



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS
ENDÓFITOS AISLADOS DE *PROSOPIS LAEVIGATA* DE
LOS JALES DE HUAUTLA, MORELOS**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Lic. CYNTHIA MARGARITA CONCEPCIÓN ACOSTA

DIRECTOR: DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE
CODIRECTOR: DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

CUERNAVACA, MORELOS

Enero, 2021

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS
AISLADOS DE *PROSOPIS LAEVIGATA* DE LOS JALES DE HUAUTLA,
MORELOS**

Tesis realizada por **Cynthia Margarita Concepción Acosta** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: Dra. Patricia Mussali Galante

Título académico, nombre completo

Codirector de tesis: Dr. Jorge Luis Folch Mallo

Título académico, nombre completo

Revisor: Dra. Susana Valencia Díaz

Título académico, nombre completo

Revisor: Dra. Luz María Bretón Deval

Título académico, nombre completo

Revisor: Dr. Efraín Tovar Sánchez

Título académico, nombre completo

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis fue realizada en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LIA) y Biología Molecular de Hongos (LBMH) del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

Agradezco el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgar la beca No. 920002, para la realización de la presente investigación.

A mis tutores:

-Dra. Patty por el apoyo incondicional, el aprendizaje, la dedicación y por toda la paciencia durante estos dos años.

-Dr. Jordi por enseñarme a querer a los hongos como nunca pensé hacerlo.

A mi comité tutorial, el Dr. Efraín, la Dra. Susana y la Dra. Luz, gracias por las sugerencias y las correcciones tras cada examen tutorial y enseñarme que siempre se puede mejorar la forma de presentar para ser un mejor profesional.

A mis compañeros de laboratorio tanto de LIA (Karen, Marcos, Dr. Alexis) y mi máximo apoyo en el LBMH, Gio, miles de gracias por todo lo que me enseñaste de biología molecular y de la morfología de los hongos, pero sobre todo gracias por tu amistad sincera.

A mis bestis Claudia y Victoria gracias por las risas, las fiestas, las horas haciendo tareas, pero en especial gracias por llegar a mi vida para quedarse.

A mi madre por guiarme por este camino difícil siempre con amor y dedicación, espero que esté orgullosa de mí tanto como yo lo estoy de ella.

A mi Papuchi, gracias por la presión ejercida, por cada explicación, por amarme, apoyarme y ser incondicional, por ayudarme a levantarme cuando creía que esto no tenía una salida, en fin, gracias por ser tú.

A mi familia en Cuba, mi abuela, mi tía, mi prima, Paneque gracias por siempre estar para mí, por cada una de las enseñanzas a lo largo de mi vida, todos y cada uno de mis logros son para ustedes.

Miles de gracias a todos por formar parte de esta carrera de resistencia que me ha enseñado tanto.

DEDICATORIA

A mi abuelo que donde sea que te encuentres sepas que todo lo que soy y seré siempre será mi dedicatoria a ti, por siempre creer que llegaría lejos.

A mi Mariana, mi hija, mi princesa, aun no te conozco y ya me das la fuerza necesaria para seguir adelante.

RESUMEN

Se ha realizado diversos estudios en los jales de la Sierra de Huautla, Morelos en relación con la contaminación por metales y sus efectos sobre humanos, animales y plantas que ahí habitan. En dichos estudios se demostró que *Prosopis laevigata* crece en los jales de Huautla, Morelos y bioacumula Pb, Cu y Zn en la raíz y en la parte aérea. No se conoce si la asociación con hongos endófitos confiere a la planta la capacidad de bioacumular mayor cantidad de metales y hacer la fitorremediación más eficiente. Con el interés de llevar a cabo la fitorremediación de sitios contaminados con metales pesados, se propone aislar y caracterizar hongos endófitos de raíces de *Prosopis laevigata* provenientes de los jales localizados en la sierra de Huautla y determinar si la presencia de los hongos endófitos puede favorecer o no la capacidad de acumulación de metales pesados por la planta. Un total de 20 cepas de hongos endófitos se aislaron de raíces de *Prosopis laevigata* en febrero 2019. Se seleccionaron 10 cepas mediante identificación morfológica y se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria sembrando las cepas en medio PDA con zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), plomo ($Pb(NO_3)_2$) y cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) a diferentes concentraciones para descartar las menos tolerantes. La cepa C7 presentó una marcada tolerancia a altas concentraciones de Cu, Zn y Pb, por lo que fue inoculada a plantas de *Prosopis laevigata* previamente germinadas en condiciones de esterilidad, para determinar remoción de metales y promoción de crecimiento vegetal en condiciones de invernadero por un período de 6 meses. Los caracteres macromorfológicos de los individuos que crecieron en sustrato testigo con la cepa C7 formaron un grupo que fue significativamente diferente al resto de los otros tratamientos, independientemente del tiempo de exposición. El cobre fue el único metal que se bioacumuló a través del tiempo de exposición, en hoja y en raíz en presencia del hongo. El hongo favorece la translocación de Cobre de la raíz a la hoja en *P. laevigata*, lo que puede considerarse para estrategias de fitorremediación.

PALABRAS CLAVES

Hongos endófitos, metales pesados, *Prosopis laevigata*, jales, fitorremediación, micorremediación, bioacumulación, caracteres macromorfológicos, factor de translocación.

SUMMARY

Various studies have been carried out in the tailings of the Sierra de Huautla, Morelos in relation to metal contamination and its effects on humans, animals and plants that live there. In these studies, it was demonstrated that *Prosopis laevigata* grows in the tailings of Huautla, Morelos and bioaccumulates Pb, Cu and Zn in the root and in the aerial part. It is not known if the association with endophytic fungi gives the plant the capacity to bioaccumulate more metals and make phytoremediation more efficient. With the interest of carrying out the phytoremediation of sites contaminated with heavy metals, it is proposed to isolate and characterize endophytic fungi from the roots of *Prosopis laevigata* from the tailings located in the Sierra de Huautla and determine if the presence of endophytic fungi can favor or not the ability to accumulate heavy metals by the plant. A total of 20 strains of endophytic fungi were isolated from roots of *Prosopis laevigata* in February 2019. Ten strains were selected by morphological identification and a previous Minimum Inhibitory Concentration was done by seeding the strains in PDA medium with zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), lead ($Pb(NO_3)_2$) and copper ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) at different concentrations to discard the less tolerant. Strain C7 presented a marked tolerance to high concentrations of Cu, Zn and Pb, for which it was inoculated to *Prosopis laevigata* plants previously germinated under sterile conditions, to determine removal of metals and promotion of plant growth under greenhouse conditions by a 6-month period. The macromorphological characters of the individuals who grew in control substrate with the C7 strain formed a group that was significantly different from the rest of the other treatments, regardless of the exposure time. Copper was the only metal that bioaccumulated through exposure time, in leaves and roots, in the presence of the fungus. The fungus does favor the translocation of Copper from the root to the leaf in *P. laevigata*, which can be considered for phytoremediation strategies.

KEY WORDS

Endophytic fungi, heavy metals, *Prosopis laevigata*, tailings, phytoremediation, mycorremediation, bioaccumulation, macromorphological characters, translocation factor.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	14
ACTIVIDAD MINERA.....	14
GENERACIÓN DE RESIDUOS MINEROS (JALES)	14
CONTAMINACION DE SUELOS POR METALES PESADOS	15
TOXICIDAD DE METALES PESADOS	18
EFECTOS DE LOS METALES PESADOS EN LAS PLANTAS	20
BIORREMEDIACION	21
FITORREMEDIACIÓN.....	22
<i>PROSOPIS LAEVIGATA</i> COMO PLANTA HIPERACUMULADORA DE METALES PESADOS.....	24
MICORREMEDIACIÓN.....	25
HONGOS ENDÓFITOS	26
CAPACIDAD DE LOS HONGOS ENDÓFITOS PARA COADYUVAR EN EL PROCESO DE FITORREMEDIACIÓN.....	28
ANTECEDENTES DEL SITIO DE ESTUDIO	29
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
METODOLOGÍA.....	33
SITIO DE ESTUDIO.....	33
COLECTA DE LAS SEMILLAS DE <i>Prosopis Laevigata</i>	33
ENSAYO DE GERMINACIÓN	34
ESCARIFICACIÓN, DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN.....	34
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE RAÍCES DE <i>Prosopis laevigata</i>	34
DESINFECCIÓN DE LOS TEJIDOS (RAÍZ).....	35
AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE RAÍZ.....	35
PRODUCCIÓN DEL MICELIO.....	35
SIEMBRA EN SUSTRATO JAL Y TESTIGO ESTERILIZADO DE PLANTAS DE <i>Prosopis laevigata</i> INOCULADAS CON LA CEPA C7 Y SIN INOCULAR.....	35
PREPARACIÓN DEL INÓCULO	36
PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	36
REMOCIÓN DE METALES PESADOS EN HOJAS Y RAÍCES	36
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL	36

TASA DE CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LAS CEPAS DE HONGOS ENDÓFITOS EVALUADAS	37
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE HONGOS ENDÓFITOS	38
RESULTADOS	39
DESINFECCIÓN DE LOS TEJIDOS Y AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE RAÍCES DE <i>Prosopis laevigata</i>	39
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL 40	
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C1 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO	41
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C2 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO	42
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C5 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO	44
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C7 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO	46
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C8 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO	48
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C10 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO	50
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN PRESENCIA DE LA MEZCLA DE METALES Cu, Zn Y Pb DE LAS CEPAS C1, C2, C7 Y C8	52
INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CARACTERES DE TALLA EN INDIVIDUOS DE <i>Prosopis laevigata</i>	54
EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS CARACTERES DE TALLA EN INDIVIDUOS DE <i>PROSOPIS LAEVIGATA</i>	58
RELACIÓN ENTRE EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN AL TRATAMIENTO Y LOS CARACTERES DA TALLA DE INDIVIDUOS DE <i>PROSOPIS LAEVIGATA</i>	60
BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN INDIVIDUOS DE <i>PROSOPIS LAEVIGATA</i>	61
TIEMPOS DE EXPOSICIÓN	61
COEFICIENTE DE TRANSLOCACIÓN.....	62
IDENTIFICACIÓN MACRO Y MICRO MORFOLÓGICA DE LA CEPA C7	64
DISCUSIÓN.....	65
Concentración Mínima Inhibitoria de las cepas C1, C2, C5, C7, C8, C10 en presencia de Cu, Zn y Pb.....	65
Influencia de la bioacumulación de metales pesados y la presencia de hongos endófitos sobre la expresión de caracteres de talla en individuos de <i>Prosopis laevigata</i>	67
Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y los caracteres de talla de individuos de <i>Prosopis laevigata</i>	70
Bioacumulación de metales pesados en individuos de <i>Prosopis laevigata</i>	71
Tiempos de exposición	71

Coeficiente de translocación.....	71
CONCLUSIONES	75
PERSPECTIVAS	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE DE CUADROS

No. Tabla	Título	Página
1	Límites máximos permisibles de metales pesados en suelos (Semarnat, 2007).	21
2	Ventajas y desventajas de la fitorremediación.	22
3	Mecanismos de fitorremediación.	24
4	Resultados de la prueba de crecimiento de los hongos endófitos con Cobre (50 y 200 ppm), Zinc (300 y 1600 ppm) y Plomo (600 y 4000 ppm). Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C1 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).	40
5	Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C2 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).	42
6	Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C5 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).	44
7	Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C7 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).	46
8	Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C8 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).	48
9	Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C10 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).	50
10	Tasa de crecimiento (T/C) diaria (cm) de la cepa C1, C2, C7 y C8, y porcentaje de inhibición (P/I) a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en el mismo medio.	52
11	Resultados derivados del Análisis de Función Discriminante (AFD) con base a los caracteres de talla de individuos de <i>Prosopis laevigata</i> bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan los caracteres que tienen un mayor peso en el análisis de función discriminante.	54
12	Valores promedio (\pm e.e.) y análisis de varianza de una vía para detectar el efecto de los tratamientos sobre los caracteres de talla en individuos de <i>Prosopis laevigata</i> bajo condiciones de invernadero. Letras diferentes denotan diferencias significativas con una $P < 0.05$ (Tukey).	58
13	Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y los caracteres de talla en individuos de <i>Prosopis laevigata</i> bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan las relaciones estadísticamente significativas.	59
14	Valores de bioacumulación de metales pesados (mg Kg ⁻¹) promedio (\pm desviación estándar) en raíz y hoja de individuos de <i>Prosopis laevigata</i> bajo condiciones de invernadero.	60
15	Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y los niveles de bioacumulación de metales pesados en tejidos de <i>Prosopis laevigata</i> bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan las relaciones estadísticamente significativas.	61
16	Coeficiente de translocación promedio en individuos de <i>Prosopis laevigata</i> a través del tiempo de exposición a sustrato jale en condiciones de invernadero. En negritas se denotan los valores de translocación superiores a 1.	62
17		63

18	Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y el coeficiente de translocación de metales en <i>Prosopis laevigata</i> bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan las relaciones estadísticamente significativas.	63
-----------	---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Título	Página
1	Toxicidad ocasionada por los metales pesados sobre las biomoléculas. (McGrath et al., 2002).	19
2	Medio de cultivo PDA inoculados con el tejido desinfectado de <i>Prosopis laevigata</i> .	39
3	10 cepas aislados de raíces de <i>Prosopis laevigata</i> en los jales de Huautla, Morelos.	39
4	CMI de la cepa C1 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$).	41
5	CMI de la cepa C2 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$).	43
6	CMI de la cepa C5 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$).	45
7	CMI de la cepa C7 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$).	47
8	CMI de la cepa C8 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$).	49
9	CMI de la cepa C10 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm),	51

- los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$).
- 10** CMI de la cepa C1, C2, C7 y C8 en presencia de diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en un mismo medio, los valores de crecimiento representan el promedio del triplicado de cada condición evaluada (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$). **53**
- 11** Gráfico de AFD 1 vs AFD 2 de caracteres de talla de individuos de *Prosopis laevigata* en seis tiempos de exposición en cuatro tratamientos, utilizando Análisis de Función Discriminante (AFD). Cada punto es una representación bidimensional (eje 1 y eje 2) de la ordenación de caracteres de talla. Los puntos que están muy juntos tienen una mayor similitud en comparación con los puntos que están más separados. Tratamientos: testigo con hongo (●), testigo sin hongo (+), jal con hongo (□), jal sin hongo (◇). **55**
- 12** Caracterización macroscópica de la cepa C7 en medio de cultivo PDA. **64**
- 13** Caracterización microscópica de la cepa C7 al objetivo de 10X con tinción azul de lactofenol. A partir de cultivos de la cepa C7 en medio PDA se extrajo el ADN genómico. **64**

INTRODUCCIÓN

ACTIVIDAD MINERA

La minería es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, practicada desde la época prehispánica y fuente de la expansión regional desde la Colonia. En el desarrollo del país es un factor importante de modernización y avance, al suministrar insumos a prácticamente todas las industrias (Hernández-Acosta et al., 2009). Aún hoy tras más de cuatro siglos de minería en México, sigue siendo un reto el desarrollo de nuevas tecnologías para aprovechar los recursos minerales e incrementar sus reservas. El potencial de México como país minero sigue siendo alto. En la actualidad es uno de los países más importantes en cuanto a riqueza mineral, tanto por calidad como por cantidad de especies minerales, hasta el momento en México se han descubierto 68 minerales, lo que lo convierte en un país mineralógico de importancia mundial (Canet & Camprubi, 2006).

Sin embargo, esta actividad genera grandes cantidades de desechos que pueden convertirse en fuentes de metales pesados contribuyendo a la formación de “jales”. En los jales, los principales metales contaminantes considerando su toxicidad y abundancia son: mercurio (Hg), arsénico (As) (cabe destacar que el arsénico es un metaloide), plomo (Pb) y en algunos lugares el cromo (Cr) (Bremauntz, 2004); (Sepúlveda, 2005); (F. M. Romero & Gutiérrez Ruíz, 2010).

GENERACIÓN DE RESIDUOS MINEROS (JALES)

Los jales, colas o relaves, como se conocen en otros países de América Latina, se definen como lodos residuales generados durante el proceso de beneficio del mineral económicamente aprovechable (González et al., 2005). Son originados después de que las rocas que contienen a los metales son molidas y mezcladas con agua y otras sustancias químicas que facilitan su obtención (Marín-Guirao et al., 2005). El nivel de peligrosidad generado por los jales depende de la naturaleza tóxica del residuo, de la geología de la mina, las concentraciones de metales y metaloides (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Se, Zn, etc.), y la influencia que ejercen los factores bióticos y abióticos sobre los residuos. Los daños al ecosistema derivados de la minería, son causados por los contaminantes que se generen en los jales, además de los que puedan ser transportados por las erosiones hídricas

provocando así un desplazamiento de estos contaminantes a zonas que antes no estaban afectadas (Corrales-Pérez & Romero, 2013).

Los principales daños causados por los jales al medio ambiente están relacionados con la generación de drenaje ácido y su dispersión a través de la erosión hídrica. La oxidación de los sulfuros metálicos genera drenajes ácidos, que no son más que soluciones con bajos pH y altas concentraciones de Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT) disueltos (Z. Lin, 1997); (Johnson et al., 2000); (Moncur et al., 2005). Dichas soluciones al ser desplazadas por las erosiones hídricas, constituyen un problema ambiental de gran magnitud al contaminar suelos, sedimentos, aguas superficiales y aguas subterráneas (Bain et al., 2000); (Armienta et al., 2001); (Jung, 2001).

En la actualidad aún no se conoce el número de jales en México que puedan estar causando contaminaciones al ambiente y en qué condiciones se encuentren, pero más de 80 siguen en funcionamiento. Históricamente, los jales se han generado cerca de las minas sin tomar en cuenta medidas para evitar el desarrollo de contaminantes que puedan convertirse en un riesgo tanto para la salud, humana, animal como ambiental de la región donde estos se encuentren ubicados (F. M. Romero & Gutiérrez Ruíz, 2010).

CONTAMINACION DE SUELOS POR METALES PESADOS

El término de metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una densidad mayor a 5g/cm^3 en su forma elemental y sea tóxico debido a que pueden transportarse inespecíficamente al interior de la célula ocasionando daño a las membranas, inactivación enzimática, perturbación de funciones celulares, daño al ADN y estrés oxidativo (Olaniran et al., 2013). Se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. Algunos metales tienen un papel vital para los microorganismos debido a que están involucrados en procesos de óxido-reducción, estabilización de moléculas y regulación osmótica por lo que son considerados esenciales (Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, K, Na y Zn). Sin embargo, también hay metales que se consideran como elementos no esenciales debido a que no tienen una función biológica (Ag, Al, Cd, Au, Pb y Hg) (Bruins et al., 2000); (Cañizares-Villanueva, 2000) por lo que no pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica. Por esta razón

tienden a bioacumularse en diferentes organismos volviéndose potencialmente peligrosos (Méndez et al., 2009).

La contaminación por metales pesados es causada por agentes naturales y antropogénicos. Las causas naturales pueden ser por actividad volcánica, procesos de formación de suelos, meteoros, erosión de rocas, terremotos, tsunamis. Las causas antropogénicas pueden ser la combustión de carburantes fósiles, emisiones vehiculares e industriales (Pachón & Vela, 2008), residuos (incineración, depósito), algunos sistemas de producción agrícola suponen la adición directa durante largos períodos de tiempo de metales pesados asociados a diferentes fertilizantes, fundamentalmente Cd por el uso de fosfatos y N por el uso de nitrato de calcio, adición de pesticidas ricos en Zn, arseniatos de Cu y Pb y distintos compuestos órgano-metálicos (McGrath & Zhao, 2003) y la actividad minera (Navarro-Aviñó et al., 2007).

Los suelos que quedan tras una explotación minera contienen todo tipo de materiales residuales: ácido sulfúrico, cal, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, sulfato de cobre, cianuro de sodio, sulfuro de zinc, sulfuro de sodio, aminas, aceites, diferentes alcoholes, etc. Estos compuestos suelen encontrarse en los jales y son una fuente importante de EPT como As, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, (F. M. Romero et al., 2008) lo que representa graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal, siendo sus características más notables las siguientes (Puga et al., 2006):

1-Clase textural desequilibrada: las operaciones mineras generalmente producen una selección en el tamaño de las partículas quedando materiales homométricos, lo que significa que todos los materiales presentes tendrán igual tamaño y predominarán las fracciones de más de 2 mm; gruesas, grava y arena (Morlans, 1852). La estructura del suelo se encuentra dividida en tres tipos de capas a las que se les llama horizontes y su diferenciación se debe tanto a la dinámica interna, ya sea por su composición y textura, como al transporte vertical debido a la lixiviación o la capilaridad. El horizonte B, también llamado subsuelo, es el más grande, se compone de materiales provenientes de fragmentos de rocas como la arena gruesa y liviana, que cumple funciones de filtración; el limo, el cual mantiene la homeostasis y la arcilla, que retiene el agua. Por lo que al solo estar presente una sola de estas fracciones se verá afectadas cada una de

estas funciones y por consiguiente la fertilidad del suelo (S. E. G. Romero et al., 2008).

2-Ausencia o baja presencia de la estructura edáfica: Se debe a la escasez de componentes coloidales, especialmente de los orgánicos; lo anterior ocasiona que las partículas quedan sueltas o forman paquetes masivos o estratificados, en consecuencia se acumulan los contaminantes en el suelo al no poder ser degradados por los microorganismos (Morlans, 1852).

3-Propiedades químicas anómalas: Los suelos de las minas son sistemas que en general han sufrido una oxidación intensa y acelerada (casi todas las reacciones de oxidación son acidificantes), que hacen descender el pH del suelo (<3) (Morlans, 1852). La presencia de condiciones de acidez crea un ambiente hiperácido e hiperoxidante, además de la producción de especies iónicas características de estos ambientes que son altamente tóxicas para los organismos acuáticos o terrestres (metales pesados como Al, Fe, Mn, Pb, Cu, Zn). Por lo que el medio no es apto para el desarrollo de los organismos y por ello muy difícilmente edafizable (S. E. G. Romero et al., 2008).

4-Disminución o desequilibrio en el contenido de nutrientes fundamentales: Dado que la actividad biológica está fuertemente reducida se presentan fuertes carencias de los principales elementos biogénicos: C, N y P, derivados del metabolismo de dichos microorganismos (Morlans, 1852). Para favorecer la actividad microbiana y metabólica, los nutrientes juegan un papel esencial por lo cual se deben encontrar en las cantidades apropiadas para su asimilación y síntesis según su requerimiento.

5-Ruptura de los ciclos biogeoquímicos: Debido a que en los procesos mineros se suelen eliminar los horizontes superficiales, que son aquellos biológicamente activos (Morlans, 1852).

6-Baja profundidad efectiva: El suelo tiene un espesor muy limitado (Morlans, 1852).

7-Dificultad de enraizamiento: Como consecuencia de la extrema delgadez del suelo las raíces solo pueden desarrollarse en la fina capa superficial (Morlans, 1852).

8-Baja retención de agua: Como consecuencia de la ausencia de los materiales dotados de propiedades coloidales y de estructura del suelo (Morlans, 1852).

9-Presencia de compuestos tóxicos: Los cuales impiden o dificultan la rápida colonización de los depósitos por los microorganismos. La estructura química del contaminante ya sea por la cantidad de enlaces y grupos funcionales o al polimerizarse conlleva a que resulte más difícil su incorporación al metabolismo microbiano, y por tanto se vuelvan potencialmente tóxicos (S. E. G. Romero et al., 2008).

TOXICIDAD DE METALES PESADOS

Actualmente, el término metal pesado es utilizado para referirse de una manera amplia a aquellos metales o metaloides con potencial de causar toxicidad (Alloway, 2012). Los principales mecanismos de toxicidad a nivel molecular son:

1. Bloqueo de grupos funcionales esenciales en biomoléculas, debido a la alta afinidad de los cationes metálicos por los grupos sulfhidrilos de las proteínas, específicamente a los residuos de cisteína, lo que ocasiona su desnaturalización (Schutzendubel & Polle, 2002); (Peralta-Videa et al., 2009).

