference substrate) of *P. laevigata*.

The stoma coverage Three leaves were selected from each individual. We measured stoma length (μ), and stoma width (μ) to obtain stoma coverage (mm^2). This was done by taking out the coverage of six stomata per individual. Stomatic coverage was calculated using this formula: $[(Q1+ Q2)/4]^2 \times \pi$, where Q1 is the smaller diameter and Q2 is the larger diameter.

The stomatic index Stomas and epidermal cells were counted on the fields that were observed in order to calculate the stomatal index. The number of stoma fields was quantified taking into account only those stomata in which the two guard cells were observed complete and the number of epidermal cells was at least 60% of the field of vision (Paniagua-Ibáñez et al. 2015). With the data obtained, Salisbury's formula (1968) was applied (Salisbury 1968).

$$IE = \frac{N.E}{N.C.E} \times 100$$

where IE is the stomatic index, N.E. is the number of stomatic cells (guard cells) per unit of leaf, and N.C.E. is the number of ordinary epidermal cells per unit of leaf.

Determination of chlorophyll content

The chlorophyll content (mg/m^2) was measured in six individuals (three leaves per individual) of *P. laevigata*

Table 1 Average values \pm standard error and ANOVA of heavy metals' concentrations (mg/kg) in roots and leaves of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions (treatments: tailing and reference substrates) and adult trees established in the mine tailings

Root					Leaf				
Metal	D.L. mg/L	Time (months)	Reference substrate Average \pm S.E.	Tailing substrate Average \pm S.E.		Time (months)	Reference substrate Average \pm S.E.	Tailing substrate Average \pm S.E.	
Pb	0.01	2	0.07 \pm 0.006 A	1.36 \pm 0.06 a	*	2	0.06 \pm 0.003 A	1.44 \pm 0.056 a	*
		4	0.07 \pm 0.004 A	1.68 \pm 0.07 b	*	4	0.05 \pm 0.002 A	1.53 \pm 0.098 a	*
		6	0.08 \pm 0.064 A	2.22 \pm 0.21 b	*	6	0.07 \pm 0.003 A	1.70 \pm 0.061 b	*
		Adults				Adults	0.07 \pm 0.004 A	1.62 \pm 0.061 ab	*
ANOVA					ANOVA				
Treatment (T)			F _{1,38} = 463.820 ***		Treatment (T)			F _{1,73} = 1494.978 ***	
Time (t)			F _{2,48} = 10.443 ***		Time (t)			F _{3,73} = 1.950 n.s.	
T \times t			F _{2,48} = 10.030 ***		T \times t			F _{3,73} = 1.892 n.s.	
Fe	0.005	2	89.54 \pm 0.360 A	4.48 \pm 0.360 a	*	2	5.13 \pm 0.188 A	2.466 \pm 0.188 a	*
		4	90.45 \pm 0.070 A	3.07 \pm 0.070 a	*	4	5.35 \pm 0.137 A	2.186 \pm 0.137 a	*
		6	90.43 \pm 0.330 A	3.29 \pm 0.330 a	*	6	4.72 \pm 0.185 A	2.671 \pm 0.185 a	*
		Adults				Adults	4.01 \pm 0.063 A	2.606 \pm 0.063 a	*
ANOVA					ANOVA				
Treatment (T)			F _{1,38} = 3917.023 ***		Treatment (T)			F _{1,73} = 299.212 ***	
Time (t)			F _{2,48} = 0.202 n.s.		Time (t)			F _{3,73} = 2.436 n.s.	
T \times t			F _{2,48} = 0.097 n.s.		T \times t			F _{3,73} = 2.329 n.s.	
Zn	0.0005	2	1.14 \pm 0.08 A	0.45 \pm 0.02 a	*	2	0.76 \pm 0.01 A	0.13 \pm 0.01 a	*
		4	1.02 \pm 0.05 A	0.63 \pm 0.02 a	*	4	0.79 \pm 0.01 A	0.17 \pm 0.01 a	*
		6	0.08 \pm 0.08 A	0.12 \pm 0.02 b	*	6	0.86 \pm 0.03 A	0.17 \pm 0.03 a	*
		Adults				Adults	0.95 \pm 0.03 A	0.65 \pm 0.03 b	n.s.
ANOVA					ANOVA				
Treatment (T)			F _{1,38} = 246.684 ***		Treatment (T)			F _{1,73} = 90.188 ***	
Time (t)			F _{2,48} = 11.042 ***		Time (t)			F _{3,73} = 8.996 ***	T
T \times t			F _{2,48} = 14.910 ***		T \times t			F _{3,73} = 3.036 ***	
Cu	0.001	2	0.28 \pm 0.03 A	0.33 \pm 0.05 a	n.s.	2	0.43 \pm 0.17 A	0.22 \pm 0.04 a	n.s.
		4	0.26 \pm 0.02 A	0.14 \pm 0.006 b	*	4	0.68 \pm 0.13 A	0.37 \pm 0.03 a	*
		6	0.31 \pm 0.02 A	0.09 \pm 0.01 b	*	6	0.67 \pm 0.13 A	0.45 \pm 0.02 a	*
		Adults				Adults	0.59 \pm 0.14 A	0.93 \pm 0.06 b	n.s.
ANOVA					ANOVA				
Treatment (T)			F _{1,38} = 19.338 ***		Treatment (T)			F _{1,73} = 16.245 ***	
Time (t)			F _{2,48} = 10.079 ***		Time (t)			F _{3,73} = 9.957 ***	T
T \times t			F _{2,48} = 13-054 ***		T \times t			F _{3,73} = 11.745 ***	

Different uppercase letters show significant differences in individuals growing in reference substrate through time (Tukey $P < 0.05$). Different lowercase letters show significant differences in individuals growing in exposed substrate to heavy metals through time (Tukey $P < 0.05$). Asterisks denote significant differences between treatments for each exposure time (Tukey $P < 0.05$). ns = no significant differences * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. DL = detection limit. Cd and Cr were found in undetectable concentrations

for each treatment (tailing substrate and reference substrate) every 2 months for a year, with a chlorophyll-measuring device (Minota SPAD 502). Measurements were also made on six trees exposed to heavy metals, established in Huautla mine tailings, and six trees established in the town of Quilamula, as trees growing in control soil. The measurements are taken by simply inserting the foliar tissue for measuring into the head of the SPAD device and pressing to close it. These measurements are taken in living tissues, without causing damage, which allows the same leaf to be measured several times as it continues growing and developing.

Heavy metal enrichment and translocation factor

Two indices were used to evaluate the capacity of *P. laevigata* individuals to phytoextract HM: the bioconcentration factor (BCF) and the translocation factor (FT). The first determines the efficiency of the plant in the accumulation of substrate metals in its tissue (Yoon et al. 2006), and the second measures the efficiency of the plant in the transportation of metals from the root to the aerial parts (Yoon et al. 2006).

These indices are calculated as follows:

$$FBC = \frac{1}{4} C_{\text{foliar}} = C_{\text{tailing}}$$

$$FT = \frac{1}{4} C_{\text{foliar}} = C_{\text{root}}$$

where C_{foliar} is the metal concentration in the leaf tissue, C_{tailing} is the bioavailable metal concentration in the tailing, and C_{root} is the metal concentration in the root tissue. According to Yoon et al. (2006) and Covarrubias and Cabriaes (2017), FT values > 1 indicate that the species is considered an accumulator of the analyzed metal.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with STATISTICA software version 8.0 (StatSoft 2000). We use the Shapiro-Wilk “W” test which is used to probe normality (Zar 2010). We performed a two-factor analysis of variance (Model I fixed effects, Zar 2010) to assess the effect of exposure time (T), treatment (t) (reference substrate and tailing substrate), and $T \times t$ interaction on bioaccumulation of root and leaf metals in *P. laevigata* individuals. Subsequently, a post hoc test (Tukey, $P < 0.05$) was performed to establish significant differences between pairs of averages (Zar 2010).

Also, two-factor analysis of variance was made to determine the effect of exposure time (T), treatment (t) (control and exposure), and interaction time \times treatment on levels of genetic damage in leaves and roots of *P. laevigata* individuals. Subsequently, a Tukey test ($P < 0.05$) was carried out to determine significant differences between pairs of averages of the levels of genetic damage between exposure times (Zar

2010). In addition, a multiple regression analysis was used to assess the influence of lead, iron, zinc, and copper bioaccumulation on leaf tissue (Pb, Fe, Zn, Cu) on genetic damage levels (single-chain break) in *P. laevigata*.

