



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO ECOTOXICOLÓGICO DE *DODONAEA VISCOSA* EN JALES  
DE HUAUTLA MORELOS: MARCADORES MORFOLÓGICOS,  
GENÉTICOS, QUÍMICOS Y DE BIOACUMULACIÓN

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A

M. EN BIBYC. JOEL DANIEL CASTAÑEDA ESPINOZA

DIRECTOR: DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ

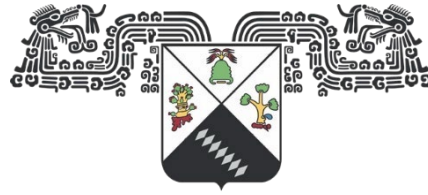
CODIRECTOR: DR. DAVID OSVALDO SALINAS SÁNCHEZ

CUERNAVACA, MORELOS

Diciembre, 2022

El trabajo se realizó:

En la máxima casa de estudios  
Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

Laboratorio de Investigaciones  
Ambientales (LIA) perteneciente al  
Centro de Investigación en  
Biotecnología (CEIB)



Centro de Investigación en  
Biodiversidad y Conservación (CIByC)



Centro de Investigación Biomédica Del  
Sur (CIBIS)



## Dedicatoria

A mis padres Jorge Castañeda T. † y Georgina Leticia Espinoza G. † les agradezco por darme la vida, y al estar conmigo en el camino de la vida, siempre presentes en mi corazón.

A mis hermanos Jorge, Antonio, Perla y a mis sobrinos (Jorge Jair, Yoselin y Maximiliano) que me han apoyado con su amor y cariño.

A Blanca Elizabeth que siempre está al pendiente de mí, apoyo y amor incondicional.

A mis amigos del laboratorio de Investigaciones Ambientales Dalia, Tatiana, Miriam, Miguel G., Juan, Janeth, Luis, Eder, Sayuri y Marcos, por las aventuras de las salidas de campo, y procesamiento del material.

A toda mi familia por estar al pendiente de mi carrera profesional.

*“En la vida ni se gana ni se pierde, ni se fracasa ni se triunfa. En la vida se aprende, se crece, se descubre; se escribe, borra y reescribe; se hila, se deshila y se vuelve a hilar”.*

Ana Cecilia Blum

## Agradecimientos

Al Doctorado de Ciencias Naturales por darme la oportunidad para realizar un posgrado para mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para la realización del proyecto.

Al comité de sínodos: Dr. Efraín Tovar Sánchez, Dra. Patricia Mussali Galante, Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez, Dr. Ramón Suárez Rodríguez, Dr. Manasés González Cortázar, Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, Dra. María Luisa Castrejón Godínez y Dra. Lucia Lourdes Aguilar Santamaria, por el tiempo dedicado a la revisión, así como sus valiosas aportaciones que enriquecieron este proyecto.

Al Dr. Efraín Tovar Sánchez director del proyecto, Gracias por brindarme siempre su apoyo, paciencia, confianza y amistad, por siempre estar al pendiente de mi trabajo. Por abrirme las puertas de su laboratorio e integrarme a este gran equipo de trabajo. Por todas las oportunidades que me ha brindado, así como sus grandes aportaciones para la realización de este proyecto.

A la Dra. Patricia Mussali Galante Gracias por brindarme sus palabras de aliento en toda la estancia doctoral, por su paciencia, confianza y amistad, y por todas las aportaciones que enriquecieron a este proyecto.

Al Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez, Gracias por brindarme su apoyo, comentarios, confianza y amistad.

Al Dr. Ramón Suárez Rodríguez Gracias por todos sus comentarios, correcciones y preguntas que nutrieron este trabajo.

Al Dr. Manasés González Cortázar Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza, amistad, comentarios, apoyo y guía durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo, confianza, tiempo y espacio brindado.

Al Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís, Gracias por sus valiosas aportaciones y comentarios para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. María Luisa Castrejón Godínez Gracias por su apoyo, comentarios y sus valiosas aportaciones para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Lucia Lourdes Aguilar Santamaria, Gracias por su apoyo, correcciones y comentarios

# Índice

	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Minería en México.....	4
Métodos de remediación para los metales pesados.....	5
Fitorremediación.....	5
Especie en estudio <i>Dodonaea viscosa</i> .....	6
Descripción botánica.....	6
Distribución geográfica.....	7
<i>Dodonaea viscosa</i> como especie hiperacumuladora.....	7
Mecanismos de genotoxicidad por metales pesados.....	8
El ensayo cometa como una técnica de evaluación genotóxica.....	9
Metabolitos con relación a los metales pesados.....	10
Justificación.....	11
Hipótesis.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares.....	12
Materiales y Métodos.....	12
Sitios de estudio.....	12
Obtención de las semillas.....	13
Tratamiento pre-germinativo.....	14
Diseño experimental.....	14
Evaluación de daño genético con Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).....	15
Caracteres morfológicos de <i>D. viscosa</i> : macro y micromorfológico.....	17
Bioacumulación de metales.....	18
Fitoquímica foliar.....	19

Obtención de los extractos.....	19
Análisis HPLC.....	20
Análisis estadístico.....	21
Resultados.....	22
Daño genético.....	22
Morfología.....	24
Bioacumulación de metales pesados en raíces y hojas de <i>D. viscosa</i> que crece en sustrato jale y control.....	28
Raíz.....	28
Hoja.....	29
Factores de enriquecimiento y translocación de metales pesados en las raíces y hojas de plantas de <i>D. viscosa</i> que crecen en sustrato jale.....	30
Relación entre la bioacumulación de metales y los caracteres de tamaño, caracteres micromorfológicos y daño genético en individuos de <i>D. viscosa</i> .....	38
Fitoquímica foliar.....	38
Relación entre la producción de glucósido de quercetina, luteolina y rutina y la bioacumulación en individuos de <i>D. viscosa</i> .....	43
Discusión.....	45
Conclusión .....	57
Bibliografía.....	58

## Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Daño al ADN (longitud de cauda, micras) por MP (promedio $\pm$ error estándar) de <i>D. viscosa</i> a través del tiempo (meses).....	23
Tabla 2. Micromorfología de <i>D. viscosa</i> a través del tiempo (meses).....	26
Tabla 3. Caracteres de tamaño y número de hojas de los individuos de <i>D. viscosa</i> a través del tiempo. (meses).....	27
Tabla 4. Biomasa de hojas y raíz de <i>D. viscosa</i> .....	28
Tabla 5. Factor de enriquecimiento y translocación de metales esenciales en individuos de <i>D. viscosa</i> .....	35
Tabla 6. Producción de glucósido de quercetina, luteolina y rutina, (promedio $\pm$ error estándar) de <i>D. viscosa</i> a través del tiempo (meses).	42

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. Sitios de estudio.....	13
Figura 2. Semillas de <i>Dodonaea viscosa</i> con radícula con 7 días después del tratamiento pregerminativo en caja Petri con papel filtro y con agua.....	14
Figura 3. Semillas de <i>Dodonaea viscosa</i> con radícula sembradas en 200 macetas con suelo.....	14
Figura 4. Plántulas de <i>Dodonaea viscosa</i> de 15 cm trasplantadas en jale y suelo de Quilamula.....	15
Figura 5. Portaobjetos preparados con 80 µl de LMPA al 0.5% y con 80 µl de LMPA al 0.5%.....	16
Figura 6. Se observa un cometa con bromuro de etidio en el microscopio de fluorescencia.....	16
Figura 7 a) Medición de la altura, numero de hojas y diámetro basal de los individuos de los diferentes tratamientos, b) Se colocaron en bolsas de papel de estraza a los individuos para el proceso de secado en la estufa eléctrica.....	17
Figura 8. La flecha amarilla muestra una célula epidérmica. La flecha negra muestra una estoma.....	18
Figura 9. a) Digestion de la muestra con acido nitrico, b) Aforo con agua destilada a 50 ml.....	19
Figura 10. Cuantificación de metales pesados en el espectrofotómetro de absorción atómica.....	19
Figura 11. Se observa núcleo de individuo control (a) y núcleo de individuo jale (b) de <i>D. viscosa</i> mediante la técnica de ensayo cometa pH13 y observados a 40X.....	22
Figura 12. Caracteres de tamaño de <i>Dodonaea viscosa</i> se observa del jal individuos de talla menor con respecto a los individuos control (a) y hojas más pequeñas en individuos en tratamiento jal (b) con respecto a las hojas de individuos control (c).....	25
Figura 13. Metales esenciales en raíz de <i>D. viscosa</i> .....	31
Figura 13. (continuación) Metales no esenciales en raíz de <i>D. viscosa</i> .....	32
Figura 14. Metales esenciales en hojas de <i>D. viscosa</i> '.....	33



Figura 14. (continuación) Metales no esenciales en hojas de <i>D. viscosa</i> .....	34
Figura 15. Análisis de regresión entre la concentración de MP y los niveles de daño genético, caracteres de tamaño y caracteres micromorfológicos en individuos de <i>D. viscosa</i> que crecen en sustrato de control y jale en condiciones de invernadero. Solo se muestran correlaciones significativas a $P < 0,05$ .....	37
Figura 16. Cromatogramas de Glucosido de quercetina jale, referencia y control (a, b y c respectivamente) en un tiempo de retención de 8.9, observada en una longitud de onda UV de 360 nm.....	39
Figura 17. Cromatogramas de rutina jale, referencia y control (a, b y c respectivamente) en un tiempo de retención de 8.7, observada en una longitud de onda UV de 360 nm.....	40
Figura 18. Cromatogramas de Luteolina jale, referencia y control (a, b y c respectivamente) en un tiempo de retención de 13.6, observada en una longitud de onda UV de 340 nm.....	41
Figura 19. Análisis de regresión entre la concentración de MP y glucósido de quercetina, luteolina y rutina de <i>D. viscosa</i> que crecen en sustrato de control y jale en condiciones de invernadero. Solo se muestran correlaciones significativas a $P < 0,05$ .....	43

**Castañeda-Espinoza, J. D.** 2022. Estudio ecotoxicológico de *Dodonaea viscosa* en jales de Huautla, Morelos: marcadores morfológicos, genéticos, químicos y de bioacumulación. Tesis doctoral. Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

## Resumen

La industria minera constituye una actividad de importante impacto económico en México. Sin embargo, muchas zonas del país han sido contaminadas por los residuos que produce esta actividad, principalmente por la mala disposición de los relaves mineros, que contienen elementos potencialmente tóxicos como los metales. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. es una planta de amplia distribución que se expande por casi todo el territorio mexicano y es utilizada en la medicina tradicional para tratar muchas dolencias. Esta especie se ha encontrado asociada con áreas contaminadas, incluyendo relaves mineros. Huautla, Morelos, México, fue un distrito metalúrgico donde las actividades mineras generaron 780,000 toneladas de desechos ricos en metales, depositados a 500 m del pueblo sin tratamiento alguno; esta situación se ha relacionado con diferentes amenazas ambientales y riesgos para la salud humana. El estudio se realizó durante 18 meses sobre plántulas desarrolladas bajo condiciones de invernadero en dos tratamientos: sustrato testigo y sustrato de relaves de mina. Se midió la concentración de seis metales (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb y Zn) mediante espectrofotometría de absorción atómica en tejidos vegetales, raíces y hojas. Los efectos de la exposición al metal se analizaron en la morfología, concentración de los metabolitos secundarios y daño genético en el tejido foliar utilizando el ensayo del cometa. Los resultados mostraron concentraciones de metales significativamente más altas en las raíces y las hojas de los individuos que crecían en el sustrato jale en comparación con los mismos tejidos de plantas que crecían en el sustrato control. Se registraron relaciones positivas y significativas entre el tiempo de exposición y la concentración de metales en raíces y hojas, y entre la bioacumulación de metales en hojas y el daño genético. Glucósido de quercetina y rutina mostraron relaciones positivas y significativas con todos los metales analizados. Cuatro de los seis caracteres micromorfológicos y de tamaño evaluados disminuyeron significativamente en las plantas expuestas, excepto el índice estomático y la biomasa de raíces. Los metales más importantes en términos del número de caracteres micromorfológicos y de tamaño significativamente afectados mostraron el siguiente patrón: Fe > Cd = Cr = Pb > Cu > Zn. *D. viscosa* es un acumulador eficiente de Cu, Cd, Fe, Pb y Zn en sus tejidos de raíces y hojas. En general, los factores de translocación de metales en las plantas expuestas de *D. viscosa* mostraron el siguiente patrón: Zn > Cu > Cd. Concluimos que *D. viscosa* tiene potencial para fitoextraer (Zn, Cu y Cd) y fitoestabilizar (Cu, Cd, Fe, Pb y Zn) metales de suelos contaminados y, junto con su abundancia, establecimiento natural en relaves mineros y los altos niveles de translocación de metales y factores de bioconcentración, sin afectar el desarrollo de

la planta, puede ser un candidato ideal para la fitorremediación de suelos contaminados por metales.

**Palabras clave:** Metales pesados, · factor de translocación, · factor de bioacumulación, · fitorremediación, metabolitos secundarios *Dodonaea viscosa*

## Introducción general

En las últimas décadas las actividades antropogénicas han intensificado de manera sustancial el deterioro ambiental del planeta (Volke y Velasco, 2002). La minería en México constituye una de las actividades con mayor importancia tanto económica como sociocultural. La minería es una de las industrias con mayor impacto económico por la obtención de metales como oro (Au), plata (Ag), hierro (Fe), cobre (Cu), cadmio (Cd) y plomo (Pb). Esta actividad minero-metalúrgica requiere de la excavación de minas, la remoción de minerales y procesos de extracción de los metales (Espino-Ortega, 2014), sin embargo, esta actividad genera impactos negativos al ambiente ya que crea grandes cantidades de residuos líquidos, gaseosos y sólidos, siendo estos últimos denominados Jales, colas, relaves o tailings, los que más se asocian con efectos negativos al ambiente (Romero *et al.*, 2008; Romero y Gutiérrez-Ruíz, 2010). Los jales son residuos de granulometría fina ( $\leq 50 \mu\text{m}$ ) que se producen durante el proceso de recuperación de los metales, frecuentemente los jales son depositados en sitios aledaños a las minas sin algún tratamiento, generando un riesgo potencial para el ambiente por el contenido de los elementos potencialmente tóxicos (EPT's) como los metales pesados (MP). Los MP son considerados elementos peligrosos para la biota, debido a que no pueden ser metabólicamente asimilados. La concentración de MP más allá de los límites máximos permisibles promueve efectos adversos para la

salud, debido a la interferencia con el funcionamiento normal de los sistemas vivos. Esto se debe a que los elementos de MP se acumularán en los tejidos corporales de los organismos vivos (bioacumulación) aumentando su potencial tóxico y luego aumentarán su concentración a medida que pasen de niveles tróficos inferiores a niveles tróficos superiores (biomagnificación), afectando todos los niveles de organización biológica -desde las moléculas hasta los ecosistemas- (Khan *et al.*, 2008; Mussali-Galante *et al.*, 2013).

La contaminación por MP se ha convertido en una gran preocupación a nivel mundial, debido a su persistencia y toxicidad que generará al medio ambiente e incluso para el hombre (Hernández-Muñoz *et al.*, 1992; Ceribasi y Yetis, 2001).

La toxicidad de los MP está dada por la exposición y los subsecuentes efectos en los organismos asociados, este proceso se puede analizar en: la exposición externa, la dosis interna, los efectos biológicos tempranos, alteraciones en estructura y función celular, cambios fisiológicos y la aparición de la enfermedad (Heuvel y Davis, 1999).

La absorción de MP por los productores primarios (plantas), es el primer paso para su incorporación a la red trófica (Prieto *et al.*, 2009), la bioacumulación de los metales en plantas puede variar entre familia, género o especie (Calow, 1993). Se ha propuesto que esta variación está relacionada con estrategias de absorción de MP presentes en organismos, como: a) capacidad de evasión (mediante la impermeabilidad y/o excreción de metales) y b) tolerancia (acumulación de cantidades excesivas de MP), a las especies con estas características se les denomina hiperacumuladoras.

Los MP pueden tener efectos negativos sobre los organismos: a) inhibición de la germinación de semillas, b) disminución del crecimiento y desarrollo de plántulas, c) disminución de biomasa, d) alteración de procesos bioquímicos, como la producción de metabolitos secundarios, e) cambios en la diversidad genética, y f) daño genético (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013; Hernández-Lorenzo, 2014; Santoyo, 2015; Murillo, 2015).

### **Minería en México**

En México, se documenta que las 32 entidades federativas tienen yacimientos mineros (CEFP, 2013), la minería ha generado una gran cantidad de sitios contaminados por MP y se ha documentado que el 65% de la contaminación industrial proviene de la industria minera (Carrizales *et al.*, 2005). En particular en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH), con una vegetación predominante de bosque tropical caducifolio (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Dorado *et al.*, 2005). En el municipio de Tlaquiltenango, Morelos, se localiza el poblado de Huautla, fue reconocida como una zona minera por excelencia durante los siglos XVIII y XIX. Como consecuencia de esta actividad se acumularon en dos jales que contienen aproximadamente 780,000 t de desechos, que se encuentran a la intemperie y sin ningún manejo (Volke *et al.*, 2004). Los MP que más abundan en la zona son el Pb y el arsénico (As), además de otra cantidad de material no procesado rico en Pb, Cd y manganeso (Mn). Una de las especies vegetales bien representada en los jales es *Dodonaea viscosa*, la cual se caracteriza por presentar una amplia distribución geográfica y estar asociada a ambientes perturbados,

además es una especie que se ha reconocido como hiperacumuladora de MP. Por lo que representa un sistema ideal para realizar estudios ecotoxicológicos.

### **Métodos de remediación para los metales pesados**

Los métodos convencionales actuales para remediar suelo y agua contaminados por MP, como la excavación *ex situ*, el vertido de los suelos contaminados (Zhou y Song, 2004), la desintoxicación (Ghosh y Singh, 2005) y la remediación físico-química son costosas (Danh *et al.*, 2009), consume tiempo, trabajo exhaustivo, incrementa la movilización de contaminantes y destruye la estructura edáfica y biótica del suelo. Por lo tanto, estas técnicas de remediación no son financieramente adecuadas para grandes áreas contaminadas (Baccio *et al.*, 2003).

La biorremediación se desarrolló como una tecnología para degradar contaminantes a un nivel bajo de tóxicos mediante el uso de microorganismos. Sin embargo, el uso de esta tecnología para remediar áreas contaminadas mediante la aplicación de organismos vivos fue menos exitosa para MP y contaminantes orgánicos. Las plantas son capaces de metabolizar sustancias producidas en ecosistemas naturales (Vidali, 2001). La fitorremediación es un enfoque en el que se aplican plantas para desintoxicar áreas contaminadas (Garbisu y Alkorta, 2001; Mangkoedihardjo y Surahmida, 2008).

### **Fitorremediación**

La fitorremediación es una tecnología prometedora de bajo costo en donde se utilizan plantas para desintoxicar áreas contaminadas (Mangkoedihardjo y Surahmida, 2008), más amigable con el medio ambiente. Ayuda a inmovilizar,

degradar, eliminar o desintoxicar contaminantes, incluidos MP, pesticidas, hidrocarburos y solventes clorados (Zhang *et al.*, 2010). Una especie ideal para la utilización en la fitorremediación con éxito debe tener una tasa de crecimiento rápida, alta biomasa, un sistema de raíces excesivo, acumulación de alta concentración de MP y una alta tolerancia cuando se expone a altas concentraciones de MP (Garbisu y Alkorta, 2001). Nagaraju y Karimulla (2002) sugieren algunas especies vegetales con potencial para la remediación de suelos contaminados con diferentes tipos de elementos trazas, entre ellas se encuentran *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) y *Cassia auriculata* (Fabaceae). Una de las especies vegetales bien representada en los jales de Huautla es *D. viscosa*.