2. El desplazamiento de centros catiónicos en enzimas importantes, como es el caso de la ribulosa1-5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco), la cual tiene un centro catiónico de Mg^{2+} que puede ser desplazado en presencia de cationes divalentes como Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . Dicho desplazamiento provoca que la enzima pierda su función (Smeets et al., 2005).

3. Por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) debido a la autooxidación de metales como Fe^{2+} o Cu^{+} , lo que resulta en la formación de H_2O_2 y del radical OH^{\cdot} vía reacción de Fenton (Schutzendubel & Polle, 2002). El radical OH^{\cdot} es uno de los más reactivos que se conocen, por su capacidad de iniciar reacciones en cadena de radicales libres que ocasionan modificaciones y daño irreversible a biomoléculas como carbohidratos, ADN, proteínas y particularmente lípidos (Mithöfer et al., 2004) que forman la membrana celular, produciendo peroxidaciones que debilitan la membrana y aumentan su permeabilidad. Debido a esto, las ERO conducen a alteraciones en la estructura celular (Hattab et al., 2009). En las plantas, dichos cambios aceleran la

senescencia o la muerte del organismo (Stobrawa & Lorenc-Plucińska, 2008) (Figura 1).

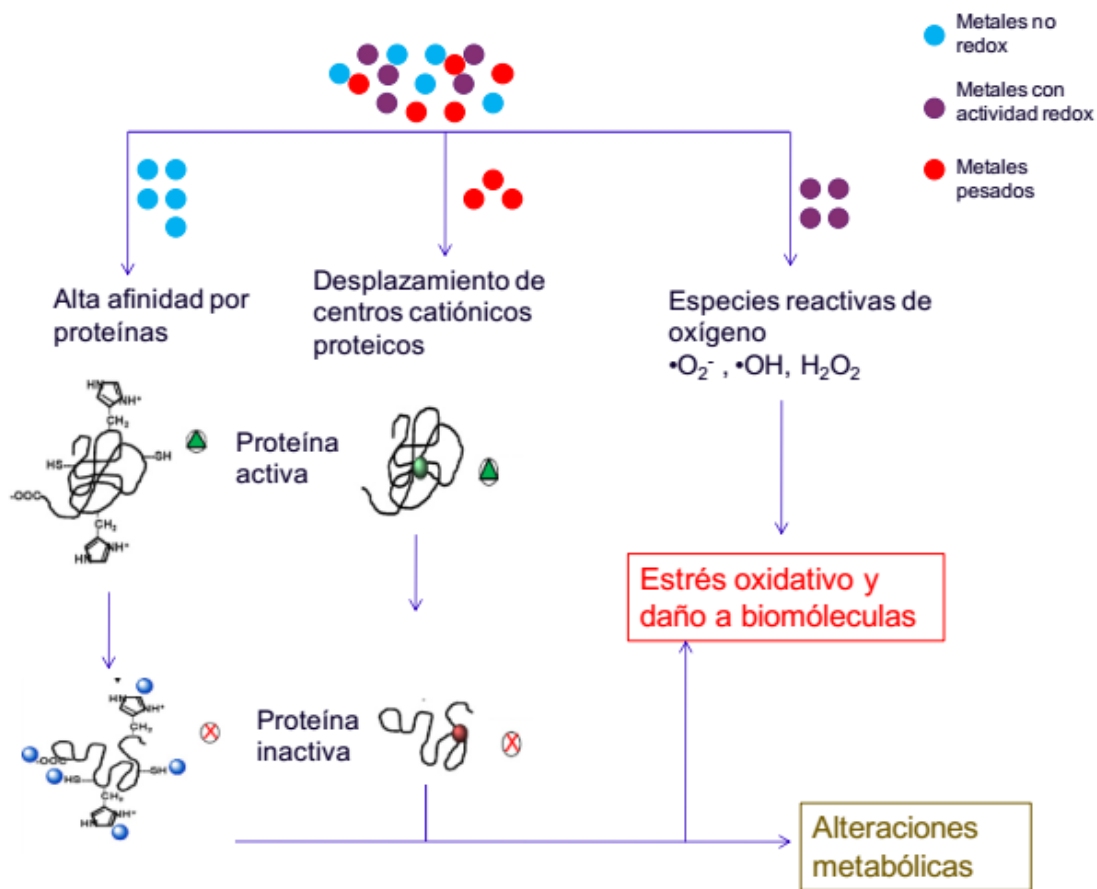


Figura 1. Toxicidad ocasionada por los metales pesados sobre las biomoléculas (McGrath et al., 2002)

El problema esencial es que debido a la semejanza entre muchos contaminantes y los elementos trazas esenciales, las células pueden incorporar elementos tóxicos que quedan dentro de ellas o incorporados en su membrana causando un daño letal (Navarro-Aviñó et al., 2007). En las células vegetales, los MP pueden unirse a átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno, y sustituir metales esenciales, alterando así diversas funciones. Sin embargo, ciertas plantas poseen mecanismos por los que pueden tolerar la presencia de MP, entre éstos se encuentran la unión del metal a la pared celular, su compartimentalización en la vacuola y la activación de sistemas enzimáticos y no enzimáticos que eliminan especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la presencia de MP. Las plantas pueden generar estrategias para limitar los efectos negativos de la toxicidad del metal y su respuesta debe ser estrictamente regulada para reducir

los daños causados por los metales asegurando la correcta homeostasis de los minerales esenciales (Y.-F. Lin & Aarts, 2012).

EFFECTOS DE LOS METALES PESADOS EN LAS PLANTAS

Las plantas que acumulan metales pesados tienen diferentes respuestas dependiendo de la disponibilidad de los metales en el suelo, éstas son capaces de sobrevivir o de reproducirse en ambientes con alto contenido de metales. Sin embargo, la excesiva concentración de metales pesados puede causar diversos efectos sobre la planta. Debido a que los metales sustituyen al ion magnesio (Mg^{2+}) en la molécula de la clorofila, afectando la captación de fotones, se generan afectaciones en la actividad fotosintética y la producción de clorofila. En el fotosistema II (PSII), el transporte electrónico fotosintético y el desprendimiento de oxígeno quedarían inhibidos, debido a la sustitución competitiva del Mg^{2+} por los MP en el sitio de la fotólisis del agua (Van Assche & Clijsters, 1986); (Ralph & Burchett, 1998). Cuando un metal se encuentra en exceso dentro de un organismo puede unirse a grupos funcionales que contienen átomos de azufre, nitrógeno u oxígeno o puede desplazar a otros metales de características fisicoquímicas similares. Sí, además, el metal tiene actividad redox, como el Cu, Fe o Mn, puede intervenir en procesos de transferencia de electrones y catalizar la formación de radicales libres (Pernía et al., 2008).

El Cu inhibe el crecimiento de las plantas y daña los procesos celulares como la respiración mitocondrial, metabolismo de la pared celular y la señalización de hormonas (Raven et al., 1999). El Pb viaja desde las raíces hasta el xilema de las hojas como iones libres, uniéndose preferentemente al O_2 , grupos aminos o sulfhidrilos y ocasiona estrés iónico. Además, algunos autores plantean, que la fitotoxicidad del plomo va a influir en la permeabilidad de la membrana celular, en las reacciones de grupos sulfhidrilos (-SH) con cationes y en la afinidad para reaccionar con grupos fosfatos, lo que puede provocar pérdida de funciones en las proteínas de los tejidos (Ortiz et al., 2006); (Raven et al., 1999).

En general, los efectos en plantas que crecen en ambientes contaminados por metales son: inhibición del crecimiento de la raíz, (Wójcik et al., 2005); (Intawongse & Dean, 2006); (DalCorso et al., 2008), alteraciones en la biomasa radicular, incremento de la defoliación, aumento en el número de pelos radicales y reducción en el número de brotes (Buendía-González et al., 2010).

Dada la alta toxicidad y los diferentes efectos que los MP pueden causar en las plantas, se han establecido límites máximos permisibles (LMP), los cuales se muestran en la tabla 1

Tabla 1. Límites máximos permisibles de metales pesados en suelos (Semarnat, 2007).

Metal	Suelo uso agrícola/residencial/comercial (mg/kg)	Suelo uso industrial (mg/kg)
As	22	260
Hg	23	310
Pb	400	800
Cr (VI)	280	510

Un aspecto que debe recordarse es que los metales pesados pueden contaminar los suelos por largos períodos de tiempo. Por tanto, representan un riesgo permanente para la salud ambiental y humana. En consecuencia, surge la necesidad de tratar, descontaminar, y remediar suelos contaminados por metales pesados (Navarro-Aviñó et al., 2007).

BIORREMEDIACION

Las prácticas de biorremediación usan diferentes organismos (plantas, microorganismos; ya sean hongos, levaduras o bacterias) para eliminar elementos contaminantes de los ecosistemas que puedan afectar la salud humana, animal o vegetal (Rodríguez, 2003). Existen diversos tipos de biorremediación, uno de ellos se basa en el empleo de plantas hiperacumuladoras de metales pesado, las cuales desarrollan mecanismos de tolerancia, eliminando así los contaminantes del suelo (Carpena & Bernal, 2007).

El proceso de biorremediación puede clasificarse de la siguiente manera (Marivela et al., 2002):

Biorremediación microbiana. Uso de microorganismos con la capacidad de acumular o metabolizar metales pesados, lo cual ha experimentado un gran desarrollo. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han empleado otros microorganismos como

hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

Fitorremediación. Consiste en el uso de plantas para contener, remover o neutralizar metales pesados. Es el método más usado para la biorremediación de metales.

FITORREMEDIACIÓN

La fitorremediación es un conjunto de tecnologías que reducen *in situ* o *ex situ* la concentración de diversos compuestos metálicos a partir de procesos bioquímicos y microorganismos asociados a ellas. Utiliza las plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes (Kelley et al., 2000). Las fitotecnologías se basan en los mecanismos fisiológicos básicos que tienen lugar en las plantas y en los microorganismos asociados a ellas, tales como: transpiración, fotosíntesis, metabolismo y nutrición (Ghosh & Singh, 2005). Estas fitotecnologías ofrecen numerosas ventajas en relación con los métodos fisicoquímicos que se usan en la actualidad. Tabla 2 (Delgadillo-López et al., 2011).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación.

Ventajas	Desventajas
Es una tecnología sustentable.	En especies como los árboles o arbustos, la fitorremediación es un proceso relativamente lento.
Es eficiente tanto para contaminantes orgánicos como inorgánicos.	Se restringe a sitios de contaminación superficial dentro de la rizósfera de la planta.
Se realiza sin necesidad de transportar el sustrato contaminado, con lo que se disminuye la diseminación de contaminantes a través del aire o del agua.	El crecimiento de las plantas está limitado por concentraciones tóxicas de contaminantes, por lo tanto, es aplicable a ambientes con concentraciones bajas de contaminantes.
Es de bajo costo.	Los contaminantes acumulados en maderas pueden liberarse por procesos de combustión.
No requiere personal especializado para su manejo.	No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras.
Actúa positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, debido a la formación de una cubierta vegetal.	La solubilidad de algunos contaminantes puede incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de contaminantes.

Ventajas	Desventajas
No requiere consumo de energía.	Se requieren áreas relativamente grandes.
Sólo requiere de prácticas agronómicas convencionales.	En sistemas acuáticos se puede favorecer la diseminación de plagas tales como los mosquitos.
Es poco perjudicial para el ambiente.	
Permite el reciclado de recursos (agua, biomasa, metales).	
Tiene una alta probabilidad de ser aceptada por el público, ya que es estéticamente agradable.	

La fitorremediación puede aplicarse eficientemente para tratar suelos contaminados con compuestos orgánicos como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos; solventes clorados; desechos de nitrotolueno; agroquímicos clorados y organofosforados; además de compuestos inorgánicos como Cd, Cr (VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn (Betancur et al., 2005).

Se han identificado una amplia diversidad de especies vegetales que se emplean para este fin. Algunas de ellas, debido a su gran capacidad para acumular metales pesados, reciben el nombre de hiperacumuladoras. Por definición, estas plantas deben acumular al menos 100 µg/g (0.01 % peso seco) de Cd y As; 1000 µg/g (0.1 % peso seco) de Co, Cu, Cr, Ni y Pb; y 10 000 µg/g (1.0 % peso seco) de Mn (Watanabe, 1997); (Reeves et al., 1999); (McGrath et al., 2001); (Kamal et al., 2004); (Yang et al., 2004); (Reeves, 2006); (Padmavathiamma & Li, 2007); (Delgadillo-López et al., 2011).

Esta tecnología se hace más efectiva a través de la manipulación genética, lo que mejora la capacidad de remediación de las plantas (Cherian & Oliveira, 2005). Se han diseñado especies vegetales con una mayor capacidad de degradación de contaminantes orgánicos o de acumulación de metales pesados. Algunas plantas genéticamente modificadas están adaptadas específicamente para la fitorremediación de Cd, Hg o bifenilos policlorados (Raskin, 1996); (Meagher, 2000); (Pilon-Smits & Pilon, 2002); (Eapen et al., 2007); (Macek et al., 2008). (Tabla 3).

Tabla 3. Mecanismos de fitorremediación.

Proceso	Mecanismo	Contaminantes
Fitoestabilización	Complejación o Quelación	Orgánicos e inorgánicos (Pb, Cd, Hg, Zn, Cu)
Fitoextracción	Hiperacumulación	Inorgánicos (As, Cr, Cd, Pb, Se, Ni)
Fitovolatilización	Volatilización a través de las hojas	Orgánicos e inorgánicos (Hg)
Fitoimmobilización	Acumulación en la rizosfera	Orgánicos e inorgánicos (Cd, Cu, Zn, As, Pb)
Fitodegradación	Uso de plantas y microorganismos asociados para degradar	Orgánicos
Rizofiltración	Uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua	Orgánicos e inorgánicos (As, Cr, B, Cu, Pb, Cd, Zn)

Dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones del sitio y el nivel de limpieza requerido; las tecnologías de fitorremediación se pueden utilizar como medio de contención (rizofiltración, fitoestabilización y fitoimmobilización) o eliminación (fitodegradación, fitoextracción y fitovolatilización) (Thangavel & Subbhuraam, 2004). En México las investigaciones se han enfocado al proceso de fitoextracción partiendo de la utilización de plantas nativas acumuladoras de metales y del conocimiento de la diversidad microbiana de cada zona particular para obtener aislados que promuevan el crecimiento vegetal y ayuden al proceso de fitorremediación al ser inoculados en las plantas (Covarrubias & Cabriales, 2017).

PROSOPIS LAEVIGATA COMO PLANTA HIPERACUMULADORA DE METALES PESADOS.

El establecimiento de especies vegetales en suelos ricos en metales pesados depende de la capacidad de las plantas para desarrollar mecanismos de tolerancia (Y.-F. Lin & Aarts, 2012). Una de las estrategias empleadas por las plantas para tolerar elevadas concentraciones de metales en el suelo es la absorción y acumulación activa en su biomasa aérea (estrategia acumuladora), lo que requiere una fisiología altamente especializada (Lázaro et al., 2002), estas plantas son llamadas hiperacumuladoras y hace referencia a plantas que tienen la capacidad de crecer en suelos metalíferos y acumular altas concentraciones de metales pesados en los órganos aéreos por encima de los niveles que se encuentran en la mayoría de especies, presentando pocos efectos fitotóxicos (Rascio & Navari-Izzo, 2011).

Prosopis laevigata es una leguminosa de la familia Fabaceae considerada una especie hiperacumuladora, ya que se puede establecer en suelos con altos contenidos de metales pesados y acumularlos en sus órganos aéreos (Haque et al., 2008); (Mokgalaka-Matlala et al., 2008). Crece principalmente en zonas áridas y semiáridas, con alto contenido de sal y suelo deficiente en nutrientes (García-Sánchez et al., 2012). Es de gran importancia ecológica por el papel que desempeña dentro del ecosistema de las zonas áridas, ya que controla la erosión, debido a su asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno, que fijan el nitrógeno de la atmósfera mejorando su fertilidad (Carrillo, 2006). Es un recurso que puede ser utilizado para la recuperación de tierras agrícolas con problemas de salinidad en suelo y agua, además se considera útil para estabilizar y mejorar el suelo al incrementar el contenido de materia orgánica, mejora la capacidad de almacenamiento de agua y la tasa de infiltración y posee una de las capacidades fotosintéticas más altas (Ruíz, 2011). De ahí la importancia de su empleo en estudios de fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

MICORREMEDIACIÓN

La micorremediación es el uso de hongos para degradar o remover contaminantes del ambiente. Los hongos tienen una gran capacidad para desarmar y romper largas y complejas cadenas de los contaminantes más recalcitrantes, convirtiéndolos en cadenas más simples y químicamente menos tóxicas (Stamets, 2005); (Singh, 2006).

La micorremediación emplea el micelio de especies de hongos seleccionados para remover o degradar contaminantes del ambiente. Ha sido demostrado, a escala de laboratorio, que la micorremediación opera en períodos de tiempo de semanas a meses y que es efectiva en la remoción de componentes recalcitrantes y tóxicos, con moléculas aromáticas de alta masa molecular de productos derivados del petróleo (hidrocarburos aromáticos policíclicos con más de 4 anillos) que son más difícilmente degradados por otros sistemas microbiológicos (Thomas et al., 1998).

Los micelios segregan enzimas extracelulares y ácidos capaces de descomponer la celulosa y la lignina, componentes estructurales de la fibra vegetal, de esta manera los ecosistemas procesan con mucha mayor rapidez y

efectividad la materia orgánica muerta y la convierten en nutrientes para las plantas, con las que se asocian (Stamets, 2005).

HONGOS ENDÓFITOS

Debido a que los suelos contaminados con jales mineros son a menudo pobres en nutrientes, se busca el uso de microorganismos que puedan aportar los elementos necesarios para el crecimiento de las plantas y que a su vez tengan la capacidad de crecer en concentraciones altas de metales pesados (Covarrubias & Cabriales, 2017).

El término endófito se conoce desde el siglo XIX y se usó inicialmente para agrupar aquellos organismos fúngicos que viven dentro de las plantas (Léveillé, 1846); (de Bary, 1866), pero el significado de este término ha variado acorde con el avance del conocimiento en este campo. En la actualidad se conocen como organismos que viven asintómicamente dentro de las raíces y tejidos aéreos vegetales vivos (G. C. Carroll, 1986), pero excluyendo los hongos productores de micorrizas (K Saikkonen et al., 1998), (Kari Saikkonen et al., 2004), ya que algunas asociaciones micorrízicas deforman la raíz, permitiendo detectar los síntomas de su colonización a simple vista (Wilson, 1995).

Los hongos endófitos forman con sus hospederos relaciones simbióticas y en la actualidad se desarrollan diversas investigaciones acerca del funcionamiento de esta simbiosis (G. Carroll, 1995). Es poco común que se encuentre una sola especie de endófito en una planta (Selim et al., n.d.); (Sánchez-Fernández et al., 2013). Incluso se ha observado la interacción directa o indirecta de un endófito con otros endófitos (hongo-hongo, hongo-bacteria y/o bacteria/bacteria) que se encuentran asociados en diversos tejidos de la planta (Kusari & Spiteller, 2012).

Los hongos son microorganismos con gran capacidad de influir en el destino y la disponibilidad de nutrientes en un ecosistema (Lodge & Cantrell, 1995), por lo que es viable pensar que su presencia tenga repercusiones fisiológicas en el hospedero. En algunos casos, los hongos endófitos confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos: utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y ésta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen. En Poaceae se ha demostrado que brindan resistencia a herbívoros mediante la producción de metabolitos secundarios que resultan tóxicos o reducen la palatabilidad para

los organismos que las consumen (insectos, mamíferos) (G. Carroll, 1988). En algunas plantas no gramíneas, aunque los hongos endófitos no se han relacionado con un incremento en la resistencia a la herbivoría, en ocasiones pueden reducir la incidencia y proteger a las plantas de infecciones causadas por microorganismos patógenos (Faeth & Fagan, 2002); (Arnold et al., 2003).

Los hongos endófitos poseen un gran potencial económico en áreas como la agronomía, la medicina y la biorremediación, ya que pueden realizar transformaciones biogeoquímicas como la biointemperización e interacciones con metales (Geoffrey M Gadd, 2007). La asociación entre la planta y los hongos endófitos juega un papel importante en la protección de la planta frente a infecciones patógenas y estrés ambiental, promoción de crecimiento, (Kunoh, 2002); (Hasegawa et al., 2006), facilita la captación de fósforo, un nutriente limitante en la mayoría de los suelos, de metales pesados, entre otros (Guerra-Sierra, 2008).

Merlin en el año 1922, observó hongos pigmentados de color café o negro asociados a las raíces de las plantas, a los cuales denominó como *Mycelium radicus astrovirens* (MRA), los cuales coexistían con hongos micorrízicos, por lo que fueron referidos como hongos “pseudomicorrízicos” (Jumpponen & Trappe, 1998). Actualmente estos hongos reciben el nombre de endófitos septados oscuros (DSE, por sus siglas en inglés) (Rodríguez et al., 2009). Este grupo de hongos puede tener varias funciones dentro de las comunidades de plantas, incluyendo un efecto nutricional, protección contra patógenos de raíz, modificaciones a tolerancias ambientales y participación en la dinámica de la comunidad de plantas. Todos estos factores pueden tener gran relevancia para la funcionalidad del ecosistema (Bonfim et al., 2016).

En México no se han realizado estudios enfocados a generar conocimientos acerca de DSE, no obstante la gran diversidad de plantas en las que pueden estar presentes, las funciones que sobre éstas y los ecosistemas puedan estar ejerciendo, el desarrollo de investigaciones que permitan conocer la riqueza, abundancia y diversidad de los DSE en las zonas áridas, semiáridas, bosques templados, bosques tropicales secos y húmedos, pastizales y humedales de México, constituye por sí mismo un reto ineludible de abordar para mejorar y complementar el conocimiento de la biodiversidad del país. Lo anterior, sumado

al potencial de aprovechamiento que ofrecen estos recursos, genera líneas de investigación muy atractivas para México (Heredia-Acuña et al., 2014).

Los DSE son un reto para los investigadores, pues esta innovadora línea de investigación, de ser bien explorada, puede generar cepas o consorcios que promuevan el crecimiento de especies de interés forestal y agrícola; así como de biotecnologías dirigidas a aspectos ambientales, por su potencial en procesos de fitorremediación de zonas contaminadas por metales pesados (Heredia-Acuña et al., 2014).

A la fecha, los estudios enfocados a fitorremediación con hongos endófitos son escasos, pero dada la utilidad de los hongos en la biorremediación, su potencial es claro. Los estudios que se centren en la dinámica de estas comunidades fúngicas a lo largo del desarrollo de la planta podrían ayudar a comprender los factores ambientales o intrínsecos de las plantas hospederas que pueden tener una influencia sobre ellos y viceversa (Rothen et al., 2017).

CAPACIDAD DE LOS HONGOS ENDÓFITOS PARA COADYUVAR EN EL PROCESO DE FITORREMEDIACIÓN

Los hongos endófitos asociados a las plantas podrían mejorar la fitoextracción al alterar la solubilidad, la disponibilidad y el transporte de metales pesados y nutrientes a través de la producción de ácidos orgánicos, la liberación de quelantes o los cambios redox. Se han reportado endófitos productores de sideróforos de varias plantas, los cuales pueden formar complejos estables con metales como Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb y Zn. La unión del sideróforo a un metal aumenta la concentración de metal soluble (Rajkumar et al., 2010). Así mismo, se ha demostrado que algunos endófitos aumentan la movilización de metales pesados a través de la secreción de ácidos orgánicos de baja masa molecular (AAC desaminasa). Otros estudios encontraron que el Pb soluble en agua aumentó y el pH disminuyó en una solución con crecimiento de endófitos y propuso que esto pudiera deberse a los ácidos orgánicos producidos por estos microorganismos (Sheng et al., 2008).