To evaluate the effect of exposure time (T), treatment (t) (control and exposure), and interaction $T \times t$ on the variation in three macromorphological parameters (height, basal diameter, number of leaves), two micromorphological (stomatic index, stomatic coverage), and a physiological parameter (chlorophyll concentration) of *P. laevigata* individuals, a two-way analysis of variance was carried out. Subsequently, a Tukey test ($P < 0.05$) was performed to determine significant differences between pairs of the average values of the character evaluated over time, in both treatments (Zar 2010). For naturally grown adult trees in mine tailings, Student’s *t* tests were performed to evaluate the effect of the treatment (tailing substrate and reference substrate) on their chlorophyll content.

A multiple regression analysis was used to assess the influence of heavy metal bioaccumulation (Pb, Fe, Zn, Cu) on the variation of parameters in *P. laevigata*: three macromorphological characters (height, basal diameter, number of leaves), two micromorphological (stomatic index, stomatic coverage), and one physiological (chlorophyll concentration) (Zar 2010). Subsequently, a Tukey test ($P < 0.05$) was performed to determine significant differences between pairs of the average values of the character evaluated through the time of exposure to heavy metals (Zar 2010).

Results

Heavy metals’ concentration in the roots and leaves of *Prosopis laevigata*

Root

The presence of Fe, Pb, Zn, and Cu was detected in *P. laevigata* root plants growing under greenhouse conditions, while Cr and Cd were not detected (Table 1). The bioaccumulation pattern of metals was as follows: $Fe > Pb > Zn > Cu$. The two-way analysis of variance showed a significant effect of time (t), treatment (T), and interaction ($t \times T$) on the bioaccumulation of four metals detected in *P. laevigata* root plants. The only exception was Fe; its concentration was not affected by the treatment or the interaction.

The bioaccumulation of the four metals detected in the plant roots growing in reference substrate remained constant over time. Likewise, Fe, Zn, and Cu had a higher concentration in plants growing in the reference substrate compared to the tailing substrate plants. In contrast, the concentration of metals in the roots of plants growing in tailing substrate showed an increase in Pb concentration, but a decrease in Fe, Zn, and Cu concentrations over time (Table 1). In

particular, it is observed that Pb was the only metal that had the highest concentrations in plants growing in tailing substrate compared to plants growing in the reference substrate. Finally, it was observed that Fe is the metal that accumulates in greater concentration at the root in both treatments.

Leaf

The presence of Fe, Pb, Zn, and Cu was detected in *P. laevigata* leaves, growing under greenhouse conditions, as well as in adult individuals growing naturally in the mine tailings. In contrast, Cr and Cd were not detected (Table 1). The pattern of metal bioaccumulation in leaves was as follows: Fe > Pb > Zn > Cu. The two-way analysis of variance showed a significant effect of time (t), treatment (T), and interaction (t × T) on the levels of bioaccumulation of

four metals (Pb, Fe, Zn, and Cu) in *P. laevigata* leaves. The exceptions were Pb and Fe that were not affected by time and the interaction.

The bioaccumulation of four metals detected in the foliar tissue of plants growing in reference substrate remained constant over time. However, Fe, Zn, and Cu had higher concentrations in the foliar tissue of plants growing in reference substrate than those in the tailing substrate. On the other hand, in plants growing in tailing substrate, Pb and Fe concentrations in leaf remain constant over time while the concentration of Zn and Cu increases over time (Table 1). In particular, it was observed that Pb was the only metal that had the highest concentration in plants growing in the tailing substrate while Fe, Zn, and Cu had higher concentrations in the foliar tissue of plants growing in reference substrate. Finally, the results show that Pb, Zn, and Cu bioaccumulate in greater concentration in foliar tissue than roots in both treatments (Table 1).

Genetic damage in *Prosopis laevigata* individuals growing in reference substrate and tailing substrate

Results show that there is a significant effect of time (t), treatment (T), and interaction (t × T) on genetic damage in individuals of *P. laevigata* (Table 2). In general, a statistically significant increase in genetic damage was observed over time in plants growing in both treatments (reference substrate and tailing substrate). However, the damage was significantly greater in plants growing in the tailing substrate.

Furthermore, results show that Pb is the only metal that presented a positive and significant relationship with the levels of genetic damage (single chain break) in leaf tissue of individuals of *P. laevigata*, explaining 19% of genetic damage found in individuals in both treatments (Table 3).

Table 2 Average values ± standard error (S.E.) and ANOVA of genetic damage (tail length in micrometers) in leaves of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions (treatments: tailing and reference substrates) and adult trees established in the mine tailing

Genetic damage			
Time (months)	Reference substrate Average ± S.E.	Tailing substrate Average ± S.E.	
2	27.24 ± 0.658 A	33.32 ± 0.660 a	*
4	59.45 ± 1.026 B	76.22 ± 1.266 b	*
6	67.91 ± 1.645 C	98.84 ± 1.910 c	*
Adults	42.22 ± 0.346 D	88.42 ± 1.902 d	*
ANOVA			
Treatment (T)	F _{1,52} = 704.88 ***		
Time (t)	F _{3,50} = 520.93 ***		
T × t	F _{3,50} = 95.78 ***		

Different uppercase letters show significative differences in individuals growing in reference substrate through time (Tukey P < 0.05). Different lowercase letters show significative differences in individuals growing in exposed substrate to heavy metals through time (Tukey P < 0.05). Asterisks denote significant differences between treatments for each exposure time (Tukey P < 0.05). ns = no significant differences *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001

Morphological and physiological changes in *Prosopis laevigata* individuals growing on tailing substrate and reference substrate through time

In general, the results show that for all macro- and micromorphological characters, as well as the physiological (chlorophyll concentration) of *P. laevigata* plants growing for 12 months under greenhouse conditions, both treatments (tailing substrate and reference substrate) showed a significant effect on time (t), treatment (T), and interaction (t × T). The only exceptions were (1) the number of leaves where there was no effect of treatment and interaction, and (2) stomatic coverage where there was no effect of time, treatment, and interaction.

Table 3 Multiple regression analysis to determine the factors that can influence genetic damage within populations of *Prosopis laevigata*

Source of variation	d.f.	SS	F	Total variation (%)
Pb	1	16,275.43	16.344 ***	19.4
Fe	1	648.79	0.651 n.s.	0.8
Zn	1	932.66	0.338 n.s.	1.1
Cu	1	868.01	0.355 n.s.	1.0

Asterisks denote significant differences between metals and their effect on genetic damage. n.s. = no significant differences, ***P < 0.001. d.f. = degrees of freedom, SS = sum of square

Macromorphological characters

In terms of plant size, it was found that in the reference substrate, there was an increase in plant height over time, while in the tailing-substrate differences in size were not statistically significant (Table 4). The same pattern was observed for stem basal diameter. Relating to number of leaves, it was observed that there was no significant effect over time in *P. laevigata* plants growing in the reference substrate. However, for individuals growing in tailing substrate, there was a significant reduction in this character (Table 4).

Table 4 Average ± standard error and two-way ANOVA, to evaluate the effect of time (1 year) and treatment (substrate exposed to heavy metals and substrate reference) macromorphological,

A multiple regression analysis was made to determine which metals are generating the greatest variation in the macromorphological parameters evaluated, and it was found that in general, HM affects only two structures of the plant: Zn affects the height (10.7%) and Pb affects the number of leaves (8.1%).

Micromorphological characters

In particular, an increase in the stomatic index was observed over time in plants growing in the reference substrate, while in

micromorphological, and physiological parameters of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions

	Time(months)	Macromorphology			ANOVA	
		Reference substrate	Tailing substrate			
Height (cm)	2	35.50 ± 2.68 A	44.33 ± 3.82 a	ns	Time (T)	F _{1,70} = 71.54, ***
	4	50.00 ± 2.04 AB	59.16 ± 7.04 b	ns	Treatment (t)	F _{5,70} = 14.84, ***
	6	78.16 ± 5.43 BC	53.00 ± 3.10 b	ns	T × t	F _{5,70} = 16.50, ***
	8	95.82 ± 8.77 C	49.66 ± 2.87 ab	*		
	10	99.82 ± 8.95 C	51.16 ± 5.14 ab	*		
	12	134.16 ± 13.20 D	47.16 ± 4.92 ab	*		
Stem diameter (mm)	2	7.55 ± 0.18 A	9.00 ± 0.78 ab	ns	Time (T)	F _{5,70} = 27.39, ***
	4	8.00 ± 0.21 A	12.45 ± 0.79 c	*	Treatment (t)	F _{1,70} = 16.39, ***
	6	11.08 ± 0.90 B	8.94 ± 0.35 a	*	T × t	F _{5,70} = 24.19, ***
	8	12.61 ± 0.82 C	9.80 ± 0.30 b	*		
	10	14.07 ± 0.68 D	9.54 ± 0.59 b	*		
	12	17.25 ± 0.50 E	9.66 ± 0.63 b	*		
Number of leaves	2	133.16 ± 19.64 A	328.66 ± 66.75 a	*	Time (T)	F _{5,70} = 24.87, ***
	4	143.00 ± 8.93 A	228.50 ± 62.64 a	*	Treatment (t)	F _{1,70} = 1.66, n.s.
	6	116.33 ± 24.77 A	198.66 ± 45.05 ab	ns	T × t	F _{5,70} = 2.20, *
	8	154.66 ± 27.35 A	136.16 ± 15.07 b	ns		
	10	115.66 ± 13.90 A	216.00 ± 15.62 ab	ns		
	12	94.83 ± 10.57 A	228.66 ± 15.62 a	*		
Stomatic index	2	11.49 ± 0.57 AB	11.64 ± 0.36 ab	ns	Time (T)	F _{5,106} = 3.92, **
	4	11.83 ± 0.54 AB	11.99 ± 0.81 a	ns	Treatment (t)	F _{1,106} = 5.93, *
	6	11.88 ± 0.82 AB	16.68 ± 0.71 c	*	T × t	F _{5,106} = 18.93, ***
	8	10.65 ± 0.46 B	9.50 ± 1.01 b	ns		
	10	16.67 ± 0.46 C	9.14 ± 0.32 b	*		
	12	14.75 ± 0.51 BC	9.35 ± 0.46 b	*		
Stomatic coverage (µm)	2	82.11 ± 1.80 A	58.04 ± 2.10 a	ns	Time (T)	F _{5,214} = 2.99, n.s.
	4	68.25 ± 2.37 A	69.84 ± 1.74 a	ns	Treatment (t)	F _{1,214} = 6.50, n.s.
	6	49.69 ± 2.87 A	66.70 ± 1.89 a	ns	T × t	F _{5,214} = 0.72, n.s.
	8	82.14 ± 2.04 A	58.04 ± 2.11 a	ns		
	10	67.25 ± 2.39 A	69.14 ± 1.75 a	ns		
	12	48.69 ± 2.90 A	69.71 ± 1.85 a	ns		
Physiology Chlorophyll concentration (mg/m ²)	2	24.46 ± 1.36 AB	19.90 ± 1.52 a	ns	Time (T)	F _{5,24} = 40.4, ***
	4	27.78 ± 0.74 BC	25.21 ± 1.02 ab	ns	Treatment (t)	F _{1,24} = 10.5, ***
	6	28.01 ± 1.23 C	19.33 ± 1.09 a	*	T × t	F _{5,206} = 2.37, *
	8	26.76 ± 0.85 BC	22.83 ± 1.36 ab	ns		
	10	29.03 ± 0.98 C	26.76 ± 1.07 b	*		
	12	30.10 ± 0.86 C	27.59 ± 0.99 b	*		

Different uppercase letters show significative differences in individuals growing in reference substrate through time (Tukey P < 0.05). Different lowercase letters show significative differences in individuals growing in exposed substrate to heavy metals through time (Tukey P < 0.05). Asterisks denote significant differences between treatments for each exposure time (Tukey P < 0.05), n.s. = no significant differences *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001

those growing in tailing substrate there was a reduction. In the case of stomatic coverage, no significant differences were detected over time and between treatments (Table 4).

Physiological parameters

In general, an increase in chlorophyll concentration over time was observed in *P. laevigata* plants growing in both treatments (reference substrate and tailing substrate) (Table 4). However, over time periods of 6, 10, and 12 months, there was a significant reduction in chlorophyll content in plants growing in the tailing substrate compared to those that grew in the reference substrate.

Regarding the chlorophyll content of adult trees (average values (\pm SD) (reference substrate = 29.833 ± 7.019 ; tailing substrate = 28.725 ± 7.0198), Student’s t tests indicated that there is no effect of treatment on chlorophyll levels ($t = -0.5464$, $P > 0.05$).

Heavy metal enrichment in roots and leaves and translocation factor in *Prosopis laevigata* individuals growing in substrate exposed to metals

Roots and leaves of *P. laevigata* plants growing in tailing substrate present enrichment or bioconcentration factor (BCF) of Zn was recorded. In contrast, no enrichment of Pb, Fe, and Cu (Table 5) was detected in any of the structures analyzed. On the other hand, the pattern of the average translocation factor (TF) values was as follows: $Zn > Cu > Fe > Pb$. Furthermore, the pattern obtained according to the percentage of plants that have TF values greater than 1 is the following (in parentheses, the

maximum and minimum TF values are presented): Cu 92.9% (0.75–7.44) > Fe 85.7% (0.62–2.69) > Pb 75.0% (0.71–1.98) > 64.3% Zn (0.29–8.10).

Heavy metals’ effect over macro- and micromorphological and physiological parameters of *Prosopis laevigata*

In general, four metals were detected in *P. laevigata* tissues; only two of them, Zn and Pb, affect two plant structures. In particular, it was observed that Zn explained 10.7% of the variation detected in the plant height character. On the other hand, the Pb explained 8.1% of the variation in the number of leaves (Table 6).

Discussion

Studies are scarce on wild plant species that focus on the transport or accumulation of metals in different structures that use an approach combining an experimental design—both under greenhouse conditions and in natural conditions (mine tailings)—with the purpose of evaluating their potential to phytoremediate polluted environments with HM. According to our knowledge, this is the first study that simultaneously addresses the effect of exposure to metals over time on a combination of biomarkers (genetic, morphological, and physiological) and also to evaluate the potential of *P. laevigata* as a useful species for the purpose of phytoremediation, under this combined approach: in situ–ex situ.

Table 5 Enrichment (bioconcentration factor) and translocation factor of heavy metals in *Prosopis laevigata* plants

Metal	Time (months)	Concentration (mg/kg)						TF	S.D.
		Tailing substrate	Root	Leaf	BCF (root)	BCF (leaf)			
Pb	2	0.23	1.36	1.44	0.17	0.16	0.94		
	4	0.23	1.68	1.53	0.14	0.15	1.10		
	6	0.23	2.22	1.69	0.10	0.14	1.31		
	Average				0.14	0.15	1.12	0.19	
Fe	2	0.4	4.48	2.46	0.09	0.16	1.82		
	4	0.4	3.07	2.18	0.13	0.18	1.41		
	6	0.4	3.29	2.67	0.12	0.15	1.23		
	Average				0.11	0.17	1.49	0.30	
Zn	2	2.14	0.45	0.12	4.76	17.83	3.75		
	4	2.14	0.63	0.16	3.40	13.38	3.94		
	6	2.14	0.12	0.17	17.83	12.59	0.71		
	Average				8.66	14.60	2.80	1.81	
Cu	2	0.04	0.33	0.12	0.12	0.33	2.75		
	4	0.04	0.14	0.08	0.29	0.50	1.75		
	6	0.04	0.09	0.05	0.44	0.80	1.80		
	Average				0.28	0.54	2.10	0.56	

BCF = bioconcentration factor, TF = translocation factor, S.D. = standard deviation

Table 6 Heavy metals' effects over morphological parameters of *Prosopis laevigata* growing under greenhouse conditions

Metal	SS	d.f.	F	P	% variance
Height					
Pb	811.48	1	0.948830	0.335465	1.6
Fe	2219.36	1	2.594996	0.114519	4.4
Zn	5466.44	1	6.391652	0.015219	10.7
Cu	440.90	1	0.515526	0.476639	0.9
Stem diameter					
Pb	2.5983	1	0.236555	0.629175	0.5
Fe	1.2988	1	0.118245	0.732621	0.3
Zn	23.0340	1	2.097073	0.154834	4.5
Cu	0.1089	1	0.009914	0.921150	0.0
Number of leaves					
Pb	47,604.7	1	4.475572	0.040214	8.1
Fe	7864.0	1	0.739334	0.394643	1.3
Zn	987.8	1	0.092868	0.762032	0.2
Cu	853.7	1	0.080260	0.778305	0.1
Chlorophyll content					
Pb	8.1255	1	0.38349	0.539085	0.7
Fe	19.8734	1	0.93795	0.338349	1.8
Zn	59.2309	1	2.79549	0.101965	5.3
Cu	18.1247	1	0.85542	0.360307	1.6
Stomatic coverage					
Pb	1.6188	1	0.26796	0.607357	0.5
Fe	12.8497	1	2.12703	0.151987	4.1
Zn	1.5881	1	0.26287	0.610776	0.5
Cu	0.1426	1	0.02361	0.878601	0.0

d.f. = degrees of freedom, SS = sum of square

Bioaccumulation of heavy metals in *Prosopis laevigata*

In this work, it was found that *P. laevigata* individuals that grew under greenhouse conditions in two treatments (reference substrate and tailing substrate) and adult individuals growing naturally in the mine tailings bioaccumulate Pb, Zn, Cu, and Fe in root and leaf tissue. Also, Fe, Zn, and Cu had a higher concentration in plants growing in the reference substrate compared to the tailing substrate plants. In general, the metal that most accumulates in *P. laevigata* plants in both structures and treatments was Fe, although its concentration remained constant over time. According to these results, a recent study shows that *P. laevigata* is a hyperaccumulator of Fe (Ramírez et al. 2019). In the literature, it has been reported that other plant species that bioaccumulate Fe are *Sanvitalia procumbens* (Lam.) (Asteraceae) (Rosas-Ramírez 2018), *Lactuca sativa* (L.) (Asteraceae), *Brassica oleracea* (L.) (Brassicaceae), *Daucus carota* (L.) (Apiaceae) and *Raphanus sativus* (L.) (Brassicaceae) (Casana and Beltrán 2017), and *Cynara cardunculus* (L.) var. *altilis* DC.