### **Especie en estudio *Dodonaea viscosa***

#### **Descripción botánica**

La especie *D. viscosa* es un arbusto perennifolio, de dos a tres metros de altura, pegajoso, con hojas alternas, sésiles o casi sésiles, angostas, de hasta 12 cm de largo, resinosas en la cara superior, con pequeñas flores, unisexuales, amarillentas, con dos a cinco pétalos (en realidad tépalos, ya que no se distinguen sépalos y tépalos), las flores masculinas con 5 a 8 estambres de filamentos cortos y anteras grandes, y con el ovario rudimentario; las flores femeninas con los estambres rudimentarios muy pequeños y su fruto es seco (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

## **Distribución geográfica**

*Dodonaea viscosa* es una especie cosmopolita y tiene una amplia distribución geográfica en México. Se ha registrado en los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998). Las condiciones geográficas y ambientales donde crece y se desarrolla no son determinantes para su distribución espacial, pues se le encuentra en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2600 m, desde zonas desérticas hasta bosques perturbados (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

## ***Dodonaea viscosa* como especie hiperacumuladora**

Lalehgani y Baradar (2016) han propuesto a *D. viscosa* como especie hiperacumuladora en la absorción de cesio-133 y estroncio-84, por lo que consideran a la especie recomendable para fitorremediador ambientes contaminados por estos metales. Por su parte, Khudhair y Zaki (2017) documentan que *D. viscosa* es una especie hiperacumuladora de plomo (Pb) en la raíz y partes aéreas. Por otro lado, *D. viscosa* mostró una buena capacidad de acumulación de metales pesados en un suelo impactado por jales, mostró enriquecimiento múltiple de metales pesados como Cr, Ni, Co, Fe, Mn, Cu, Zn (Nawab *et al.*, 2016).



## **Mecanismos de genotoxicidad por metales pesados**

La toxicidad de los MP está en función de la efectividad del transporte de membrana, ya que ésta condiciona el tiempo de permanencia con sus moléculas blanco, lo que depende de diversos factores como son: a) tipo de compuesto al que se haya expuesto el organismo, b) dosis, c) vía de exposición y d) tipo celular (Hartwig, 1995; Ferrer, 2003). En general, los mecanismos en que los MP producen daño al ADN son: a) estrés oxidante por la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), b) interferencia con las enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, c) alquilación de bases, d) formación de aductos y e) entrecruzamientos inter e intracadena (Mussali-Galante *et al.*, 2013).

El estrés oxidante es una condición que resulta por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) potencialmente tóxicos como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo (OH), y las actividades de los sistemas de secuestro de éstas, en los que se incluyen enzimas como son la superóxido dismutasa, la catalasa, la peroxidasa y la peroxiredoxina. Cuando las ERO no son secuestradas, estas reaccionan con el ADN oxidando el esqueleto azúcar-fosfato y las bases; esta reacción con los azúcares provoca su fragmentación, que lleva a la pérdida de la base nitrogenada y al corte de la cadena.

Asimismo, éstas pueden reaccionar con las enzimas involucradas en los procesos de reparación del ADN cambiando su estructura, lo cual conlleva a su desactivación; por lo tanto, si el daño es muy extenso no alcanza a ser reparado por completo y durante la replicación de ese segmento, el ADN polimerasas

pueden incorporar bases equivocadas al leer la base oxidada, perpetuando así la alteración (Ramos *et al.*, 2006; Tapia y Araya, 2006).

Como consecuencia del creciente interés por evaluar los efectos causados por distintos agentes potencialmente genotóxicos, se han desarrollado varias técnicas que permiten cuantificar el daño al ADN, dentro de las cuales algunas de las más utilizadas son: a) intercambio de cromátidas hermanas (ICH), b) ensayo de Ames, c) micronúcleos, d) aberraciones cromosómicas y e) electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa (Prieto *et al.*, 2006). Esta última ha tenido recientemente gran aceptación debido a su grado de sensibilidad, por la rapidez con la que se realiza, por su capacidad de utilizar cualquier tipo celular eucarionte, además de permitir la evaluación de células individuales y que la cantidad de muestra necesaria es pequeña ( $1.5 \times 10^4$  células; Valverde *et al.*, 1999; Mussali, 2001; Márquez *et al.*, 2003; Vindas *et al.*, 2004). Asimismo, esta técnica ha sido utilizada con gran éxito para la evaluación del efecto genotóxico de los MP sobre la biota y como importante biomonitor ambiental (Mussali-Galante *et al.*, 2013).

### **El ensayo cometa como una técnica de evaluación genotóxica**

Ostling y Johanson (1984) proponen la electroforesis unicelular alcalina para la detección de daño genotóxico en células individuales. Consiste en una electroforesis en microgel, donde las células han sido cubiertas con agarosa y colocadas en una solución de lisis con base en detergentes; a continuación, son sometidas a un campo eléctrico, son marcadas con fluorocromos y finalmente observadas en un microscopio de fluorescencia, donde las células se asemejan a la forma de un cometa. En los últimos años la metodología ha sufrido

modificaciones que permiten mayor sensibilidad en la detección de daño genotóxico, así como adaptaciones a distintos tipos celulares, las más relevantes son: en el pH de la solución de lisis, en el pH del amortiguador usado durante la electroforesis, en el voltaje de electroforesis, en el tiempo de desenrollamiento de ADN y en el de corrimiento durante la electroforesis (Mussali, 2001; Martínez-Pacheco, 2008; Cervantes-Ramírez, 2009).

### **Metabolitos con relación a los metales pesados**

En plantas superiores, el estrés biótico (por ejemplo, el ataque de herbívoros o patógenos), así como el estrés abiótico (MP) a menudo inducen la síntesis y acumulación de los mismos metabolitos secundarios (MS) relacionados con la defensa (Mithöfer *et al.*, 2004). Eder y Cosio, 1994 documenta que las plantas poseen mecanismos de defensa bioquímicos que previenen o reducen el daño generado. La defensa incluye la inducción tanto de la biosíntesis *de novo* como de la rápida acumulación de MS. Estos compuestos representan moléculas orgánicas de bajo peso molecular que no son necesarias para los procesos fisiológicos normales de la planta y, además, exhiben diferentes actividades biológicas (Kuc, 1995). Los MS tienen una gran diversidad química. Independientemente de la especie de planta o taxón, se encuentran las principales clases de metabolitos secundarios, como flavonoides, terpenoides y alcaloides (Kuc, 1995).

La importancia de realizar estudios en estos sistemas biológicos es conocer el comportamiento de las plantas ante los efectos de los metales pesados, los cuales podrían ser utilizados en estudios de fitorremediación de suelos contaminados por estos agentes tóxicos, debido a que son elementos clave en la

dinámica de los ecosistemas, y que son la base de las pirámides alimenticias en estos ecosistemas.

### **Justificación**

En México existen una gran cantidad de sitios contaminados por MP. En particular, en Huautla, Morelos, en donde se reportan 780,000 toneladas de desechos, a la intemperie y sin ningún manejo. Una de las especies vegetales bien representada en los jales es *D. viscosa*, una especie reconocida como hiperacumuladora de MP, el cual puede ser un sistema ideal para realizar estudios ecotoxicológicos. Por lo que es importante realizar estudios en estos sistemas biológicos, para conocer el comportamiento ante los efectos de acumulación de los MP en diferentes caracteres morfológicos, químicos y genéticos.

### **Hipótesis**

Si los individuos de *Dodonaea viscosa* son capaces de crecer y reproducirse en los jales de Huautla, Morelos, los cuales contienen metales biodisponibles, entonces se espera que estos bioacumulen metales pesados en sus tejidos incrementando los niveles de daño genético, cambios en los caracteres morfológicos, así como alteraciones en la composición de metabolitos secundarios.

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de los MP provenientes de los jales mineros de Huautla, Morelos sobre los caracteres morfológicos, genéticos, químicos y de bioacumulación en *D. viscosa* bajo condiciones de invernadero.

## Objetivos particulares

- Caracterizar parámetros morfológicos (micro y macromorfología) en individuos de *Dodonaea viscosa* creciendo en sustrato jal y testigo en invernadero.
- Evaluar el daño genético foliar de *Dodonaea viscosa* creciendo en invernadero con sustrato jal y testigo.
- Cuantificar la bioacumulación de Fe, Cr, Cd, Cu, Mn, Zn y Pb en raíz y hoja en *Dodonaea viscosa* expuesta en jal.
- Evaluar los grupos de compuestos químicos que presenta *Dodonaea viscosa* creciendo en sustrato jal y testigo.

## Materiales y Métodos

### Sitios de estudio

El sitio de estudio corresponde a los jales ubicados en el poblado de Huautla, Morelos, en donde se encuentran dos jales inactivos desde hace más de 20 años y a una distancia aproximada de 500 m de la población (Velasco *et al.*, 2004), esta zona se localiza en el interior de la REBIOSH, con una vegetación predominante de bosque tropical caducifolio (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Dorado *et al.*, 2005).

*Sitios expuestos:* Los jales se encuentran en los paralelos 18°26'36.37"N-99°01'26.71"O y 18°26'22.62"N-99°01'51.71"O a 500 m y 100 m respectivamente del poblado, con una separación entre ellos de 3 kilómetros (Figura 1). Los jales fueron explotados para extracción principalmente de Ag, Pb y Zn.

*Sitio control:* Se localiza en el poblado Quilamula ubicado al sur-oeste del municipio de Tlalquitenango, Morelos en los paralelos 18°30'52''N y 98°59'59''O, a una altitud de 1100 msnm, Se optó por el poblado Quilamula ya que presentan condiciones geográficas, climáticas, y de vegetación muy similares a las del poblado de Huautla, con la diferencia de que en estos sitios no presenta actividad minera, ni posee residuos de esta actividad (Figura 1).

En los sitios expuestos se obtuvo las muestras de jale y en el sitio control se obtuvo el suelo y las semillas.

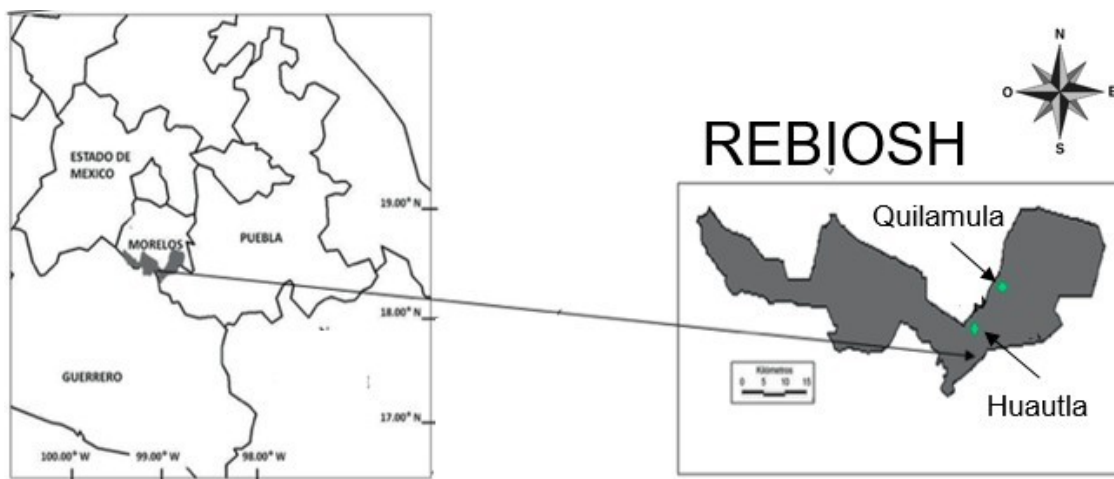


Figura 1. Sitios de estudio.

### **Obtención de las semillas**

Las semillas se recolectaron en el sitio control (Quilamula) de acuerdo a Gold *et al.* (2004), se realizó un transecto, y se recolectaron los frutos de 20 individuos elegidos al azar, se recogieron el 20% de las semillas maduras en ese momento, con la finalidad de tener representada la variabilidad genética de la especie, la colecta se realizó en el mes agosto cuando presentan frutos (Longitud: 18.509225, Latitud -99.013505).

### Tratamiento pre-germinativo:

Las semillas recolectadas fueron sumergidas en un litro de agua a 75°C, durante 3 minutos, para remover la cutícula, la cual es una capa cerosa impermeable que actúa como barrera física para el agua y agentes externos (Megías *et al.*, 2015), pasado el tiempo, se colocaron en agua a

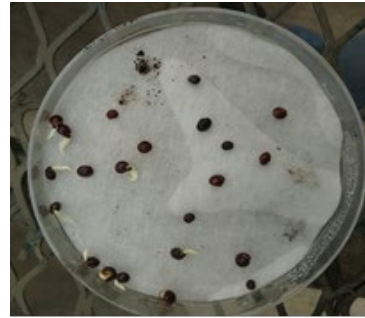


Figura 2. Semillas de *D. viscosa* con radícula con 7 días después del tratamiento pregerminativo en caja Petri con papel filtro y con agua.

temperatura ambiente (25°C±3°C), durante 12 horas (Camacho *et al.*, 1993). Posteriormente se colocaron en cajas Petri (100 x 15 mm) con papel filtro humedecido hasta la obtención de la radícula (Aproximadamente de 15 días; Figura 2).



a)



b)

Figura 3. Semillas de *D. viscosa* a) con radícula y b) sembradas en 200 macetas con suelo.

### Diseño experimental:

El crecimiento y desarrollo de las plántulas de *D. viscosa* se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero. El Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC), en el campus Chamilpa UAEM.

Se trasplantaron los individuos con una edad de 2 meses a 100 macetas sustrato-jale y 100 macetas con sustrato-control (Figura 4). Se realizó una cosecha cada 90 días, se muestrearon al azar seis individuos de cada



Figura 4. Plántulas de *D. viscosa* de 15 cm trasplantadas en jale y suelo de Quilamula.

tratamiento y se les evaluó el daño genético mediante ensayo cometa, morfológico (macro y micromorfología), químico y de bioacumulación de MP.

### **Evaluación de daño genético con Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)**

Para evaluar el daño genético se utilizó la técnica de electroforesis unicelular alcalina (pH 13), de acuerdo a Rojas *et al.* (1999; ensayo cometa). Se recolectaron 6 hojas de 6 individuos de sustrato-jale y sustrato control de *D. viscosa* de forma azarosa. Se aislaron los núcleos de las células, para ello, las muestras de tejido vegetal se colocaron en cajas de Petri oscuras con 250  $\mu$ l de PBS a una

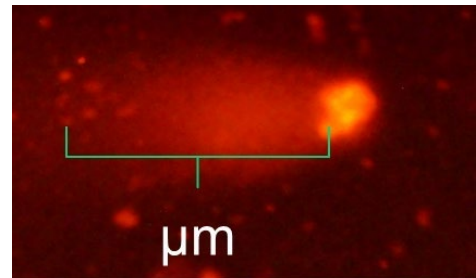


Figura 6. Se observa la medición de la cauda (fragmentación del ADN) de un cometa con bromuro de etidio, en el microscopio de fluorescencia.

temperatura de 4 °C; se realizaron diversos cortes. La muestra con los cortes se dejó reposar por un momento para permitir a los núcleos se precipitarán. Una vez que los núcleos se precipitaron, se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) al 1 % a 4 °C, se colocó en un portaobjeto previamente preparado con una



capa con 80  $\mu$ l de LMPA al 0.5% y por último se le colocó otra capa con 80  $\mu$ l de LMPA al 0.5% (Figura 5). De cada muestra se prepararon dos laminillas (Tice *et al.*, 2000). Posteriormente las muestras fueron colocadas en una

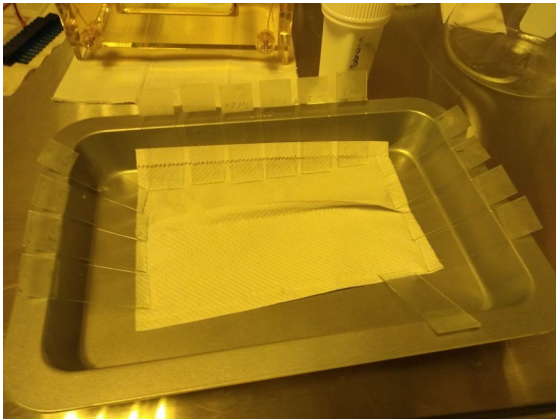


Figura 5. Portaobjetos preparados con 80  $\mu$ l de LMPA al 0.5% y con 80  $\mu$ l de LMPA al 0.5%.

solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trisma-base pH 10) con 1 % Tritón-X y 10 % DMSO 10% y aforada a 100 ml en vasos Köppling a 4 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo, los geles se colocaron en una cámara de electroforesis cubiertos con

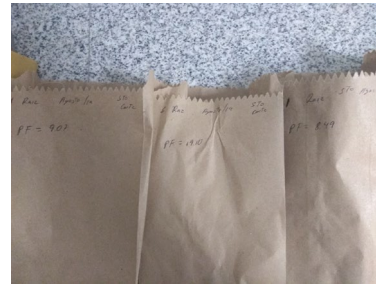
amortiguador alcalino a 4 °C [NaOH (300 mM) + 1 mM EDTA; (pH 13.0) ] por 20 minutos para el proceso de desenrollamiento del ADN; la electroforesis se realiza a 300 mA y 25 Volts por 20 minutos, en condiciones de oscuridad. Finalmente, los geles fueron neutralizados con Tris (0.4 M pH 7.5; tres lavados por 5 min; Tice *et al.*, 2000) y fijados con etanol absoluto a 4 °C por 10 minutos. Para analizar el efecto genotóxico, se analizó como parámetro indicador del daño al ADN la longitud de la cauda del cometa (migración del ADN) en 100 núcleos consecutivos (50 núcleos por laminilla, dos laminillas por muestra), se le colocó 25  $\mu$ l de un fluorocromo (bromuro de etidio al 10 %) y se observó en el microscopio de fluorescencia Carl Zeiss modelo Axiostar Plus H-BO-100, con filtros de excitación de 515-560 nm y de barrera de 590 nm, utilizando el *software* Comet IV (Figura 6).

## Caracteres morfológicos de *D. viscosa*: macro y micromorfológico

Se evaluaron los cambios macromorfológicos de *D. viscosa*, en: hojas, tallo y raíz. De cada estructura se obtuvo el peso fresco y peso seco (g) y se cuantifico: altura, diámetro basal y número de hojas totales (Figura 7a). En particular, las raíces se lavaron con agua corriente (por tres ocasiones) para eliminar el exceso de jale o suelo, posteriormente fueron sometidas a un último lavado con agua destilada. Para obtener el peso seco de las hojas y raíz se secaron en una estufa eléctrica a 50 °C hasta alcanzar un peso constante (Figura 7b).



a)



b)

Figura 7 a) Medición de la altura, número de hojas y diámetro basal de los individuos de los diferentes tratamientos, b) Se colocaron en bolsas de papel de estraza a los individuos para el proceso de secado en la estufa eléctrica.

Para la parte micromorfológica: La parte aérea de la planta se seccionó en tres segmentos; apical, media y basal tomando una hoja de cada sección, se prensaron y secaron a 60 °C. Una vez secas, se realizaron tres laminillas (impresiones foliares) de la lámina foliar abaxial, posteriormente se tomó una muestra en seco de 1 × 1 cm de la parte media, intercostal y cercana a la nervadura central, las impresiones foliares se realizaron mediante la técnica de réplica con pegamento de cianoacrilato.