El P soluble es a menudo el nutriente mineral limitante para la producción de biomasa en ecosistemas naturales. Se ha demostrado que algunos aislados endofíticos solubilizan fosfato mineral. *Piriformospora indica* es un hongo

endofítico colonizador de raíces de amplio hospedador que permite que las plantas crezcan bajo un estrés físico y nutricional extremo. Este hongo contiene cantidades sustanciales de una fosfatasa ácida que tiene el potencial de solubilizar fosfato en el suelo y lo hace asimilable para la planta hospedera; También puede mejorar la absorción de nitrato y regular el metabolismo de carbono (C) y azufre (S) (Oelmüller et al., 2009).

Otro ejemplo es la liberación de ácido 5-cetoglucónico, que disuelve varias fuentes de Zn como ZnO, ZnCO₃ o Zn₃(PO₄)₂, lo que hace que el Zn esté disponible para la absorción de la planta (Saravanan et al., 2007). También se encontró que algunos endófitos de podrían liberar metabolitos que movilizan metales en el suelo contaminado, movilizaron Zn o Cd, y mejoraron la acumulación de metales en las hojas de *Salix caprea* (Kuffner et al., 2010).

Ya sea que aumente o disminuya la presencia de endófitos, la captación y acumulación de metales va a depender en gran medida de la concentración de estos en el suelo (Li et al., 2012).

ANTECEDENTES DEL SITIO DE ESTUDIO

Los principales metales obtenidos por medio de la minería en el estado de Morelos son Ag, Pb y Zn. En los siglos XVIII y XIX fueron explotadas seis minas, las cuales se encuentran abandonadas en la actualidad (Volke Sepúlveda et al., 2004). En la zona de Huautla sólo hay en existencia tres jales, con concentraciones de As (139.2±14.9 mg/kg) y Pb (2297.9±833.2 mg/kg), límites permisibles superiores a los establecidos por PROFEPA en 2006 y la NOM-127-SSA1-2004 As (20 mg/kg residencial y 40 mg/kg suelo industrial) y Pb (200 mg/kg residencial y 1500 mg/kg suelo industrial).

Durante la época de lluvia estos residuos pueden ser transportados por erosión hídrica a otras regiones debido a que se encuentran a campo abierto, lo que va a facilitar el proceso de lixiviación de los metales pesados hacia los cuerpos de agua cercanos. Existen estudios previos en la zona en relación con la contaminación por metales y sus efectos sobre humanos, animales y plantas que ahí habitan. Los estudios con especies vegetales, se ha reportado que existen 19 especies contenidas en 10 familias, siendo *Acacia farnesiana*, *Pithecellobium*

dulce y *Prosopis laevigata* las tres especies con mayor abundancia relativa en los jales de Huautla (Martínez-Becerril, 2009).

Se ha reportado una bioacumulación de Cu y Pb en tejido foliar de *Prosopis laevigata* y una reducción en la mayoría de los caracteres anatómicos y morfológicos en individuos asociados a sitios contaminados con respecto a individuos del sitio testigo (Hernández-Lorenzo, 2015). Se realizó un estudio con *Phitecellobium dulce* en el que mostró la bioacumulación de metales pesados (Cu, Pb y Zn) en el tejido foliar y una reducción en los caracteres morfológicos. Además se registraron mayores niveles de daño genético en los individuos expuestos a metales pesados (Castañeda Bautista, 2016). En otra investigación se encontró que individuos de *Acacia farnesiana* bioacumulan Cu, Pb y Zn en el tejido foliar, lo que provocó elevados niveles de daño genético y una reducción en los caracteres morfológicos foliares. No obstante, no se encontraron reportes de biorremediación relacionados con los hongos endófitos de esta planta (Santoyo-Martínez, 2016). En otros estudios se obtuvo que *S. procumbens* bioacumuló mayor concentración de metales en las raíces que en las hojas. Encontró una relación negativa y significativa entre la bioacumulación de Cd y Pb y la concentración de clorofila, siendo los individuos provenientes del sitio expuesto los que presentan menor concentración de clorofila con respecto a los individuos provenientes del sitio testigo. Los resultados muestran que no hay un efecto significativo del origen de la semilla sobre los caracteres morfológicos analizados (Rosas-Ramírez, 2018).

Estudios recientes lograron aislar 22 cepas de hongos endófitos provenientes de las raíces de *Acacia farnesiana* que habita en la zona de jales localizados en la Sierra de Huautla y determinaron que las cepas eran tolerantes a diferentes concentraciones de metales y solo dos de ellas (H17 y H21) mostraron una alta tolerancia a Cu y Pb. Por medio del método Neighbor-joining elaboraron un árbol filogenético que les permitió determinar que la cepa H17 pertenece a una especie del género *Fusarium*, uno de los géneros de hongos endófitos más aislados de plantas hiperacumuladoras de metales pesados y la cepa H21 al género *Aspergillus* (Salazar-Ramírez et al., 2020).

Las evidencias antes mencionadas demuestran que los recursos naturales del sitio están contaminados por diversos metales, lo que ha afectado a la biota circundante (Mussali-Galante et al., 2013).

JUSTIFICACIÓN

Estudios previos han demostrado que *Prosopis laevigata* crece en los jales de Huautla, Morelos y es capaz de bioacumular Plomo, Cobre y Zinc tanto en la raíz como en la parte aérea. Sin embargo, no se conoce aún si la asociación con microorganismos, como los hongos endófitos confiere a la planta mayor tolerancia y capacidad para bioacumular una mayor cantidad de metales pesados y por lo tanto de hacer el proceso de fitorremediación más eficiente. Es por eso que, con el interés de llevar a cabo la fitorremediación de sitios contaminados con metales pesados se proponen estrategias para aislar y caracterizar cepas de hongos que crecen asociados a esta planta.

HIPÓTESIS

Las cepas de hongos endófitos aisladas de *Prosopis laevigata* crecidas en los jales localizados en la sierra de Huautla, le confieren a *P. laevigata* una mayor capacidad de acumulación de metales pesados.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar hongos endófitos de raíces de *Prosopis laevigata* provenientes de los jales localizados en la sierra de Huautla y determinar si la presencia de los hongos endófitos puede favorecer o no la capacidad de acumulación de metales pesados por *P. laevigata*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Aislar hongos endófitos de la raíz de individuos de *Prosopis laevigata* provenientes de los jales de Huautla, Morelos.
- 2.- Evaluar la capacidad de promoción de crecimiento vegetal y remoción de metales pesados de los hongos endófitos sobre plantas de *Prosopis laevigata* en condiciones de invernadero.

3.- Analizar la capacidad de translocación de metales pesados de la planta *Prosopis laevigata* en presencia y ausencia de hongos endófitos.

METODOLOGÍA

SITIO DE ESTUDIO

La región oriente de la sierra de Huautla se localiza al sureste del estado Morelos entre los 18° 12' y 18° 40' N, y los 98° 51' y 99° 08' O; incluye los municipios de Tlalcingo, Puente de Ixtla, Amacuzac, Tlaquiltenango, y Ciudad Ayala, y tiene una extensión aproximada de 40 000 ha. Se ubica en la cuenca del alto Balsas, y la mayor parte de la región está incluida en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (Albores & Cedillo, 2002).

El clima es cálido subhúmedo, con una marcada época seca en el invierno y otra en el verano; el porcentaje de lluvias invernales es menor al 5% anual (Guízar & Sánchez, 1991), con régimen de lluvias en verano y canícula, donde el porcentaje de lluvia invernal es menor de 5 mm. La precipitación máxima anual oscila entre 800 y 1000 mm en septiembre y la mínima se registra en febrero, marzo y diciembre con un valor menor de 5 mm. La región es isotermal, con oscilación de temperaturas entre 20° y 29°C (Rzedowski & Huerta, 1978), la temperatura más alta se registra en mayo y la más baja en diciembre y enero (Guízar & Sánchez, 1991).

El tipo de vegetación predominante es la selva baja caducifolia (o bosque tropical caducifolio). Su marcada estacionalidad climática, origina que la mayor parte de las especies vegetales pierdan sus hojas por períodos de cinco a ocho meses en la época seca del año (Rzedowski & Huerta, 1978). En condiciones naturales, la selva baja caducifolia es una comunidad densa, con árboles de 4 a 10 m de altura. Crecen algunas especies interesantes por su importancia económica, como henequén (*Agave fourcroydes*), cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), y varias especies del género *Bursera* (*B. lancifolia*, *B. morelensis*, *B. aloexylon*, *B. palmeri*), ocotillo (*Salvia sessei*), copal jiote (*Pseudosmodium perniciosum*), palo blanco (*Conzattia multiflora*), amate amarillo (*Ficus petiolaris*), *Euphorbia fulva*, *Mimosa* sp., entre otras (Rzedowski, 1987).

COLECTA DE LAS SEMILLAS DE *Prosopis Laevigata*

Las semillas se colectaron de arbustos de *Prosopis laevigata* con un promedio de altura de hasta 10 m, en el sitio testigo Quilamula, Tlaquiltenango, Morelos

(Sitio Testigo). Se realizó un muestreo aleatorio de frutos maduros y sanos que no presentaran daños mecánicos. La colecta se realizó en junio de 2018. Una vez en el laboratorio las vainas fueron sometidas a diferentes tratamientos: primeramente, a un secado a 32°C durante 3 días, después fueron almacenadas en bolsas de papel estraza y en bolsas de plástico a $-3^{\circ}\text{C}\pm 1$, previo a su uso se almacenaron por 24h a 4°C, finalmente se colocaron a temperatura ambiente y se desenvainaron.

ENSAYO DE GERMINACIÓN

Seleccionamos 90 semillas que mostraron madurez morfológica y ausencia de daños y realizamos un ensayo de germinación para determinar el porcentaje de germinación de las semillas. Colocamos 30 semillas en recipientes plásticos sobre algodón humedecido y las cubrimos con bolsas de plástico para evitar pérdida de humedad. Este procedimiento se realizó por triplicado y se llevó a cabo por 7 días a 32°C.

ESCARIFICACIÓN, DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN

Las semillas de *Prosopis laevigata* presentan un estado de dormancia o latencia que evita su rápida germinación. El endocarpio del fruto es uno de los principales factores que favorece la latencia. Con el fin de inducir su germinación realizamos escarificación mecánica mediante abrasiones con una lija para eliminar esta barrera natural.

Para la desinfección de las semillas realizamos lavados con hipoclorito de sodio al 10% y agua destilada estéril, por 15 minutos cada uno y se realizó un ensayo de control de desinfección, seleccionando semillas al azar que inoculamos en una caja Petri con agar-agua e incubamos por 24 horas a 37°C.

Las semillas se sembraron en charolas de plástico en sustrato Peat Moss, se regaron cada tercer día hasta la obtención de la plántula, y se trasplantaron a un homogenizado de sustrato jal y sustrato testigo.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE RAÍCES DE *Prosopis laevigata*

Las muestras se obtuvieron de las raíces de plantas de *Prosopis laevigata*, crecidas en los jales mineros ubicados cerca del poblado de Huautla. El

muestreo fue aleatorio; las raíces de *Prosopis laevigata* se almacenaron a 4°C en tubos cónicos de 25ml hasta su utilización.

DESINFECCIÓN DE LOS TEJIDOS (RAÍZ)

La desinfección de los tejidos de raíz se realizó mediante una adaptación del protocolo de desinfección según lo descrito por (Schulz et al., 1993). Durante 10 minutos realizamos un lavado con agua corriente, posteriormente realizamos un lavado por 5 minutos con agua doble destilada estéril, sumergimos la raíz en una solución de etanol al 70% durante 3 minutos y después en una solución de NaClO (4% Cl disponible + surfactante Tween 80®) durante 5 minutos, se sumergió nuevamente en una solución de etanol al 70% durante 5 segundos y para concluir lavamos con agua doble destilada estéril por 1 minuto la raíz y secamos en condiciones de esterilidad de 15 a 20 minutos.

AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE RAÍZ

Cuando la raíz se desinfectó se hicieron cortes de 4 × 0.5 cm o 1.5 × 0.5 cm y se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa (PDA) pH 5.5, para inhibir el crecimiento de las bacterias endófitas el medio fue suplementado con 50 µg/mL de amoxicilina. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: incubadora fija, temperatura de 28-30°C por 40 días, oscuridad y las puntas de hifas emergentes se aislaron cada dos días.

PRODUCCIÓN DEL MICELIO

Por cada aislamiento realizamos un pre-inóculo tomando un disco de 0.5 diámetro × 0.8 cm de grosor y fue inoculado cada uno sobre una caja de Petri con medio PDA simple pH 5.5, las condiciones de incubación fueron: oscuridad, temperatura de 28-30°C, hasta obtener la biomasa necesaria de los hongos endófitos.

SIEMBRA EN SUSTRATO JAL Y TESTIGO ESTERILIZADO DE PLANTAS DE *Prosopis laevigata* INOCULADAS CON LA CEPA C7 Y SIN INOCULAR

Las plántulas de *P. laevigata* se trasplantaron a un homogenizado de sustrato jal y sustrato testigo previamente esterilizados. Realizamos 50 réplicas, para un total de 6 mediciones por mes en un período de 6 meses para cada sustrato. Empleamos como control plantas de *P. laevigata* germinadas en sustrato jal y sustrato testigo esterilizados sin inocular hongos endófitos.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Preparamos una suspensión de esporas en 1 mL de solución salina al 0.9% (6 repeticiones). En una placa de 96 pocillos realizamos diluciones desde 10^1 hasta 10^3 , colocando 90 μL de agua destilada estéril y 10 μL de la suspensión en cada pocillo. Luego tomamos 10 μL de la dilución 10^2 para cada repetición y lo colocamos en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de esporas en cada cuadrante. Una vez que se tiene el total de esporas por repetición realizamos el cálculo para determinar los μL necesarios de inóculo (8.8 μL para el sustrato testigo y 8.5 μL para el sustrato jal).

PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL

La promoción de crecimiento vegetal se determinó en ambos sustratos (testigo y jal). Cada mes tomaremos 6 individuos de cada tratamiento (sustrato testigo con hongo y sin hongo, sustrato jal con hongo y sin hongo): número de hojas (#), peso fresco y peso seco de raíz (g), peso fresco y peso seco de hojas (g) y altura de la planta (cm).

REMOCIÓN DE METALES PESADOS EN HOJAS Y RAÍCES

Tomamos muestras de hojas y raíces cada mes de 6 individuos por tratamiento, y medimos concentración de Pb, Cu y Zn. Una vez realizado el corte de las hojas y lavadas las raíces, se pusieron en una estufa a 60°C por 24 horas para su secado hasta peso constante, posteriormente se tomaron 0.25 g de cada una de las muestras y se le adicionaron 10 mL de ácido nítrico (HNO_3) suprapuro para la digestión ácida en el digestor de microondas EPA-3051. Una vez realizada la digestión, cada muestra se dejó enfriar y se filtró en matraces aforados de 25 mL, se aforaron con agua destilada y por último se realizó la lectura de las muestras en el espectrofotómetro de absorción atómica (GBC-908-AA, Scientific equipment) en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales del CEIB. Los límites de detección para los metales analizados son 0.01 para Pb, 0.001 para Cu y 0.0005 para Zn.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL

Para determinar la CMI de las cepas de hongos endófitos aislados, se cultivaron en medio PDA con sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), nitrato de

plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) y sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), las cuales se adicionaron en diferentes concentraciones (50, 100 y 200 ppm para Cu; 300, 950 y 1600 ppm para Zn; 600, 1800, 3000 y 4000 ppm para Pb) teniendo en cuenta las concentraciones de biodisponibilidad en el jal (Solís-Miranda, 2016).

Teniendo en cuenta que la CMI es aquella en la cual no se observó crecimiento, inoculamos en el centro de la caja Petri un disco de agar con el hongo reactivado donde evaluamos el crecimiento radial. Para el control realizamos el mismo procedimiento con el medio PDA libre de metales. Las condiciones de incubación fueron: temperatura de 30°C , período de incubación de 8 días y cada dos días medimos el crecimiento radial del hongo. Todas las concentraciones se evaluaron por triplicado incluyendo el control.

Evaluamos el crecimiento de los hongos ante la presencia de los tres metales (Cu, Zn y Pb) en un mismo medio. Las concentraciones que empleamos fueron 50 ppm de Cu, 300 ppm de Zn y 600 ppm de Pb (Tratamiento 1); 100 ppm de Cu, 950 ppm de Zn y 1800 ppm de Pb (Tratamiento 2); 200 ppm de Cu, 1600 ppm de Zn y 4000 ppm de Pb (Tratamiento 3). Inoculamos un disco de 0.8 cm con el micelio del hongo en cada uno de los medios, evaluamos igualmente el crecimiento radial, teniendo en cuenta el procedimiento antes mencionado.

TASA DE CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LAS CEPAS DE HONGOS ENDÓFITOS EVALUADAS

De cada una de las cepas en cada una de las concentraciones de Cu, Zn y Pb señaladas en la CMI calculamos la tasa de crecimiento, mediante un promedio de los valores obtenidos (triplicados) de la medición del crecimiento radial y a través de la elaboración de una gráfica de dispersión de datos calculamos la pendiente, cuyo valor será la tasa de crecimiento.

Para el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = 100 - \left(\text{TCM} * \frac{100}{\text{TCC}} \right)$$

Donde:

TCM: Es la tasa de crecimiento del hongo a analizar en presencia del metal pesado.

TCC: Es la tasa de crecimiento del hongo control (sin metales).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Empleando el programa estadístico PAST 4, realizamos un análisis de función discriminante que nos permite explicar la influencia de los tratamientos sobre la expresión de los caracteres de talla en individuos de *P. laevigata* en los diferentes tiempos de exposición. Los análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las regresiones que determinaron la relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y los caracteres de talla de individuos de *P. laevigata*, así como la influencia del tiempo de exposición al tratamiento sobre la capacidad de bioacumulación de metales pesados de *P. laevigata* y la translocación de los metales pesados de las raíces a las hojas, se realizaron en el programa STATISTICA 7.

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE HONGOS ENDÓFITOS

El análisis morfológico se llevó a cabo cultivando las cepas en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) y tiñendo los micelios de siete días con azul de lactofenol para observar al microscopio las estructuras asexuales de reproducción tales como conidióforos, células conidiógenas y conidios. La tinción azul de lactofenol es una tinción simple que está basada en la afinidad del colorante por los componentes celulares, en particular por las estructuras fúngicas. El fenol destruye la microbiota acompañante en caso de existir contaminantes en la muestra, el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas debido a un gradiente osmótico entre el interior y exterior de la estructura y el azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios, haciendo posible observarlos al objetivo de 40 y 100X.

RESULTADOS

DESINFECCIÓN DE LOS TEJIDOS Y AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS DE RAÍCES DE *Prosopis laevigata*

Las diferentes muestras de raíces de *Prosopis laevigata* se cultivaron como se describe en la metodología (Figura 2), observándose crecimiento micelial a los 10 días de incubación.

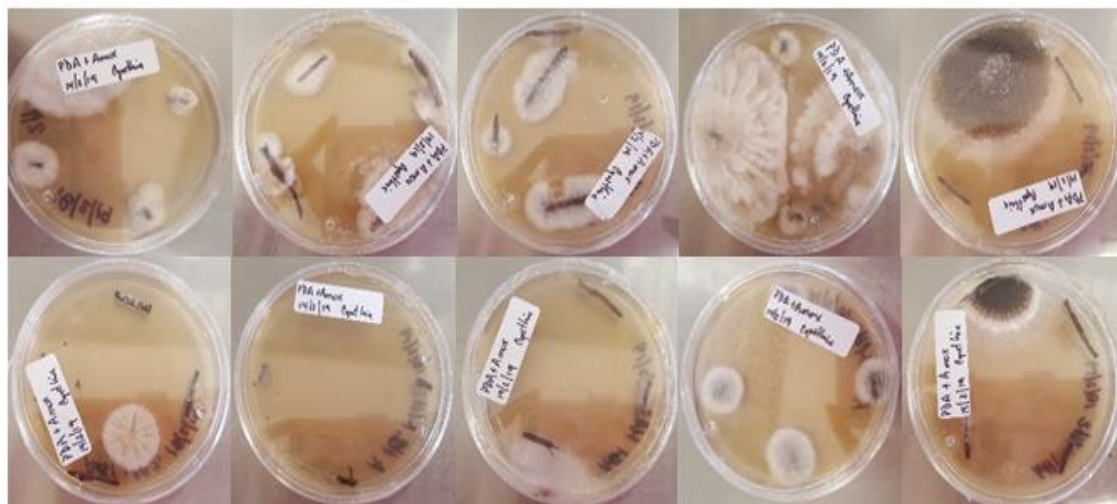


Figura 2. Medio de cultivo PDA inoculados con el tejido desinfectado de *Prosopis laevigata*.

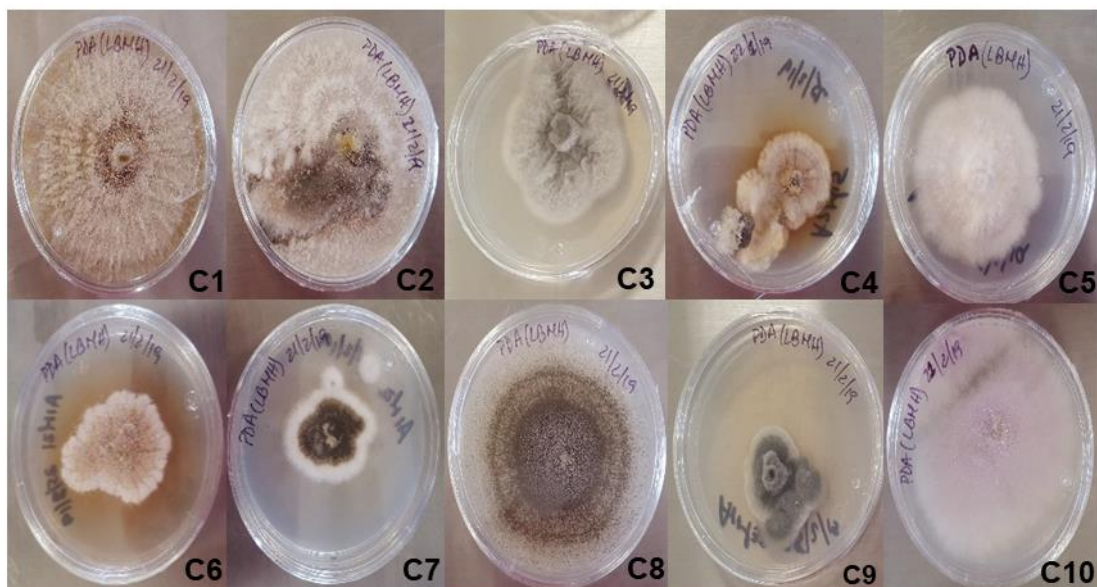


Figura 3. 10 cepas aislados de raíces de *Prosopis laevigata* en los jales de Huautla, Morelos.

Se logró aislar un total de 20 organismos de hongos endófitos. Teniendo en cuenta la morfología que presentaba el micelio (tamaño, forma, color de las

colonias, etc.), se decidió reducir la clasificación de los 20 organismos en 10 distintas cepas (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10) (Figura 3), suponiendo que son cepas “hermanas” (siblings).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL

Se realizó un experimento previo utilizando la menor y la mayor concentración para los tres metales a probar (50 y 200 ppm para Cu, 300 y 1600 ppm para Zn, 600 y 4000 ppm para Pb, de acuerdo con resultados previos del laboratorio) con el fin de observar si las 10 cepas de hongos seleccionadas eran capaces de tolerar dichas concentraciones. Las cepas C5 y C10 presentaron un crecimiento de 5-8cm en todas las concentraciones incluido el Zn, a excepción de las cepas C1, C2, C7 y C8, las cuales presentaron el mismo rango de crecimiento en todas las concentraciones, aunque no crecieron a 1600 ppm de Zn (Tabla 4). A partir de estos resultados preliminares seleccionamos las 6 cepas mencionadas anteriormente para realizar los experimentos de CMI por ser las más tolerantes a los metales a probar.