(Asteraceae) (Capozzi et al. 2020). A possible explanation for the high concentrations of this metal in plants is that Fe

is an essential metal and a structural component of porphyrin molecules, such as cytochromes (Rout and Sahoo 2015). In addition, this metal is involved in oxidation-reduction reactions in respiration and photosynthesis, playing an important role in enzyme systems related to chlorophyll synthesis (Kaya et al. 2020). Specifically, in this work, it was found that the highest concentration of this metal is in the root. A similar pattern was detected in *P. laevigata* trees established near a river contaminated with HM (Ramírez et al. 2019) and in soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae)) where Fe was detected in the root elongation areas during the maturation process, as well as in the young lateral roots (Ambler et al. 1971). This metal has also been detected in the root tissue of *R. sativus* (Brassicaceae) (Casana and Beltrán 2017) and in the macrophyte aquatic plant *Phragmites australis* (Cav.) Trin. (Poaceae) (Batty and Younger 2003). It has been suggested that the concentration of root metals is a mechanism of protection against the toxicity of these elements, preventing significant amounts from being translocated to the aerial parts (Batty and Younger 2003).

On the other hand, Pb remained constant in root plants of *P. laevigata* growing in both treatments. However, in leaf, it can be seen that the concentration increases over time in both treatments, which suggests that this metal is being translocated

to aerial parts of plants. Previously, the presence of this metal in foliar tissue of *P. laevigata* individuals was recently reported (Alcalá-Jáuregui et al. 2018). In the literature, there are reports of other plant species that accumulate Pb in leaf tissue. For example, *Brickellia veronicifolia* (Kunth) Grey. (Asteraceae) accumulates Cd, Cu, Ni, and Pb (Hernández-Acosta et al. 2009) in its leaf tissue. Similarly, *Buddleja scordioides* Kunth (Scrophulariaceae) has high concentrations of Pb in leaf tissue also in *Mimosa aculeaticarpa* (Ortega) (Fabaceae) and *Acacia schaffneri* (S. Watson) F.J. Herm. (Fabaceae) (Salas-Luévano et al. 2009). More recently, the presence of Pb in *Plantago lanceolata* (L.) (Plantaginaceae) (Salas-Luévano et al. 2017) and *Schinus molle* (L.) (Anacardiaceae) (Alcalá-Jáuregui et al. 2018) in leaf tissue also has been reported. This could be because Pb inhibits the transport of essential metals such as Cu, Fe, and Zn (Patra et al. 2004), increasing its concentration over time and thus its translocation to the aerial part of the plant. Even a rapid translocation of the root to detoxify and sequester heavy metals in the leaves is a possible defense mechanism against herbivores (Rascio and Navari-Izzo 2011).

On the other hand, Zn bioaccumulates mostly in *P. laevigata* roots compared to leaves. These results are similar with other results found in *Zea mays* (L.) (Poaceae), where a greater bioaccumulation of Zn in root plants in comparison with leaves of corn is exposed to HM in mine tailings (Tovar-Sánchez et al. 2018).

This could occur because the roots are the first organ with which soil metals have contact and can restrict the translocation of these metals to the leaves and fruits, sequestering and inactivating the metals and thus stabilizing their toxicity (Buendía-González et al. 2019; Dinu et al. 2020).

In the case of Cu, its concentration increases over time in both treatments. However, in general, it accumulates mostly in leaves rather than in roots. A higher concentration of Cu in the leaves suggests that this metal could also be translocated from roots to aerial parts over time. This result coincides with those reported in *Z. mays* (Benimeli et al. 2010) and *C. cardunculus* (Capozzi et al. 2020) where this metal was bioaccumulated in greater quantity in leaf tissue compared to root tissue. These results could be explained as Cu is an essential metal which can also be translocated to aerial parts of plants because it is an important component in regulatory proteins. It participates in the transport of electrons in chloroplasts and mitochondria of foliar cells. In addition, it acts as a cofactor of enzymes such as Cu-SOD and cytochrome oxidase and participates in different metabolic processes such as hormonal signaling, cell wall metabolism, and stress response (DalCorso 2012).

Interestingly, we found that Fe, Zn, and Cu had a higher concentration in plants growing in the reference substrate compared to the tailing substrate plants. In general, these results could be explained considering that Quilamula, Morelos, presents a natural richness of mineral soils (mainly sulfur minerals) of silver and lead. The most commonly found are arsenopyrite (FeAsS), galena (PbS), acanthite (Ag₂S), and calclacita (Cu₂S) (Volke et al. 2005). Therefore, the soils of the region may contain some metals.

Genetic damage in individuals of *P. laevigata* growing in greenhouse and mine tailings

The results obtained from individuals growing under greenhouse conditions in both treatments (reference substrate and tailing substrate) indicate a significant increase in genetic damage over time. However, this damage was significantly higher in plants growing in the tailing substrate. This same pattern was found in adult plants that grow naturally in reference substrate and tailing substrate. The increase in genetic damage over time may be possible because as plants grow, the amount of HM that they absorb and translocate to aerial parts also increases, as it was observed in this study for Pb. There is a study where an increase in genetic damage over time was detected in leaves of tobacco plants growing in a substrate from a soil contaminated with heavy metals (Gichner et al. 2006). In general, over time, metals can saturate the sequestration zones of these elements in cells (vacuoles and

cell walls), a fact that can affect the cytoplasm and the nucleus by promoting genetic damage (García 2006; Sánchez-Pinzón 2010).

With reference to genetic damage present in individuals growing in reference substrate in greenhouse and in soil of the control site (Quilamula), it could be occurring because Huautla is an area naturally rich in minerals (Secretaría de Economía 2011) as previously mentioned. For example, the presence of metals has been reported in their bioavailable form in soil of this area, as in the case of Zn, Pb, Cu, and Fe (Solís-Miranda 2016).

Moreover, results indicated that genetic damage was significantly greater in *P. laevigata* plants exposed to HM from tailing substrate in greenhouses and in adult individuals that grow naturally in the study area. Previous studies with *P. laevigata* individuals that are established in the mine tailings of Huautla, Morelos, indicate that this species bioaccumulates Pb, Zn, and Cu and presents significantly greater genetic damage in individuals exposed to HM. Also, a positive and significant relation between the concentration of Cu and Pb accumulated in leaf tissue and genetic damage was detected (Murillo-Herrera 2015). Our results are similar, but in this case, it was found that of four metals detected in tissues of *P. laevigata* individuals, only Pb was related to the levels of genetic damage detected in both treatments. Comparable results were reported in tobacco plants exposed to Pb at different concentrations and exposure times, and greater genetic damage was found in exposed individuals compared to controls (Gichner et al. 2006). It has been documented that Pb can induce chromosomal aberrations because it binds to the components of cell walls or membranes, mineralizing the wall, changing its physicochemical properties, and disorganizing the microtubules (Eun et al. 2000). It has also been reported that this metal produces double- and single-strand breaks of DNA and can replace Zn in repair and replication enzymes with zinc fingers, as well as oxidative stress (Pourrout et al. 2013). Finally, it has been proposed that Pb is involved in the production of reactive oxygen species (Huihuia et al. 2020) causing genetic damage (Ercal et al. 2001). This information shows the possible mechanisms of action through which the Pb detected in the individuals of *P. laevigata* exposed to this metal may be causing the observed genotoxic damage.

Morphological and physiological changes in individuals of *P. laevigata* growing on tailing substrate and reference substrate over time

In general, the results showed a reduction in the macro- and micromorphological characters analyzed in *P. laevigata*

plants growing in tailing substrate over time compared to individuals growing in the reference substrate. A similar response was detected with physiological parameters (chlorophyll content).