El índice estomático se calculó de acuerdo con Salisbury (1928), lo anterior bajo el siguiente procedimiento: se colocó la laminilla con la impresión y se seleccionó un campo visual de forma aleatoria, en el cual se contabilizó el número de



Figura 8. La flecha amarilla muestra una célula epidérmica. La flecha negra muestra una estoma.

estomas (células guarda) y células tabicadas (células epidérmicas no estomáticas; Figura 8.); para calcular el índice estomático se consideró como campo el área de observación del microscopio óptico (40 X), así mismo se tomaron en cuenta sólo las células estomáticas y las células tabicadas que tuviesen toda su área o al menos un 60% dentro del campo muestreado. Para la medición del ancho y largo de la estoma se utilizó el programa de imageJ® versión 1.52v. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener el índice estomático:  $I.E. = (N.E. / N.E. + N.C.E.) \times 100$ ; Donde I.E. = índice estomático, N.E. = número de células estomáticas (células guarda) por unidad de área foliar, N.C.E. = número de células tabicadas (epidérmicas no estomáticas) ordinarias por unidad de área foliar (Paniagua-Ibáñez, 2010).

### **Bioacumulación de metales**

Una vez lavadas las muestras con agua desionizada, se secaron a 50 °C en una estufa eléctrica por 72h, se pulverizó y se tomaron .25 g para llevar a cabo el proceso de digestión con 10 ml de ácido trioxonítrico (HNO<sub>3</sub>) concentrado, se aforó

a 50 ml con agua destilada (Figura 9). Posteriormente se analizó por espectrofotometría de absorción atómica en el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB-UAEM; Figura 10).



Figura 9. a) Digestion de la muestra con ácido nítrico, b) Aforo con agua destilada a 50 ml.



Figura 10. Cuantificación de metales pesados en el espectrofotómetro de absorción atómica

## Fitoquímica foliar

### Obtención de los extractos de *D. viscosa*

Se recolectaron las hojas de 6 individuos de cada sustrato jale y control de *D. viscosa* (cada 90 días por 6 ocasiones), se secaron en una estufa eléctrica a 50 °C por 72 h, se pulverizaron y posteriormente se llevó a cabo una maceración, se

colocaron 200 mg de cada individuo en un vial y se le agregó 10 ml de metanol grado HPLC por 48 horas, posterior se filtró (Whatman 16) y se liofilizó.

### **Análisis HPLC**

Los análisis cualitativos y cuantitativos de los extractos de sustrato jale y control se realizaron en un módulo de separación Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, EE. UU.) junto con un detector PDA Spectral System UV2996. La separación de los compuestos se llevó a cabo utilizando una columna Supelcosil™ LC-F (4,6 mm 250 mm, 5 m, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, EE. UU.). La fase móvil consistió en una mezcla de dos disolventes: el disolvente A (ácido trifluoroacético-agua, 0,5 %, v/v) y B (acetonitrilo). El sistema de gradiente que se utilizó fue el siguiente: 0–1 min, 100–0% B; 2–3 min, 95–5% B; 4–20 min, 70–30 % B; 21–23 min, 50–50 %, 24–25 min, 20–80 % B, 26–27 min, 0–100 % B y 28–30 min 100–0 % B. El flujo se mantuvo a 0,9 mL min<sup>-1</sup>, y el volumen de inyección de la muestra fue de 10 µL. La longitud de onda del detector de matriz de fotodiodos se fijó en 340 para luteolina (Lu) y 360 nm para glucósido de quercetina (GQ) y rutina (Ru), fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV con los compuestos de referencia (estándares comerciales) para la identificación y para la cuantificación se estimaron por interpolación de las áreas de los picos y comparación con una curva de calibración construida para cada uno de los compuestos. Las curvas de calibración para GQ, Ru y Lu, se inyectaron concentraciones ascendentes (12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) de estándares comerciales [p. ej., rutina, glucósido de quercetina y luteolina (Sigma-Aldrich)].

La curva de calibración fue lineal en el rango de 12.5-200 µg/mL de GQ ( $Y=2820.7x-5170.8$ ,  $R^2=0,999$ ), Ru ( $y = 17389x + 1980.4$ ,  $R^2 = 0,999$ ) y Lu ( $y = 45894x - 29106$ ,  $R^2 = 0,999$ ).

### **Análisis estadístico**

El análisis y el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico Statistica 8. Se realizó un análisis de regresión para determinar la relación entre el tiempo de exposición al jale y FBC en la raíz, FT en hoja (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb y Zn) en *D. viscosa* en crecimiento.

Se realizaron análisis de regresión para evaluar la relación entre la bioacumulación de metales y el daño genético (rompimiento de cadena sencilla), caracteres de tamaño (altura, número de hojas, biomasa de raíz y hoja), caracteres micromorfológicos (índice y cobertura estomática) y la producción de metabolitos secundarios en individuos de *D. viscosa* creciendo en sustrato control y jale.

## Resultados

En general, los resultados del análisis de varianza de dos vías muestran que el tratamiento (T), el tiempo de exposición (t) y la interacción entre estos dos factores (T × t) tuvieron un efecto significativo en el daño genético, el tamaño de la planta y los caracteres micromorfológicos de *D. viscosa* analizados durante 18 meses. Para el tratamiento con sustrato de jale, las plantas de *D. viscosa* mostraron caracteres micromorfológicos y de tamaño significativamente más bajos que las plantas del tratamiento control. En contraste, las plantas que crecen en sustrato jale registraron un mayor daño genético. Las únicas excepciones fueron el índice estomático y la biomasa de raíces, donde no hubo efecto del tratamiento.

### Daño genético

Se puede apreciar los núcleos de *D. viscosa* del sustrato control (fig.11a) y sustrato jale (fig.11b) obtenidos mediante la técnica de electroforesis unicelular alcalina pH13 (figura11).

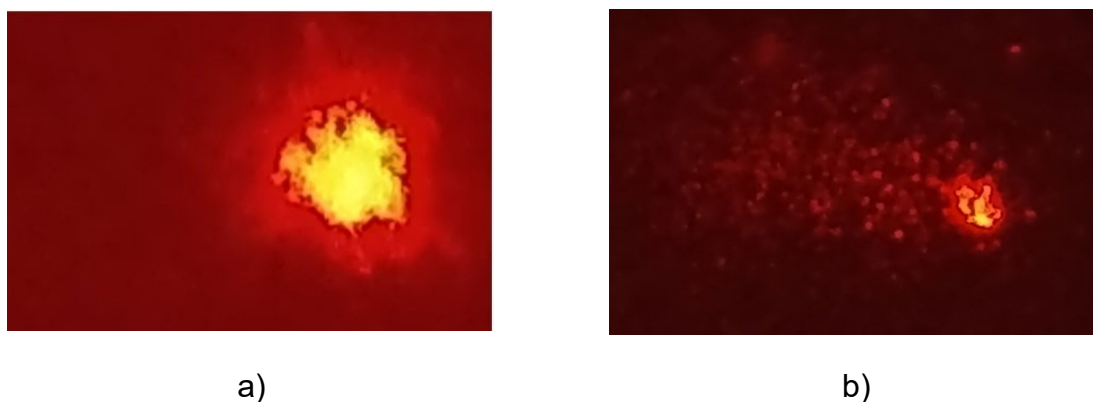


Fig.11 Se observa núcleo de individuo control (a) y núcleo de individuo jale (b) de *D. viscosa* mediante la técnica de ensayo cometa pH13 y observados a 40X.

Los resultados del análisis de daño genético de 7200 núcleos de células foliares de *D. viscosa* muestran diferencias significativas entre los tratamientos (Control vs jale) en la inducción de rompimientos de cadena sencilla observable mediante la longitud de cauda de los cometas durante la ontogenia de la especie. El daño genético promedio  $\pm$  Error estándar evidenciado mediante el ensayo cometa en los individuos que se encuentran en tratamiento e individuos control. En general, los niveles de daño en el ADN aumentaron significativamente a lo largo del tiempo de exposición para ambos tratamientos (tabla 1).

**Tabla 1.** Daño al ADN (longitud de cauda, micras) por MP (promedio  $\pm$  error estándar) de *D. viscosa* a través del tiempo (meses).

Tiempo (meses)	Sustrato		ANOVA	F	Signif.	*
	Control	Jale				
3	14.67 $\pm$ 0.18	24.94 $\pm$ 0.27				
6	15.16 $\pm$ 0.26	30.02 $\pm$ 0.38				
9	26.22 $\pm$ 0.35	48.98 $\pm$ 0.59				
12	28.74 $\pm$ 0.39	58.67 $\pm$ 0.068				
15	31.09 $\pm$ 0.41	60.35 $\pm$ 0.77				
18	32.37 $\pm$ 0.40	62.72 $\pm$ 0.78				
	Tratamiento (T)			$F_{1,7188} = 6421.52^{***}$		
	Tiempo (t)			$F_{5,7188} = 1193.84^{***}$		
	T $\times$ t			$F_{5,7188} = 150.73^{***}$		

Media  $\pm$  desviación estándar y ANOVA de dos vías para detectar el efecto del tiempo, el tratamiento (control y jale) y la interacción (tratamiento  $\times$  tiempo) en los niveles de daño genético en individuos de *D. viscosa* en crecimiento en condiciones de invernadero

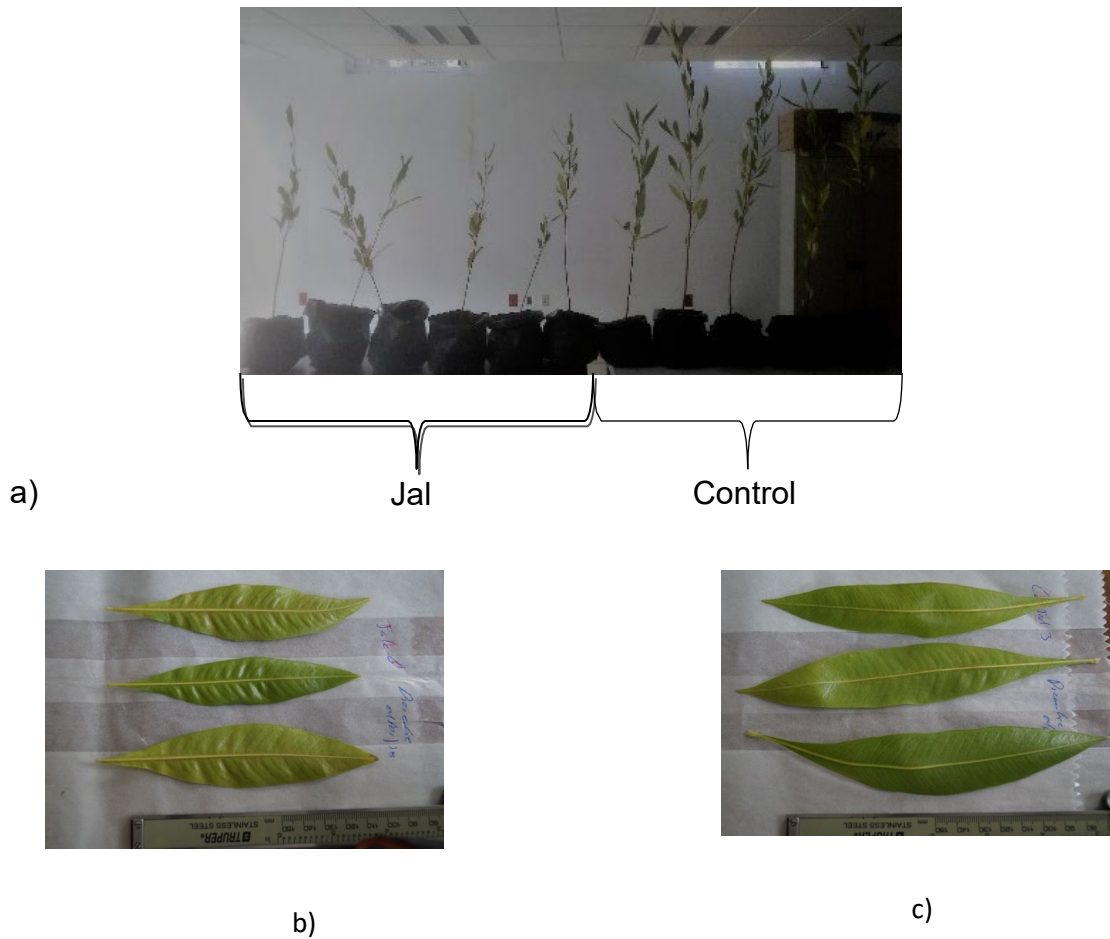


## Morfología

En general, se observó que los caracteres tamaño y micromorfológicos foliares en los individuos de *D. viscosa* muestran una reducción los individuos del jale con respecto a los individuos control (Fig. 12), se muestra un efecto significativo en cada uno de los caracteres analizados a excepción en la parte micromorfológica en el Índice estomático, no se observaron diferencias significativas entre control y jale. Durante los primeros 6 meses de exposición, la cobertura estomática no difirió entre tratamientos; a partir de entonces, estos valores fueron mayores en las plantas de control. Asimismo, para ambos tratamientos se observó un incremento en la cobertura estomática hasta los 9 meses de exposición, la cual se mantiene hasta el final del experimento. En la cobertura estomática se observa diferencias significativas entre control y jale (tabla 2).

Durante los primeros 3 meses de exposición, la altura de la planta no se vio afectada por ningún tratamiento; sin embargo, después de 6 meses de exposición, las plantas de control mostraron valores de altura de planta significativamente más altos en comparación con las plantas que crecían en sustrato de jale (tabla 3).

El número de hojas aumentó significativamente en las plantas del sustrato control a lo largo del tiempo, en contraste con las plantas que crecieron en el sustrato jale que no mostraron cambios en el número de hojas (tabla 3).



**Fig. 12** Caracteres de tamaño de *Dodonaea viscosa* se observa del jal individuos de talla menor con respecto a los individuos control (a) y hojas más pequeñas en individuos en tratamiento jal (b) con respecto a las hojas de individuos control (c).

La biomasa de las hojas en las plantas de control aumentó significativamente a lo largo del tiempo de exposición, mientras que la biomasa de las hojas de las plantas que crecieron en el sustrato de jale no cambió durante el primer año, pero aumentó posteriormente hasta el final del experimento. Finalmente, la biomasa de raíces no presentó diferencias significativas entre tratamientos, pero a los 6 meses de exposición se presenta un incremento significativo en la biomasa de raíces que se mantiene hasta el final del experimento (tabla 4).

**Tabla 2.** Micromorfología (promedio  $\pm$  error estándar) de *D. viscosa* a través del tiempo (meses).

Caracteres Micro-morfológico	Tiempo (meses)		Sustrato		
	Control		Jale		
<b>Índice estomático</b>					
3	19.56 $\pm$ 6.53	a	20.66 $\pm$ 5.68	A	n.s
6	21.89 $\pm$ 5.25	a	22.24 $\pm$ 5.36	A	n.s
9	23.13 $\pm$ 8.25	a	24.36 $\pm$ 7.16	B	n.s
12	22.79 $\pm$ 2.94	a	19.72 $\pm$ 3.26	A	n.s
15	21.65 $\pm$ 2.67	a	20.46 $\pm$ 3.25	A	n.s
18	16.83 $\pm$ 6.02	b	15.48 $\pm$ 4.75	C	n.s
<b>Cobertura estomática (<math>\mu\text{m}</math>)</b>					
3	550.16 $\pm$ 119.30	a	555.32 $\pm$ 95.70	A	n.s
6	731.04 $\pm$ 135.60	b	687.58 $\pm$ 175.01	BC	n.s
9	1180.37 $\pm$ 301.82	c	803.96 $\pm$ 254.31	C	*
12	1206.13 $\pm$ 352.65	c	748.06 $\pm$ 216.67	C	*
15	1256.51 $\pm$ 289.45	c	725.19 $\pm$ 195.31	C	*
18	1124.37 $\pm$ 305.33	c	671.13 $\pm$ 167.02	BC	*
ANOVA		Tratamiento (T)	$F_{1,204} = 0.845$ n.s		
		Tiempo (t)	$F_{5,204} = 15.340$ ***		
		T $\times$ t	$F_{5,204} = 1.661$ n.s		
ANOVA		Tratamiento (T)	$F_{1,420} = 272.338$ ***		
		Tiempo (t)	$F_{5,420} = 63.123$ ***		
		T $\times$ t	$F_{5,420} = 25.219$ ***		

Media  $\pm$  desviación estándar y ANOVA de dos vías para detectar el efecto del tiempo, el tratamiento (control y jale) y la interacción (tratamiento  $\times$  tiempo) caracteres micromorfológicos en individuos de *D. viscosa* en crecimiento en condiciones de invernadero

**Tabla 3.** Caracteres de tamaño y número de hojas de los individuos de *D. viscosa* a través del tiempo. (meses)

Tiempo (meses)		Sustrato			
Caracteres de tamaño	Control		Jale		
<b>Altura (cm)</b>					
3	20.18 ± 2.55	a	12.27 ± 2.50	A	n.s
6	74.02 ± 4.82	b	45.86 ± 11.25	B	*
9	126.50 ± 7.08	c	79.17 ± 11.35	BC	*
12	143.17 ± 12.02	c	95.83 ± 12.26	C	*
15	155.33 ± 4.54	c	74.00 ± 15.57	C	*
18	170.83 ± 5.99	c	86.23 ± 10.10	C	*
<b>Número de hojas</b>					
3	15.16 ± 5.80	a	10.50 ± 2.50	A	*
6	35.23 ± 6.20	b	15.30 ± 3.20	A	*
9	52.80 ± 8.40	c	22.16 ± 5.30	A	*
12	62.80 ± 9.30	c	32.16 ± 4.50	B	*
15	70.60 ± 10.20	cd	24.20 ± 3.50	AB	*
18	75.85 ± 12.56	d	21.60 ± 5.68	AB	*
ANOVA		Tratamiento (T)	$F_{1, 60} = 253.733$ ***		
		Tiempo (t)	$F_{5, 60} = 138.500$ ***		
		T × t	$F_{5, 60} = 14.244$ ***		
		Tratamiento (T)	$F_{1, 60} = 482.823$ ***		
		Tiempo (t)	$F_{5, 60} = 71.116$ ***		
		T × t	$F_{5, 60} = 27.544$ ***		

Media ± desviación estándar y ANOVA de dos vías para detectar el efecto del tiempo, el tratamiento (control y jale) y la interacción (tratamiento × tiempo) en caracteres de tamaño en individuos de *D. viscosa* en crecimiento en condiciones de invernadero

**Tabla 4. Biomasa de hojas y raíz de individuos de *D. viscosa***

Tiempo (meses)	Sustrato			
	Control		Jale	
<b>Biomasa de hojas(g)</b>				
3	1.16 ± 0.81	a	0.25 ± 0.11	A *
6	4.23 ± 1.20	b	1.26 ± 0.45	A *
9	8.03 ± 1.78	c	2.94 ± 1.02	A *
12	8.80 ± 2.24	c	2.78 ± 1.76	A *
15	9.44 ± 2.96	cd	3.65 ± 0.61	B *
18	11.43 ± 2.29	d	3.41 ± 0.84	B *
<b>Biomasa de raíz (g)</b>				
3	0.22 ± 0.13	a	0.09 ± 0.08	A n.s
6	2.11 ± 0.37	a	1.39 ± 0.23	A n.s
9	4.89 ± 0.67	b	2.78 ± 0.38	B n.s
12	4.95 ± 0.69	b	3.09 ± 0.68	B n.s
15	5.07 ± 0.84	b	4.22 ± 0.87	B n.s
18	5.72 ± 0.32	b	4.89 ± 0.58	B n.s
		Tratamiento (T)	$F_{1,60} = 168.383 ***$	
		Tiempo (t)	$F_{5,60} = 36.745 ***$	
		T × t	$F_{5,60} = 6.114 ***$	
<b>ANOVA</b>				
		Tratamiento (T)	$F_{1,60} = 2.265$ n.s.	
		Tiempo (t)	$F_{5,60} = 32.730 ***$	
		T × t	$F_{5,60} = 1.358$ n.s.	