Tabla 4. Resultados de la prueba de crecimiento de los hongos endófitos con Cobre (50 y 200 ppm), Zinc (300 y 1600 ppm) y Plomo (600 y 4000 ppm).

Cepa	Metales (ppm)					
	Cu		Zn		Pb	
	50	200	300	1600	600	4000
C1	+++	+++	+++	-	+++	++
C2	+++	+++	+++	-	+++	++
C3	++	++	++	+	++	++
C4	++	++	++	-	++	++
C5	+++	+++	+++	++	+++	++
C6	+++	++	++	±	++	-
C7	+++	+++	+++	-	+++	+++
C8	+++	+++	+++	-	+++	+++
C9	+	+	+	-	++	-
C10	+++	+++	+++	+	+++	+

Leyenda: (-) Sin crecimiento (0cm); (+) Poco crecimiento (0.1-2cm); (++) Buen crecimiento (2.1-5cm); (+++) Excelente crecimiento (5.1-8cm).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C1 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO

La cepa C1 presentó tolerancia a Cu, mostrando que no había diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P>0.05$) en el crecimiento de la cepa para ninguna de las concentraciones evaluadas con respecto al control (medio sin metal). La cepa C1 no fue capaz de crecer a 1600 ppm de Zn evidenciando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P<0.05$) en el crecimiento de la cepa para esta concentración en particular con respecto al control, esto indica la toxicidad del Zn en altas concentraciones. Sin embargo, tuvo un crecimiento igual al del control a 950 ppm de Zn. En presencia de Pb la cepa C1 presentó un excelente crecimiento hasta 3000 ppm y poco crecimiento a la máxima concentración de Pb (4000 ppm). Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) en el crecimiento de la cepa para esta concentración en particular con respecto al control y al 4to día para 3000 ppm, esto indica la tolerancia moderada al Pb en altas concentraciones para la cepa C1 (Figura 4).

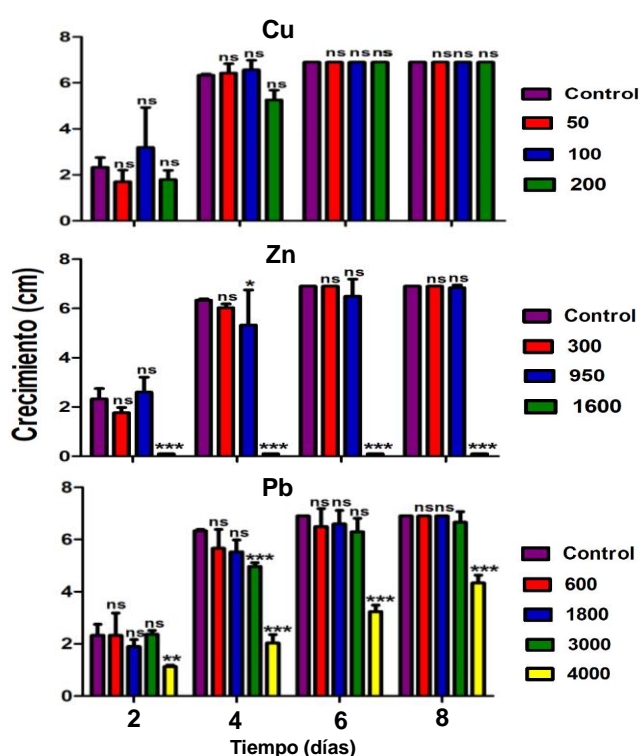


Figura 4. CMI de la cepa C1 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P>0.05$; *, diferencias significativas)

con respecto al control para $P<0.05$; **, diferencias significativas para $P<0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P<0.001$).

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento de la cepa C1 en presencia de Cu, Zn y Pb, se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición en presencia de cada uno de estos metales (Tabla 5). La cepa mostró una mayor tolerancia a Pb, posteriormente a Cu y finalmente a Zn, observándose un 100% de inhibición a 1600ppm.

Tabla 5. Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C1 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).

Cepa C1			
Metal	ppm	Tasa de Crecimiento	Porcentaje de Inhibición
Control	0	0.713	ND
Cu	50	0.80	-12.62
	100	0.57	19.86
	200	0.85	-18.69
Zn	300	0.81	-14.02
	950	0.69	2.80
	1600	0	100
Pb	600	0.73	-1.87
	1800	0.80	-12.62
	3000	0.712	0.23
	4000	0.54	24.30

Leyenda: (ND) No determinado. Los valores negativos indican que el hongo creció más en ese porcentaje que el control sin metal.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C2 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO

En el caso del Cu, la cepa C2 al igual que la cepa C1 mostró una excelente tolerancia frente a este metal. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P<0.05$) en el crecimiento de la cepa a 200 ppm al 2do y 4to día de mediciones, esto indica la tolerancia moderada al Cu en altas concentraciones para la cepa C2. Para el caso del Zn la cepa C2 no fue capaz de tolerar altas concentraciones de este metal (Figura 7), demostrando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P<0.05$) en el crecimiento de la cepa a 1600 ppm en todos los días de medición, y al 4to día para 950 ppm. Esto indica la toxicidad del Zn en altas concentraciones sobre la cepa C2. En cuanto al Pb la cepa C2 toleró este metal eficientemente a pesar de presentar poco crecimiento a 4000 ppm (Figura 8), demostrando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P<0.05$) en el crecimiento de la cepa a esta concentración, y al 4to día para 3000 ppm. Esto indica la tolerancia de la cepa C2 al Pb en altas concentraciones (Figura 5).

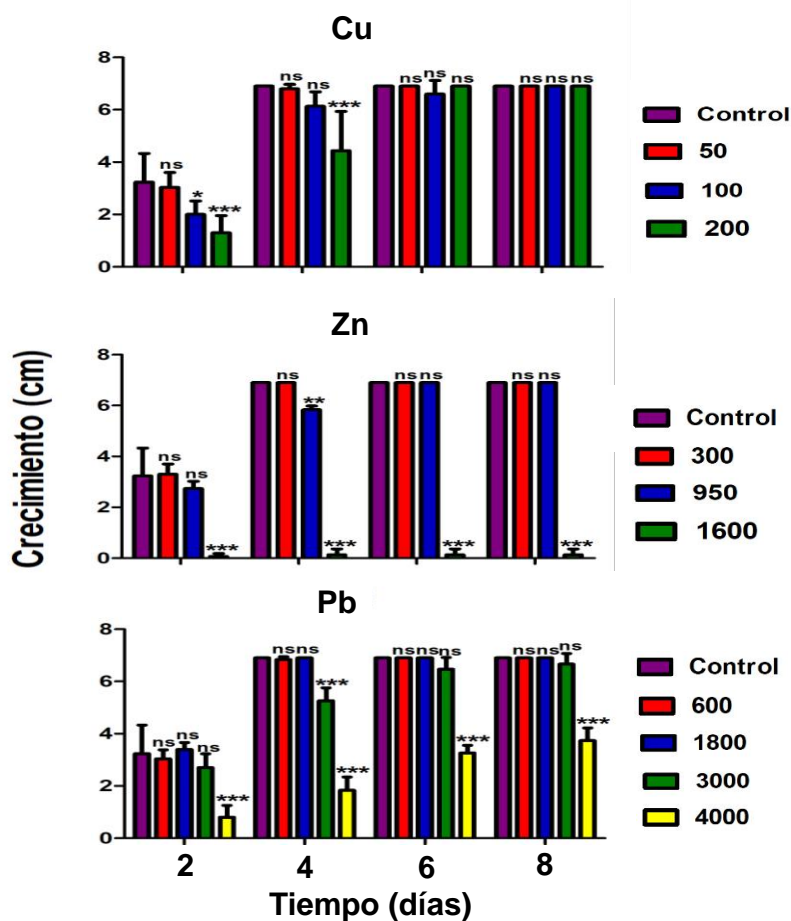


Figura 5. CMI de la cepa C2 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P > 0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.05$; **, diferencias significativas para $P < 0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.001$).

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento de la cepa C2 en presencia de Cu, Zn y Pb, se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición en presencia de cada uno de estos metales (Tabla 6). La cepa mostró una excelente tolerancia a Pb, posteriormente a Cu y finalmente a Zn observándose un 98.18% de inhibición a 1600 ppm.

Tabla 6. Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C2 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).

Cepa C2			
Metal	Ppm	Tasa de Crecimiento	Porcentaje de Inhibición
Control	0	0.55	ND
Cu	50	0.59	-6.36
	100	0.76	-37.88
	200	0.96	-75.15
	300	0.54	1.82
Zn	950	0.68	-23.33
	1600	0.01	98.18
	600	0.58	-6.06
Pb	1800	0.53	4.55
	3000	0.66	-19.09
	4000	0.51	6.97

Leyenda: (ND) No determinado. Los valores negativos indican que el hongo creció más en ese porcentaje que el control sin metal.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C5 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO

En el caso del Cu, la cepa C5 toleró todas las concentraciones de Cu inclusive mostró mayor crecimiento que el control a 50 ppm, observándose diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) desde el 2do hasta el 6to día de crecimiento indicando la tolerancia moderada al Cu. Para el caso del Zn la cepa C5 mostró menor tolerancia comparada con la que presentó con Cu, pudiendo crecer hasta 950 ppm, presentando menor crecimiento con respecto al control al final del experimento. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) en el crecimiento de la cepa a partir 1600 ppm desde el 4to día de mediciones. Sin embargo, cabe hacer notar que esta cepa logra un 67.25% de inhibición de crecimiento con respecto al control en 1600 ppm de Zn cuando se le compara con las cepas anteriormente descritas que no crecen. En cuanto al Pb la cepa C5 toleró hasta 1800 ppm, conforme se aumentó la concentración de Pb la cepa disminuyó su crecimiento con respecto al control, mostrando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) en el crecimiento de la cepa a 3000 y 4000 ppm desde el 4to día de crecimiento. Esto indica la toxicidad del Pb en altas concentraciones sobre la cepa C5. Este dato también es contrastante con las cepas anteriormente descritas, pero en sentido opuesto, ya que C1 y C2 toleran 4000 ppm de Pb (aunque no crecen como el control, C1 logra 24.30% de inhibición de crecimiento, mientras que C2 6.97%) (Figura 6).

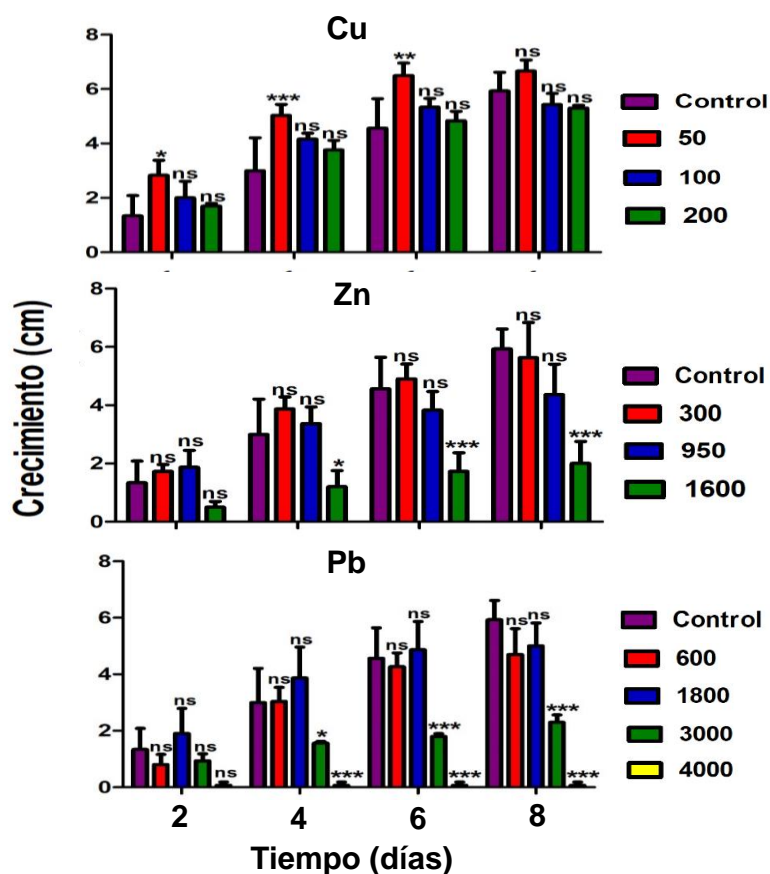


Figura 6. CMI de la cepa C5 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P > 0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.05$; **, diferencias significativas para $P < 0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.001$).

A partir de los datos de crecimiento de la cepa C5 en presencia de Cu, Zn y Pb, se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición en presencia de cada uno de estos metales (Tabla 7). La cepa mostró una mayor tolerancia a Cu, posteriormente de Zn y finalmente a Pb, mostrando un 100% de inhibición a 4000 ppm.

Tabla 7. Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C5 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).

Cepa C5			
Metal	ppm	Tasa de Crecimiento	Porcentaje de Inhibición
Control	0	0.77	ND
Cu	50	0.65	15.62
	100	0.57	25.38
	200	0.59	22.78
	300	0.64	17.14
Zn	950	0.40	48.16
	1600	0.25	67.25
	600	0.58	24.30
Pb	1800	0.50	35.57
	3000	0.14	81.56
	4000	0	100

Leyenda: (ND) No determinado.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C7 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO

La cepa C7 toleró todas las concentraciones de Cu presentando un excelente crecimiento. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) en el crecimiento de la cepa al 2do y 4to día para las concentraciones evaluadas con respecto al control, el cual mostró menos crecimiento que los tratamientos durante todo el experimento. Para el caso del Zn la cepa C7 mostró su máximo crecimiento a 950 ppm incluso por encima del control demostrando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$). Además, fue capaz de tolerar mejor (77.66% de inhibición de crecimiento) que C1 y C2 las 1600 ppm, evidenciando igualmente diferencias estadísticamente significativas que muestran el menor crecimiento a esta concentración con respecto al control. En cuanto al Pb la cepa C7 fue capaz de tolerar todas las concentraciones. Mostró diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) en el crecimiento de la cepa a 600, 1800 y 3000ppm en el tiempo 2 y a 600 y 1800 ppm en el tiempo 4, con respecto al control, demostrando la tolerancia elevada al Pb de la cepa C7 (Figura 7).

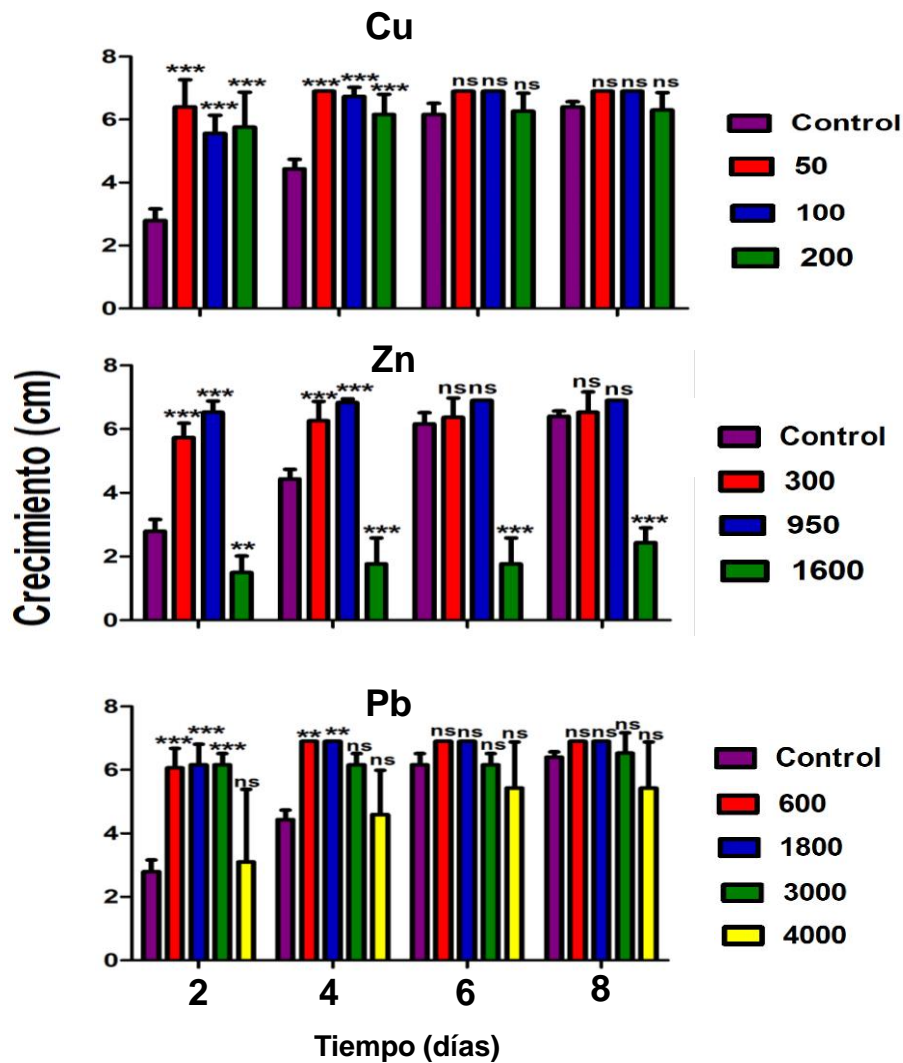


Figura 7. CMI de la cepa C7 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P > 0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.05$; **, diferencias significativas para $P < 0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.001$).

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento de la cepa C7 en presencia de Cu, Zn y Pb, se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición en presencia de cada uno de estos metales (Tabla 8). La cepa mostró una mayor tolerancia a Pb, posteriormente a Cu y finalmente a Zn.

Tabla 8. Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C7 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).

Cepa C7			
Metal	ppm	Tasa de Crecimiento	Porcentaje de Inhibición
Control	0	0.63	ND
Cu	50	0.08	88.03
	100	0.21	66.76
	200	0.09	86.44
	300	0.13	80.05
Zn	950	0.06	90.69
	1600	0.14	77.66
	600	0.13	80.05
Pb	1800	0.11	82.45
	3000	0.06	91.22
	4000	0.39	37.50

Leyenda: (ND) No determinado.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C8 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO

Al igual que las cepas C1, C2 y C7, la cepa C8 presentó crecimiento frente a todas las concentraciones de Cu, además, no mostró diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) entre las diferentes concentraciones evaluadas con respecto al control, evidenciando una alta tolerancia al Cu. En presencia de Zn la cepa C8 mostró su máximo crecimiento a 950 ppm. Sin embargo, a 1600 ppm se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) en el crecimiento de la cepa con respecto al control a esta concentración y cabe destacar que su porcentaje de inhibición (11.86%) es mucho menor en comparación con el resto de las cepas evaluadas. La cepa C8 al igual que la cepa C7 fue capaz de crecer a altas concentraciones de Pb, presentando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) a 4000 ppm al tiempo 2 y al tiempo 4 (Figura 8).

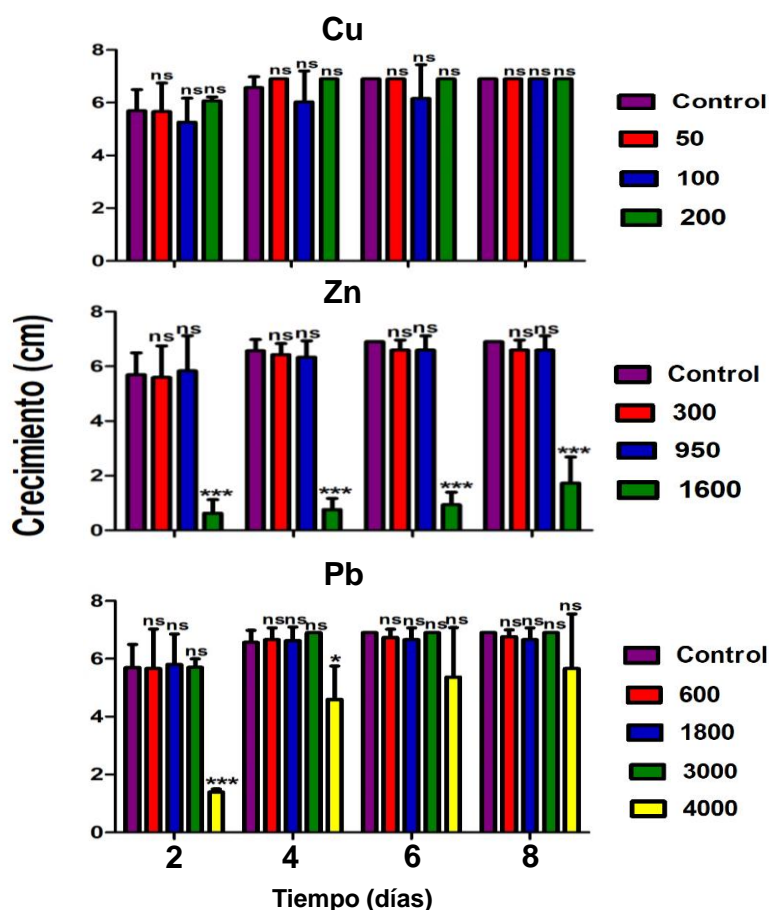


Figura 8. CMI de la cepa C8 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P > 0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.05$; **, diferencias significativas para $P < 0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.001$).

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento de la cepa C8 en presencia de Cu, Zn y Pb, se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición en presencia de cada uno de estos metales (Tabla 9). La cepa mostró una mayor tolerancia a Cu, posteriormente a Pb y finalmente a Zn.

Tabla 9. Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C8 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).

Cepa C8			
Metal	ppm	Tasa de Crecimiento	Porcentaje de Inhibición
Control	0	0.20	ND
Cu	50	0.19	88.03
	100	0.25	66.76
	200	0.13	86.44
Zn	300	0.16	19.49
	950	0.13	34.75
	1600	0.17	11.86
	600	0.17	14.41
Pb	1800	0.13	33.05
	3000	0.18	8.47
	4000	0.68	-244.92

Leyenda: (ND) No determinado. Los valores negativos indican que el hongo creció más en ese porcentaje que el control sin metal.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LA CEPA C10 EN PRESENCIA DE COBRE, ZINC Y PLOMO

La cepa C10 toleró todas las concentraciones de Cu, aunque mostró mayor crecimiento en el medio control desde el inicio del experimento. Además, mostró diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) a 50 y 200 ppm, al final del experimento, evidenciando una tolerancia moderada al Cu. Por otro lado, la cepa C10 fue capaz de crecer en presencia de Zn observando un aumento en el crecimiento proporcional al tiempo, aunque no mayor al control. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) con respecto al control en el tiempo 4 para 950 ppm, en el tiempo 6 para 1600 ppm, y el tiempo 8 para 300 y 1600 ppm, con un porcentaje de inhibición de crecimiento (56.06% y 29.57%, respectivamente), igualmente superior a las cepas C1 y C2. La cepa C10 mostró poco crecimiento ante la presencia de Pb en el medio de cultivo. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) desde el tiempo 6, esto indica la toxicidad del Pb altas concentraciones sobre la cepa C10. Esta cepa se diferencia de las demás en su tolerancia a este metal, que es muy pobre comparado con las cepas descritas anteriormente (Figura 9).