Macromorphological characters

The results obtained show that HM bioaccumulation has an effect on plant size, since individuals of *P. laevigata* growing under greenhouse conditions that were exposed to metals have lower values compared to those that grew in reference substrate. This is comparable with results of other studies where a reduction of height plants exposed to soils contaminated with HM was detected. For example, in *Arundo donax* (L.) (Poaceae) growing in a soil contaminated with Pb, a higher concentration of this metal was found in its aerial parts, in addition to a significant reduction in size as well as a thickening of the base of stem (Guo and Miao 2010; Dinu et al. 2020). In the process of cell expansion, the lignification and stiffness of cell wall (Chaoui and El Ferjani 2005) increase, influencing strongly the elasticity and plasticity, increasing tissue stiffness and retarding plant growth (Kabata-Pendias 2011), which can affect the growth of different structures, such as leaves, generating a reduction in their size. This information is relevant because it allows us to explain that in this study, the number of *P. laevigata* leaves was significantly affected by the presence of Pb over time.

Interestingly, the results in terms of the leaves' number revealed an enhanced growth of *P. laevigata* plants growing in the polluted substrate in comparison to individuals growing in the reference substrate. Similar results have been reported in basil *Ocimum basilicum* (L.) (Lamiaceae) (Dinu et al. 2020) under greenhouse conditions. The authors suggest that these results may occur because the presence of the metals at different concentration levels influenced the plant development, being involved in manifold metabolic and physiological processes. For example, the exposure to some metals like Cr, Cd, Pb, and Ni at low concentrations could positively influence the plant growth (Prasad et al. 2011). This process is called hormesis that is the stimulatory effect of sub-inhibitory concentrations of any toxic substances on any organism (Helmstädter 2008). The stimulation response can be seen as an adaptive compensatory process following an initial disruption in homeostasis. Metal ions can act as elicitors of defense responses that in turn can stimulate the growth of plants, particularly under stress conditions (Poschenrieder et al. 2013).

In addition, multiple regressions analysis showed that Zn has an influence on plant height. This result can be explained taking into consideration that one of the toxic effects of Zn is to inhibit the growth of roots and the emergence of lateral roots (DalCorso 2012). It has been documented that the growth and number of roots is essential for nutrient absorption, for water balance, and to support plants (Frankenberger and Arshad 2020). Also, zinc is an essential micronutrient that

affects several metabolic processes of plants (Prasad et al. 2012). Therefore, if these processes are affected, the presence of Zn could compromise the size of the plants. In this context, our results indicate that Zn bioaccumulates in *P. laevigata* roots, a fact that could explain the reduction of the plants size exposed to metals. Other studies have evidenced a decreased growth and development and metabolic alterations in some plant species such as *Lycopersicon esculentum* L. (Solanaceae) (Ali et al. 2015), *Zea mays* and *Oryza sativa* L. (Poaceae) (Yang et al. 2015), and *Brassica juncea* (L.) Coss. (Brassicaceae) (Chaudhry et al. 2020). Finally, it has been documented that the translocation of HM to the aerial part of the plants promotes a break in the balance of nutrients in the root, which affects the process of cell expansion increasing the lignification and stiffness of the cell wall affecting the growth of the plants and, therefore, their size (Chaoui and El Ferjani 2005; Buendía-González et al. 2019).

Micromorphological characters

Stomata are specialized cells by which plants exchange gas, and which permit the entering of CO₂ necessary for photosynthesis. Besides performing perspiration, stomata allow a loss of water vapor belonging to leaf cells and, at the same time, they rapidly diffuse drier air from the outside of each leaf (Kathpalia and Bhatla 2018). The results of this study show that there is a reduction in the stomatic index in *P. laevigata* individuals exposed to tailing substrate compared to individuals growing on the reference substrate in greenhouse. The same pattern was previously reported in individuals of this species growing in the mine tailings and control sites (Hernández-Lorenzo 2015) and in *Beta vulgaris* (L.) (Amaranthaceae) plants grown hydroponically (Sagardoy et al. 2010). This decrease in the number of stomata per unit area (mm²) prevents excessive perspiration of plants; it increases stomatic resistance (Cuypers et al. 2013). The literature indicates that this character can be reduced by exposure to HM, since occlusive cells are very sensitive to chemical stress and changes in position, and the number of stomata can be generated and leaves can fall earlier as a defense mechanism against the metal effects (Rajakaruna and Baker 2006; Rascio and Navari-Izzo 2011). For example, it has been documented that metals such as Pb affect cell walls and stomata and change tissue elasticity (Kabata-Pendias 2011), which could lead to a decrease in stomatic coverage. When plants are exposed to high concentrations of HM, there are direct effects on the guard cells generating hydroactive closure (Bhatla 2018). But, in this study, individuals exposed to metals did not show significant differences in stomatic coverage in comparison to plants growing in the reference substrate. In general, this may occur because plants exposed to metals may present anatomical and physiological changes as an adaptive response to these environmental conditions (Pedrosa-Gomes et al. 2011).

From this perspective, it is important to consider that *P. laevigata* is a species belonging to the Fabaceae family. Most of the representatives of this species family present adaptation mechanisms to deal with high concentrations of metals in soils (Mahar et al. 2016).

Physiological parameters

When chlorophyll content was evaluated in adult trees established naturally in mine tailings and also compared with trees in the control site, it was found that there are no significant differences. Despite this, in individuals growing under greenhouse conditions, there was an effect of the treatment (tailing substrate) on chlorophyll content, since there was a reduction of it in *P. laevigata* individuals exposed to HM. These results are similar with those observed in *S. procumbens*, where there was a reduction in chlorophyll content in plants exposed to Pb contained in tailing substrate (Rosas-Ramírez 2018). Similarly, a reduction in chlorophyll concentration in corn plants exposed to Pb was documented (Yllanes et al. 2014), besides a reduction in photosynthetic pigments in plants exposed to high concentrations of this metal (DalCorso 2012).

It has been documented that the accumulation of HM in toxic concentrations generates different adverse effects on plant physiology, such as inactivation of enzymes, chlorosis, weak growth, and blocking of metabolically important groups such as chlorophyll (Guala et al. 2010; Manara 2012); this can destabilize the cell wall and generate alterations in plant metabolism, affecting their photosynthetic activity (Rascio and Navari-Izzo 2011; Ruiz and Armenta 2012), due to thylakoid damage and modifying the cycle of Calvin, as well as pigmentation alterations that generate chlorosis and cell necrosis (Yadav 2010).

For example, it has been reported that Pb displaces Mg in chlorophyll affecting photosynthesis and electron transport (Singh et al. 2010). HMs also affect the photosynthetic functions of plants inhibiting chlorophyll biosynthesis (Aggarwal et al. 2012), decreasing the total proportion of chlorophyll a and b, which can cause a decrease in the photosynthetic rate (Cenkci et al. 2010; Pourrut et al. 2011). Even so, when chlorophyll in adult trees established in mine tailings and in soil of the control site was measured, no significant differences were observed between treatments, nor in stomatic coverage. This could indicate that over time in adult individuals, physiological adaptations are generated in response to different environmental conditions, which allows them to tolerate HM effects (Pedrosa-Gomes et al. 2011). In this case, these adaptations could be occurring in adult individuals of *P. laevigata*, generating tolerance to HM effects on chlorophyll concentration and stomatic coverage as a stress protection strategy caused by exposure to HM (Maestri et al. 2010; Rascio and Navari-Izzo 2011). This result is comparable with a study in which the

chlorophyll content in leaves of 3-year-old trees of *Olea europea* (L.) (Oleaceae) species exposed to heavy metals was measured with a SPAD device and the results indicated the absence of chlorophyll content loss (Wilson and Pyatt 2007).