Media ± desviación estándar y ANOVA de dos vías para detectar el efecto del tiempo, el tratamiento (control y jale) y la interacción (tratamiento × tiempo) biomasa de hoja y raíz en individuos de *D. viscosa* en crecimiento en condiciones de invernadero

### **Bioacumulación de metales pesados en raíces y hojas de *D. viscosa* que crece en sustrato jale y control**

#### **Raíz**

Las plantas de *D. viscosa* que crecieron en sustrato jale en condiciones de invernadero bioacumulaban metales esenciales (Cu, Fe y Zn), así como metales

altamente tóxicos (Cd, Cr y Pb) a nivel de la raíz (Fig. 13). Por el contrario, las plantas que crecen en el sustrato de control solo bioacumulan metales esenciales (Fig. 13). En general, en las raíces de las plantas de *D. viscosa* que crecieron sobre sustrato de jale, todas las concentraciones de metales mostraron valores estadísticamente más altos con respecto a las plantas que crecieron en el sustrato de control. De acuerdo con el análisis de varianza de dos vías, el tratamiento (T), el tiempo (t) y la interacción de ambos parámetros ( $T \times t$ ) muestran un efecto significativo sobre la bioacumulación de metales en las raíces de *D. viscosa*. La concentración de Cu y Cr no mostró una diferencia significativa entre tratamientos a los 3 meses de exposición. Asimismo, las concentraciones de Cd, Pb y Zn no mostraron diferencias significativas entre tratamientos a los 3 y 6 meses de exposición (Fig. 13). Además, detectamos una relación positiva y significativa entre el tiempo de exposición y la concentración de metales en raíces de *D. viscosa* de individuos que crecen bajo condiciones de invernadero.

## Hoja

Las plantas de *D. viscosa* que crecieron en sustrato de jale en condiciones de invernadero bioacumularon metales esenciales (Cu, Fe y Zn), así como metales altamente tóxicos (Cd, Cr y Pb) a nivel de las hojas (Fig. 14). Por el contrario, las plantas que crecen en sustrato de control solo bioacumulan metales esenciales (Fig. 14). En general, el resultado del análisis de varianza de dos vías (ANOVA) mostró un efecto significativo del tratamiento (T), el tiempo de exposición (t) y la interacción de estos dos parámetros ( $T \times t$ ) en la bioacumulación de todos los metales. detectado en hojas de *D. viscosa*. No se detectó cromo en hojas de *D.*

*viscosa* en el primer tiempo de muestreo (3 meses), mientras que no se detectó Cd en hojas a los 3 y 6 meses de exposición.

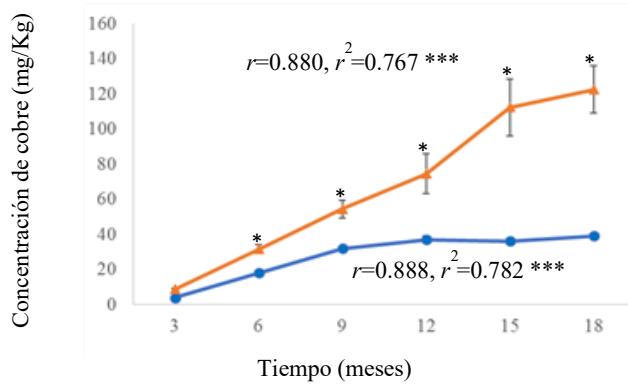
Posteriormente, todas las concentraciones de metales fueron significativamente más altas en las plantas que crecieron en el sustrato de jale que en las que crecieron en el sustrato de control. En general, el resultado del análisis ANOVA mostró que el tratamiento (T), el tiempo de exposición (t) y la interacción (T × t) tuvieron un efecto significativo en la bioacumulación de todos los metales evaluados en hojas de *D. viscosa*. Finalmente, se detectó una relación positiva y significativa entre el tiempo de exposición y la concentración de metales en las hojas de *D. viscosa* (Fig. 14).

#### **Factores de enriquecimiento y translocación de metales pesados en las raíces y hojas de plantas de *D. viscosa* que crecen en sustrato jale**

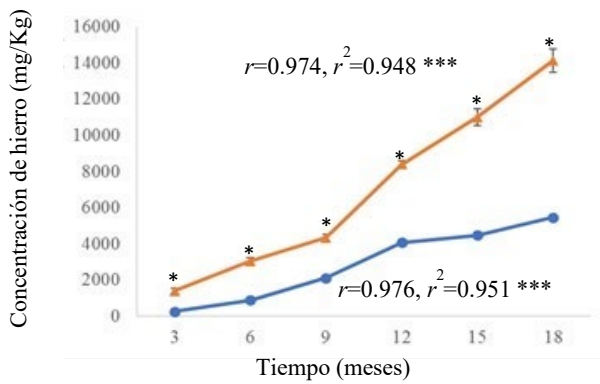
De acuerdo con los valores calculados de FBC, las raíces de *D. viscosa* que crecieron sobre el sustrato de relaves mineros mostraron un enriquecimiento de Cu, Fe y Pb, mientras que en el mismo sustrato, Fe y Pb mostraron un enriquecimiento en las hojas de *D. viscosa* (tabla 5).

**Fig. 13** Metales esenciales en raíz de *D. viscosa*

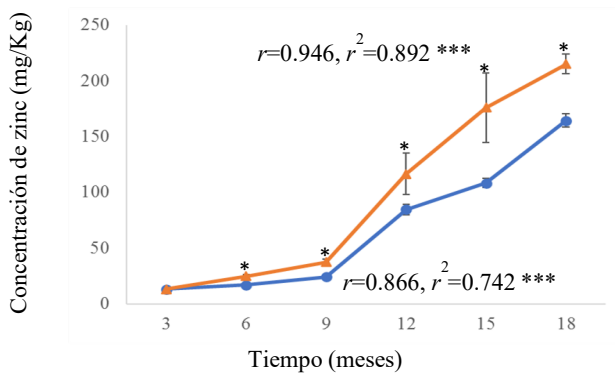
ANOVA



Tratamiento (T)  $F_{1,60}=921.068$  \*\*\*  
 Tiempo (t)  $F_{5,60}=120.187$  \*\*\*  
 T×t  $F_{5,60}=120.187$  \*\*\*



Tratamiento (T)  $F_{1,60}=699.735$  \*\*\*  
 Tiempo (t)  $F_{5,60}=332.046$  \*\*\*  
 T×t  $F_{5,60}=57.556$  \*\*\*



Tratamiento (T)  $F_{1,60}=88.764$  \*\*\*  
 Tiempo (t)  $F_{5,60}=92.934$  \*\*\*  
 T×t  $F_{5,60}=30.139$  \*\*\*

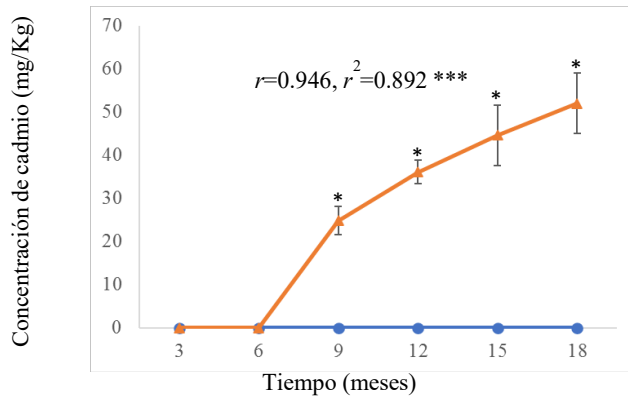
▲ Sustrato jale  
● Sustrato control

Concentración de MP (valores promedio ± error estándar), ANOVA de dos vías para evaluar el efecto del tratamiento (sustrato control y jal), el tiempo y la interacción (tratamiento × tiempo) en raíz de *D. viscosa* que crecen en invernadero. Análisis de regresión entre tiempo de exposición y concentración de MP en raíz. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos por tiempo de exposición con  $P < 0.05$  (Tukey). Prueba ANOVA: \*\*\* =  $P < 0,001$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \* =  $P < 0,05$ . n.s. = diferencias no significativas

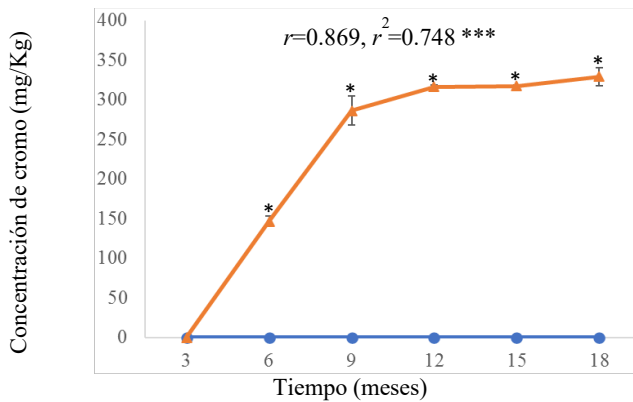


**Fig. 13 (continuación)** Metales no esenciales en raíz de *D. viscosa*

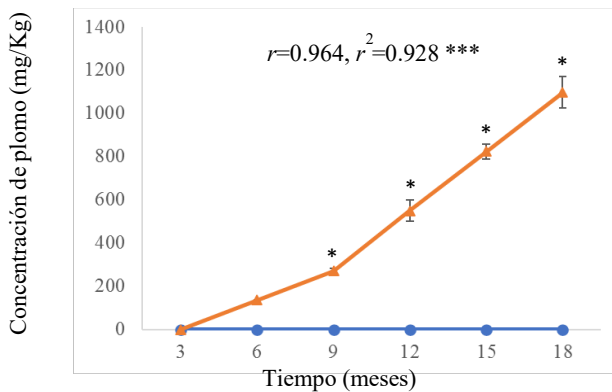
ANOVA



Tratamiento (T)  $F_{1,60}=205.140$  \*\*\*  
 Tiempo (t)  $F_{5,60}=24.777$  \*\*\*  
 T×t  $F_{5,60}=24.777$  \*\*\*



Tratamiento (T)  $F_{1,60}=3709.716$  \*\*\*  
 Tiempo (t)  $F_{5,60}=200.795$  \*\*\*  
 T×t  $F_{5,60}=200.795$  \*\*\*

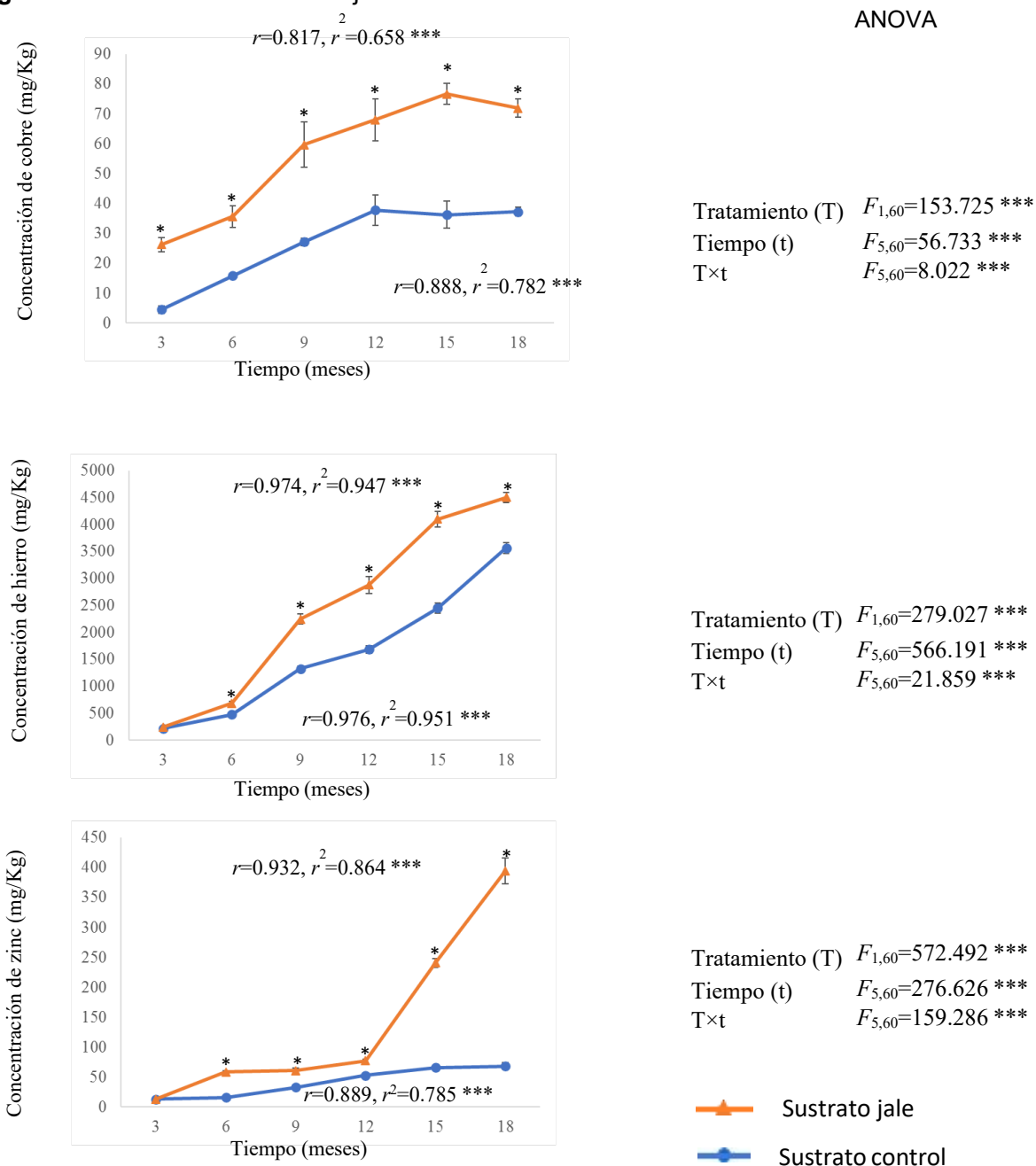


Tratamiento (T)  $F_{1,60}=921.068$  \*\*\*  
 Tiempo (t)  $F_{5,60}=120.187$  \*\*\*  
 T×t  $F_{5,60}=120.187$  \*\*\*

—▲— Sustrato jale  
 —●— Sustrato control

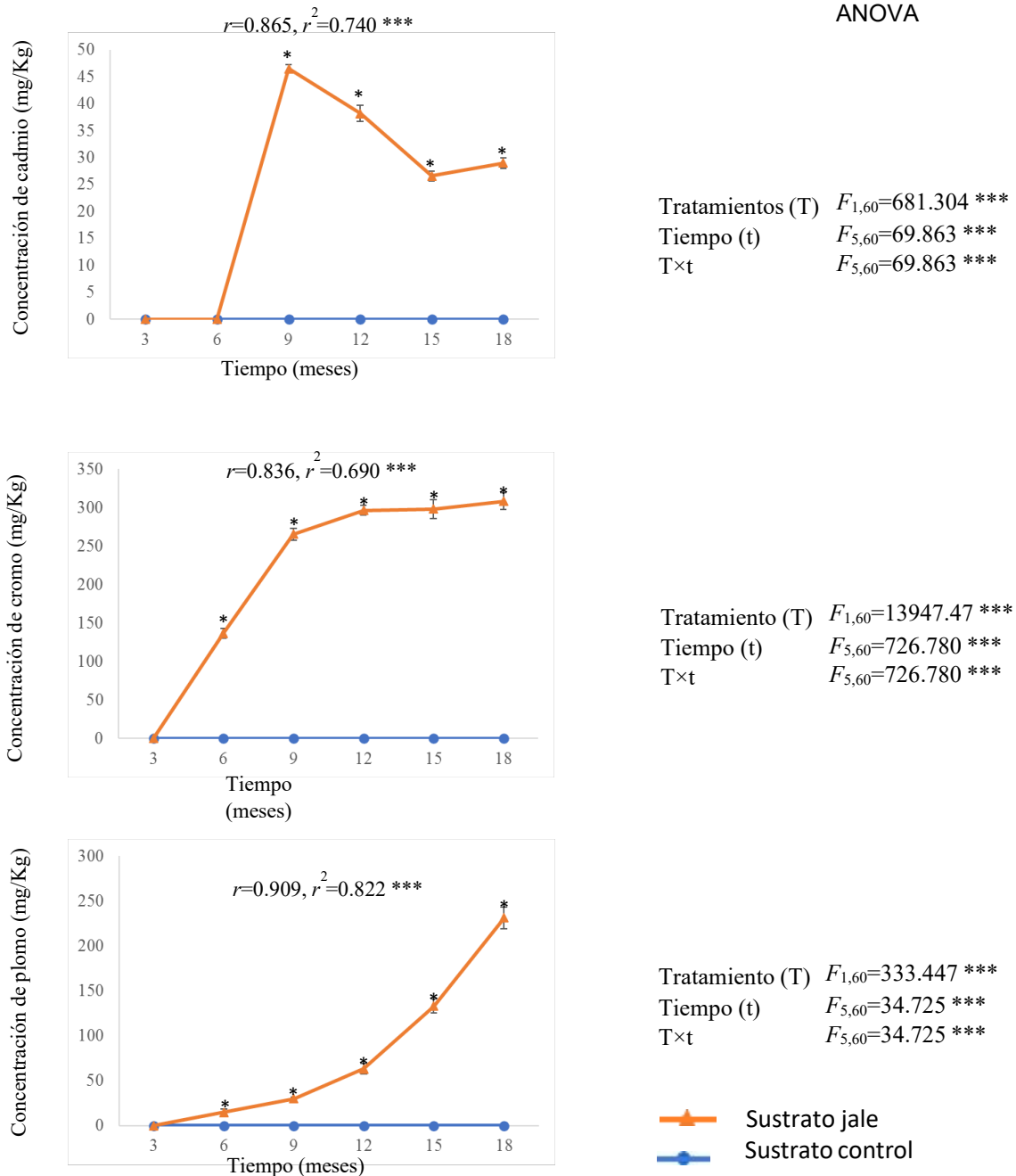
Concentración de MP (valores promedio ± error estándar), ANOVA de dos vías para evaluar el efecto del tratamiento (sustrato control y jal), el tiempo y la interacción (tratamiento × tiempo) en raíz de *D. viscosa* que crecen en invernadero. Análisis de regresión entre tiempo de exposición y concentración de MP en raíz. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos por tiempo de exposición con  $P < 0.05$  (Tukey). Prueba ANOVA: \*\*\* =  $P < 0,001$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \* =  $P < 0,05$ . n.s. = diferencias no significativas

**Fig. 14 Metales esenciales en hojas de *D. viscosa***



Concentración de MP (valores promedio ± error estándar), ANOVA de dos vías para evaluar el efecto del tratamiento (sustrato control y jal), el tiempo y la interacción (tratamiento × tiempo) en hoja de *D. viscosa* que crecen en invernadero. Análisis de regresión entre tiempo de exposición y concentración de MP en hoja. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos por tiempo de exposición con  $P < 0.05$  (Tukey). Prueba ANOVA: \*\*\* =  $P < 0,001$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \* =  $P < 0,05$ . n.s. = diferencias no significativas