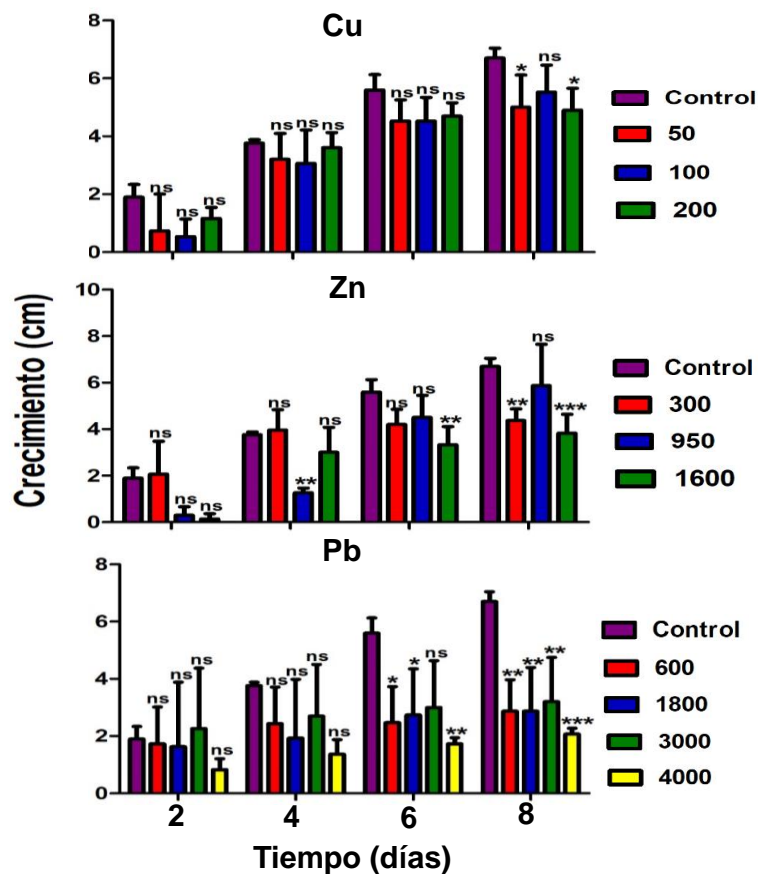


Figura 9. CMI de la cepa C10 en presencia de distintas concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm), los valores representan el promedio del triplicado de cada condición correspondiente al crecimiento radial de las cepas (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P > 0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.05$; **, diferencias significativas para $P < 0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.001$).

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento de la cepa C10 en presencia de Cu, Zn y Pb, se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición en presencia de cada uno de estos metales (Tabla 10). La cepa mostró una mayor tolerancia a Cu, posteriormente de Zn y finalmente a Pb.

Tabla 10. Tasa de crecimiento diaria (cm) de la cepa C10 y porcentaje de inhibición a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en partes por millón (ppm).

Cepa C10			
Metal	ppm	Tasa de Crecimiento	Porcentaje de Inhibición
Control	0	0.81	ND
Cu	50	0.71	12.94
	100	0.82	-1.44
	200	0.62	24.23
	300	0.36	56.06
Zn	950	1.00	-22.79
	1600	0.57	29.57
	600	0.17	78.85
Pb	1800	0.23	72.28
	3000	0.16	80.90
	4000	0.20	74.95

Leyenda: (ND) No determinado. Los valores negativos indican que el hongo creció más en ese porcentaje que el control sin metal.

Después de realizada la CMI en presencia de Cu, Zn y Pb de manera individual para las cepas C1, C2, C5, C7, C8 y C10, pudimos concluir que la cepa C1 y C2 mostraron una elevada tolerancia a Cu, la cepa C7 presentó una marcada tolerancia a altas concentraciones de Zn desde el 2do día de crecimiento, y la cepa C8 mostró una elevada tolerancia a Pb desde el 4to día de mediciones. A partir de estos resultados elegimos las cepas C1, C2, C7 y C8 para realizar la CMI en presencia de Cu, Zn y Pb dentro del mismo medio.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN PRESENCIA DE LA MEZCLA DE METALES Cu, Zn Y Pb DE LAS CEPAS C1, C2, C7 Y C8

Para la realización de esta prueba se emplearon tres tratamientos a las cepas C1, C2, C7 y C8:

- Tratamiento 1: 50 ppm de Cu, 300 ppm de Zn y 600 ppm de Pb.
- Tratamiento 2: 100 ppm de Cu, 950 ppm de Zn y 1800 ppm de Pb.
- Tratamiento 3: 200 ppm de Cu, 1600 ppm de Zn y 4000 ppm de Pb.

La cepa C1 fue capaz de crecer solamente en presencia del Tratamiento 1, mostrando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) ante todos los tratamientos aplicados con respecto al control, con excepción del tratamiento 1 que no mostró diferencias significativas al octavo día de crecimiento. La cepa C2 fue capaz de crecer en presencia de tratamiento 1, aunque presentó un pequeño crecimiento al octavo día en el tratamiento 2. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$)

ante todos los tratamientos aplicados con respecto al control, con excepción del tratamiento 1 que no mostró diferencias significativas a partir del sexto día. La cepa C7 fue capaz de tolerar todos los tratamientos aplicados, presentando diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$), exceptuando el tratamiento 1 a partir del sexto día de crecimiento. La cepa C8 fue capaz de tolerar todos los tratamientos aplicados, aunque a diferencia de la cepa C7 solo presentó un pequeño crecimiento en el octavo día a en el tratamiento 3. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$) para el tratamiento 1 al cuarto día y para el tratamiento 2 y 3 durante todo el experimento (Figura 10).

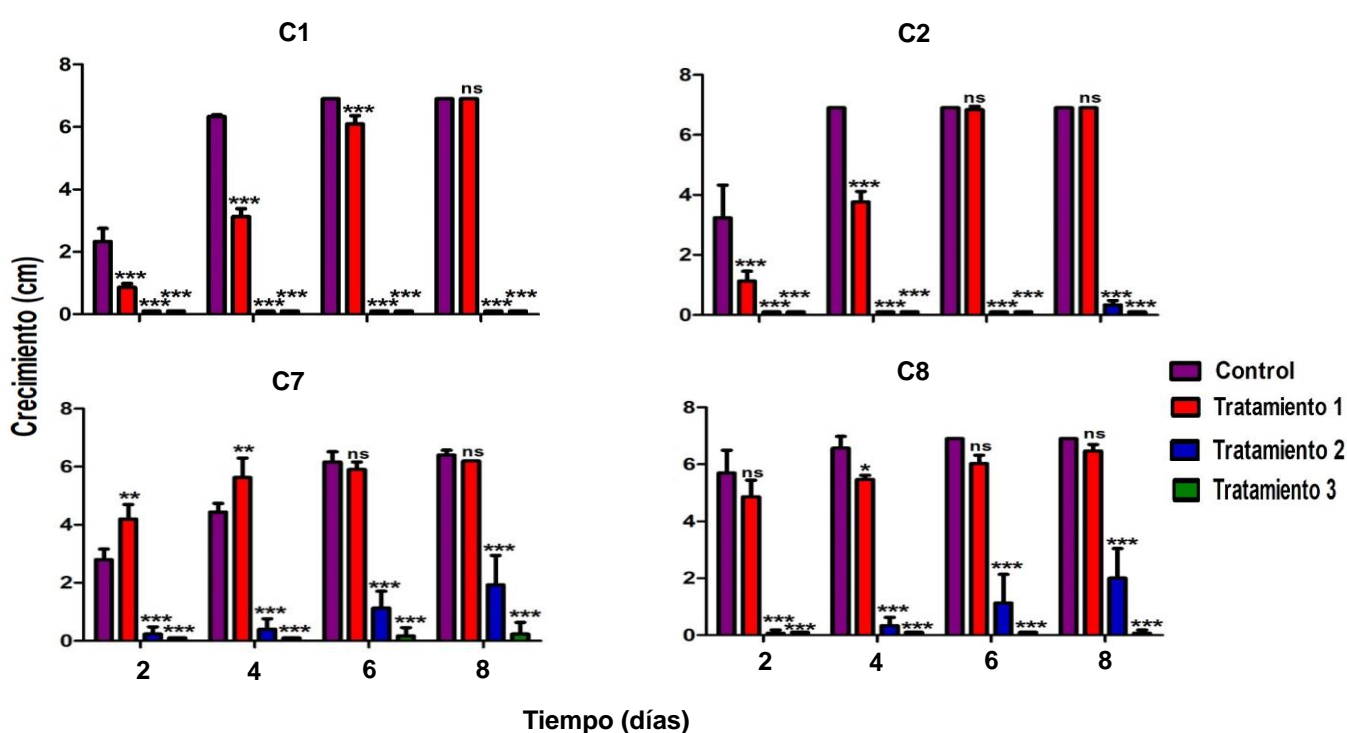


Figura 10. CMI de la cepa C1, C2, C7 y C8 en presencia de diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en un mismo medio, los valores de crecimiento representan el promedio del triplicado de cada condición evaluada (Leyenda: ns, no diferencias significativas con respecto al control para $P > 0.05$; *, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.05$; **, diferencias significativas para $P < 0.01$; ***, diferencias significativas con respecto al control para $P < 0.001$).

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento de la cepa C1, C2, C7 y C8 en presencia de Cu, Zn y Pb, se determinó la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición, donde se observó una inhibición total del crecimiento en presencia del tratamiento 2 y 3, para la cepa C1 y C2 (Tabla 11).

Tabla 11. Tasa de crecimiento (T/C) diaria (cm) de la cepa C1, C2, C7 y C8, y porcentaje de inhibición (P/I) a las diferentes concentraciones de Cu, Zn y Pb en el mismo medio.

Cepas								
	C1		C2		C7		C8	
	T/C	% de Inhibición	T/C	% de Inhibición	T/C	% de Inhibición	T/C	% de Inhibición
Control	0.71	ND	0.55	ND	0.63	ND	0.20	ND
Tratamiento 1	1.05	-42.76	1.02	-85	0.31	50	0.27	-36
Tratamiento 2	0	100	0.05	91	0.29	53.46	0.33	-67.80
Tratamiento 3	0	100	0	100	0.04	93.09	0.01	94.92

Leyenda: (ND) No determinado. Los valores negativos indican que el hongo creció más en ese porcentaje que el control sin metal.

Después de realizada la CMI en presencia de Cu, Zn y Pb de manera conjunta en el mismo medio para las cepas C1, C2, C7 y C8 pudimos concluir que la cepa C2, C7 y C8 mostraron mayor tolerancia ante los tratamientos aplicados, en particular la cepa C7.

INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CARACTERES DE TALLA EN INDIVIDUOS DE *Prosopis laevigata*

En general, los caracteres morfológicos de talla de individuos de *P. laevigata* permiten que éstos se ordenen de acuerdo con el tratamiento a que fueron sometidos, por tiempo de exposición. En particular, se pueden observar dos grupos bien definidos de individuos que se separan del resto de acuerdo a los caracteres de talla, el perteneciente al sustrato testigo con hongo y el del sustrato testigo sin hongo, mientras que los individuos del sustrato jal con hongo y sin hongo se sobrelapan entre ellos. Lo anterior independientemente del tiempo de exposición (Figura 11).

Tiempo de exposición

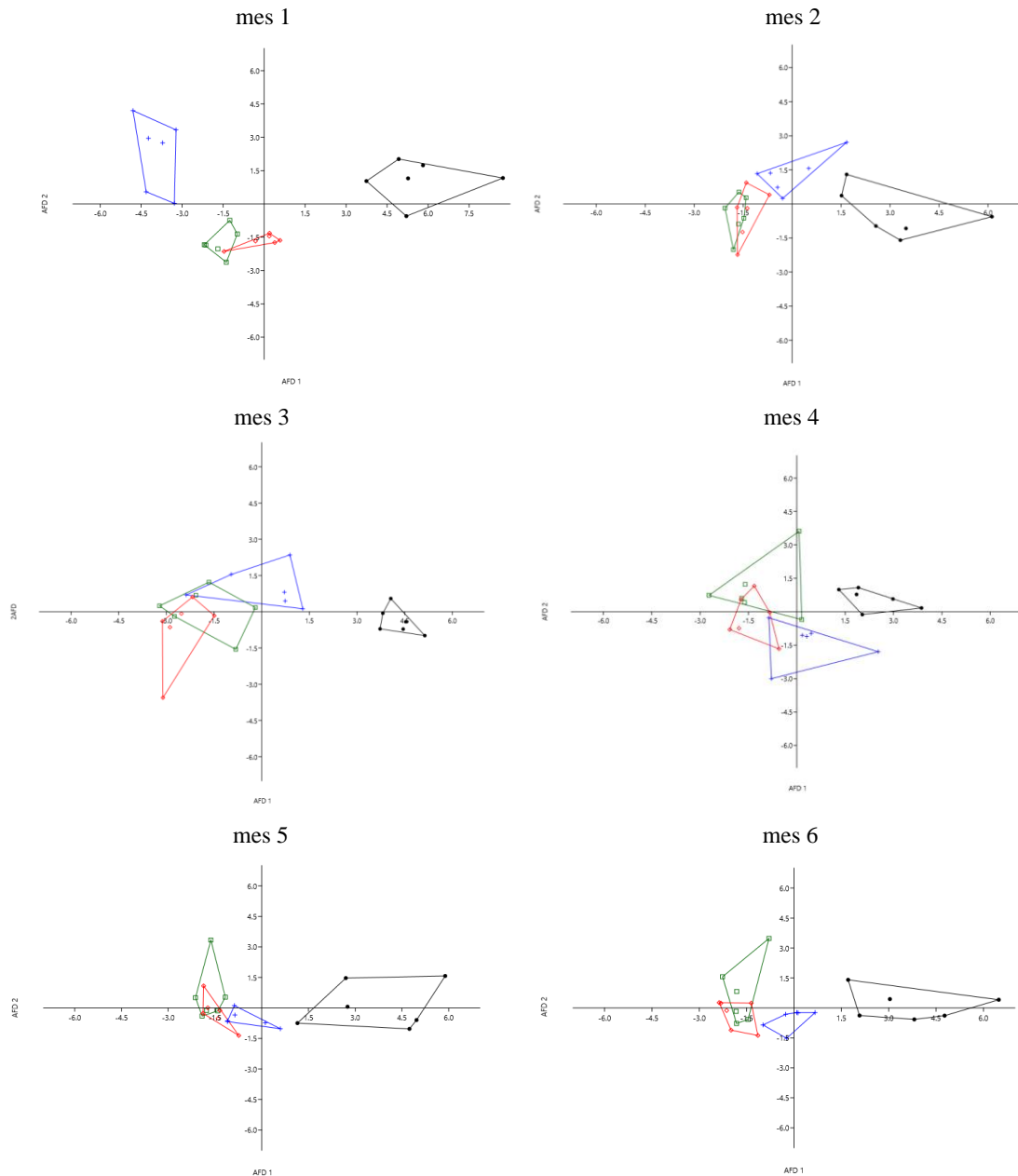


Figura 11. Gráfico de AFD 1 vs AFD 2 de caracteres de talla de individuos de *Prosopis laevigata* en seis tiempos de exposición en cuatro tratamientos, utilizando Análisis de Función Discriminante (AFD). Cada punto es una representación bidimensional (eje 1 y eje 2) de la ordenación de caracteres de talla. Los puntos que están muy juntos tienen una mayor similitud en comparación con los puntos que están más separados. Tratamientos: testigo con hongo (●), testigo sin hongo (+), jal con hongo (□), jal sin hongo (◇).

El análisis de función discriminante explicó el 99.66% de la variación del conjunto de datos del AFD1 y AFD2 para caracteres de talla de individuos de *P. laevigata* durante el primer mes de exposición (Tabla 12, Figura 11). La AFD1 explica el 79.88 % de la variación y la biomasa foliar en peso fresco es la variable que más contribuyen a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa de raíz

en peso seco es la que más contribuyen de manera negativa. Por su parte, la AFD2 explica el 19.78 % de la variación y la variable biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuye a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso fresco es la que más contribuyen de manera negativa.

El análisis de función discriminante explicó el 98.47% de la variación del conjunto de datos del AFD1 y AFD2 para caracteres de talla de individuos de *P. laevigata* durante el segundo mes de exposición (Tabla 12, Figura 11). La AFD1 explica el 84.72% de la variación y la biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuyen a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso fresco es la que más contribuyen de manera negativa. Por su parte, la AFD2 explica el 13.75 % de la variación y la variable biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuye a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso fresco es la que más contribuyen de manera negativa.

El análisis de función discriminante explicó el 99.82% de la variación del conjunto de datos del AFD1 y AFD2 para caracteres de talla de individuos de *P. laevigata* durante el tercer mes de exposición (Tabla 12, Figura 11). La AFD1 explica el 94.24 % de la variación y la biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuyen a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso fresco es la que más contribuyen de manera negativa. Por su parte, la AFD2 explica el 5.53% de la variación y la variable biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuye a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa de raíz en peso seco es la que más contribuyen de manera negativa.

El análisis de función discriminante explicó el 94.43% de la variación del conjunto de datos del AFD1 y AFD2 para caracteres de talla de individuos de *P. laevigata* durante el cuarto mes de exposición (Tabla 12, Figura 11). La AFD1 explica el 68.69% de la variación y la biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuyen a la ordenación de forma positiva, mientras que la altura es la que más contribuyen de manera negativa. Por su parte, la AFD2 explica el 25.74% de la variación y la variable biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuye a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso fresco es la que más contribuyen de manera negativa.

El análisis de función discriminante explicó el 98.6% de la variación del conjunto de datos del AFD1 y AFD2 para caracteres de talla de individuos de *P. laevigata* durante el quinto mes de exposición (Tabla 12, Figura 11). La AFD1 explica el 93.99% de la variación y la biomasa foliar en peso fresco es la variable que más contribuyen a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso seco es la que más contribuyen de manera negativa. Por su parte, la AFD2 explica el 4.61% de la variación y la variable biomasa foliar en peso seco es la variable que más contribuye a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa de raíz en peso fresco es la que más contribuyen de manera negativa.

El análisis de función discriminante explicó el 98.84% de la variación del conjunto de datos del AFD1 y AFD2 para caracteres de talla de individuos de *P. laevigata* durante el sexto mes de exposición (Tabla 12, Figura 11). La AFD1 explica el 95.17% de la variación y la biomasa foliar en peso fresco es la variable que más contribuyen a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso seco es la que más contribuyen de manera negativa. Por su parte, la AFD2 explica el 3.67% de la variación y la variable biomasa foliar en peso fresco es la variable que más contribuye a la ordenación de forma positiva, mientras que la biomasa foliar en peso seco es la que más contribuyen de manera negativa.

Tabla 12. Resultados derivados del Análisis de Función Discriminante (AFD) con base a los caracteres de talla de individuos de *Prosopis laevigata* bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan los caracteres que tienen un mayor peso en el análisis de función discriminante.

Carácter	AFD 1	AFD 2	AFD 1	AFD 2
	mes 1		mes 2	
Biomasa raíz (PS)	-53.85	-5.64	20.99	5.04
Biomasa foliar (PS)	-28.32	31.37	141.05	154.23
Altura	-0.59	0.67	-0.16	-0.75
No. de hojas	-0.05	0.01	-0.05	-0.17
Biomasa raíz (PF)	5.47	5.89	-2.78	1.85
Biomasa foliar (PF)	105.24	-36.98	-41.35	-41.90
Eigenvalor	14.87	3.68	4.30	0.70
% variación	79.88	19.78	84.72	13.75
	mes 3		mes 4	
Biomasa raíz (PS)	-27.29	-13.50	4.80	27.16
Biomasa foliar (PS)	144.34	29.12	17.31	112.04
Altura	0.38	-0.36	-0.25	0.21
No. de hojas	0.06	0.06	0.00	-0.05
Biomasa raíz (PF)	5.94	2.75	2.59	-6.95
Biomasa foliar (PF)	-53.54	-10.50	1.18	-35.76
Eigenvalor	8.43	0.49	2.68	1.01
% variación	94.24	5.53	68.69	25.74
	mes 5		mes 6	
Biomasa raíz (PS)	4.28	1.73	0.26	5.11
Biomasa foliar (PS)	-6.17	23.36	-24.16	-106.77
Altura	0.14	-0.21	-0.14	0.12
No. de hojas	0.01	-0.06	0.02	0.01
Biomasa raíz (PF)	-0.06	-0.69	1.91	-2.06
Biomasa foliar (PF)	6.94	11.98	11.86	57.12
Eigenvalor	5.90	0.29	5.57	0.22
% variación	93.99	4.61	95.17	3.67

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS CARACTERES DE TALLA EN INDIVIDUOS DE *PROSOPIS LAEVIGATA*

En general, el análisis de varianza de una vía detectó un efecto significativo de los tratamientos sobre todos los caracteres de talla evaluados en individuos de *P. laevigata* independientemente del tiempo de exposición. Exceptuando, el carácter de altura en el mes 4. Asimismo, el análisis *post hoc* (Tukey) documentó que en el tratamiento de sustrato testigo con hongo los individuos expresan de manera consistente valores significativamente mayores en todos los caracteres en comparación con los otros tres tratamientos (Tabla 13).

Tabla 13. Valores promedio (\pm e.e.) y análisis de varianza de una vía para detectar el efecto de los tratamientos sobre los caracteres de talla en individuos de *Prosopis laevigata* bajo condiciones de invernadero. Letras diferentes denotan diferencias significativas con una $P < 0.05$ (Tukey).