Potential of *P. laevigata* as a useful species for phytoremediate soils contaminated with heavy metals

P. laevigata is a tree species of wide geographic distribution in Mexico and is common in disturbed places such as metal-contaminated sites (Salas-Luévano et al. 2017). This species frequently inhabits arid and semi-arid areas and is established along with other species of the same family (Fabaceae) such as *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn. (Ibarra-García et al. 2017) and *V. campechiana* (Santoyo-Martínez et al. 2020). These species are closely related and there are reports that they also bioaccumulate HM such as Pb, Cu, and Zn (Murillo-Herrera 2015; Santoyo-Martínez et al. 2020). However, this is the first report that indicates that *P. laevigata* bioaccumulates Fe in root and foliar tissues in individuals growing in greenhouse; also, Fe was bioaccumulated in *P. laevigata* trees naturally established in the mine tailings. The last result is comparable with a recent study that indicates that *P. laevigata* trees established near a river contaminated with HM hyperaccumulated Fe (Ramírez et al. 2019). In general, it has been documented that plant species used to phytoremediate environments contaminated by metals belong to the following families: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Flacourtaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae, and Euphorbiaceae (Mahar et al. 2016; Salas-Luévano et al. 2017; Mei et al. 2020), these being mostly species of herbaceous life form. The results obtained in the present study propose *P. laevigata* as a tree species with potential use to phytoremediate contaminated sites for the following reasons: (1) *P. laevigata* is an accumulator species of the four metals analyzed (Zn, Pb, Fe, and Cu); therefore, according to literature, a plant can be considered an accumulator if its translocation factor (TF) is equal to or greater than 1 and hyperaccumulating if the values are > 5 (Olguín and Sánchez-Galván 2012; Ali et al. 2013). In this study *P. laevigata* showed the following average FT values: Pb (1119), Fe (1487), Cu (2410), Zn (2798). Considering these values, *P. laevigata* can be considered an accumulator of the four metals analyzed. However, when evaluating at the individual level, the following intervals are observed: Cu 92.9% (0.75–7.44) $>$ Fe 85.7% (0.62–2.69) $>$ Pb 75.0% (0.71 to 1.98) $>$ 64.3% Zn (0.29–8.10). These data suggest that there may be differences in the ability of individuals to carry out this process and that even some plants may be hyperaccumulative as they had FT values > 5 . In addition, the bioaccumulation factor for Zn, both in leaf and in root of *P. laevigata* individuals, was 8662 and 14,598, respectively. According to the TF values observed in this study, there are

individuals of *P. laevigata* that can be accumulators of Pb and Fe, but also hyperaccumulators of Zn and Cu, which is of interest to phytoremediate polluted soils with these metals (Mousavi Kouhi and Moudi 2020). Plants that accumulate higher concentration of metals in aerial parts than their roots show great phytoextraction potential (Mojiri et al. 2013; Ibarra-García et al. 2017; Ramírez et al. 2019). (2) Although a reduction in morphological (macro and micro) and physiological (chlorophyll content) parameters was observed, as well as genetic damage in plants exposed to heavy metals, they did not present mortality. Even adult individuals, grown in mine tailings, have apparently adapted to the presence of metals without altering their chlorophyll levels. The above suggests that plants survive and fulfill a bioaccumulative function (Buendía-González et al. 2019) indicating that individuals of this species may be tolerant to the effects of HM (Ibarra-García et al. 2017; Buendía-González et al. 2019). (3) *P. laevigata* is a nitrogen-fixing plant with the potential to enrich the soil around it, promoting the growth of bushes associated with it and preventing soil erosion (Salas-Luévano et al. 2017). Moreover, it is a host plant for bird and rodent species (Golubov et al. 2001) and influences plant diversity and soil fertility (García-Sánchez et al. 2012). Therefore, it is of great ecological importance. These characteristics also make it a good candidate to be used in phytoremediation processes, as it offers other environmental services in addition to the bioaccumulation of HM. (4) As a plant widely distributed in arid and semi-arid areas of Mexico (Dorado et al. 2005; Salas-Luévano et al. 2017; Navarrete-Gutiérrez et al. 2018) and growing naturally in mine tailings, it is a candidate species to be used in phytoremediation processes in different areas contaminated by mine activity in Mexico (Ibarra-García et al. 2017; Buendía-González et al. 2019).

Due to greater amounts of metals found in roots compared to leaves, and when observing that nonessential metals such as Pb (which are of interest for phytoremediation) increase over time, the plants of *P. laevigata* do not bioaccumulate more of this metal even over 6 months of exposure. With this in mind, two proposals were generated for phytoremediation mine tailings: the first is to harvest all plants after 6 months of exposure during a phytoremediation process, because this species bioaccumulates a greater amount of Pb in roots, but also accumulates other metals in its structure (Fe, Zn, and Cu). The second proposal is to let plants grow until adults, and periodically harvest aerial parts of the trees, since all the metals analyzed are being translocated to aerial parts. Therefore, harvesting leaves periodically will allow the removal of metals. The information generated in this study suggests that *P. laevigata* is a species with potential for phytoremediation of soils contaminated by Fe, Pb, Zn, and Cu. Studies like this one are necessary for the implementation of integral phytoremediation processes that include the use of plant species like those that bioaccumulate different metals in contaminated soils with different metal mixtures.

Conclusion

In this study, *P. laevigata* chronically exposed to heavy metals in greenhouse/experimental conditions and in adult individuals established in mine tailings showed phytoremediation potential based on the calculated TF values and capacity to bioaccumulate HM in roots and leaves. Also, the biomarkers used in this study revealed that this tree species is sensitive to HM exposure because it showed a significant increase in genotoxic damage and changes in physiological and morphological characters as compared with plants growing without the presence of metals. However, *P. laevigata* develops and survives properly in polluted environments with HM. In conclusion, these results suggest that this tree species may be an appropriate candidate for its use in phytoremediation studies in polluted soils mainly for Fe, Zn, Cu, and Pb, due to their ability to establish in abandoned mine tailings and becoming one of the dominant plant species, without affecting plant development and survival, its ability to bioaccumulate HM in roots and leaves, and its high levels of HM translocation.

Finally, we consider that conducting phytoremediation studies with different plant species is an efficient approach to remove distinct metals from soils, so it is necessary to combine plant species to develop more effective strategies that can be used in polluted soil with complex HM mixtures.

Acknowledgments We thank the “Doctorado en Ciencias Naturales,” Autonomous University of Morelos State (UAEM), for the facilities granted to carry out this project. This research was supported by a CONACyT scholarship grant to M.S.M. (Grant: 429356). Also, we thank Rosalind Pearson Hedge for her comments and English edition that improved our manuscript.

Compliance with ethical standards

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

References

- Aggarwal A, Sharma I, Tripathi B, Munjal A, Baunthiyal M, Sharma V (2012) Metal toxicity and photosynthesis. *Photosynthesis: overviews on recent progress and future perspectives*, 229–236
- Alcalá Jáuregui J, Rodríguez Ortíz JC, Hernández Montoya A, Filippini MF, Martínez Carretero E, Díaz Flores PE (2018) Capacity of two vegetative species of heavy metal accumulation. *Rev FCA UNCUYO* 50(1):123–139
- Ali H, Khan E, Sjad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Ali MR, Mehraj H, Jamal Uddin AFM (2015) Effects of foliar application of zinc and boron on growth and yield of summer tomato. *Biosci Agric Res* 06:512–517. <https://doi.org/10.18801/jbar.060115.61>
- Ambler JE, Brown JC, Gauch HG (1971) Sites of Iron reduction in soybean plants. *Agron J* 63:9597