**Fig. 14 (continuación)** Metales no esenciales en hoja de *D. viscosa*



Concentración de MP (valores promedio ± error estándar), ANOVA de dos vías para evaluar el efecto del tratamiento (sustrato control y jal), el tiempo y la interacción (tratamiento × tiempo) en hoja de *D. viscosa* que crecen en invernadero. Análisis de regresión entre tiempo de exposición y concentración de MP en hoja. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos por tiempo de exposición con  $P < 0.05$  (Tukey). Prueba ANOVA: \*\*\* =  $P < 0.001$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \* =  $P < 0.05$ . n.s. = diferencias no significativas

**Tabla. 5** Factor de enriquecimiento y translocación de metales esenciales en individuos de *D. viscosa*

Metales esenciales	Tiempo (meses)	Concentración (mg/kg)					
		Sustrato jale	Raíz	hoja	BCF (raíz)	BCF (hoja)	TF
Cu	3	0.04	0.01	0.04	0.31	1.08	2.95
	6	0.04	0.15	0.17	3.81	0.24	1.12
	9	0.04	0.27	0.30	6.82	0.13	1.09
	12	0.04	0.37	0.34	9.33	0.12	0.91
	15	0.04	0.56	0.38	14.05	0.11	0.68
	18	0.04	0.71	0.42	17.75	0.10	0.59
Promedio			0.34± 0.25	0.27± 0.14	8.69±6.46	0.29±0.38	1.22±0.87
Fe	3	0.40	7.10	1.20	17.75	3.00	0.17
	6	0.40	15.26	3.37	38.14	8.41	0.22
	9	0.40	21.57	11.20	53.93	28.01	0.52
	12	0.40	42.48	14.40	106.21	36.00	0.34
	15	0.40	54.13	20.05	135.33	50.13	0.37
	18	0.40	69.28	22.78	173.21	56.95	0.33
Promedio			34.97±24.2	12.16±8.69	87.42±60.68	30.41±21.7	0.32±0.12
Zn	3	2.14	0.06	0.06	0.03	0.03	1.00
	6	2.14	0.12	0.30	0.06	0.14	2.38
	9	2.14	0.19	0.30	0.09	0.14	1.61
	12	2.14	0.57	0.38	0.27	0.18	0.66
	15	2.14	0.88	1.21	0.41	0.56	1.37
	18	2.14	3.00	5.48	1.40	2.56	1.83
Promedio			0.80±1.12	1.28±2.09	0.37±0.52	0.60±0.97	1.47±0.60

BCF = factor biocentración, TF = factor translocación

El enriquecimiento en metales según los valores de FBC en tejido radicular mostró el siguiente patrón: Fe > Cu > Pb > Cd, mientras que en hojas el patrón de enriquecimiento en metales fue: Fe > Pb (tabla 5). Además, se mostró una relación positiva y significativa entre el tiempo de sustrato jale y el BCF de todos los metales evaluados en la raíz de *D. viscosa* (Fig. 15). Sin embargo, en hojas de *D. viscosa*, se documentó una relación positiva y significativa solo entre el tiempo de

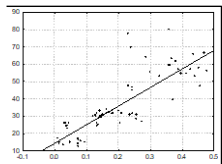
exposición a jale y los valores de FBC de Fe y Pb. Finalmente, el factor de translocación mostró el siguiente patrón: Zn > Cu > Cd (Fig. 15).

**Tabla. 5 (continuación)** Factor de enriquecimiento y translocación de metales esenciales en individuos de *Dodonaea viscosa*

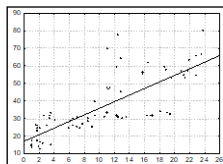
Metales no esenciales	Tiempo (meses)	Concentration (mg/kg)			BCF		TF
		Sustrato jale	Raíz	hoja	BCF (raíz)	(hoja)	
Cd	3	0.05	--	--	--	--	--
	6	0.05	--	--	--	--	--
	9	0.05	0.03	0.06	0.56	0.96	1.87
	12	0.05	0.06	0.07	1.15	0.82	1.06
	15	0.05	0.12	0.07	2.29	0.72	0.60
	18	0.05	0.14	0.08	2.65	0.65	0.58
Promedio			0.09±0.05	0.07±0.01	1.66±0.97	0.78±0.13	1.02±0.60
Cr	3	--	--	--	--	--	--
	6	--	0.79	0.74	--	--	0.93
	9	--	1.58	1.47	--	--	0.93
	12	--	1.58	1.48	--	--	0.94
	15	--	1.59	1.49	--	--	0.94
	18	--	1.60	1.50	--	--	0.94
Promedio			1.43±0.35	1.33±0.33			0.93±0.003
Pb	3	0.23	--	--	--	--	--
	6	0.23	0.68	0.08	2.93	0.33	0.11
	9	0.23	1.35	0.15	5.87	0.65	0.11
	12	0.23	2.75	0.31	11.94	1.33	0.11
	15	0.23	2.82	0.46	12.25	1.99	0.16
	18	0.23	2.23	0.47	9.70	2.02	0.21
Promedio			1.96±0.92	0.29±0.17	8.53±4.03	1.26±0.76	0.14±0.04

BCF = factor biocentración, TF = factor translocación

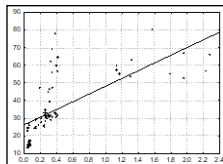
### Daño genético



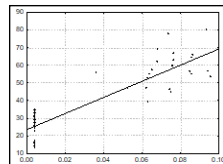
$r=0.837, r^2=0.697^{***}$



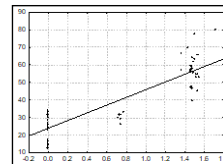
$r=0.791, r^2=0.620^{***}$



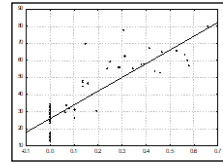
$r=0.699, r^2=0.481^{***}$



$r=0.894, r^2=0.796^{***}$

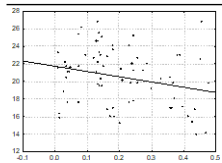


$r=0.881, r^2=0.773^{***}$

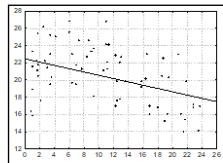


$r=0.861, r^2=0.737^{***}$

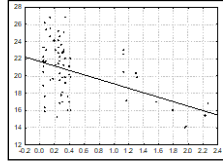
### Índice estomático



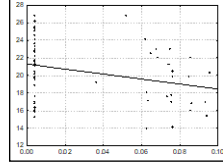
$r=-0.250, r^2=0.051^*$



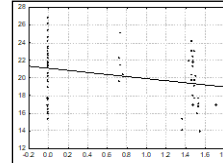
$r=-0.440, r^2=0.180^{***}$



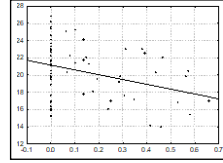
$r=-0.450, r^2=0.190^{***}$



$r=-0.300, r^2=0.078^{**}$



$r=-0.260, r^2=0.055^*$



$r=-0.340, r^2=0.100^{**}$

### Cobertura estomática



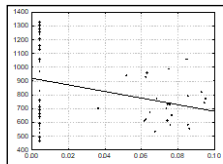
$r=-0.039, r^2=0.013^{n.s.}$



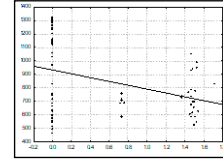
$r=-0.197, r^2=0.025^{n.s.}$



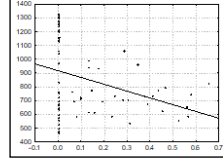
$r=-0.170, r^2=0.014^{n.s.}$



$r=-0.300, r^2=0.076^*$

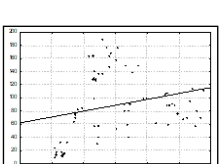


$r=-0.370, r^2=0.121^{**}$

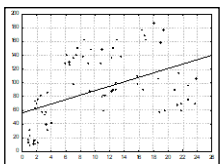


$r=-0.340, r^2=0.101^{**}$

### Altura



$r=0.246, r^2=0.047^*$



$r=0.477, r^2=0.216^{***}$



$r=-0.051, r^2=0.012^{n.s.}$



$r=-0.080, r^2=0.008^{n.s.}$



$r=-0.160, r^2=0.010^{n.s.}$

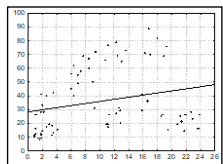


$r=-0.090, r^2=0.006^{n.s.}$

### Numero de hojas



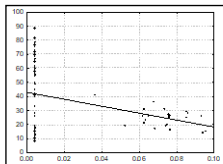
$r=-0.030, r^2=0.013^{n.s.}$



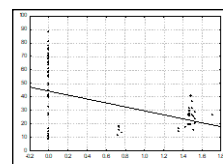
$r=0.244, r^2=0.046^*$



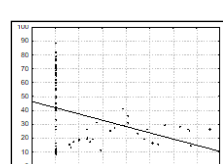
$r=-0.180, r^2=0.018^{n.s.}$



$r=-0.370, r^2=0.123^{**}$



$r=-0.450, r^2=0.190^{***}$

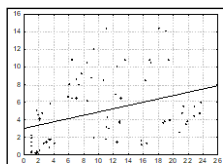


$r=-0.370, r^2=0.122^{**}$

### Biomasa de hoja



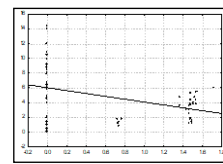
$r=0.067, r^2=0.610^{n.s.}$



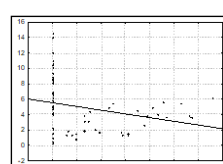
$r=0.356, r^2=0.114^{**}$



$r=-0.240, r^2=0.044^*$

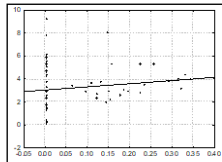


$r=-0.350, r^2=0.113^{**}$

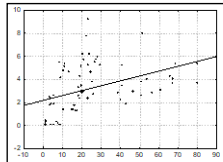


$r=-0.230, r^2=0.041^*$

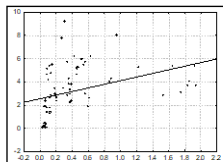
### Biomasa de raíz



$r=0.335, r^2=0.098^{**}$



$r=0.410, r^2=0.156^{***}$



$r=0.373, r^2=0.127^{**}$



$r=0.131, r^2=0.003^{n.s.}$



$r=0.047, r^2=0.012^{n.s.}$



$r=0.131, r^2=0.003^{n.s.}$

Variables analizadas

Cobre (Cu)

Hierro (Fe)

Zinc (Zn)

Cadmio (Cd)

Cromo (Cr)

Plomo (Pb)

Concentración de metal (mg/Kg)

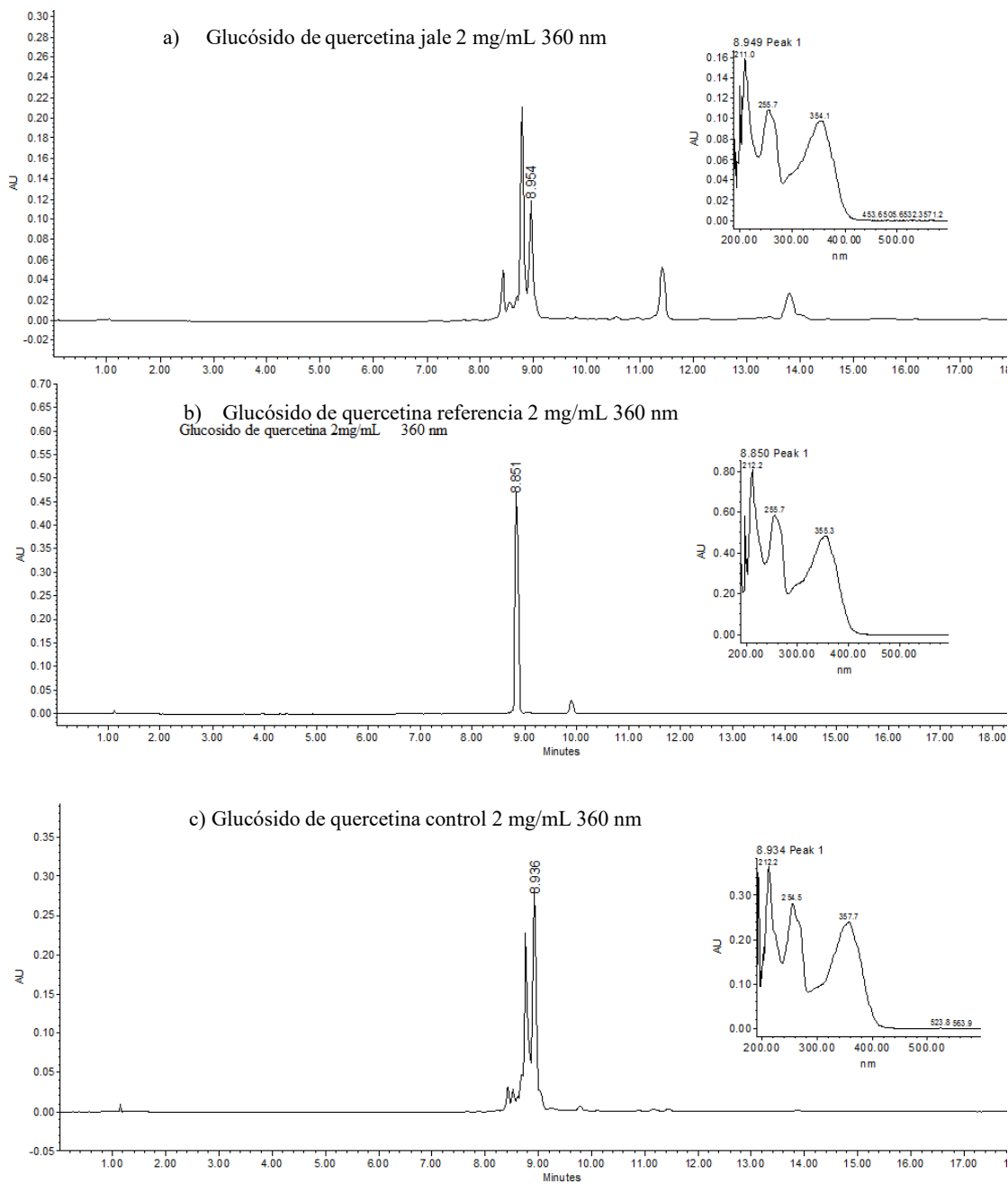
**Fig. 15** Análisis de regresión entre la concentración de MP y los niveles de daño genético, caracteres de tamaño y caracteres micromorfológicos en individuos de *D. viscosa* que crecen en sustrato de control y jale en condiciones de invernadero. Solo se muestran correlaciones significativas a  $P < 0,05$

### **Relación entre la bioacumulación de metales y los caracteres de tamaño, caracteres micromorfológicos y de daño genético en individuos de *D. viscosa***

Se detectó una relación positiva y estadísticamente significativa entre la bioacumulación de metales (metales esenciales y no esenciales) en células de tejido foliar y la inducción de daño genético (roturas monocatenarias de ADN) en individuos de *D. viscosa*. Por el contrario, se detectó una relación negativa y estadísticamente significativa entre la bioacumulación de metales (metales esenciales y no esenciales) en hojas y el índice estomático en individuos de *D. viscosa*. El índice de cobertura estomática en individuos de *D. viscosa* registró una relación negativa y estadísticamente significativa solo con la bioacumulación de metales no esenciales. La altura de la planta y la biomasa de la raíz documentaron una relación positiva y estadísticamente significativa con la bioacumulación de metales esenciales, excepto Zn en las plantas de mayor tamaño. Finalmente, el número de hojas y la biomasa foliar reportaron una relación negativa y estadísticamente significativa con la bioacumulación de metales no esenciales, a excepción del Fe que documentó un patrón inverso (Fig. 15).

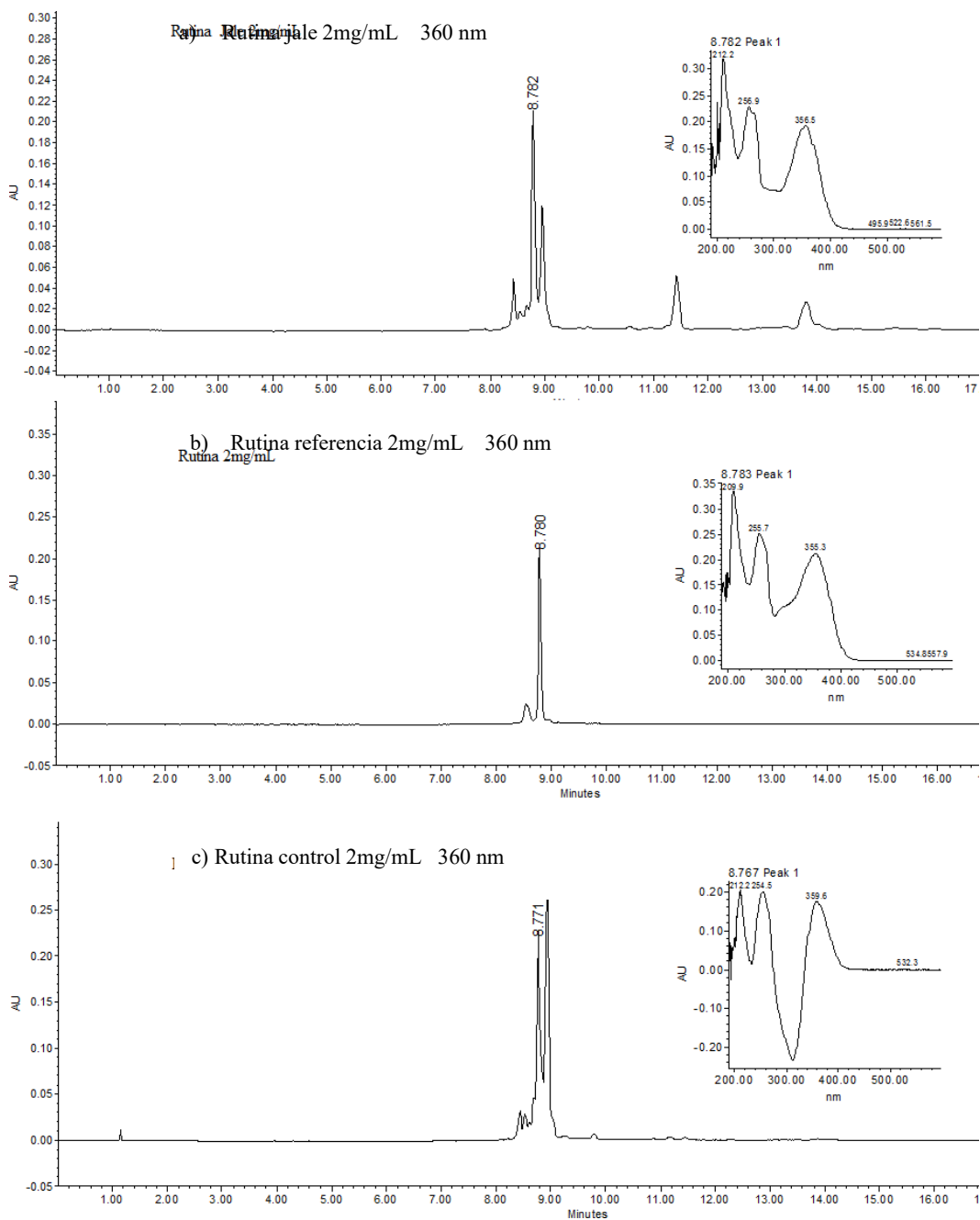
### **Fitoquímica foliar**

Se identificaron GQ, Ru y Lu por comparación de los tiempos de retención y los espectros UV con los compuestos de referencia. El tiempo de retención de GQ fue de 8.9 (212, 255, 355 nm) (Fig. 16), Ru fue de 8.7 (209, 255, 355 nm) (Fig. 17) y Lu fue de 13.6 (211, 253, 348 nm) (Fig. 18).