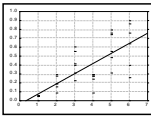
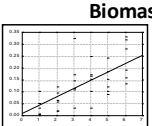
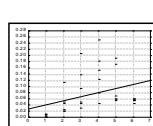
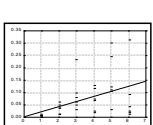
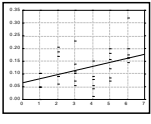
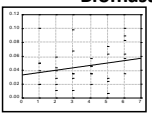
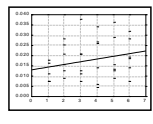
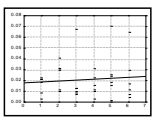
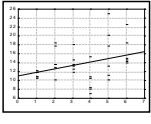
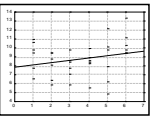
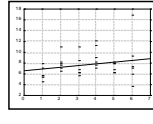
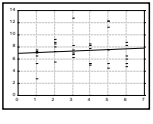
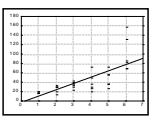
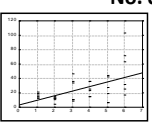
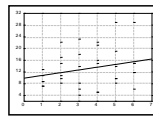
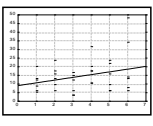
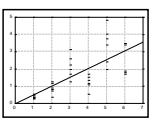
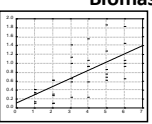
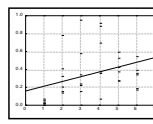
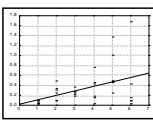
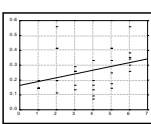
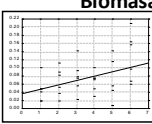
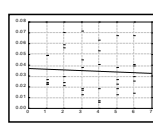
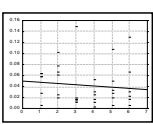
Tratamiento	Caracteres de talla											
	BRPS		BFPS		Altura		No. de hojas		BRPF		BFPF	
mes 1												
Testigo con hongo	0.050 \pm 0.000	a	0.075 \pm 0.011	a	11.462 \pm 0.329	a	18.667 \pm 0.615	a	0.375 \pm 0.042	a	0.158 \pm 0.008	a
Testigo sin hongo	0.042 \pm 0.014	a	0.047 \pm 0.012	ac	9.167 \pm 0.710	b	16.000 \pm 1.461	ac	0.283 \pm 0.053	a	0.047 \pm 0.012	b
Jale con hongo	0.005 \pm 0.002	b	0.011 \pm 0.002	b	6.000 \pm 0.485	c	9.333 \pm 0.955	b	0.034 \pm 0.011	b	0.033 \pm 0.005	b
Jale sin hongo	0.007 \pm 0.001	b	0.018 \pm 0.002	bc	6.700 \pm 0.331	c	12.100 \pm 1.915	bc	0.062 \pm 0.009	b	0.054 \pm 0.006	b
ANOVA	$F_{3,20}=11.169^{***}$		$F_{3,20}=12.279^{***}$		$F_{3,20}=25.502^{***}$		$F_{3,20}=9.697^{***}$		$F_{3,20}=23.379^{***}$		$F_{3,20}=48.903^{***}$	
mes 2												
Testigo con hongo	0.199 \pm 0.030	a	0.134 \pm 0.025	a	15.617 \pm 1.685	a	28.833 \pm 0.038	a	0.859 \pm 0.133	a	0.317 \pm 0.070	a
Testigo sin hongo	0.064 \pm 0.016	b	0.033 \pm 0.007	b	8.000 \pm 0.639	b	11.167 \pm 1.400	b	0.343 \pm 0.092	b	0.065 \pm 0.015	b
Jale con hongo	0.045 \pm 0.015	b	0.024 \pm 0.007	b	8.017 \pm 0.670	b	13.833 \pm 2.120	b	0.334 \pm 0.099	b	0.060 \pm 0.021	b
Jale sin hongo	0.036 \pm 0.009	b	0.025 \pm 0.005	b	7.917 \pm 0.559	b	14.500 \pm 2.579	b	0.258 \pm 0.065	b	0.059 \pm 0.013	b
ANOVA	$F_{3,20}=15.716^{***}$		$F_{3,20}=13.350^{***}$		$F_{3,20}=14.553^{***}$		$F_{3,20}=8.735^{***}$		$F_{3,20}=7.579^{**}$		$F_{3,20}=11.419^{***}$	
mes 3												
Testigo con hongo	0.416 \pm 0.059	a	0.119 \pm 0.025	a	14.000 \pm 0.899	a	35.500 \pm 3.030	a	2.159 \pm 0.272	a	0.294 \pm 0.772	a
Testigo sin hongo	0.152 \pm 0.040	b	0.046 \pm 0.013	b	7.883 \pm 0.558	b	24.000 \pm 6.648	ab	0.837 \pm 0.170	b	0.109 \pm 0.034	b
Jale con hongo	0.094 \pm 0.028	b	0.018 \pm 0.004	b	7.367 \pm 0.801	b	12.167 \pm 3.038	b	0.414 \pm 0.122	b	0.034 \pm 0.009	b
Jale sin hongo	0.092 \pm 0.029	b	0.020 \pm 0.009	b	8.083 \pm 0.961	b	9.667 \pm 2.348	b	0.266 \pm 0.026	b	0.038 \pm 0.022	b
ANOVA	$F_{3,20}=14.266^{***}$		$F_{3,20}=9.847^{***}$		$F_{3,20}=14.552^{***}$		$F_{3,20}=7.619^{**}$		$F_{3,20}=24.999^{**}$		$F_{3,20}=7.694^{***}$	
mes 4												
Testigo con hongo	0.248 \pm 0.033	a	0.087 \pm 0.016	a	10.083 \pm 1.228	a	38.833 \pm 7.507	a	1.381 \pm 0.095	a	0.144 \pm 0.043	a
Testigo sin hongo	0.145 \pm 0.030	ab	0.040 \pm 0.005	b	8.317 \pm 0.599	a	25.167 \pm 3.945	ab	0.943 \pm 0.145	ab	0.066 \pm 0.009	ab
Jale con hongo	0.139 \pm 0.031	ab	0.024 \pm 0.008	b	9.267 \pm 0.847	a	14.000 \pm 3.055	b	0.550 \pm 0.136	bc	0.040 \pm 0.016	b
Jale sin hongo	0.081 \pm 0.016	b	0.020 \pm 0.004	b	6.717 \pm 0.668	a	18.333 \pm 3.148	b	0.398 \pm 0.089	c	0.029 \pm 0.006	b
ANOVA	$F_{3,20}=6.161^{**}$		$F_{3,20}=10.138^{***}$		$F_{3,20}=2.760$ n.s.		$F_{3,20}=5.170^{**}$		$F_{3,20}=13.713^{**}$		$F_{3,20}=4.693^*$	
mes 5												
Testigo con hongo	0.610 \pm 0.77	a	0.136 \pm 0.021	a	16.217 \pm 2.371	a	47.500 \pm 7.065	a	3.389 \pm 0.431	a	0.287 \pm 0.047	a
Testigo sin hongo	0.149 \pm 0.023	b	0.034 \pm 0.012	b	8.533 \pm 1.102	b	24.333 \pm 6.922	b	1.015 \pm 0.192	b	0.0625 \pm 0.227	b
Jale con hongo	0.221 \pm 0.141	b	0.019 \pm 0.004	b	7.183 \pm 0.379	b	15.000 \pm 3.225	b	0.412 \pm 0.054	b	0.031 \pm 0.008	b
Jale sin hongo	0.153 \pm 0.041	b	0.026 \pm 0.010	b	8.933 \pm 1.438	b	14.000 \pm 3.225	b	0.675 \pm 0.173	b	0.041 \pm 0.015	b
ANOVA	$F_{3,20}=6.930^{**}$		$F_{3,20}=17.404^{***}$		$F_{3,20}=7.323^{**}$		$F_{3,20}=8.177^{***}$		$F_{3,20}=29.255^{***}$		$F_{3,20}=19.623^{***}$	
mes 6												
Testigo con hongo	0.633 \pm 0.105	a	0.195 \pm 0.026	a	16.517 \pm 1.377	a	98.833 \pm 14.827	a	2.625 \pm 0.369	a	0.367 \pm 0.042	a
Testigo sin hongo	0.237 \pm 0.034	b	0.071 \pm 0.010	b	10.550 \pm 0.617	b	42.667 \pm 8.838	b	1.158 \pm 0.171	b	0.126 \pm 0.025	b
Jale con hongo	0.055 \pm 0.003	b	0.032 \pm 0.013	b	7.240 \pm 0.430	b	14.800 \pm 1.077	b	0.549 \pm 0.098	b	0.040 \pm 0.006	b
Jale sin hongo	0.037 \pm 0.012	b	0.022 \pm 0.009	b	6.600 \pm 0.678	b	20.500 \pm 6.840	b	0.416 \pm 0.257	b	0.045 \pm 0.019	b
ANOVA	$F_{3,20}=24.882^{***}$		$F_{3,20}=24.328^{***}$		$F_{3,20}=28.186^{***}$		$F_{3,20}=17.012^{***}$		$F_{3,20}=16.948^{***}$		$F_{3,20}=33.850^{***}$	

Legenda: BRPS (Biomasa Raíz Peso Seco), BFPS (Biomasa Foliar Peso Seco), BRPF (Biomasa Raíz Peso Fresco), BFPF (Biomasa Foliar Peso Fresco).

RELACIÓN ENTRE EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN AL TRATAMIENTO Y LOS CARACTERES DA TALLA DE INDIVIDUOS DE *PROSOPIS LAEVIGATA*

En general, se puede observar que el porcentaje de relaciones estadísticamente significativas entre el tiempo de exposición al tratamiento (seis meses) y los caracteres de talla en individuos de *P. laevigata* mostraron el siguiente patrón: sustrato testigo con hongo (100%) > sustrato testigo sin hongo (66.7%) > sustrato jale con hongo (33.3%) = sustrato jale sin hongo (33.3%). Asimismo, todas las relaciones estadísticamente significativas fueron positivas, es decir conforme aumento el tiempo de exposición se incrementaron los valores de los caracteres evaluados (Tabla 14).

Tabla 14. Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y los caracteres de talla en individuos de *Prosopis laevigata* bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan las relaciones estadísticamente significativas.

		Tratamiento (sustrato)					
		Testigo		Jale			
		c/hongo	s/hongo	c/hongo	s/ hongo		
Biomasa raíz (PS)							
$r = 0.765$ $r^2 = 0.573$ $P = 0.0000$		$r = 0.667$ $r^2 = 0.429$ $P = 0.0000$		$r = 0.354$ $r^2 = 0.099$ $P = 0.034$		$r = 0.436$ $r^2 = 0.166$ $P = 0.008$	
Biomasa foliar (PS)							
$r = 0.422$ $r^2 = 0.153$ $P = 0.01$		$r = 0.226$ $r^2 = 0.022$ $P = 0.186$		$r = 0.245$ $r^2 = 0.032$ $P = 0.149$		$r = -0.086$ $r^2 = 0.021$ $P = 0.617$	
Altura							
$r = 0.340$ $r^2 = 0.090$ $P = 0.042$		$r = -0.234$ $r^2 = 0.027$ $P = 0.169$		$r = 0.227$ $r^2 = 0.023$ $P = 0.184$		$r = 0.095$ $r^2 = 0.020$ $P = 0.580$	
No. de hojas							
$r = 0.734$ $r^2 = 0.524$ $P = 0.0000$		$r = 0.533$ $r^2 = 0.263$ $P = 0.0008$		$r = 0.250$ $r^2 = 0.035$ $P = 0.141$		$r = 0.294$ $r^2 = 0.059$ $P = 0.082$	
Biomasa raíz (PF)							
$r = 0.736$ $r^2 = 0.528$ $P = 0.0000$		$r = 0.665$ $r^2 = 0.426$ $P = 0.0000$		$r = -0.354$ $r^2 = 0.100$ $P = 0.033$		$r = 0.425$ $r^2 = 0.156$ $P = 0.009$	
Biomasa foliar (PF)							
$r = 0.354$ $r^2 = 0.099$ $P = 0.034$		$r = 0.397$ $r^2 = 0.132$ $P = 0.0167$		$r = -0.06$ $r^2 = 0.025$ $P = 0.732$		$r = -0.11$ $r^2 = 0.017$ $P = 0.533$	

BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN INDIVIDUOS DE *PROSOPIS LAEVIGATA*

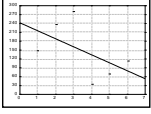
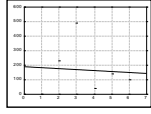
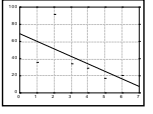
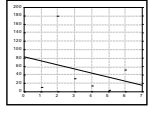
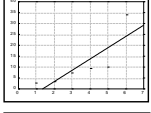
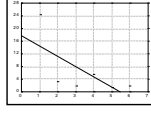
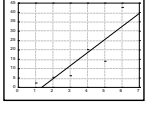
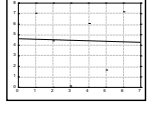
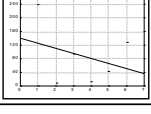
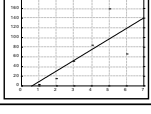

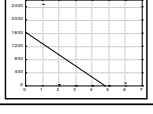
TIEMPOS DE EXPOSICIÓN

Los individuos de *P. laevigata* registraron una relación positiva y significativa entre la bioacumulación de cobre y el tiempo de exposición tanto en raíz y hoja, únicamente con el tratamiento en presencia del hongo. En contraste, no se detectó ninguna relación significativa entre el tiempo de exposición y la bioacumulación de Pb y Zn en los cuatro tratamientos (Tabla 15 y Tabla 16).

Tabla 15. Valores de bioacumulación de metales pesados (mg Kg⁻¹) promedio (\pm desviación estándar) en raíz y hoja de individuos de *Prosopis laevigata* bajo condiciones de invernadero.

Metal (L.D. mg/L)	Tiempo (meses)	Jal			
		c/hongo		s/hongo	
		raíz	hoja	raíz	hoja
Pb (0.01)	1	36.35 \pm 3.35	150.87 \pm 67.05	12.39 \pm 3.43	4.05 \pm 1.19
	2	92.10 \pm 33.26	239.48 \pm 47.85	180.20 \pm 44.46	228.38 \pm 61.73
	3	34.58 \pm 9.92	281.49 \pm 86.28	30.84 \pm 9.93	311.40 \pm 97.66
	4	28.78 \pm 13.23	35.15 \pm 6.84	15.47 \pm 6.13	40.10 \pm 12.21
	5	17.21 \pm 7.09	69.45 \pm 11.81	4.35 \pm 2.91	30.46 \pm 33.63
	6	20.95 \pm 5.40	111.89 \pm 42.01	52.78 \pm 8.49	98.61 \pm 11.21
Cu (0.001)	1	24.20 \pm 7.79	2.61 \pm 1.31	7.12 \pm 3.85	2.17 \pm 0.82
	2	3.39 \pm 1.29	3.14 \pm 0.27	4.47 \pm 2.98	5.18 \pm 2.57
	3	1.85 \pm 0.92	7.32 \pm 3.28	0.82 \pm 0.28	5.98 \pm 2.64
	4	5.47 \pm 3.21	9.34 \pm 3.42	6.12 \pm 1.08	19.88 \pm 5.97
	5	1.21 \pm 0.29	10.20 \pm 3.20	1.72 \pm 1.44	14.19 \pm 3.75
	6	2.02 \pm 0.99	34.18 \pm 9.04	7.22 \pm 2.26	42.91 \pm 14.75
Zn (0.0005)	1	38857.24 \pm 7586.27	240.08 \pm 78.11	2457.04 \pm 841.54	4.30 \pm 0.904
	2	21.87 \pm 7.28	7.37 \pm 3.17	31.64 \pm 15.18	15.66 \pm 6.51
	3	15.13 \pm 3.65	93.84 \pm 36.74	12.89 \pm 4.04	52.33 \pm 7.40
	4	10.60 \pm 4.94	15.08 \pm 5.63	25.59 \pm 7.73	85.61 \pm 49.18
	5	16.70 \pm 7.25	43.90 \pm 13.96	25.86 \pm 11.44	158.78 \pm 42.97
	6	13.03 \pm 5.87	130.02 \pm 38.69	76.28 \pm 14.96	65.33 \pm 14.74

Tabla 16. Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y los niveles de bioacumulación de metales pesados en tejidos de *Prosopis laevigata* bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan las relaciones estadísticamente significativas.

Metal	Tratamiento			
	Hoja		Raíz	
	c/hongo	s/hongo	c/hongo	s/hongo
Pb	$r = -0.53$ $r^2 = 0.095$ $P = 0.284$ 	$r = -0.07$ $r^2 = 0.243$ $P = 0.895$ 	$r = -0.60$ $r^2 = 0.200$ $P = 0.207$ 	$r = -0.27$ $r^2 = 0.157$ $P = 0.601$ 
Cu	$r = 0.826$ $r^2 = 0.603$ $P = 0.043$ 	$r = -0.690$ $r^2 = 0.338$ $P = 0.132$ 	$r = 0.864$ $r^2 = 0.682$ $P = 0.026$ 	$r = -0.030$ $r^2 = 0.249$ $P = 0.953$ 
Zn	$r = -0.320$ $r^2 = 0.125$ $P = 0.542$ 	$r = 0.737$ $r^2 = 0.430$ $P = 0.094$ 	$r = -0.650$ $r^2 = 0.285$ $P = 0.158$ 	$r = -0.640$ $r^2 = 0.267$ $P = 0.168$ 

COEFICIENTE DE TRANSLOCACIÓN

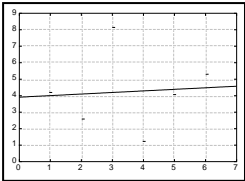
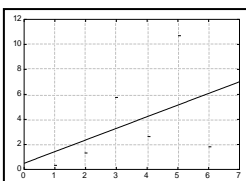
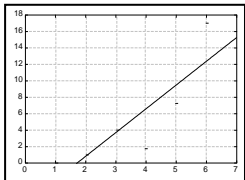
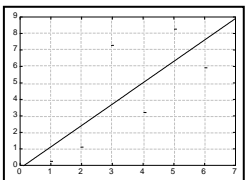
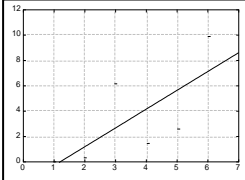
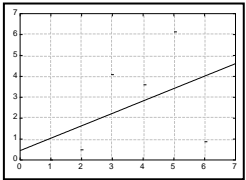
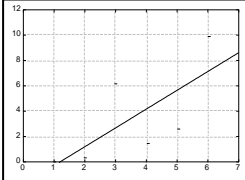
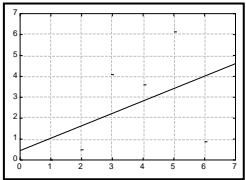
En promedio los valores de translocación de Pb, Cu y Zn registraron el siguiente patrón: sustrato con hongo (Cu) > sustrato sin hongo (Cu) > sustrato con hongo (Pb) > sustrato sin hongo (Pb) > sustrato con hongo (Zn) > sustrato sin hongo (Zn). Los niveles de translocación en el tratamiento con hongo para el metal plomo oscilaron de 1.2 a 8.1, mientras que para el sustrato sin hongo fueron de 0.3 a 10.1. Los niveles de translocación en el tratamiento con hongo para el metal cobre oscilaron de 0.1 a 16.9, mientras que para el sustrato sin hongo fueron de 0.3 a 8.3. Los niveles de translocación en el tratamiento con hongo para el metal Zinc oscilaron de 0 a 10.0, mientras que para el sustrato sin hongo fueron de 0 a 6.1 (Tabla 17). Se observa una tendencia con todos los metales; conforme pasa el tiempo de exposición, éstos se translocan más de la raíz a la hoja, también se observa que el hongo si juega un papel importante en la translocación de los metales de la raíz a la hoja, ya que todos los promedios del factor de translocación con hongo fueron mayores que aquellos sin hongo, por lo que se observa que el hongo si favorece la translocación de los metales en *P. laevigata* (Tabla 17).

Tabla 17. Coeficiente de translocación promedio en individuos de *Prosopis laevigata* a través del tiempo de exposición a sustrato jale en condiciones de invernadero. En negritas se denotan los valores de translocación superiores a 1.

Time (meses)	Pb		Cu		Zn	
	c/hongo	s/hongo	c/hongo	s/hongo	c/hongo	s/hongo
1	4.2	0.3	0.1	0.3	0.0	0.0
2	2.6	1.3	0.9	1.2	0.3	0.5
3	8.1	10.1	4.0	7.3	6.2	4.1
4	1.2	2.6	1.7	3.3	1.4	3.6
5	4.0	7.3	8.4	8.3	2.6	6.1
6	5.3	1.9	16.9	5.9	10.0	0.9
Promedio	4.2	3.9	5.3	4.4	3.4	2.5

Además, se detectó una relación positiva y significativa entre el tiempo de exposición al sustrato jal con hongo y los niveles de translocación del cobre. En contraste no se documentó ninguna relación entre el tiempo de exposición y los niveles de translocación para el resto de los tratamientos. (Tabla 18).

Tabla 18. Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y el coeficiente de translocación de metales en *Prosopis laevigata* bajo condiciones de invernadero. En negritas se denotan las relaciones estadísticamente significativas.

Metal	Tratamiento (sustrato)			
	c/hongo		s/hongo	
Pb	$r = 0.075$		$r = 0.450$	
	$r^2 = 0.243$		$r^2 = 0.202$	
Cu	$P = 0.888$		$P = 0.370$	
	$r = 0.870$		$r = 0.737$	
Zn	$r^2 = 0.695$		$r^2 = 0.429$	
	$P = 0.024$		$P = 0.09$	
Zn	$r = 0.710$		$r = 0.455$	
	$r^2 = 0.340$		$r^2 = 0.008$	
	$P = 0.114$		$P = 0.365$	

IDENTIFICACIÓN MACRO Y MICRO MORFOLÓGICA DE LA CEPA C7

La cepa C7 es un hongo filamentoso que presenta características macroscópicas tales como forma y bordes irregulares, elevación convexa con textura algodonosa, y esporas de color negro, en el reverso la colonia tiene una coloración cremosa con superficie basal corrugada (Figura 12).

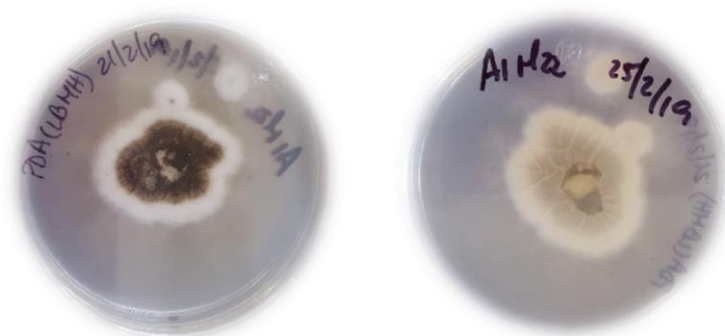


Figura 12. Caracterización macroscópica de la cepa C7 en medio de cultivo PDA.

En cuanto a sus características microscópicas observados con la tinción azul de lactofenol y con un objetivo de 10X se aprecia que posee hifas largas y delgadas con cabezas conidiales radiales, vesículas esféricas, fiálides ocupando toda la superficie de la vesícula y conidios globulares lisos (Figura 13).

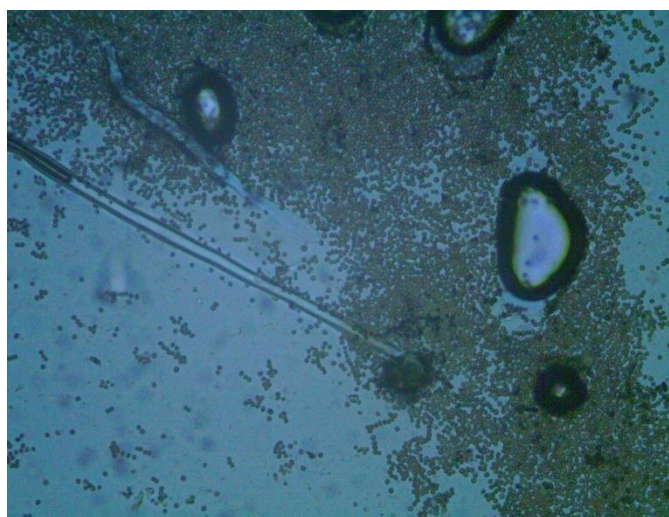


Figura 13. Caracterización microscópica de la cepa C7 al objetivo de 10X con tinción azul de lactofenol. A partir de cultivos de la cepa C7 en medio PDA se extrajo el ADN genómico.

A partir de observaciones preliminares de la morfología del micelio y de las estructuras conidiales se considera que la cepa C7 podría pertenecer al género *Aspergillus*, sin embargo, se requiere hacer el análisis molecular.

DISCUSIÓN

Las estrategias de remediación basadas en procesos microbianos (microremediación) pueden minimizar la toxicidad y la biodisponibilidad de los metales pesados. Dentro de estas técnicas se encuentran la bioestimulación en donde se activa a la población microbiana nativa; la bioaugmentación que involucra la introducción artificial de poblaciones viables, la bioacumulación utilizando células vivas y la biosorción mediante biomasa microbiana muerta. Estas técnicas se caracterizan por ser tecnologías de remediación promisorias desde el punto de vista económico y de efectividad (Rajendran et al., 2003)

De otro lado, la fitorremediación es el uso de plantas para remover contaminantes del ambiente. Existen plantas denominadas hiperacumuladoras que pueden absorber grandes cantidades de metales en sus tejidos aéreos como tallos y hojas, lo cual es una ventaja a la hora del postratamiento de metales pesados. La asociación entre hongos endófitos y plantas hiperacumuladoras de metales pesados es un punto de investigación que se ha comenzado a desarrollar en los últimos años; tanto para determinar la implicación de estos organismos en la remoción de los contaminantes del suelo como para determinar si son capaces de promover el crecimiento de las plantas a las que se encuentran asociados (Padmavathiamma & Li, 2007).

Los hongos endófitos pueden tolerar la presencia de metales pesados debido a la acción de diversos mecanismos (quelación, intercambio iónico, cristalización, adsorción, cambio de valencia, precipitación intra y extracelular y captación activa), que modifican la toxicidad del contaminante y ayudan a tener una mayor tolerancia a este (Choo et al., 2015).

[Concentración Mínima Inhibitoria de las cepas C1, C2, C5, C7, C8, C10 en presencia de Cu, Zn y Pb](#)

Las cepas C1 y C2 presentan comportamientos similares en presencia de los metales pesados evaluados. Ambas cepas no se ven afectadas en su crecimiento a ninguna de las concentraciones de Cu evaluadas (50, 100 y 200 ppm). Para el caso del Zn no son capaces de crecer a altas concentraciones (1600 ppm) de este metal. Con respecto al Pb se observa un retraso en el crecimiento a 4000 ppm con respecto al control sin metal.