- Arena C, Figlioli F, Sorrentino MC, Izzo LG, Capozzi F, Giordano S, Spagnuolo V (2017) Ultrastructural, protein and photosynthetic alterations induced by Pb and Cd in *Cynara cardunculus* L., and its potential for phytoremediation. *Ecotox Environ Safe* 145:83–89. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.015>
- Ayeni O, Nkaidemi PA, Snyman RG, Odendaal JP (2010) Chemical, biological and physiological indicators of metal pollution in wetlands. *Sci Res Essays* 5:1938–1949. <https://doi.org/10.5897/SER>
- Batty LC, Younger PL (2003) Effects of external iron concentration upon seedling growth and uptake of Fe and phosphate by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. *Ann Bot-London* 92(6):801–806. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg205>
- Benimeli CS, Medina A, Navarro CM, Medina RB, Amoroso MJ, Gómez MI (2010) Bioaccumulation of copper by *Zea mays*: impact on root, shoot and leaf growth. *Water Air Soil Pollut* 210(1–4):365–370. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0259-6>
- Bhatla SC (2018) Light perception and transduction. In: Bhatla SC, Lal MA (eds) *Plant physiology. Development and Metabolism* Springer, Singapore, pp 519–558
- Buendía-González L, Orozco-Villafuerte B, Cruz-Sosa F, Barrera-Díaz CE, Vernon-Carte EJ (2010) *Prosopis laevigata*, a potencial chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bio/Technology* 101:5862–5867. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.027>
- Buendía González L, Cruz Sosa F, Rodríguez Huevo ME, Barrera Díaz CE, Hernández Jaimes C, Orozco Villafuerte J (2019) In vitro simultaneous accumulation of multiple heavy metals by *Prosopis laevigata* seedlings cultures. *Rev Mex Ing Quím* 18(3):1167–1177
- Capozzi F, Sorrentino MC, Caporate AG, Fiorentino N, Giordano S, Spagnuolo V (2020) Exploring the phytoremediation potential of *Cynara cardunculus*: a trial on an industrial soil highly contaminated by heavy metals. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07575-9>
- Casana MM, Beltrán RA (2017) Bioacumulación de cobre, plomo, hierro y zinc en *Lactuca sativa* “lechuga”, *Brassica oleracea* “repollo”, *Daucus carota* “zanahoria” y *Raphanus sativus* “rabanito”. *Conocimiento para el desarrollo* 4(2) <https://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/167>
- Cenkci S, Cigerci IH, Yildiz M, Özyay C, Bozdag A, Terzi H (2010) Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environ Exp Bot* 67:467–473. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.10.001>
- Chaoui A, El Ferjani E (2005) Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *C R Biol* 328(1):23–31. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2004.10.001>
- Chaudhry H, Nisar N, Mehmood S, Iqbal M, Nazir A, Yasir M (2020) Indian mustard *Brassica juncea* efficiency for the accumulation, tolerance and traslocation of zinc from metal contaminated soil. *Biocatal Agric Biotechnol* 23. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101489>
- Covarrubias SA, Peña Cabrales JJ (2017) Contaminación por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Rev Int Cont Amb* 7-21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>
- Cuypers A, Remans T, Weyens N, Colpaert J, Vassilev A, Vangronsveld J (2013) Soil-plant relationships of heavy metals and metalloids. In: Alloway BJ (ed) *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 161–193
- DalCorso G (2012) Heavy metal toxicity in plants. In: Furini A (ed) *Plants and heavy metals* SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Dordrecht pp 1–25. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4441-7_1
- De la Cruz-Landero N, Hernández VE, Guevara E, López-López MA, Santos AT, Ojeda-Trejo E, Alderete Chavez A (2010) Lipinus versicolor response in soils contaminated with heavy metals from a petroleum extraction field. *J Appl Sci* 10(8):694–609
- De la Rosa G, Cruz G, Cano I, Fuentes R, Gardea JL (2008) Efecto de la edad de la planta y presencia de SS-EDDS en la tolerancia y absorción de Cr (III) por *Helianthus annuus*. *Rev Mex Ing Quím* 7:243–251
- Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O (2011) Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropic Subtropic Agroecosyst* 14:597–612
- Dinu C, Vasile GG, Buleandra M, Popa DE, Gheorghie S, Ungureanu EM (2020) Traslocation and accumulation of heavy metals in *Ocimum basilicum* L. plants grown in a mining-contaminated soil. *J Soil Sedim* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02550-w>
- Dorado O, Arias D, Ramírez R, Sousa M (2005) Leguminosas de la Sierra de Huautla Universidad Autónoma del Estado de Morelos Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla 176
- Ercal N, Gurer Orhan H, Aykin Burns N (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1(6):529–539. <https://doi.org/10.2174/1568026013394831>
- Eun SO, Youn HS, Lee Y (2000) Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiol Plant* 110:357–365. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2000.1100310.x>
- Frankenberger WT Jr, Arshad M (2020) *Phytohormones in soils microbial production & function*. CRC Press
- García-Sánchez R, Camargo-Ricalde SL, García-Moya E, Luna-Cavazos M, Romero-Manzanarez A, Montaña M (2012) *Prosopis laevigata* and *Mimosa biuncifera* (Leguminosae), jointly influence plant diversity and soil fertility of a Mexican semiarid ecosystem. *Rev Biol Trop* 60:87–103
- García V (2006) Efectos fisiológicos y compartamentalización radicular en plantas de *Zea mays* L. expuestas a la toxicidad por plomo. Dissertation, Universidad Autónoma de Barcelona
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K (2006) Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotox Environ Safe* 65:420–426. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.08.006>
- Gold-Bouchot G, Zapata-Pérez O (2004) Contaminación, ecotoxicología y manejo costero. In: *El Manejo Costero en México*. Rivera Arriaga E, Villalobos GJ, Azuz Adeath I, Rosado May F. (eds) Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad, Universidad de Quintana Roo, Campeche, Mexico. 654: 277–286
- Golubov J, Mandujano MC, Eguarte LE (2001) The paradox of mesquites (*Prosopis* spp.): invading species or biodiversity enhancers? *Bot Sci* 69:23–30. <https://doi.org/10.17129/botsci.1644>
- Gonçalves AC Jr, Schwantes D, Braga de Sousa RF, Benetoli da Silva TR, Guimar VF, Campagnolo MA, Soares de Vasconcelos E, Zimmermann J (2020) Phytoremediation capacity, growth and physiological responses of *Crambe abyssinica* Hochst on soil contaminated with Cd and Pb. *J Environ Manag* 262:110432. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110342>
- Guala SD, Vega FA, Covelo EF (2010) The dynamics of heavy metals in plant–soil interactions. *Ecol Model* 221:1148–1152
- Guo Z, Miao X (2010) Growth changes and tissues anatomical characteristics of giant reed (*Arundo donax* L.) in soil contaminated with arsenic, cadmium and lead. *J Cent South Univ T* 17:770–777. <https://doi.org/10.1007/s11771-010-0555-8>
- Guo J, Shi R, Cao Y, Luan Y, Zhou Y, Gao Y, Tian Y (2020) Genotoxic effects of imidacloprid in human lymphoblastoid TK6 cells. *Drug Chem Toxicol* 43:208–212. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1497048>
- Helmstädter A (2008) Is there a tonic in the toxin? The Arndt–Schulze law as an explanation for non-linear dose–response relationships. In: Balz V, Schwerin A.v, Stoff H, Wahrig B (eds) *Precarious Matters*.

- The History of Dangerous and Endangered Substances in the 19th and 20th Centuries, Max Planck Institut für Wissenschaftsgeschichte, Berlin, pp. 29–37
- Hernández-Acosta E, Mondragón-Romero E, Cristobal-Acevedo D, Rubiños-Panta JE, Robledo-Santoyo E (2009) Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Rev Chapingo Ser Cie* 15(2):109–114
- Hernández-Lorenzo B (2015) Análisis de la anatomía y morfología de *Prosopis laevigata*, por acumulación de metales pesados en la Sierra de Huautla, Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Dissertation <https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:f1e6be7a-3573-45ac-8d0f-bd0dd2f859d1>
- Huihuia Z, Xina L, Zisonga X, Yueb W, Zhiyuanb T, Meijunc A, Yuehuic Z, Wenxud Z, Nanb X, Guangyub S (2020) Toxic effects of heavy metals Pb and Cd on mulberry (*Morus alba* L.) seedling leaves: photosynthetic function and reactive oxygen species (ROS) metabolism responses. *Ecotox Environ Safe* 195. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110469>
- Ibarra-García AR, Barceló-Quintal ID, García-Albortante J, López-Lafuente AL, González-Huecas C, Quintana-Nieto JR, Mugica-Alvarez V (2017) Phytoextraction of metals by native plants from mining wastes in Zacatecas, Mexico. *Acta Hort* 1227:409–416. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1227.51>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) (2016) Sistema de cuentas nacionales de México. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie>
- Kabata-Pendias A (2011) Trace elements in soil and plants, 4th edn. CRC Press, Boca Raton
- Kathalia R, Bhatla SC (2018) Plant water relations. In: Bhatla SC, Lal MA (eds) *Plant physiology. Development and Metabolism* Springer, Singapore, pp 37–81
- Kaya C, Higgsb D, Ashrafic M, Alyemenid MN, Ahmadd P (2020) Integrative roles of nitric oxide and hydrogen sulfide in melatonin-induced tolerance of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants to iron deficiency and salt stress alone or in combination. *Physiol Plant* 168: 256–277. <https://doi.org/10.1111/pp1.12976>
- Maestri E, Marmiroli M, Visioli G, Marmiroli N (2010) Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environ Exp Bot* 68:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.10.011>
- Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi MK, Lahori AH, Wang Q, Li R, Zhang Z (2016) Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 126:111–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>
- Manara A (2012) Plant responses to heavy metal toxicity. In: Furini A (ed) *Plant and heavy metals*. Springer Science & Business Media, Pisa, Italy, pp 27–53
- Mei Y, Zhou H, Gao L, Zuo YM, Wei KH, Cui NQ (2020) Accumulation of Cu, Cd, Pb, Zn and total P from synthetic stormwater in 30 bioretention plants. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07731-6>
- Mojiri A, Aziz HA, Zahed MA, Aziz SQ, Selamat MRB (2013) Phytoremediation of heavy metals from urban waste leachate by southern cattail (*Typha domingensis*). *Int J Sci Res Environ Sci* 1: 63–70
- Mousavi Kouhi SM, Moudi M (2020) Assessment of phytoremediation potential of native plant species naturally growing in a heavy metal-polluted saline-sodic soil. *Environ Sci Pollut Res* 27:10027–10038. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07578-6>
- Murillo-Herrera AI (2015) Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevigata* de los jales de Sierra de Huautla, Morelos, México provocado por metales pesados. Universidad Nacional Autónoma de México, Dissertation <https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:5d2461a0-1ec2-4d8a-96f3-1ea8ae5f5174>
- Mussali-Galante P, Ávila Costa MR, Piñón Zarate G, Martínez Levy G, Rodríguez Lara V, Rojas Lemus M, Fortoul TI (2005) DNA damage as an early biomarker of effect in human health. *Toxicol Ind Health* 21(5–6):155–166. <https://doi.org/10.1191/0748233705th2240a>
- Mussali-Galante P, Tovar Sánchez E, Valverde M, Rojas del Castillo E (2013) Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Rev Int Contam Ambie* 29:117–140
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8(3): 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Navarrete Gutiérrez DM, Pons MN, Cuevas Sánchez JA, Echevarria G (2018) Is metal hyperaccumulation occurring in ultramafic vegetation of central and southern Mexico? *Ecol Res* 33:641–649. <https://doi.org/10.1007/s11284-018-1574-4>
- Olguín E, Sánchez Galván G (2012) Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnol* 30:3–8. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.05.020>
- Paniagua-Ibáñez M, López-Caamal A, Mussali-Galante P, Sánchez-Salinas E, Ortiz-Hernández LM, Ramírez-Rodríguez R, Tovar-Sánchez E (2015) Morphological variation of *Cosmos bipinnatus* (Asteraceae) and its relation to abiotic variables in Central Mexico. *Rev Chil Hist Nat*:2–13. <https://doi.org/10.1186/s40693-015-0044-4>
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* 52(3):199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.009>
- Pedrosa-Gomes M, Lara Lanza T, Marques D, de Oliveira GM, de Castro E, Soares A (2011) Accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. *Sci Agr* 68:566–573. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000500009>
- Poschenrieder C, Cabot C, Martos S, Gallego B, Barceló J (2013) Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Sci* 212:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.012>
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. In: Whitacre D (ed) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4
- Pourrut B, Shahid M, Douay F, Dumat C, Pinelli E (2013) Molecular mechanisms involved in lead uptake, toxicity and detoxification in higher plants. In: Gupta DK (ed) *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer, Heidelberg, Berlin pp 121–147. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38469-1_7
- Prasad A, Kumar S, Khaliq A, Pandey A (2011) Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biol Fertil Soils* 47:853–861
- Prasad TNVKV, Sudhakar P, Sreenivasulu Y, Latha P, Munaswamy V, Reddy KR, Pradeep T (2012) Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J Plant Nutr* 35(6):905–927. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.663443>
- Rajakaruna N, Baker AJM (2006) Serpentine: a model habitat for botanical research in Sri Lanka. *Ceylon J Sci* 32:1–19
- Ramírez V, Baez A, López P, Bustillos B, Villalobos MA, Carreño R, Contreras JL, Muñoz Rojas J, Fuentes LE, Martínez J, Munive JA (2019) Chromium hyper-tolerant *Bacillus* sp. MH778713 assists phytoremediation of heavy metals by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Front Microbiol* 10:1833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01833>
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?