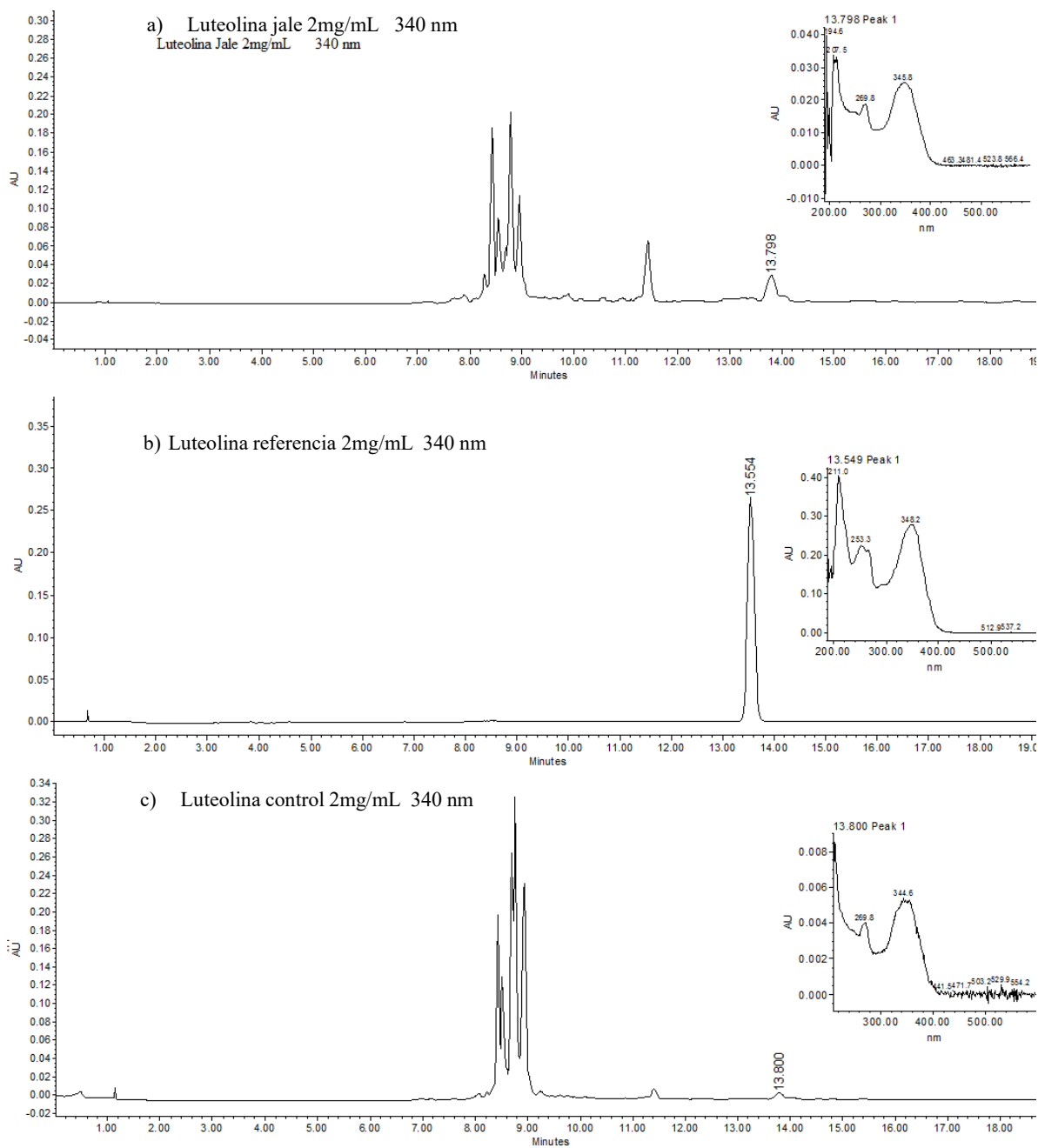


**Fig. 16** Cromatogramas de Glucosido de quercetina jale, referencia y control (a, b y c respectivamente) en un tiempo de retención de 8.9, observada en una longitud de onda UV de 360 nm.





**Fig. 17** Cromatogramas de rutina jale, referencia y control (a, b y c respectivamente) en tiempo de retención de 8.7, observada en una longitud de onda UV de 360 nm.



**Fig. 18** Cromatogramas de Luteolina jale, referencia y control (a, b y c respectivamente) en un tiempo de retención de 13.6, observada en una longitud de onda UV de 340 nm.

La producción de los compuestos se observa un incremento en GQ y Ru en individuos que se encuentran en sustrato jale, sin embargo, en Lu se observa una menor producción en los individuos jale (tabla 6)

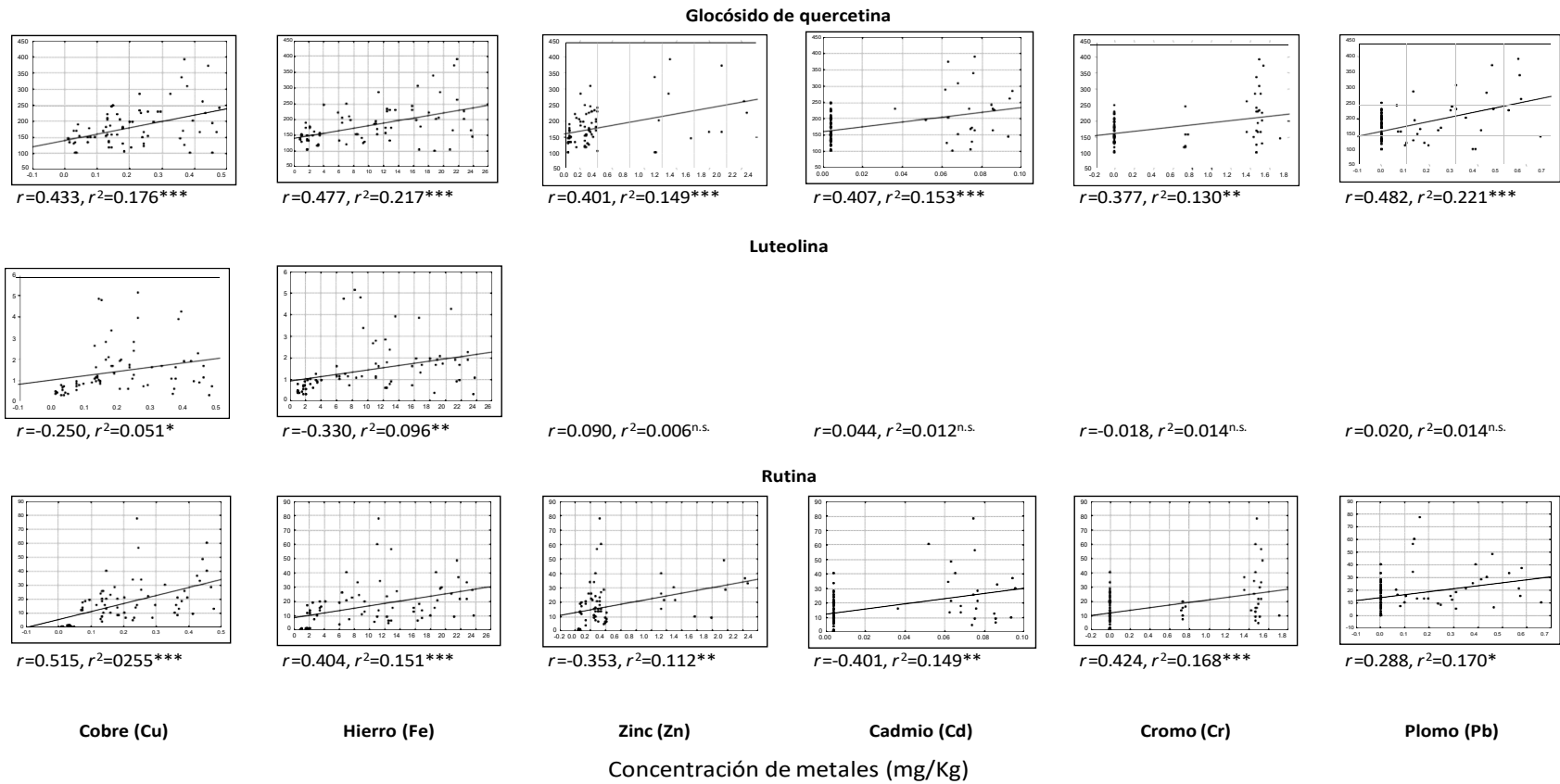
**Tabla 6.** Producción de glucósido de quercetina, luteolina y rutina, (promedio  $\pm$  error estándar) de *D. viscosa* a través del tiempo (meses).

tiempo (meses)	Sustrato	
	Control	jale
Glucósido de quercetina (mg /g extrato)		
3	149.91 $\pm$ 14.11	169.16 $\pm$ 27.03
6	126.57 $\pm$ 19.83	125.76 $\pm$ 22.25
9	168.48 $\pm$ 35.74	151.19 $\pm$ 32.33
12	158.26 $\pm$ 32.44	91.74 $\pm$ 12.99
15	91.85 $\pm$ 16.90	157.40 $\pm$ 20.65
18	100.10 $\pm$ 12.65	114.37 $\pm$ 18.62
Luteolina		
3	0.48 $\pm$ 0.19	0.54 $\pm$ 0.17
6	0.96 $\pm$ 0.47	0.93 $\pm$ 0.21
9	1.54 $\pm$ 0.81	1.68 $\pm$ 0.74
12	3.30 $\pm$ 1.97	1.36 $\pm$ 1.28
15	2.11 $\pm$ 1.22	1.91 $\pm$ 1.27
18	1.48 $\pm$ 0.77	1.23 $\pm$ 0.72
Rutina		
3	0.37 $\pm$ 0.11	0.66 $\pm$ 0.13
6	15.39 $\pm$ 3.40	13.60 $\pm$ 4.57
9	16.85 $\pm$ 3.43	35.69 $\pm$ 16.14
12	24.92 $\pm$ 8.37	10.86 $\pm$ 1.22
15	14.21 $\pm$ 2.16	22.18 $\pm$ 7.95
18	14.47 $\pm$ 2.49	17.43 $\pm$ 3.83

Media  $\pm$  desviación estándar de la producción de metabolitos secundarios en individuos de *D. viscosa* en condiciones de invernadero

## **Relación entre la producción de glucósido de quercetina, luteolina y rutina y la bioacumulación en individuos de *D. viscosa***

Se detectó una relación positiva y estadísticamente significativa entre la bioacumulación de metales (metales esenciales y no esenciales) en GQ en individuos de *D. viscosa*. Se detectó una relación estadísticamente positiva y significativa entre la bioacumulación de metales (metales esenciales y no esenciales) en Lu en individuos de *D. viscosa* (Fig. 19).



**Fig. 19** Análisis de regresión entre la concentración de MP y glucósido de quercetina, luteolina y rutina de *D. viscosa* que crecen en sustrato de control y jale en condiciones de invernadero. Solo se muestran correlaciones significativas a  $P < 0,05$

## Discusión

Si bien existen estudios que han documentado la bioacumulación y translocación de metales en especies vegetales para evaluar su potencial fitorremediador, este estudio contribuye a abordar el efecto de la exposición a metales pesados con un enfoque de múltiples biomarcadores (bioacumulación, translocación, daño genético, caracteres de tamaño y micromorfología) y tuvo como objetivo evaluar el potencial de *D. viscosa* como una especie útil para fitorremediar suelos contaminados con metales.

### **Bioacumulación de metales pesados en plantas de *D. viscosa***

El presente estudio se realizó en condiciones de invernadero; las raíces y las hojas de las plantas de *D. viscosa* que crecen tanto en sustrato control como en jale bioacumulan metales esenciales, como Cu, Fe y Zn. Pero solo las plantas que crecen en sustrato jale bioacumulan metales no esenciales (Cd, Cr y Pb) tanto en las raíces como en las hojas. Este patrón de bioacumulación concuerda con los hallazgos de informes previos en especies de plantas, como *Acacia robeorum* Maslin (He *et al.* 2012), *P. laevigata* (Muro-González *et al.* 2020) y *V. campechiana* (Santoyo-Martínez *et al.* 2020), todas pertenecientes a la familia Fabaceae. Por lo tanto, la bioacumulación de metales no esenciales en el tejido foliar de las plantas que habitan suelos contaminados por metales podría ser útil como mecanismo de desintoxicación. En general, el Fe fue el metal más acumulado tanto en los tejidos como en los tratamientos de *D. viscosa*, la concentración de Fe aumenta significativamente con el tiempo. En un estudio previo, Nazir *et al.* (2015) sugieren que *D. viscosa* es un acumulador de Fe.

En la literatura se ha documentado que diferentes especies de plantas de diferentes familias son capaces de bioacumular Fe, entre ellas *Brassica oleracea* (L.) (Brassicaceae), *Daucus carota* (L.) (Apiaceae), *Raphanus sativus* (L.) (Brassicaceae) (Casana y Beltrán 2017), y *Cynara cardunculus* (L.) (Asteraceae) (Capozzi *et al.* 2020), mientras que estudios previos realizados en los jales mineros de Huautla han reportado especies de plantas como *P. laevigata* (Muro-González *et al.* 2020), *Sanvitalia procumbens* (Lam.) (Asteraceae) (Rosas-Ramírez 2019), y *V. campechiana* (Santoyo-Martínez *et al.* 2020) como hiperacumuladores de Fe. La acumulación de alto nivel de Fe en las hojas podría explicarse por el papel del Fe como un metal traza esencial; Fe es un componente importante del centro metálico de las moléculas de porfirina, implicadas como componentes estructurales de proteínas importantes como citocromos, catalasa, peroxidasa y leghemoglobina. El Fe también está involucrado en las reacciones de oxidación-reducción en la respiración y la fotosíntesis, y juega un papel esencial en los sistemas enzimáticos relacionados con la síntesis de clorofila (Marschner 1995; Rout y Sahoo 2015; Kaya *et al.* 2020).

Además, encontramos que la mayor concentración de Fe estaba en las raíces de *D. viscosa*; un patrón de acumulación similar se detectó en *P. laevigata* (Muro-González *et al.* 2020) y *V. campechiana* (Santoyo-Martínez *et al.* 2020), ambas plantas establecidas en los jales mineros de Huautla y en *R. sativus* (Casana y Beltrán 2017). Una posible explicación de la alta acumulación de Fe en las raíces es que la acumulación de Fe en concentraciones más altas en la raíz es un mecanismo probable de protección contra su toxicidad, evitando la translocación

excesiva a las partes aéreas (Batty y Younger 2003). Por ejemplo, Sinha *et al.* (1997) documentaron que la toxicidad de Fe en *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle (Hydrocharitaceae) está asociada con una disminución en la actividad de fotosíntesis y un aumento en el estrés oxidativo y la actividad de peroxidación de ascorbato. La alta concentración de  $Fe^{+2}$  produce radicales libres que alteran la estructura celular, dañan las membranas, el ADN y las proteínas (Arora *et al.* 2002).

En este estudio, solo las plantas de *D. viscosa* que crecieron en sustrato jale acumularon Cr en raíces y hojas, siendo mayor en raíces. Asimismo, también se documentó que su concentración aumentaba con el tiempo de exposición en ambos tejidos. Estos hallazgos están respaldados por Kocik e Ilavsky (1994), Golovatyj y Bogatyreva (1999) y Sharma *et al.* (2003) quienes informaron que las concentraciones máximas de Cr comúnmente se registran a nivel de la raíz, mientras que la acumulación de Cr en los órganos vegetativos y reproductivos es mínima. La absorción de Cr a través del sistema radicular puede atribuirse al alto contenido de ácidos orgánicos en esta estructura; la interacción de los ácidos orgánicos con las formas insolubles de metales en el suelo provoca un aumento en su biodisponibilidad, favoreciendo su absorción por las plantas (Panda y Choudhury 2005).

Además, las plantas hiperacumuladoras emplean diferentes estrategias de desintoxicación de metales (Bidwell *et al.* 2004); a nivel de raíz, el Cr se inmoviliza en vacuolas celulares, evitando su toxicidad (Shanker *et al.* 2005). Además,



diversos metales, incluido el Cr, pueden translocarse y concentrarse en las hojas para proteger a la planta de los efectos fitotóxicos.

De acuerdo con los presentes resultados, las concentraciones de Pb en los tejidos (raíz y hoja) de las plantas que crecen en el sustrato jale aumentaron con el tiempo, mostrando la mayor acumulación a nivel de raíz. La acumulación de plomo en hojas ha sido previamente documentada en *D. viscosa* (Rojas-Loria *et al.* 2012), y plantas de diferentes familias como *Acacia schaffneri* (S. Watson) F.J.Herm (Fabaceae) (Salas-Luévano *et al.* 2009) , *Brickellia veronicifolia* (Kunth) A. Gray (Asteraceae) (Hernández-Acosta *et al.* 2009), *Buddleja scordioides* Kunth (Scrophulariaceae) (Salas-Luévano *et al.* 2009), *Plantago lanceolate* (L.) (Plantaginaceae) (Salas- Luévano *et al.* 2017), *P. laevigata* (Muro-González *et al.* 2020), *Mimosa aculeaticarpa* Ortega (Fabaceae) (Salas-Luévano *et al.* 2009), *Schinus molle* (L.) (Anacardiaceae) (Alcalá-Jáuregui *et al.* 2018), y *V. campechiana* (Santoyo-Martínez *et al.* 2020). La acumulación de Pb inhibe el transporte de metales esenciales, provocando un aumento en su concentración y translocación en el tiempo en el tejido foliar (Patra *et al.* 2004).

Con respecto al Cd, este estudio mostró que su concentración se detectó solo en plantas que crecían sobre sustrato jale en ambos tejidos (raíz y hoja), y su concentración aumentó significativamente con el tiempo. La mayor concentración encontrada fue en las raíces seguida de las hojas. Este resultado coincide con lo reportado en *Theobroma cacao* (L.), *Matisia cordata* Bonpl, *Malvaviscus sp.* Fabr., todas pertenecientes a la familia Malvaceae (Llatance *et al.* 2018). Asimismo, esto es sustentado por Chan y Hale (2004) quienes sugieren que el Cd se acumula

preferentemente en la raíz secuestrado en la vacuola de las células, y solo una ínfima parte es transportada a la parte aérea de la planta, registrándose el siguiente patrón de bioacumulación: raíz > tallos > hojas > frutos > semillas.

En general, detectamos bajas concentraciones de metales esenciales, como Cu y Zn, en tejidos de raíz y hoja de *D. viscosa*. La interpretación de estos resultados podría ser que la absorción de Pb reemplaza a la de Cu y Zn, alterando la permeabilidad de las membranas y haciéndolas indisponibles para su acumulación y movilidad dentro de la planta (Patra *et al.*2004).