La cepa C5 presentó un crecimiento más rápido a 50 ppm Cu, sin embargo a 100 y 200 ppm crece más lento que las cepas C1 y C2. El crecimiento de la cepa C5 se ve afectado negativamente a 1600 ppm de Zn con respecto al control. La cepa C5 no fue capaz de crecer a 4000 ppm de Pb.

La cepa C10 presenta el mismo comportamiento para todos los metales evaluados. Tanto para Cu, Zn y Pb se observa un lento crecimiento de la cepa con respecto al control sin metal, lo cual evidencia que no es una cepa que pueda ser usada para tratamientos de biorremediación para los cuales se requiera obtener resultados eficientes de manera rápida.

Las cepas C7 y C8 se comportan de manera muy similar. En presencia de Cu las cepas presentan un crecimiento más acelerado que el control sin metales. En el caso del Zn las cepas se ven afectadas negativamente en presencia de 1600 ppm de Zn. En presencia de Pb ambas cepas presentan un retraso en el crecimiento a los 2 días de comienzo del experimento a 4000 ppm de Pb aunque a los 8 días no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin metal.

Debido a lo anteriormente expuesto las cepas C7 y C8 podrían considerarse hongos endófitos metalófilos, ya que pueden crecer mejor en presencia de altas concentraciones de metales pesados que en su ausencia (Ramírez et al., 2006) y ser empleadas en estudios posteriores en combinación con otras estrategias de biorremediación para remediar suelos contaminados con altas concentraciones biodisponibles de Cu, Zn y Pb

En el caso de la Sierra de Huautla, Morelos, también se han reportado metales biodisponibles como el Pb, y en menor medida el Zn y Cu en los jales de la región (Solís-Miranda, 2016), por lo que también podrían aplicarse estas cepas para programas de biorremediación de suelos contaminados.

En un estudio previo llevado a cabo en Malasia, lograron aislar de plantas de *Nypa fruticans* un total de 8 cepas de hongos endófitos resistentes a 1000 ppm de Cu, Pb y Zn, mostrando un orden de tolerancia de $Cu < Pb < Zn$, en medio PDA (Choo et al., 2015), lo que es congruente con el patrón de tolerancia encontrado en nuestro estudio.

En el presente estudio, también pudimos observar que a medida que la concentración de los metales pesados aumenta, disminuye el crecimiento radial de las cepas, lo que podría estar determinado por el nivel de toxicidad del metal, el cual actuará de manera diferente sobre cada una de las cepas. Se conoce que

algunas biomasas microbianas pueden adherirse a los metales de manera inespecífica, mientras otras lo hacen selectivamente (Gupta et al., 2000), a las estructuras celulares de unión a metales pesados (pared celular, vacuolas, etc) (Wang & Chen, 2009).

De manera general han sido sugeridos dos mecanismos que emplean los hongos para la tolerancia a metales pesados: a) Secuestro extracelular (quelación y unión a la pared celular y b) Secuestro físico intracelular de metal al unirse a proteínas u otros ligandos para evitar que dañe los objetivos celulares sensibles a los metales. Los mecanismos extracelulares se basan principalmente en impedir que los metales entren, mientras que los intracelulares se encargan de reducir en el citosol la carga de metales (Anahid et al., 2011).

En el primer mecanismo, la célula fúngica excreta diferentes moléculas orgánicas que no forman parte de la matriz de la pared celular, cuya función principal será quelar los iones metálicos. Debido a la presencia de diversas estructuras aniónicas como el glucano y la quitina (Maghsoudi et al., 2009), la superficie celular de los hongos se encuentra cargada negativamente, lo que favorece la unión a cationes metálicos, dicha unión se conoce como biosorción (Bellion et al., 2006).

En el segundo mecanismo, en la tolerancia a los metales pueden participar proteínas transportadoras, las cuales pueden expulsar los iones metálicos tóxicos fuera del citosol o permitir el secuestro en el compartimiento vacuolar de los metales (Abdul & Maghsoud, 2007; Bellion et al., 2006). Debido a esto, en las cepas C1, C2, C5 y C10 se observa una disminución del crecimiento radial.

Influencia de la bioacumulación de metales pesados y la presencia de hongos endófitos sobre la expresión de caracteres de talla en individuos de *Prosopis laevigata*

El análisis de función discriminante es una prueba estadística que selecciona que variables ya sean independientes o predictivas nos permiten diferenciar grupos, es considerada una prueba de clasificación y dependencia (Torrado & Berlanga, 2012). Dicho análisis fue usado en nuestro estudio para seleccionar los caracteres de talla que contribuyeron en mayor medida a explicar las diferencias entre los tratamientos, así como determinar la influencia que ejercieron los distintos tratamientos aplicados (testigo con hongo, testigo sin hongo, jal con hongo y jal sin hongo) sobre la expresión de los diferentes caracteres de talla de individuos de *Prosopis laevigata*. De manera general

observamos un patrón que se repite durante todo el tiempo del experimento (6 meses), donde el sustrato testigo con hongo presenta una diferenciación con respecto a los demás tratamientos. Los caracteres morfológicos que más contribuyen a la ordenación son la biomasa foliar de peso fresco y la biomasa foliar de peso seco.

La bioacumulación de metales pesados en la biomasa foliar activa el mecanismo de quelación, no es más que la unión o secuestro de los metales pesados por ligandos (grupos fosfatos, hidroxilo, carboxilo o sulfhidrilo), lo cual va a disminuir la toxicidad de los metales pesados. Esto puede provocar cambios en la morfología de los tejidos foliares de las plantas expuestas a estos contaminantes (Santoyo-Martínez et al., 2020).

Se pueden observar dos grupos bien definidos de individuos que se separan del resto de acuerdo a los caracteres de talla, el perteneciente al sustrato testigo con hongo y el del sustrato testigo sin hongo, mientras que los individuos del sustrato jal con hongo y sin hongo se sobrelapan entre ellos. Lo anterior independientemente del tiempo de exposición. Como podemos comprobar el hongo no está ejerciendo ninguna influencia en esta diferenciación entre los grupos, más bien la contaminación con los metales y el efecto que esta ejerce sobre los caracteres de talla son los causantes de la separación.

Por su parte, el análisis de varianza de una vía evidenció un efecto significativo de los tratamientos sobre todos los caracteres de talla en individuos de *P. laevigata*, exceptuando, el carácter de altura en el mes 4, independientemente del tiempo de exposición. Por su parte la prueba estadística de Tukey mostró que en el tratamiento sustrato testigo con hongo los caracteres morfológicos presentan valores consistentes significativamente mayores con respecto al resto de los tratamientos evaluados.

En estudios realizados en la Sierra de Huautla, Morelos se han encontrado una reducción de los caracteres macromorfológicos de individuos de *Prosopis laevigata* crecidos en sustrato jal en condiciones de invernadero, en comparación con el sustrato testigo. Ellos sugieren que esto se debe a la presencia de metales pesados en particular al Zn que afecta la altura de las plantas debido a que uno de sus efectos tóxicos es inhibir el crecimiento de las raíces y por consiguiente se ve afectada la toma de nutrientes, agua y el soporte de las plantas (Muro-

González et al., 2020). En otra investigación realizada en el mismo sitio de estudio observaron una disminución en los caracteres morfológicos de individuos de *V. campechiana* crecidos en sustrato jal en comparación con las plantas crecidas en sustrato testigo (Santoyo-Martínez et al., 2020). La toxicidad de los metales pesados va a depender en gran medida de su concentración en el sustrato, de su forma química y su persistencia en el ambiente. Otro aspecto importante es la mezcla de metales pesados en el suelo, ya que pueden tener efectos antagónicos o sinérgicos, lo que dificulta conocer el efecto real del metal (Navarro-Aviñó et al., 2007).

Por su parte es importante destacar el efecto de los hongos endófitos sobre los caracteres morfológicos de *Prosopis laevigata*, lo cual favoreció positivamente todos los caracteres morfológicos evaluados exceptuando la altura, en las plantas crecidas en sustrato testigo inoculadas con la cepa C7. La interacción planta- endófito provee a la planta capacidad adaptativa frente a condiciones de estrés tanto bióticos (insectos, ácaros) como abióticos (sequía, estrés oxidativo y metales pesados) (Abello & Kelemu, 2006).

En otra investigación evaluaron el efecto de la inoculación dual de hongos ectomicorrízicos y las bacterias *Micrococcus luteus* y *Sphingomonas sp.* sobre el crecimiento de plantas de sauce (*Salix sp.*) en suelos contaminados con metales encontrando que estas asociaciones tienen gran potencial biorremediador (Zimmer et al., 2009).

La asociación planta-microorganismo confiere diversas ventajas adaptativas a ambos simbioses. Un ejemplo de ellos son los hongos micorrízicos arbusculares, los cuales toman de la planta hidratos de carbono y a su vez ellos le facilitan a la planta la captación de nutrientes esenciales (N, P Fe, Zn, Cu, Ca y Agua (Bago et al., 2000; Troeh & Loynachan, 2003). Por su parte las bacterias estimulan la producción de hormonas reguladoras del crecimiento, fijación del nitrógeno y producción de sideróforos (Vejan et al., 2016). Por su parte otros autores reportan que la inoculación de hongos en las raíces de las plantas promueve la producción de aminoácidos, proteínas, clorofila y contenido de azúcares comparada con plantas no inoculadas (Mathur & Vyas, 2000), además, favorece la captación de nutrientes, lo que tiene un efecto positivo en el desarrollo de las plantas (Avis et al., 2008).

Aunque es de vital importancia establecer que la mayoría de los estudios con hongos endófitos se basan en la identificación molecular y menos en el estudio de sus efectos sobre los procesos adaptativos a factores de estrés (Ordóez et al., 2012).

Relación entre el tiempo de exposición al tratamiento y los caracteres de talla de individuos de *Prosopis laevigata*

Como se ha ido describiendo a la largo del trabajo, el tratamiento correspondiente al sustrato testigo con hongo se ha diferenciado estadísticamente del resto de los tratamientos evaluados. Con este análisis estadístico demostramos que al igual que los tratamientos ejercen un efecto sobre los caracteres morfológicos, el tiempo de exposición (6 meses) tiene una relación estadísticamente significativa con dichos caracteres, mostrando el siguiente patrón: sustrato testigo con hongo (100%) > sustrato testigo sin hongo (66.7%) > sustrato jale con hongo (33.3%) = sustrato jale sin hongo (33.3%). Además, todas las relaciones significativas fueron positivas, es decir, a medida que aumentó el tiempo de exposición se incrementaron los valores de los caracteres evaluados, sobre todo en el sustrato testigo. Lo que indica que la presencia de metales pesados enmascara el efecto positivo de los hongos, ya que en el tratamiento jal con y sin hongo, en general no se observan estas relaciones.

Como ya hemos discutido con anterioridad los hongos endófitos pueden contribuir a la protección la planta contra factores bióticos (patógenos y herbívoros) y abióticos (estrés salino, térmico, presencia de metales, etc.), lo cual pueden llevar a cabo mediante tres mecanismos (Sánchez-Fernández et al., 2013):

1. Directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito.
2. Indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera.
3. Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación.

Los mecanismos de protección hacia las plantas pueden actuar de manera simultánea bajo diversas condiciones de estrés. Otro factor importante es el

tiempo de colonización o tiempo de exposición al hongo endófito, el cual va a favorecer la activación con mayor eficiencia de los mecanismos de adaptación de la planta al medio contaminado debido a la presencia del endófito en su interior (Varma, 2008).

El papel que juegan los microorganismos y en particular los hongos endófitos en los procesos de fitorremediación aún no se encuentran totalmente dilucidados. Por lo cual son de vital interés los estudios donde se genere información acerca de la interacción planta hiperacumuladora y hongo endófito, para conocer qué mecanismos pudieran estar involucrados tanto en la bioacumulación de los metales como en la promoción de crecimiento de las plantas. Se conoce que los microorganismos son capaces de modificar los mecanismos involucrados en la tolerancia, exclusión, acumulación y movilización de los metales, ya que algunos pueden provocar variaciones en la biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo cambiando el pH del mismo y liberando agentes quelantes (GEOFFREY M Gadd, 2001; Wenzel et al., 2003).

Se han desarrollado diversas investigaciones empleando hongos endófitos de diferentes géneros (*Trichoderma*, *Fusarium*) donde se ha observado que son capaces de estimular el crecimiento vegetal, mejorar la acumulación de los metales pesados en las raíces y aumentar la translocación de los mismos a la parte aérea de las plantas (Adams et al., 2007; Arriagada et al., 2007; Santoyo-Martínez, 2016).

Bioacumulación de metales pesados en individuos de *Prosopis laevigata*

Tiempos de exposición

Coeficiente de translocación

Los resultados obtenidos muestran una mayor bioacumulación durante el tiempo de exposición del Cu tanto en raíz y hoja, únicamente con el tratamiento en presencia del hongo, no evidenciándose así una relación significativa para Pb y Zn. Así como una relación positiva entre el tiempo de exposición y los niveles de translocación de Cu.

Estos resultados no presentan una relación directa con el coeficiente de translocación que sigue un patrón: sustrato con hongo (Cu) > sustrato sin hongo (Cu) > sustrato con hongo (Pb) > sustrato sin hongo (Pb) > sustrato con hongo (Zn) > sustrato sin hongo (Zn)

En estudios anteriores se reportó una mayor bioacumulación de Cu en plantas de *Acacia farnesiana*, *Pithecellobium dulce* y *Prosopis laevigata* (Castañeda Bautista, 2016; Santoyo-Martínez, 2016). Debido a la alta capacidad de translocar y bioacumular en tejidos foliar metales pesados, *P. laevigata* es considerada una especie hiperacumuladora de metales. Esto hace posible su empleo en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Hernández-Acosta et al., 2020).

El Cu es un metal esencial que forma parte de la estructura de proteínas reguladoras, lo que hace posible su translocación a los tejidos foliares de las plantas. Participa en una amplia variedad de procesos metabólicos como son la respuesta ante estrés, o la señalización hormonal. Además, es un importante cofactor de la enzima citocromo oxidasa en la cadena transportadora de electrones en mitocondrias y cloroplastos de células foliares (DalCorso et al., 2013)

A su vez evidenciamos con este trabajo que el uso de hongos endófitos asociados a esta planta puede ser una estrategia para potenciar, acelerar y hacer más eficiente el proceso de fitorremediación, ya que se observa una tendencia con todos los metales; conforme pasa el tiempo de exposición, éstos se translocan más de la raíz a la hoja, también se observa que el hongo si juega un papel importante en la translocación de los metales de la raíz a la hoja, ya que todos los promedios del factor de translocación con hongo fueron mayores que aquellos sin hongo, por lo que el hongo si favorece la translocación de los metales en *P. laevigata* . Este es un resultado muy interesante y de interés en estrategias de fitorremediación empleando hongos. Esto se puede deber a lo antes mencionado acerca de los mecanismos de protección bióticos y abióticos de los hongos hacia la planta, pero también, puede deberse a que las hifas de los hongos endófitos son capaces de pegarse a los metales pesados que se encuentran tanto en la rizosfera de la planta como en sus raíces. Esto podría favorecer la tolerancia de las plantas a los metales pesados (Vivas et al., 2006).

Otros mecanismos que podían estar involucrados tanto en la bioacumulación como en la translocación de los metales a los tejidos foliares de *Prosopis laevigata* pueden ser que los metales se unen a la superficie celular a través de interacciones electrostáticas (fuerzas de Van de Waals, interacciones redox,

uniones covalentes, etc.) o a los grupos cargados de la pared celular que son capaces de absorber y retener los metales pesados (Rajendran et al., 2003). La bioacumulación es un proceso celular llevado a cabo por un sistema de transporte de membrana que mediante un gasto energético realizado por la H⁺-ATPasa, internaliza los metales pesados al citoplasma donde son secuestrados por proteínas llamadas metalotioneinas y fitoquelatinas (Marrero-Coto et al., 2010).

Las metalotioneinas son proteínas de bajo peso molecular (6-7 KDa) ricas en cisteína, que se dividen en tres clases de acuerdo al contenido de cisteína y a su estructura; Clase I las que tienen dominios Cis-Cis, Clase II las que tienen dominios Cis-X-Cis y Clase III las que tienen dominios Cis-X-X-Cis en donde X corresponde a cualquier aminoácido. Tienen un papel importante en la interacción planta-microorganismo ya que la unión con el metal facilita su absorción y transformación (Wu et al., 2010). Por su parte las fitoquelatinas son metalotioneinas clase III que secuestran los metales, brindando protección a las enzimas sensibles a ellos (Kavamura & Esposito, 2010).

Diversos factores externos van a ejercer una influencia sobre este proceso de bioacumulación y translocación de los metales. La presión osmótica de la raíz favorecerá un mayor desplazamiento hacia el interior celular si existe una gran concentración de metales en el exterior. Las altas temperaturas provocan un aumento en la evapotranspiración lo que ocasiona un mayor movimiento de agua de la raíz a la parte aérea y por consiguiente un aumento en la translocación de metales pesados a los tejidos foliares de la planta (Baghour et al., 2001).

En primer lugar, para poder mejorar la bioacumulación se debe garantizar que los metales pesados no producen efectos tóxicos en la planta durante su transporte, lo cual puede evitarse si el metal fluye de manera rápida de la raíz a la parte aérea. Para garantizar esta disminución de la toxicidad del metal debe ocurrir el proceso de quelación de manera eficiente, que se garantice la suficiente cantidad de ligando en el citoplasma para amortiguar el efecto del metal. En segundo lugar, el metal debe ser depositado en la vacuola donde se compartimentaliza. Y en tercer lugar aumentar los mecanismos de transporte para garantizar que el metal llegue a su destino causando el menor daño posible a la planta (Beltrán & Gómez, 2016)

Aunque los mecanismos de acción a través de los cuales la cepa C7 interactúa con *Prosopis laevigata* para brindarle tolerancia a los metales pesados se desconocen, debido a que aún no conocemos su identificación molecular, esta interacción favorece la bioacumulación y translocación de los metales a los tejidos foliares de la planta. Por lo que sería beneficioso el empleo de dicha interacción hongo endófito C7 y planta *Prosopis laevigata* como estrategia para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados.

CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas C1 y C2 mostraron una elevada tolerancia a Cu, mostrando crecimiento en presencia de este metal (6.9 cm para ambas cepas en todas las concentraciones).
- 2.- La cepa C7 presentó una marcada tolerancia a altas concentraciones de Zn mostrando crecimiento en presencia de este metal (6.53 cm a 300 ppm, 6.9 cm a 950 ppm y 2.43 cm a 1600 ppm).
- 3.- La cepa C8 demostró ser altamente tolerante a Pb dado su crecimiento en presencia de este metal (6.8 cm a 600 ppm, 6.7cm a 1800 ppm, 6.9 cm a 3000 ppm y 5.7 cm a 4000 ppm).
- 4.- Las cepas C2, C7 y C8 presentaron una mayor tolerancia ante los tratamientos aplicados, en particular la cepa C7 (6.2, 1.9 y 0.2 cm para el tratamiento 1, 2 y 3 respectivamente).
- 5.- Se registró una relación positiva y significativa entre el tiempo de exposición y la biomasa de raíz, en todos los tratamientos. Lo que significa que el hongo no influye en el aumento de la biomasa de raíz de *P. laevigata*.
- 6.- Se documentó que en el tratamiento del sustrato testigo en presencia del hongo, los individuos de *P. laevigata* expresaron de manera consistente valores significativamente mayores en todos los caracteres de talla analizados, en comparación con los otros tres tratamientos, por lo que el hongo es un promotor de crecimiento en individuos de *P. laevigata*.
- 7.- Los caracteres de talla corporal de los individuos que crecieron en sustrato testigo con hongo formaron un grupo que fue significativamente diferente al resto de los otros tratamientos, independientemente del tiempo de exposición.
- 8.- El cobre fue el único metal que se bioacumuló a través del tiempo de exposición, en hoja y en raíz en presencia del hongo. Por lo que podemos decir que el hongo juega un papel importante en la bioacumulación de cobre en individuos de *P. laevigata*.
- 9.- Se detectó una relación positiva y significativa entre el tiempo de exposición al sustrato con hongo y los niveles de translocación del cobre. En contraste no

se documentó ninguna relación entre el tiempo de exposición y los niveles de translocación para el Zn y el Pb.

10.- Debido a que todos los promedios del factor de translocación con hongo para todos los metales analizados fueron mayores que aquellos sin hongo, se observa que el hongo si favorece la translocación de los metales de la raíz a la hoja en *P. laevigata*, lo que puede considerarse para estrategias de fitorremediación.

11.- La cepa C7 no genera efectos fitotóxicos en las plantas de *Prosopis laevigata* crecidas en sustrato jal.

PERSPECTIVAS

- Identificar molecularmente a que especies pertenecen los hongos endófitos aislados de individuos de *Prosopis laevigata* provenientes de los jales de Huautla, Morelos.
- Evaluar la capacidad de las cepas C7 y C8 en consorcio en cuanto a la promoción de crecimiento vegetal y remoción de metales pesados en condiciones de invernadero.
- Desarrollar una estrategia de fitorremediación empleando la cepa C7 para disminuir la contaminación con Cu en los jales de Huautla, Morelos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul, T. K. I., & Maghsoud, Z. T. (2007). *Critical behavior of Iron (III) with a typical catecholate siderophore*.
- Abello, J. F., & Kelemu, S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(2), 55–57.
- Adams, P., De-Leij, F. A. A. M., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 54(2), 306–313.
- Albores, J. E. R., & Cedillo, M. G. R. (2002). Avifauna de la región oriente de la sierra de Huautla, Morelos, México. *Anales Del Instituto de Biología. Serie Zoología*, 73(1), 91–111.
- Alloway, B. J. (2012). *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability* (Vol. 22). Springer Science & Business Media.
- Anahid, S., Yaghmaei, S., & Ghobadinejad, Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica*, 18(3), 502–508.
- Armienta, M. A., Villaseñor, G., Rodriguez, R., Ongley, L. K., & Mango, H. (2001). The role of arsenic-bearing rocks in groundwater pollution at Zimapan Valley, Mexico. *Environmental Geology*, 40(4–5), 571–581.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649–15654.
- Arriagada, C. A., Herrera, M. A., & Ocampo, J. A. (2007). Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 84(1), 93–99.
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2008). Multifaceted

beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1733–1740.

- Baghour, M., Moreno, D. A., Villora, G., Hernández, J., Castilla, N., & Romero, L. (2001). Phytoextraction of Cd and Pb and physiological effects in potato plants (*Solanum tuberosum* var. Spunta): Importance of root temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5356–5363.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., & Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124(3), 949–958.
- Bain, J. G., Blowes, D. W., Robertson, W. D., & Frind, E. O. (2000). Modelling of sulfide oxidation with reactive transport at a mine drainage site. *Journal of Contaminant Hydrology*, 41(1–2), 23–47.
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D., & Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), 173–181.
- Beltrán, M. E., & Gómez, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172–197.
- Betancur, L. M. A., Mazo, K. I. M., & Mendoza, A. J. S. (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 57–60.
- Bonfim, J. A., Vasconcellos, R. L. F., Baldesin, L. F., Sieber, T. N., & Cardoso, E. J. B. N. (2016). Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. *Fungal Ecology*, 20, 202–210.
- Bremauntz, A. F. (2004). *Las sustancias tóxicas persistentes*. Instituto Nacional de Ecología.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198–207.

- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C. E., & Vernon-Carter, E. J. (2010). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, 101(15), 5862–5867.
- Canet, C., & Camprubi, A. (2006). *Yacimientos minerales: los tesoros de la tierra*. Fondo de Cultura Económica, México DF, México.
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA-MEXICO-*, 42(3), 131–143.
- Carpaena, R. O., & Bernal, M. P. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Carrillo, F. R. (2006). Efecto de la poda sobre el potencial productivo de mezquites nativos (*Prosopis glandulosa* Torr., var. *glandulosa*) en la Comarca Lagunera. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 6, 47–54.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69(1), 2–9.
- Carroll, G. (1995). Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1316–1324.
- Carroll, G. C. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. *Microbiology of the Phyllosphere*, 203–222.
- Castañeda Bautista, J. A. (2016). *Estudio ecotoxicológico de los jales mineros en Huautla, Morelos: El caso de Pithecellobium dulce (Roxb) Benth. (Fabaceae)*. Tesis de Maestría. Centro de investigación en biodiversidad y conservación
- Cherian, S., & Oliveira, M. M. (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental Science & Technology*, 39(24), 9377–9390.
- Choo, J., Sabri, N. B. M., Tan, D., Mujahid, A., & Müller, M. (2015). Heavy metal

- resistant endophytic fungi isolated from *Nypa fruticans* in Kuching Wetland National Park. *Ocean Science Journal*, 50(2), 445–453.
- Corrales-Pérez, D., & Romero, F. M. (2013). Evaluación de la peligrosidad de jales de zonas mineras de Nicaragua y México y alternativas de solución. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*, 65(3), 427–446.
- Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7–21.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., & Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1268–1280.
- DalCorso, G., Manara, A., & Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics*, 5(9), 1117–1132.
- de Bary, A. (1866). *Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten*. Engelmann.
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2), 597–612.
- Eapen, S., Singh, S., & D'souza, S. F. (2007). Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances*, 25(5), 442–451.
- Faeth, S. H., & Fagan, W. F. (2002). Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, 42(2), 360–368.
- Gadd, Geoffrey M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1), 3–49.

- Gadd, GEOFFREY M. (2001). Metal transformations. *British Mycological Society Symposium Series*, 23, 359–382.
- García-Sánchez, R., Camargo-Ricalde, S. L., García-Moya, E., Luna-Cavazos, M., Romero-Manzanares, A., & Manuel Montaña, N. (2012). *Prosopis laevigata* and *Mimosa biuncifera* (Leguminosae), jointly influence plant diversity and soil fertility of a Mexican semiarid ecosystem. *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 87–103.
- Ghosh, M., & Singh, S. P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian J Energy Environ*, 6(4), 18.
- González, C. M. C., Pérez, M. J., & Carillo-González, R. (2005). El sistemaplanta-Microorganismo-suelo en áreas contaminadas con residuos de minas. *Colegio de Posgraduados. Texcoco, México*.
- Guerra-Sierra, B. E. (2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Revista Tecnología En Marcha*, 21(1), ág-191.
- Guízar, E., & Sánchez, A. (1991). *Guía para el reconocimiento de los principales árboles del Alto Balsas*.
- Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R. K., & Mohapatra, H. (2000). Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science*, 967–973.
- Haque, N., Peralta-Videa, J. R., Jones, G. L., Gill, T. E., & Gardea-Torresdey, J. L. (2008). Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. *Environmental Pollution*, 153(2), 362–368.
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T., & Kunoh, H. (2006). Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica*, 20(2), 72–81.
- Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Kheder, M. Ben, & Bousetta, H. (2009). Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. *Journal of Environmental Sciences*, 21(11), 1552–1556.

- Heredia-Acuña, C., Alarcón, A., Hernández-Cuevas, L. V., Ferrera-Cerrato, R., & Almaraz-Suarez, J. J. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Sciences*, 92(3), 321–333.
- Hernández-Acosta, E., Mondragón-Romero, E., Cristobal-Acevedo, D., Rubiños-Panta, J. E., & Robledo-Santoyo, E. (2009). Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 15(2), 109–114.
- Hernández-Acosta, E., Zaragoza, V. M. D., & Morales, A. V. (2020). Biodisponibilidad y acumulación de plomo y cobre en *Prosopis laevigata* establecida en depósitos mineros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(2).
- Hernández-Lorenzo, B. (2015). Análisis de la anatomía y morfología de *Prosopis laevigata*, por acumulación de metales pesados en la Sierra de Huautla, Morelos. *Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Del Estado de Morelos, Cuernavaca*.
- Intawongse, M., & Dean, J. R. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Additives and Contaminants*, 23(1), 36–48.
- Johnson, R. H., Blowes, D. W., Robertson, W. D., & Jambor, J. L. (2000). The hydrogeochemistry of the Nickel Rim mine tailings impoundment, Sudbury, Ontario. *Journal of Contaminant Hydrology*, 41(1–2), 49–80.
- Jumpponen, A. R. I., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, 140(2), 295–310.
- Jung, M. C. (2001). Heavy metal contamination of soils and waters in and around the Imcheon Au–Ag mine, Korea. *Applied Geochemistry*, 16(11–12), 1369–1375.
- Kamal, M., Ghaly, A. E., Mahmoud, N., & Cote, R. (2004). Phytoaccumulation of

- heavy metals by aquatic plants. *Environment International*, 29(8), 1029–1039.
- Kavamura, V. N., & Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*, 28(1), 61–69.
- Kelley, C., Gaither, K. K., Baca-Spry, A., & Cruickshank, B. J. (2000). Incorporation of phytoremediation strategies into the introductory chemistry laboratory. *The Chemical Educator*, 5(3), 140–143.
- Kuffner, M., De Maria, S., Puschenreiter, M., Fallmann, K., Wieshammer, G., Gorfer, M., Strauss, J., Rivelli, A. R., & Sessitsch, A. (2010). Culturable bacteria from Zn-and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1471–1484.
- Kunoh, H. (2002). Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. *Japanese Journal of Phytopathology*, 68(2), 124–127.
- Kusari, S., & Spiteller, M. (2012). Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*, 241–266.
- Lázaro, J. D., 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.
- Léveillé, J. H. (1846). *Considérations mycologiques, suivies d'une nouvelle classification des champignons*. Imprimerie de I. Martinet.
- Li, H.-Y., Wei, D.-Q., Shen, M., & Zhou, Z.-P. (2012). Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity*, 54(1), 11–18.
- Lin, Y.-F., & Aarts, M. G. M. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3187–3206.
- Lin, Z. (1997). Mobilization and retention of heavy metals in mill-tailings from

- Garpenberg sulfide mines, Sweden. *Science of the Total Environment*, 198(1), 13–31.
- Lodge, D. J., & Cantrell, S. (1995). Fungal communities in wet tropical forests: variation in time and space. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 1391–1398.
- Macek, T., Kotrba, P., Svatos, A., Novakova, M., Demnerova, K., & Mackova, M. (2008). Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. *Trends in Biotechnology*, 26(3), 146–152.
- Maghsoudi, V., Razavi, J., & Yaghmaei, S. (2009). *Production of chitosan by submerged fermentation from Aspergillus niger*.
- Marín-Guirao, L., Atucha, A. M., Barba, J. L., López, E. M., & Fernández, A. J. G. (2005). Effects of mining wastes on a seagrass ecosystem: metal accumulation and bioavailability, seagrass dynamics and associated community structure. *Marine Environmental Research*, 60(3), 317–337.
- Marivela, C., Guerrero, C., López, L., Sánchez, V., & Toledo, A. (2002). Metales pesados y medio ambiente. *Grupo de Seminario*, 1–26.
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(1), 67–78.
- 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). *Mexico: Universidad Autónoma Del Estado de Querétaro*.
- Mathur, N., & Vyas, A. (2000). Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. *Journal of Arid Environments*, 45(3), 191–195.
- McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 277–282.

- McGrath, S. P., Zhao, F. J., & Lombi, E. (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil*, 232(1–2), 207–214.
- McGrath, S. P., Zhao, J., & Lombi, E. (2002). *Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides*.
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2), 153–162.
- Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., & García, F. P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29–44.
- Mithöfer, A., Schulze, B., & Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*, 566(1–3), 1–5.
- Mokgalaka-Matlala, N. S., Flores-Tavizon, E., Castillo-Michel, H., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2008). Toxicity of arsenic (III) and (V) on plant growth, element uptake, and total amylolytic activity of mesquite (*Prosopis juliflora* x *P. velutina*). *International Journal of Phytoremediation*, 10(1), 47–60.
- Moncur, M. C., Ptacek, C. J., Blowes, D. W., & Jambor, J. L. (2005). Release, transport and attenuation of metals from an old tailings impoundment. *Applied Geochemistry*, 20(3), 639–659.
- Morlans, M. C. (1852). Introducción a la Ecología del paisaje y estructura del paisaje Editorial Científica Universitaria. *Universidad Nacional de Catamarca ISSN*, 3013, 2005.
- Muro-González, D. A., Mussali-Galante, P., Valencia-Cuevas, L., Flores-Trujillo, K., & Tovar-Sánchez, E. (2020). Morphological, physiological, and genotoxic effects of heavy metal bioaccumulation in *Prosopis laevigata* reveal its potential for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(32), 40187–40204.

- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., & del Castillo, E. R. (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 117–140.
- Navarro-Aviñó, J. P., Alonso, I. A., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Oelmüller, R., Sherameti, I., Tripathi, S., & Varma, A. (2009). Piriformospora indica, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis*, 49(1), 1–17.
- Olaniran, A. O., Balgobind, A., & Pillay, B. (2013). Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10197–10228.
- Ordóez, N. F., Otero, J. T., & Díez, M. C. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282–290.
- Ortiz, J. C. R., Fuentes, H. R., de Lira Reyes, G., de la Cerda, J. M., & Mireles, J. L. L. (2006). Capacidad de seis especies vegetales para acumular plomo en suelos contaminados. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(3), 239–245.
- Pachón, J. E., & Vela, H. S. (2008). Análisis espacio-temporal de la concentración de metales pesados en la localidad de Puente Aranda de Bogotá-Colombia. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 43, 120–133.
- Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184(1–4), 105–126.
- Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G., & Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *The International Journal*

- of Biochemistry & Cell Biology*, 41(8–9), 1665–1677.
- Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R., & Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*, 33(2), 112–119.
- Pilon-Smits, E., & Pilon, M. (2002). Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(5), 439–456.
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., & Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera: Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada*, 5(1–2), 149–155.
- Rajendran, P., Muthukrishnan, J., & Gunasekaran, P. (2003). *Microbes in heavy metal remediation*.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142–149.
- Ralph, P. J., & Burchett, M. D. (1998). Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution*, 103(1), 91–101.
- Ramírez, N., Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56–71.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169–181.
- Raskin, I. (1996). Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), 3164.
- Raven, J. A., Evans, M. C. W., & Korb, R. E. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthesis Research*, 60(2–3), 111–150.

- Reeves, R. D. (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants. In *Phytoremediation of metal-contaminated soils* (pp. 25–52). Springer.
- Reeves, R. D., Baker, A. J. M., Borhidi, A., & Berazain, R. (1999). Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany*, 83(1), 29–38.
- Rodríguez, D. T. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Revista Ecosistemas*, 12(2).
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, a R. S. and. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330.
- Romero, F. M., Armienta, M. A., Gutiérrez, M. E., & Villaseñor, G. (2008). Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 24(2), 43–54.
- Romero, F. M., & Gutiérrez Ruíz, M. (2010). Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*, 62(1), 43–53.
- Romero, S. E. G., Bustos, D. C. G., Marín, A. M. H., Rodríguez, C. Z. H., Casallas, M. L., & Vargas, P. C. M. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9), 76–84.
- Rosas-Ramírez, M. E. (2018). *Relación entre la bioacumulación de metales pesados y la concentración de clorofila en Sanvitalia procumbens*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma
- Rothen, C., Miranda, V., Aranda-Rickert, A., Fracchia, S., & Rodríguez, M. A. (2017). Characterization of dark septate endophyte fungi associated with cultivated soybean at two growth stages. *Applied Soil Ecology*, 120, 62–69.
- Ruíz, T. D. R. (2011). Uso potencial de la vaina de mezquite para la alimentación de animales domésticos del Altiplano Potosino. *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*, 1–114.

- Rzedowski, J. (1987). *Atlas cultural de México; flora*.
- Rzedowski, J., & Huerta, L. (1978). *Vegetación de México* editorial limusa. México, DF.
- Saikkonen, K, Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 319–343.
- Saikkonen, Kari, Wäli, P., Helander, M., & Faeth, S. H. (2004). Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9(6), 275–280.
- Salazar-Ramírez, G., Flores-Vallejo, R. del C., Rivera-Leyva, J. C., Tovar-Sánchez, E., Sánchez-Reyes, A., Mena-Portales, J., Sánchez-Carbente, M. del R., Gaitán-Rodríguez, M. F., Batista-García, R. A., & Villarreal, M. L. (2020). Characterization of Fungal Endophytes Isolated from the Metal Hyperaccumulator Plant *Vachellia farnesiana* Growing in Mine Tailings. *Microorganisms*, 8(2), 226.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132–146.
- Santoyo-Martínez, M. (2016). *Bioacumulación, daño genotóxico y cambios en la morfología foliar de Acacia farnesiana en los jales de Huautla, Morelos*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca
- 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. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–17.

- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., & Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66(9), 1794–1798.
- Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S., & Aust, H.-J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97(12), 1447–1450.
- Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1351–1365.
- Selim, K. A., El-Beih, A. A., & Abdel-Rahman, T. M. (n.d.). dan El-Diwany, Al 2012. Biology of endophytic fungi. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol*, 2(1), 31–38.
- Semarnat. (2007). Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1 (2004). Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio . *Diario Oficial de La Federación*.
- Sepúlveda, T. V. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Instituto Nacional de Ecología.
- Sheng, X.-F., Xia, J.-J., Jiang, C.-Y., He, L.-Y., & Qian, M. (2008). Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, 156(3), 1164–1170.
- Singh, H. (2006). *Mycoremediation: fungal bioremediation*. John Wiley & Sons.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., & Vangronsveld, J. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(5), 437–444.
- Solís-Miranda, B. (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*.

Stamets, P. (2005). *Mycelium running: how mushrooms can help save the world*. Random House Digital, Inc.

Stobrawa, K., & Lorenc-Plucińska, G. (2008). Thresholds of heavy-metal toxicity in cuttings of European black poplar (*Populus nigra* L.) determined according to antioxidant status of fine roots and morphometrical disorders. *Science of the Total Environment*, 390(1), 86–96.

Thangavel, P., & Subbhuraam, C. V. (2004). Phytoextraction: role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B*, 70(1), 109–130.

Thomas, S., Becker, P., Pinza, M. R., & Word, J. Q. (1998). *Mycoremediation of aged petroleum hydrocarbon contaminants in soil*.

Torrado, M., & Berlanga, V. (2012). Análisis Discriminante mediante SPSS. *REIRE. Revista d'Innovació i Recerca En Educació*, 2012, Vol. 6, Num. 2, p. 150-166.

Troeh, Z. I., & Loynachan, T. E. (2003). Endomycorrhizal fungal survival in continuous corn, soybean, and fallow. *Agronomy Journal*, 95(1), 224–230.

Van Assche, F., & Clijsters, H. (1986). Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effects on electron transport and photophosphorylation. *Physiologia Plantarum*, 66(4), 717–721.

Varma, A. (2008). *Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. Springer Science & Business Media.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, 21(5), 573.

Vivas, A., Barea, J. M., Biro, B., & Azcon, R. (2006). Effectiveness of

autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), 587–598.

- Volke Sepúlveda, T. L., Velasco, J. A., de la Rosa, D. A., & Solórzano, G. (2004). *Evaluación de Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados con Metales*.
- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195–226.
- Watanabe, M. E. (1997). Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environmental Science & Technology*, 31(4), 182A-186A.
- Wenzel, W. W., Bunkowski, M., Puschenreiter, M., & Horak, O. (2003). Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*, 123(1), 131–138.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 274–276.
- Wójcik, M., Vangronsveld, J., & Tukiendorf, A. (2005). Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 53(2), 151–161.
- Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., & Ruan, C. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, 174(1–3), 1–8.
- Yang, X. E., Long, X. X., Ye, H. B., He, Z. L., Calvert, D. V., & Stoffella, P. J. (2004). Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant and Soil*, 259(1–2), 181–189.
- Zimmer, D., Baum, C., Leinweber, P., Hrynkiewicz, K., & Meissner, R. (2009). Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from

a metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. *International Journal of Phytoremediation*, 11(2), 200–213.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 16 de diciembre del 2020.

NOMBRAMIENTO DE LA COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dra. Patricia Mussali Galante (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (codirector de tesis CEIB, UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB, UAEM)

Dra. Luz María Bretón Deval (IBT, UNAM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC, UAEM)

Por este conducto, me permito informarle que ha sido asignado integrante de la Comisión Revisora de la tesis que presenta la **C. Cynthia Margarita Concepción Acosta**, titulada: "**Aislamiento y caracterización de hongos endófitos aislados de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos**", realizada bajo la dirección de la DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE y codirección del DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL, en el Programa Educativo de Maestría en Biotecnología.

Agradezco su valiosa participación en esta Comisión y quedo a sus órdenes para cualquier aclaración o duda al respecto.

Atentamente

Por una humanidad culta
Una Universidad de excelencia

DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE
COORDINADORA DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA



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 DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2020-12-17 10:02:15 | Firmante

eGFjKRnBV4slG9QUgTrs8EliE4BvuvAyc/mBzHg1vDs/ot2dEjQd9/EsnesZ17AsDJNKaeJn7bAyTsO62Edc9fBrrqUCm/RkYmZPOJCgHGwS0OGcgxLYBShv8PR/ninPTHwptK1kWKuDxZNQxofynGZQjQ1cK8KaLYu+aZ9HkxQNiIN9CmtETyI+A2FIBE+v2CP1sDt7YzcZDvEixThIn+lK9P3rZ/Hhwnmr4+qSLQz15f7XlKv7bJGHountg5WSJz6tsIU/zJKZVwRZsQfpAeO4NRwar33hF4oiTbS6/Qw4Hsn92Ita3D77PZESfq+dn3cYKQKIQEes56bi2UA==

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



X3Kljd

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cANVkhicrUWGUxVrqXf6GS61RSx8LOmu>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Malloí (codirector de tesis CEIB, UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB, UAEM)

Dra. Luz María Bretón Deval (IBT, UNAM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC, UAEM)

Tesis: **"Aislamiento y caracterización de hongos endófitos aislados de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Cynthia Margarita Concepción Acosta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

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:2021-01-05 12:33:28 | Firmante

YxiyPM2T2uvU6PodOjUOXcSkvIDLpMYSmIPvmDoZKS4gKbvEIQpEuA2O472k87gyfPkMei5JBz3YN4X52ctFmdtAK0LDPOOXWbIMUc7qBSRKHc4TTyIwEOk2aMKgxmFDXe
p31dz9AzQpUDIWI+UyJwN1Fq6EZ6zEWxkd/idHROB+F72wjYvVce6d4f9J4yhYVtLgfKISG4khk9g3S7JOwyrghEVPqTbWXCLvpITajUaj2m9WSt++L3PKK2vVbTLbvPdEBIMCG
sYEWdL9+RnaQ+6ixraE7QymYe8G0PV4sjYt0xQXrqpJXy6w5l7y0UuA9Gf7/Hk5sDP4540Zssl6A==

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



[3kmA8M](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wLOp5swxQrGSim4ev1rvVHUcn7CGSXJz>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallol (codirector de tesis CEIB, UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB, UAEM)

Dra. Luz María Bretón Deval (IBT, UNAM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC, UAEM)

Tesis: **"Aislamiento y caracterización de hongos endófitos aislados de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Cynthia Margarita Concepción Acosta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL



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

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2021-01-04 18:15:16 | Firmante

P5a//wh5Eh6nRDsME3bUnnTHp68TP80g6jcOKD3qGwG1zOTr7xXTRmP3DivgBkiCocOz3a93OAOtZkEe1MWkGolkeUq00F2f/QbRh6b4AeShP2hp3oXSFiQo4LZONUXLxV4X
MtD2Dy4Q3NHR4kATmJUGZNqoAuwbL0JuLDFe+DCStDjigRylH9WXImN8vaQ7FV1dag1PihAPUHubDifQcHqheUoRrY0DpAM/R11KzpbWQug6xUtF5ut69/ASXsNOiw8R+n5w
LM6xolwsSHJcAPt7u5NWwbu2k9eiiP+1gR7YDaxvfW2P3luFVRThipD1+VUBO3RniEiczp0tSv8+aw==

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



NVfG8c

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qbJoArbUXUuYxtGEitTFpsVwKsQ8MNOV>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (codirector de tesis CEIB, UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB, UAEM)

Dra. Luz María Bretón Deval (IBT, UNAM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC, UAEM)

Tesis: **"Aislamiento y caracterización de hongos endófitos aislados de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Cynthia Margarita Concepción Acosta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

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:2021-01-04 17:50:20 | Firmante

ILpj6d4YgpRmiNNQIRNwBSI/Xax/0A1MOWj9dtNKDZnzibSgFLcidQ/J+6KMxWA96WmjKz9IE3w1Mi0t79EA09HheXvJVX8Mrl7hhj9gw57tWpn/KT1a+29NShyDzlYQth4dZvlkrT6844oWAP+8XXWgX6UnLbGmMYuZGEX1MaL6TtiSQiuQ9S/r22k1nixozDv/y3QbmTvqnnZdlRi47a3z0HpYwZl22ur/brDmku1+CUj1r+cPLjH51BxHDzWkf2ETXIJFvUbOLYk12lItqv3SCO38H/gbuTlyoibdTitSa57w+VHsMbJYnOnrJSJd4uzWRvUhl87obsW69BVhg==

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



[FyCcAJ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/A6aHLtjM0HgnHZwCtzcMn4U7Nf5M2Zai>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Malloí (codirector de tesis CEIB, UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB, UAEM)

Dra. Luz María Bretón Deval (IBT, UNAM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC, UAEM)

Tesis: **"Aislamiento y caracterización de hongos endófitos aislados de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Cynthia Margarita Concepción Acosta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. SUSANA VALENCIA DÍAZ



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

SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2021-01-04 20:30:52 | Firmante

H8+SqjqfUvULYigX6ftFSNSRhgWCVFp9S/Lge5319IN6XLzjHykGMBSbJI+hBDYSAqdPGODGSoIlgmqth/nKmVJRIJeUEPNa8qFNGpUj87tudjtOzmlu9M0Wky7rNSGQ2C/vj
QMLUuEZhf6bw22Ps3e/WqmoPfmhMf7a2+RAcZ9tDSZuvdfnx7Zx0MAQ3xtXdmktnacygPF0Z/bjxal01oN76dY4PjgCjq/miVISwhH1NKcmleq4Egw2po3ahmyrD6BnFuctiKyApaeZ
HNz9eOxBSCdskclV9VA547dYsVI0PfxbvYw7J+SPFTTweQjMxsza6HZEIOdE3GnA==

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



oiALsR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Q6868ujExBFdELjANPnKixFIRVTU40so>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 16 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (codirector de tesis CEIB, UAEM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB, UAEM)

Dra. Luz María Bretón Deval (IBT, UNAM)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (CIByC, UAEM)

Tesis: **"Aislamiento y caracterización de hongos endófitos aislados de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Cynthia Margarita Concepción Acosta**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. LUZ MARÍA BRETÓN DEVAL



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

LUZ DE MARIA BRETON DEVAL | Fecha:2021-01-08 15:21:17 | Firmante

CwqubqLYGM6f+/wdt5pqPDUYgpZJLIkInbG5JbV17eC4hlwjsU2mMc0Aq2W8INy2Gd8Jqdy2X/ohaAUQG9CGB4YBig9EDbiM1W8Aur6zVw2w35n9vpmwTgqaQEupa13Aqjmbk2zgHtKLC+62XKFddQSD9ZrIBWrVWZei4zhgdVFEIBW6hlcqC148OszKEE+wYvLhpVVesyijHmhBBV/zfUppqmH+QsTbBZHGLNgk8T9dD3bJ/sDfab6RSnOQz3Yj8HKbF83YUeTxIVJyY/WSIX/Ys5opT07IDrmb7E3aeTGt1U4kf3zYLV1ECe5Jd6awgss8fuAfwmkYQF9O7CF/Hg==

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



[mVISHB](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7HqsZOPkdFXADEFCLSzOt7YvzBwd01PN>