- Plant Sci 180(2):169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Rodríguez-Sauceda EN, Rojo Martínez GE, Valverde Ramírez B, Martínez Ruíz R, Cong Hermida MC, Medina Torres SM, Piña Ruíz HH (2014) Análisis técnico del árbol del Mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) En México. *Ra Ximhai* 10(3): 173–193
- Rojas E, López MC, Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr* 722:225–254
- Rosas-Ramírez ME (2018) Relación entre la bioacumulación de metales pesados y la concentración de clorofila en *Sanvitalia procumbens*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Dissertation <https://documentcloud.adobe.com/link/review?uri=urn:aaid:scds:US:b942e10e-6309-4556-bb54-1a8c395dd158>
- Rout GR, Sahoo S (2015) Role of iron in plant growth and metabolism. *Rev Agric Sci* 3:1–24. <https://doi.org/10.7831/ras.3.1>
- Ruiz HEA, Armienta HMA (2012) Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev Int Contam Ambie*:103–117
- Sagardoy R, Vázquez S, Florez-Sarasa ID, Albacete A, Ribas-Carbó M, Flexas J, Abadia J, Morales F (2010) Stomatal and mesophyll conductances to CO₂ are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. *New Phytol* 187: 145–158. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03241.x>
- Salas-Luévano MA, Manzanares-Acuña E, Letechipía-de León C, Vega-Carrillo HR (2009) Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian J Exp Sci* 23(1): 27–32
- Salas Luévano MA, Mauricio-Castillo JA, González-Rivera ML, Vega-Carrillo HL, Salas-Muñoz S (2017) Accumulation and phytostabilization of As, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, Mexico. *Environ Earth Sci* 76: 806. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-7139-y>
- Salisbury FT (1968) Las plantas vasculares: forma y función. México: Herrero Hermanos Sucesores pp 598
- Sánchez-Pinzón MS (2010) Contaminación por metales pesados en el Botadero de basuras de Moravia en Medellín: Transferencia a flora y fauna y evaluación del potencial fitorremediador de especies nativas producidas. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, Dissertation
- Santoyo-Martínez M, Mussali-Galante P, Hernández-Plata I, Valencia-Cuevas L, Flores-Morales A, Ortiz-Hernández L, Flores-Trujillo K, Ramos-Quintana F, Tovar-Sánchez E (2020) Heavy metal bioaccumulation and morphological changes in *Vachellia campechiana* (Fabaceae) reveal its potential for phytoextraction of Cr, Cu, and Pb in mine tailings. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07730-7>
- Secretaría de Economía (2011) Panorama Minero del estado de Morelos. Servicio Geológico Mexicano, serie panorama minero de los estados, Pachuca
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2005) Dirección de Investigación en Residuos y Sitios Contaminados Subdirección de Investigación en Sitios Contaminados y Sustancias Tóxicas. Informe 42 anual de actividades. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II. [Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2016]. http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgcnica/metales_eii2005.pdf
- Sharma P, Pandey S (2014) Status of phytoremediation in world scenario. *Int J Environ Bioremediation & Biodegradation* 2:178–191
- Sharma RK, Agrawal M (2005) Biological effects of heavy metals: an overview. *J Environ Biol* 26(2):301–313. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-4-5>
- Shiqi L, Yang B, Kou Y, Zeng J, Wang R, Xiao Y, Li F, Lu Y, Mu Y, Zhao C (2018) Assessing the difference of tolerance and phytoremediation potential in mercury contaminated soil of a nonfood energy crop, *Helianthus tuberosus* L. (Jerusalem artichoke). *Peer J* 6:1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.4325>
- Singh R, Tripathi RD, Dwivedi S, Kumar A, Trivedi PK, Chakrabarty D (2010) Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. *Bioresour Technol* 101:3025–3032. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.031>
- Solís-Miranda BA (2016) Aislamiento de bacterias de jales mineros y análisis de su potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Dissertation <https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:3a5f2873-da05-408d-b7d5-8b170013d30e>
- StatSoft (2000) Correspondence analysis. Tulsa, StatSoft Inc 2000 <http://www.statsoftinc.com/textbook/stcoran.html>
- Suman J, Uhlik O, Viktorova J, Macek T (2018) Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment? *Front Plant Sci* 9:1476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.0147>
- Talavera O, Yta M, Moreno R, Dótor A, Flores N, Durante C (2005) Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact. *Geofis Int* 44:49–64
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H et al (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Tovar-Sánchez E, Mussali Galante P, Martínez-Pacheco M, Ortiz Hernández ML, Sánchez-salinas E, Olvera-Verona A (2016) Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in an arsenic contaminated area in Morelos, Mexico. *Rev Int Contam Ambie* 32:101–117
- Tovar-Sánchez E, Cervantes Ramírez T, Castañeda Bautista J, Gómez Arroyo S, Ortiz Hernández L, Sánchez Salinas E, Mussali Galante P (2018) Response of *Zea mays* to multimetal contaminated soils: a multibiomarker approach. *Ecotoxicology* 27:1161–1177. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1974-9>
- Velasco J, De la Rosa D, Ramírez M, Volke T (2004) Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales Etapa II. SEMARNAT-INE, México pp 46
- Volke ST, Velasco TA, De la Rosa PA, Solórzano OG (2005) Evaluaciones de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México
- Wilson B, Pyatt FB (2007) Heavy metal bioaccumulation by the important food plant, *Olea europaea* L., in an ancient metalliferous polluted area of Cyprus. *B Environ Contam Tox* 78(5):390–394. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9162-2>
- Yadav SK (2010) Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot* 76:167–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yang Z, Chen J, Dou R, Gao X, Mao C, Wang L (2015) Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Int J Env Res Pub He* 12:15100–15109
- Yllanes P, Vélez A, Lozano S (2014) Efectos fitotóxicos del plomo en maíz híbrido Dekalb (*Zea mays* L.) en suelo arenoso y limoso. *Biologist* 12:337–248
- Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ (2006) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ* 368:456–464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>
- Zar JH (2010) Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.