### **Daño genético en individuos de *D. viscosa* cultivados en relaves mineros y sustratos de control en condiciones de invernadero**

Los resultados del análisis de varianza de dos vías (ANOVA) mostraron un efecto estadísticamente significativo del tratamiento (sustrato jale y control), el tiempo de exposición y la interacción (T × t) en la inducción de daño genético (roturas de cadena simple de ADN) en las células de las hojas. El daño genotóxico fue significativamente mayor en los individuos de *D. viscosa* que crecían en el sustrato jale. También se detectó un aumento significativo del daño genético a lo largo del tiempo de exposición; este último resultado podría estar relacionado con las mayores concentraciones de metales en las hojas, ya que, durante el crecimiento de la planta, los metales son gradualmente absorbidos y translocados a los tejidos aéreos provocando una mayor bioacumulación, como se observó en este estudio para metales esenciales (Cu, Fe, Zn) y no esenciales (Cd, Cr, Pb). Se documentaron resultados similares en *Nicotiana tabacum* (L.) (Solanaceae)(Gichner *et al.* 2006) y *P. laevigata* (Muro-González *et al.*2020). La

exposición crónica a metales en las plantas puede saturar las estructuras de secuestro (vacuolas y paredes celulares) de estos elementos en las células, alterando así el citoplasma y el núcleo al aumentar los niveles de daño genético (Sánchez-Pinzón 2010).

El potencial genotóxico de los metales ha sido ampliamente documentado en diferentes organismos. El nivel de daño genético depende en parte del tipo de metal; entre los metales, Pb, Cu, Cr y Cd son los más genotóxicos para las células vegetales (Al-Qurainy *et al.* 2010). Los metales afectan a la molécula de ADN al inducir entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas, roturas de doble y simple cadena de ADN y daño promutagénico observado como alteraciones de la base del ADN, entre otros.

La toxicidad por metales pesados es principalmente el resultado del estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Stohs y Bagchi 1995; Huihui *et al.* 2020). Además, la mayoría de las sales metálicas son venenos para el huso mitótico debido a su afinidad por los grupos tiol que promueven diversas anomalías mitóticas y variaciones cromosómicas debido a la mala segregación de los pares de cromosomas.

El Pb induce indirectamente rupturas de cadena doble y sencilla del ADN y puede reemplazar al Zn en las enzimas de reparación y replicación con iones de zinc, así como al estrés oxidativo (Pourrout *et al.* 2013). Finalmente, el Pb está involucrado en la producción de ROS (Huihui *et al.* 2020) generando daño genético (Ercal *et al.* 2001). El Cd produce estrés oxidativo que promueve alteraciones de la membrana y las proteínas (Wu *et al.* 2003; Balestrasse *et al.* 2004; Romero-

Puertas *et al.* 2002), así como oxidaciones de pares de bases de ADN que conducen a roturas de cadena doble y sencilla (Benavides *et al.* 2005). El Cr ha sido documentado como una potente genotoxina con efectos muy marcados en las plantas; generando la inducción de daño oxidativo y roturas directas del ADN (Patra *et al.* 2004). Rogstad *et al.* (2003) informaron que un aumento en la concentración de metales como Cr aumenta las tasas de mutación en el tejido de la hoja. Además, Cuypers *et al.* (2002) documentaron que las hojas primarias de plántulas, metales como Cu y Zn tenían un efecto cada vez más pronunciado sobre las actividades de peroxidasa, lo que sugiere la generación de estrés oxidativo en estas estructuras que puede dañar la molécula de ADN. Finalmente, todos los mecanismos de daño antes mencionados pueden explicar la genotoxicidad observada del tejido foliar en los individuos de *D. viscosa*.

### **Cambios de tamaño y micromorfológicos en plantas de *D. viscosa* que crecen en relaves mineros y sustratos de control a lo largo del tiempo**

#### **Carácter micromorfológico**

En general, los resultados mostraron que los individuos de *D. viscosa* que crecieron en sustrato jale en condiciones de invernadero mostraron valores de carácter micromorfológico significativamente más bajos en comparación con las plantas que crecieron en el sustrato de control. Se ha documentado que la cobertura de estomas puede verse reducida por la exposición a metales, ya que las células oclusivas son muy sensibles al estrés químico y las hojas pueden caer antes como mecanismo de defensa contra la exposición a metales (Rascio y Navarizzo 2011). Además, la alta exposición a metales produce el cierre

hidroactivo de las células guarda del estoma (Bhatla 2018). Por ejemplo, Kabata-Pendias (2011) documentó que la acumulación de Pb podría conducir a una disminución de la cobertura estomática, al afectar las paredes celulares y cambiar la elasticidad del tejido estomático. Sin embargo, en este estudio, los individuos de *D. viscosa* expuestos a una mezcla de metales no mostraron diferencias significativas en el índice estomático en comparación con las plantas que crecieron en el sustrato control. Este último resultado podría deberse a que plantas como *D. viscosa* que tienen una amplia distribución geográfica, incluyendo áreas perturbadas como jales mineros, pueden presentar cambios anatómicos y fisiológicos como respuesta adaptativa a estas condiciones ambientales (Gomes *et al.* 2011).

### **Caracteres de tamaño**

En este estudio, la bioacumulación de metales en *D. viscosa* influyó en el tamaño de la planta, ya que los caracteres de tamaño de las plantas expuestas tuvieron valores más bajos en comparación con los de las plantas que crecieron en el sustrato control, a excepción de la biomasa de raíz. Estos resultados mostraron que los metales interfieren con el crecimiento de las plantas, provocando una reducción del tamaño de *D. viscosa*. Se informaron resultados similares para especies de plantas asociadas con sitios contaminados con metales como *P. laevigata* (Muro-González *et al.* 2020), *V. campechiana* (Santoyo-Martínez *et al.* 2020) y *Zea mays* (L.) (Poaceae) (Tovar-Sánchez *et al.* 2018), en el que se observó una disminución de los valores morfológicos de las raíces y las hojas. Algunos autores han documentado que la disminución de los caracteres del tamaño de las

plantas puede estar relacionada con modificaciones de procesos metabólicos potencialmente tóxicos. Estos efectos adversos dan como resultado anomalías en el crecimiento (Bini *et al.* 2012) junto con un crecimiento débil de las plantas y bajo rendimiento, lo que podría estar asociado con trastornos en el metabolismo de las plantas, como la reducción de la zona meristemática (Maleci *et al.* 2001). Curiosamente, los resultados en términos de biomasa de raíces revelaron el mismo tamaño en los individuos de *D. viscosa* que crecían en el sustrato de cola en comparación con los individuos que crecían en el sustrato de control; esto puede ocurrir porque la bioacumulación de metales en diferentes concentraciones influye en el desarrollo de la planta, que involucra varios procesos metabólicos y fisiológicos. Por ejemplo, la exposición a metales como Cd, Cr y Pb en bajas concentraciones podría influir positivamente en el crecimiento de las plantas (Prasad *et al.* 2011). Según Helmstädter (2008), este mecanismo se denomina hormesis, que es un efecto estimulador de concentraciones subletales de cualquier sustancia tóxica sobre cualquier organismo. En esta respuesta particular, los iones metálicos actúan como inductores de respuestas de defensa que, a su vez, pueden estimular el crecimiento de las plantas, particularmente en condiciones de estrés (Poschenrieder *et al.* 2013).

### **Química foliar**

En general, los MP inducen estrés a las plantas activando las reacciones defensivas, lo que resulta en un cambio en la transcripción de los genes que codifican las enzimas que influyen en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Kasparová y Siatka 2004). Este trabajo coincide con Sobral-Souza *et al.*, (2014) en

donde reporta que *Psidium sbraleanum* al agregar  $Fe^2$  aumento la producción de compuestos fenólicos, al igual lo documenta Zafari, *et al.*, (2016) en donde agrego grandientes ascendente de concentración de Pb a *Prosopis farcta* y se detectó un incremento de compuestos fenólicos. Berglund y Ohlsson (1993) documenta que las plantas al estar en ambientes contaminados como los MP, genera la inhibición del glutatión y inducen la presencia de ROS, incrementando la producción de MS. En este estudio se observa un incremento en la concentración de GQ, Lu y Ru. De acuerdo a Nasim, S. A., & Dhir, B. (2010), reporta que los MP dependiendo de su concentración pueden inducir la producción de metabolitos secundarios, menciona que las ROS (especies reactivas de oxígeno) generadas por el estrés oxidativo inducido por metales pesados conducen a la formación de hidroperóxidos lipídicos, que se convierten en oxilipinas. Las oxilipinas inducen la expresión génica involucrada en la biosíntesis y la acumulación de metabolitos secundarios. Otras vías de señalización incluyen la biosíntesis de etileno y la producción de ácido jasmónico (JA) a través del precursor del ácido 12-oxofitodieónico (OPDA), que también puede desempeñar un papel indirecto en la activación de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

### **Usos potenciales de *D. viscosa* como especie fitorremediadora de suelos contaminados con metales pesados**

*D. viscosa* es una especie arbustiva o arbórea de amplia distribución geográfica en México. Esta especie se distribuye frecuentemente en áreas con diferentes tipos de vegetación, como bosques tropicales húmedos y secos, arbustos xerófitos, bosques templados y bosques mesófilos (Rzedowski 2006;

González-Elizondo *et al.* 2007); además, sus hojas presentan baja palatabilidad para herbívoros (Sher *et al.* 2012) y se distribuyen comúnmente en áreas contaminadas por metales (Noriega-Luna *et al.* 2016). En este estudio, se reporta la bioacumula metales esenciales (Cu, Fe, Zn) y no esenciales (Cd, Cr y Pb) en raíz y hoja en individuos de *D. viscosa* que crecen en sustrato jale. En general, se ha reconocido que las especies de plantas herbáceas utilizadas con fines de fitorremediación en ambientes contaminados por metales pertenecen a las familias: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae y Violaceae (Mahar *et al.* 2016; Salas-Luévano *et al.* 2017; Mei *et al.* 2020; Muro-González *et al.* 2020; Santoyo-Martínez *et al.* 2020). Los presentes resultados respaldan el potencial de *D. viscosa* para ser considerada como fitorremediadora de suelos contaminados por MP, ya que es una especie acumuladora de metales esenciales (Cu, Zn, Fe) y no esenciales (Cd, Cr, Pb). En consecuencia, una planta puede ser considerada acumuladora si su TF es  $\geq 1$  (Olguín y Sánchez-Galván 2012; Ali *et al.* 2013).

Las plantas que pueden acumular una mayor concentración de metales en la parte aérea en comparación con las raíces muestran un mejor potencial de fitoextracción (Mojiri *et al.* 2013; Ibarra-García *et al.* 2017; Ramírez *et al.* 2019). *D. viscosa* presentó los siguientes valores promedio de FT: Zn (1.5), Cu (1.2) y Cd (1.0). Con base en estos valores, *D. viscosa* puede considerarse un acumulador de estos metales. Estos niveles de FT son similares a los encontrados en especies de acumuladores que crecen directamente en suelos contaminados con metales como *Cyperus esculentus* (L.) ((Cyperaceae)(Pb = 1.6, Zn = 1.1)), *Gentiana pennelliana*



Fernald ((Gentianaceae) (Zn = 1,2)), *L. flava* (Cd = 1,3), *Phyla nodiflora* (L.) Greene ((Verbenaceae) (Cu = 12,0, Zn = 1,1)), *P. laevigata* (Pb = 1,1, Fe = 1, 5, Cu = 2,4, Zn = 2,8), *Rubus fruticosus* Lour. ((Rosaceae) (Cu = 5,6)), *Sesbania herbacea* (Molino) McVaugh ((Fabaceae) (Cu = 4,0)) y *V. campechiana* (Pb = 1,2 y Cu = 1,2) (Yoon *et al.* 2006; Abhilash *et al.* 2009; Muro-González *et al.* 2020; Santoyo-Martínez *et al.* 2020). b) El FBC para Cu en raíz fue 8.7 y 7.2 en hojas; para Fe en raíz fue 87.4 y 30.4 en hojas; para Cd en raíz fue 1.7 y 1.5 en hojas; mientras que para Pb en raíz fue 8.5 y 1.3 en hojas. Los estudios de Lin *et al.* (2003) y Santoyo-Martínez *et al.* (2020) avalan los resultados obtenidos en el presente trabajo para Cu. En el primer estudio reportaron bioacumulación de Cu en *Helianthus annuus* (L.) (Asteraceae), con una concentración de 2 a 10 veces mayor que la concentración de Cu en el suelo. En el segundo estudio, los autores documentaron que *V. campechiana* reportó FBC en raíz 7,6 veces mayor que la concentración de Cu en sustrato jale. Con respecto al Fe, nuestros resultados están respaldados por Santoyo-Martínez *et al.* (2020) quienes reportaron en *V. campechiana* FBC de 5.3 en raíz y de 4.3 en tejido foliar. Asimismo, con respecto al Pb, Santoyo-Martínez *et al.* (2020) documentaron en *V. campechiana* un BFC de 15.1 en raíz y de 17.4 en tejido foliar. En *D. viscosa*, la acumulación de metales esenciales (Cu, Fe, Zn) y no esenciales (Cd, Cr, Pb) aumentó con el tiempo (18 meses) en hojas y raíz; por lo que estudios a largo plazo podrían registrar una mayor acumulación de estos metales. El índice de estomas y la biomasa de la raíz en las plantas de *D. viscosa* no se vieron afectados significativamente por la bioacumulación de metales

pesados. A lo largo del estudio (18 meses), no se registró mortalidad en plantas de *D. viscosa* expuestas a metales, hecho que aumenta el potencial fitorremediador.

## **Conclusiones**

De acuerdo con el resultado del presente estudio, los individuos de *D. viscosa* cultivados bajo condiciones de invernadero mostraron su capacidad de bioacumular metales esenciales y no esenciales en los tejidos de la raíz y la hoja cuando estuvieron expuestos (18 meses) al sustrato jale, registrando valores elevados en los factores de bioconcentración y translocación. Los biomarcadores evaluados en este estudio evidenciaron que los individuos expuestos mostraron niveles más altos de daño genético y reducciones significativas en el tamaño y caracteres micromorfológicos, así como incremento de MS en relación con las plantas que crecían en el sustrato de control, a pesar de que los individuos de *D. viscosa* podían establecerse, desarrollarse y sobrevivir de forma natural en suelos contaminados con metales. Los resultados del presente estudio sugieren que *D. viscosa* puede ser una especie apropiada para la implementación de estrategias de fitorremediación en suelos contaminados con metales como Cd, Cu, Fe, Pb y Zn, debido a su capacidad para establecerse exitosamente en sustratos con altos niveles de metales, convirtiéndose en una de las especies de plantas dominantes en estos sitios, con un crecimiento rápido y alta biomasa, sin afectar el desarrollo, la supervivencia y la aptitud de las plantas, así como su capacidad de fitoestabilización en el sistema radicular y la fitoextracción de altos niveles de metales del suelo a través de mecanismos de translocación. Además, no hay reportes de insectos herbívoros asociados con esta especie; por lo tanto, los

metales bioacumulados en las hojas no se transfieren a través de las redes tróficas. Sugerimos evaluar el potencial fitorremediador de *D. viscosa* mediante estudios in situ, preferiblemente estudios durante un tiempo de exposición más largo, particularmente porque detectamos que BCF y TF aumentan con el tiempo.

## 9. Bibliografía

- Abhilash**, P. C., Pandey, V. C., Srivastava, P., Rakesh, P. S., Chandran, S., Singh, N., Thomas, A. P. **2009**. Phytofiltration of cadmium from water by *Limnocharis flava* (L.) Buchenau grown in free-floating culture system. *J Hazard Mater* 170:791–797.
- Alcala-Jauregui**, J., Rodriguez-Ortiz, J. C., Hernandez-Montoya, A., Filippini, M. F. R., Martinez-Carretero, E. E., Diaz-Flores, P. E. **2018**. Capacity of two vegetative species of heavy metal accumulation. *Rev FCA UNCUYO* 50(1):123–139
- Alagarsamy**, V., Venket, N. R., Thangathirupathy, A., Amuthalakshmi, S., Sivakamisundari, P., Jubie, S., Syed-Ali, A. K. S., Suresh, M. **2007**. Antiinflammatory activity of *Dodonaea viscosa* Linn leaf extracts. *Indian Drugs* 44(7):559–560
- Ali**, H., Khan, E., Sajad, M. A. **2013**. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere* 91(7):869–881.
- Al-Qurainy**, F., Alameri, A. A., Khan, S. **2010**. RAPD profile for the assessment of genotoxicity on a medicinal plant. *Eruca Sativa J Med Plant Res* 4(7):579–586.
- Arora**, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. **2002**. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 1227–1238

- Baccio**, D., Tognetti, R., Sebastiani, L. y Vitagliano, C. 2003. Responses of *Populus deltoides* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I214 to high zinc concentrations. *New Phytologist*. 159(2):443-452
- Balestrasse**, K. B., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. 2004. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant Soil* 262:373–381.
- Batty**, L. C., Younger, P. L. 2003. Effects of external iron concentration upon seedling growth and uptake of Fe and phosphate by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. *Ann Bot* 92(6):801–806. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg205>
- Benavides**, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17:21–34
- Berglund**, T., & Ohlsson, A. B. 1993. The glutathione biosynthesis inhibitor buthionine-sulfoximine (BSO) induces cardenolide accumulation in *Digitalis lanata* tissue culture. *Journal of plant physiology*, 142(2), 248-250.
- Bhatla**, S. C. 2018. Light perception and transduction. In: Bhatla SC, Lal MA (eds) *Plant physiol, development and metabolism*. Springer, Singapore, pp 519–558.
- Bidwell**, S.D., Crawford, S. A., Woodrow, I. E., Sommer-Knudsen, J., Marshall, A. T. 2004. Sub-cellular localization of Ni in the hyperaccumulator, *Hybanthus floribundus* (Lindley) F. Muell *Plant Cell Environ* 27(6):705–716.
- Bini**, C, Wahsha, M., Fontana S., Maleci, L. 2012. Effects of heavy metals on morphological characteristics of *Taraxacum officinale* Web growing on mine soils in NE Italy. *J Geochem Explor* 123:101–108.
- CEFP**, 2013. Centro de estudios de las finanzas públicas: <http://www.cefp.gob.mx/indicadores/gaceta/2013/iescefp0172013.pdf>.
- Camacho**, M., Gonzales K., y Mancera O. 1993. Guía tecnológica para el cultivo del chapulixtle (*Dodonaea viscosa* (L) Jacq); arbusto útil para la producción de

- tutores hortícolas, control de la erosión y setos urbanos. Guía tecnológica No. 1. CENID-COMEF, INIFAP. México. 35 p.
- Calow, P. 1993.** Handbook of ecotoxicology. Vol. I. 478 p. Blackwell Science Ltd., London, England.
- Capozzi, F., Sorrentino, M. C., Caporale, A. G., Fiorentino, N., Giordano, S., Spagnuolo, V. 2020.** Exploring the phytoremediation potential of *Cynara cardunculus*: a trial on an industrial soil highly contaminated by heavy metals. *Environ Sci Pollut Res* 1–10.
- Cappa, J. J., Pilon-Smits, E. A. 2014.** Evolutionary aspects of elemental hyperaccumulation. *Planta* 239(2):267–275.
- Carrizales, L., Jasso, Y., Espinosa-Reyes, G., Torres-Dosal, A. y Díaz-Barriga, F. 2005.** Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de los riesgos ambientales en sitios peligrosos de México. Instituto Nacional de Ecología. México. 66p.
- Casana M. M, Beltran, R. A. 2017.** Bioacumulacion de cobre, plomo, hierro y zinc en *Lactuca sativa* “lechuga”, *Brassica oleracea* “repollo”, *Daucus carota* “zanahoria” y *Raphanus sativus* “rabanito”. *Conoc Desarro* 4(2).
- Çeribası, I. H., y Yetis, U. 2001.** Biosorption of Ni (II) and Pb (II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system—kinetics. *Water SA*, 27(1), 15-20.
- Cervantes-Ramírez, L. T. 2009.** Daño genóxico en *Baiomys musculus* (RODENTIA: MURIDAE) por efecto de los jales mineros de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Estado Morelos. Morelos. México. 65 p.
- Chan, D. Y., Hale, B. A. 2004.** Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *J Exp Bot* 55(408):2571–2579.
- Cid, N., Ibanez, C., Palanques, A., Prat, N. 2010.** Patterns of metal bioaccumulation in two filter-feeding macroinvertebrates: exposure distribution, inter-species differences and variability across developmental stages. *Sci Total Environ* 408(14):2795–2806.

- Covarrubias, S. A., Cabriales, J. J. P. 2017.** Contaminación por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Rev Int Cont Amb* 7–21.
- Cuypers, A. N. N., Vangronsveld, J., Clijsters, H. 2002.** Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: a comparison. *J Plant Physiol* 159(8):869–876.
- Daniel, W. W. 2014.** Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. Limusa Wiley. México. 928 p
- Danh, L. T., Truong, P., Mammucari, R., Tran, T. y Foster, N. 2009.** Vétiver grass, *Vetiveria zizanioides*: A choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *Int. J. Phytoremediation* 11(8):664-691.
- Dorado, O., Maldonado, B., Arias, D. M., Sorani, V., Ramírez, R., Leyva, E., y Valenzuela, D., 2005.** Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera de Huautla. *Comisión Nacional de áreas Naturales Protegidas-Secretaría de medio Ambiente y Recursos Naturales. México, DF, México.*
- Ducic, T., y Polle, A. 2005.** Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 103-112.
- Eder, J. y Cosio, E. G. 1994.** Elicitors of plant defense responses. In *International review of cytology* (Vol. 148, pp. 1-36). Academic Press.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. 2001.** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1(6):529–539.
- Espino-Ortega V. 2014.** *Afectación de suelos y sedimentos por la dispersión de los residuos mineros históricos del distrito minero San Antonio – El Triunfo, B.C.S.* Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 108 pp.
- Ferrer, A. 2003.** Intoxicación por metales. *Anales Sis San Navarra*. 26:141-153.
- Fritsch, C., Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Douay, F., Raoul, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Vaufléury, A., Scheifler, R. 2010.** Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere* 81(2):141–155.

- Garbisu, C. y Alkorta, I., 2001.** Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Biores Tech* 77: 229–236.
- Ghosh, M. y Singh, S. P. 2005.** A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 3(1):1-18.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Demnerova, K. 2006.** Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotox Environ Safe* 65:420–426.
- Gold, K., León-Lobos, P., y Way, M. 2004.** Manual de recolección de semillas de plantas silvestres. *Editorial Altamirano. La Serena–Chile.* 6-9.
- Golovatyj, S. E., Bogatyreva, E. N. 1999.** Effect of levels of chromium content in a soil on its distribution in organs of corn plants. *Soil Res Fertilizers* 197–204
- Gomes, M. P., Marques, T. C., Nogueira, M. D., Castro, E. M., Soares, A. M. 2011.** Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. *Sci Agric* 68:566–573.
- Gonzalez-Elizondo, M. S., Gonzalez-Elizondo, M., Marquez-Linares, M. A. 2007.** Vegetacion y ecorregiones de Durango. Plaza y Valdes Editores, Instituto Politecnico Nacional. Mexico. 164:104
- Hartwig, A. 1995.** Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals.* 8(1): 3-11.
- He, H., Bleby, T. M., Veneklaas, E. J., Lambers, H., Kuo, J. 2012.** Morphologies and elemental compositions of calcium crystals in phyllodes and branchlets of *Acacia robeorum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Ann Bot* 109:887–896.
- Helmstadter, A. 2008.** Is there a tonic in the toxin? The Arndt–Schulze law as an explanation for non-linear dose–response relationships, In: Balz V, Schwerin AV, Stoff H, Wahrig B (eds) *Precarious matters. The history of dangerous and endangered substances in the 19th and 20th centuries*, Max Planck Institut fur Wissenschaftsgeschichte, Berlin pp 29–37
- Hernandez-Acosta, E., Mondragon-Romero, E., Cristobal-Acevedo, D., Rubinos-Panta, J. E., Robledo-Santoyo, E. 2009.** Vegetacion, residuos de mina y elementos potencialmente toxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo. Mexico *Rev Chapingo Ser Cie* 15(2):109–114

- Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., y Sánchez, V. C. 1992.** Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 294(1), 160-167.
- Hernández-Lorenzo, B. 2014.** *Análisis de la anatomía y morfología de Prosopis laevigata, por acumulación de metales pesados en la Sierra de Huautla, Morelos.* Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos. 62 pp.
- Hernandez-Plata., I., Rodriguez, V. M., Tovar-Sanchez, E., Carrizalez, L, Villalobos, P., Mendoza-Trejo, M. S., Mussali-Galante, P. 2020.** Metal brain bioaccumulation and neurobehavioral effects on the wild rodent *Liomys irroratus* inhabiting mine tailing areas. *Environ Sci Pollut Res* 27(29):36330–36349.
- Hesel, D. 1990.** Less than obvious. *Environ Sci Technol* 24(12):1766–1774
- Heuvel, J. P. V. y Davis, J. W., 1999.** Molecular approaches to identify exposure and risk to specific environmental pollutants. *Biomarkers* 4(2), 93-105.
- Huihui, Z., Xin, L., Zisong, X., Yue, W., Zhiyuan, T., Meijun, A., Yuehui, Z., Wenxu, Z., Nan, X., Guangyu, S. 2020.** Toxic effects of heavy metals Pb and Cd on mulberry (*Morus alba* L.) seedling leaves: photosynthetic function and reactive oxygen species (ROS) metabolism responses. *Ecotoxicol Environ Saf* 195:110469.
- Ibarra-Garcia, A. R., Barcelo-Quintal, I. D., Garcia-Albortante, J., Lopez-Lafuente, A. L., Gonzalez-Huecas, C., Quintana-Nieto, J. R., Mugica-Alvarez, V. 2017.** Phytoextraction of metals by native plants from mining wastes in Zacatecas, Mexico. *Acta Horti* 1227:409–416.
- Kabata-Pendias, A. 2011.** Trace elements in soil and plants, 4th edn CRC Press, Boca Raton
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Ahmad, P. 2020.** Responses of nitric oxide and hydrogen sulfide in regulating oxidative defense system in wheat plants grown under cadmium stress. *Physiol Plant* 168(2):345–360.



- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z. y Zhu, Y. G. 2008.** Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental pollution*, 152(3), 686-692.
- Khudhair, I. R. y Zaki, H. F. 2017.** Phytoremediation of Lead (Pb) Metal in Contaminated Soils of some locations in Baghdad City.
- Kocik, K., Ilavsky, J. 1994.** Effect of Sr and Cr on the quantity and quality of the biomass of field crops. In: Ilavsky J (ed) Production and utilization of agricultural and forest biomass for energy: Proceedings of a seminar held at Zvolen. Slovakia, pp 168–178
- Kuc, J. 1995.** Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual review of phytopathology*, 33(1), 275-297.
- Lin, J., Jiang, W., Liu, D. 2003.** Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons, and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biores Technol* 86:151–155.
- Llatance, W. O., Gonza, S. C. J., Guzman, C. W., Pariente, M. E. 2018.** Bioacumulacion de cadmio en el cacao (*Theobroma cacao*) en la Comunidad Nativa de Pakun. Peru. *Rev For Peru* 33(1):63–75.
- Maceda-Veiga, A., Monroy, M., de Sostoa, A. 2012.** Metal bioaccumulation in the Mediterranean barbel (*Barbus meridionalis*) in a Mediterranean river receiving effluents from urban and industrial wastewater treatment plants. *Ecotox Environ Safety* 76:93–101.
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., Li, R., Zhang, Z. 2016.** Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 126:111–121.
- Maleci, L., Bini, C., Paolillo, A. 2001.** Chromium (III) uptake by *Calendula arvensis* L. and related phytotoxicity. *Proc VI ICOBTE Guelph On* p 384
- Mangkoedihardjo, S. y Surahmaida, A. 2008.** *Jatropha curcas* L. for phytoremediation of lead and cadmium polluted soil. *World Appl. Sci. J.* 4(4):519-522
- Marquez-Ferrando, R., Santos, X., Pleguezuelos, J. M., Ontiveros, D. 2009.** Bioaccumulation of heavy metals in the lizard *Psammmodromus algirus* after a

tailing-dam collapse in Aznalcollar (Southwest Spain). *Arch Environ Contam Toxicol* 56(2):276–285.

**Márquez, M., López, J., Correa, G., Pareja, A. y Giraldo, N. 2003.** Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. *IATREIA*. 16: 275-282.

**Martínez-Pacheco, M. 2008.** Evaluación de los efectos genotóxicos de metales presentes en el agua de bebida de la población de huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 77 pp.

**Marschner, H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, p 889

**Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. A., 2015.** Órganos vegetales “Semilla”. Atlas de histología vegetal y animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

**Mei, Y., Zhou, H., Gao, L., Zuo, Y. M., Wei, K. H., Cui, N. Q. 2020.** Accumulation of Cu, Cd, Pb, Zn and total P from synthetic stormwater in 30 bioretention plants. *Environ Sci Pollut Res* 27(16):19888–19900.

**Mojiri, A., Aziz, H. A., Zahed, M. A., Aziz, S. Q., Selamat, M. R. B. 2013.** Phytoremediation of heavy metals from urban waste leachate by southern cattail (*Typha domingensis*). *Int J Environ Sci* 1(4):63–70

**Murillo, H. A. I. 2015.** Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevis* de los jales de la Sierra de Huautla, Morelos, México provocado por metales pesados. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 66p.

**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 laevis* reveal its potential for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-18.

**Mussali, P. 2001.** ¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? Estudio inicial sobre la inducción de daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de

acción conocidos. De Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 113 p.

- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M. y Rojas, E. 2013.** Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29:117-40.
- Nagaraju, A., y Karimulla, S. 2002.** Accumulation of elements in plants and soils in and around Nellore Mica Belt, Andhra Pradesh, India—a biogeochemical study. *Environmental Geology*, 41(7), 852-860.
- Nasim, S. A., Dhir, B. 2010.** Heavy metals alter the potency of medicinal plants. *Rev Environ Contam Toxicol* 139–149.
- Navarrete, M. H., Carrera, P., de Miguel, M., de la Torre, C. 1997.** A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 389(2–3):271–277.
- Nawab, J., Khan, S., Shah, M. T., Gul, N., Ali, A., Khan, K., & Huang, Q. 2016.** Heavy metal bioaccumulation in native plants in chromite impacted sites: a search for effective remediating plant species. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 44(1), 37-46.
- Nazir, R., Khan, M., Masab, M., Rehman, H. U., Rauf, N. U., Shahab, S., Ameer, N., Sajed, M., Ullah, M., Rafeeq, M., Shaheen, Z. 2015.** Accumulation of heavy metals (Ni, Cu, Cd, Cr, Pb, Zn, Fe) in the soil, water and plants and analysis of physico-chemical parameters of soil and later collected from Tanda Dam Kohat. *J Pharm Sci Res* 7(3):89
- Noriega-Luna, B., Morales-Rodriguez, A. A., Luna-Quintanilla, R., Ulloa-Vazquez, T., Cruz-Jimenez, G., Serafin-Munoz, A. H., Gutierrez-Ortega, N. L. 2016.** Identificación de especies vegetales asociadas a jales del distrito minero de Guanajuato. *Acta Universitaria* 26(2):71–77
- Lei, Y., Korpelainen, H., y Li, C. 2007.** Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere*, 68(4), 686-694.

- Lalehgani, B. y Baradar, A., 2016.** Uptake of Cs and Sr in the Organs of Two Tree Species, *Acacia Salicina* and *Dodoneae Viscose*, and Their Phytoremediation Potential. *Afghanistan Quarterly* Volume 11, Issue 1, pp.169-191.
- Olguin, E. J., Sanchez-Galvan, G. 2012.** Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *N Biotechnol* 30(1):3–8.
- Ostling, O. y Johanson, K. J., 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Panda, S. K., Choudhury, S. 2005.** Chromium stress in plants. *Braz J Plant Physiol* 17:95–102.
- Paniagua, M., 2010.** Variación morfológica de *Cosmos bipinnatus* Cav. (Asteracea) en el Eje Neovolcánico Transversal.
- Paniagua-Ibanez, M., Lopez-Caamal, A., Mussali-Galante, P., Sanchez-Salinas, E., Ortiz-Hernandez, M. L., Ramirez-Rodriguez, R., Tovar-Sanchez, E. 2015.** Morphological variation of *Cosmos bipinnatus* (Asteraceae) and its relation to abiotic variables in central Mexico. *Rev Chil Hist Nat* 88(1):1–13
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A. 2004.** Comparison of mercury, lead, and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* 52(3):199–223.
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., Barcelo, J. 2013.** Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Sci* 212:15–25.
- Pourrout, B., Shahid, M., Douay, F., Dumat, C., Pinelli, E. 2013.** Molecular mechanisms involved in lead uptake, toxicity, and detoxification in higher plants. In: Gupta DK (ed) *Heavy metal stress in plants*. Springer, Heidelberg, Berlin pp 121–147.
- Prasad, A., Kumar, S., Khaliq, A., Pandey, A. 2011.** Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biol Fertil Soils* 47:853–861

- Prieto, F.,** Lechuga, M., Méndez, M., Barrado, E. y Gaytán, J. **2006.** Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26: 94-97.
- Rajamanickam, V.,** Rajasekaran, A., Anandarajagopal, K., Sridharan, D., Selvakumar, K., Rathinaraj, B. S. **2010.** Anti-diarrheal activity of *Dodonaea viscosa* root extracts. *Int J Pharma Bio Sci* 1(4):182–185
- Ramirez, V.,** Baez, A., Lopez, P., Bustillos, R., Villalobos, M. A., Carreno, R., Contreras, J. L., Munoz-Rojas, J., Fuentes, L. E., Martinez, J., Munive, J. A. **2019.** Chromium hyper-tolerant *Bacillus* sp. MH778713 assists phytoremediation of heavy metals by mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Front. Microbiol* 10:1833.
- Ramos, W.,** Galarza, C., de Amat, F., Pichardo, L., Ronceros, G., Juárez, D., Mayhua, A., Anaya, R., Hurtado, J., Chía, H., Guizado, D. y Ortega-Loayza, A. **2006.** Queratosis arsenical en pobladores expuestos a relaves mineros en altura en San Mateo de Huanchor: ¿sinergismo entre arsenicismo y daño actínico crónico?. *Dermatología Peruana*. 16: 41-45.
- Rascio, N.,** Navari-Izzo, F. **2011.** Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci* 180(2):169–181.
- Rengel, M.,** Gil, F., Montano, J. **2011.** Growth and dynamics of nutrient accumulation in sugarcane. I *Macronutrients Bioagro* 23(1):43–50
- Rogstad, S. H.,** Keane, B., Collier, M. H. **2003.** Minisatellite DNA mutation rate in dandelions increases with leaf-tissue concentrations of Cr, Fe, Mn, and Ni. *Environ Toxicol Chem: Int J* 22(9):2093–2099.
- Rojas, E.,** Lopez, M. y Valverde, M. **1999.** Single cell gel electrophoresis assay methodology and applications. *Journal of Chromatography*. 722:225-254.
- Rojas-Loria, C. C.,** Peralta-Perez, M. D. R., Buendia-Gonzalez, L., Volke-Sepulveda, T. L. **2012.** Effect of a saprophytic fungus on the growth and the lead uptake, translocation and immobilization in *Dodonaea viscosa*. *Int J Phytoremediat* 14(5):518–529.
- Romero, F. M.,** Armienta, M. A., Gutiérrez, M. E. y Villaseñor, G. **2008.** Factores

geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*.

- Romero, F y Gutiérrez M. 2010.** Estudio comparativo en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 62: 43-53.
- Romero-Puertas, M. C., Palma, J. M., Gomez, M., Del Rio, L. A., Sandalio, L. M. 2002.** Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environment* 25(5):677–686.
- Rosas-Ramirez, M. E. 2018.** Relacion entre la bioacumulacion de metales pesados y la concentracion de clorofila en *Sanvitalia procumbens*. Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Facultad de Ciencias Biologicas
- Rout, G. R., Sahoo, S. 2015.** Role of iron in plant growth and metabolism. *Rev Agric Sci* 3:1–24
- Rzedowski, G. C. y Rzedowski, J. 2001.** *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a ed. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.
- Rzedowski, J. 2006.** Vegetacion de Mexico. 1ra. Edicion digital, Comision Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Mexico 213:271–293 pp
- Salas-Luevano, M. A., Manzanares-Acuna, E., Letechipia-de Leon, C., Vega-Carrillo, H. R. 2009.** Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian J Exp Biol Sci* 23(1):27–32
- Salas-Luevano, M. A., Mauricio-Castillo, J. A., Gonzalez-Rivera, M. L., Vega-Carrillo, H. R., Salas-Munoz, S. 2017.** Accumulation and phytostabilization of As, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas. *Mexico Environ Earth Sci* 76(23):1–12.
- Salinas-Sanchez, D. O., Zamilpa, A., Perez, S., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., Gonzalez-Cortazar, M., Jimenez-Ferrer, E. 2015.** Effect of hautriwaic acid isolated from *Dodonaea viscosa* in a model of kaolin/ carrageenan-induced monoarthritis. *Planta Med* 81(14):1240–1247.

- Salisbury, F. B., Parke, R. V. 1968.** Las plantas vasculares, forma y función. Herrero Hermanos, Mexico
- Sanchez-Chardi, A., Marques, C. C., Nadal, J., da Luz, M. M. 2007.** Metal bioaccumulation in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, inhabiting an abandoned pyrite mine site. *Chemosphere* 67(1):121–130.
- Sanchez-Pinzon, M. 2010.** Contaminacion por metales pesados en el botadero de basuras de Moravia en Medellin: transferencia a flora y fauna y evaluacion del potencial fitorremediador de especies nativas e introducidas. Bogota, DC: Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Programa de Posgrado Departamento de Quimica Gibuj. Colombia
- Santoyo-Martinez, M., Mussali-Galante, P., Hernandez-Plata, I., Valencia-Cuevas, L., Flores-Morales, A., Ortiz-Hernandez, L., Flores-Trujillo, K., Ramos-Quintana, F., Tovar-Sanchez, E. 2020.** Heavy metal bioaccumulation and morphological changes in *Vachellia campechiana* (Fabaceae) reveal its potential for phytoextraction of Cr, Cu, and Pb in mine tailings. *Environ Sci Pollut Res* 27(10):11260–11276.
- Santoyo, M. M., Mussali, G. P., Tovar, S. E. y Ortíz, H. L., 2015.** Bioacumulación y daño genotóxico de *Acacia farnesiana* en los jales de Huautla, Morelos. En *Memorias del V Congreso Mexicano de Ecología. Fronteras de la ecología en un mundo globalizado*. SLP, México, pp. 514.
- Salisbury, E. J. 1928.** I. On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 216(431-439), 1-65.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. 2005.** Chromium toxicity in plants. *Environ Int* 31(5):739–753.
- Sharma, D. C., Sharma, C. P., Tripathi, R. D. 2003.** Phytotoxic lesions o chromium in maize. *Chemosphere* 51(1):63–68.
- Sher, Z., Hussain, F., Saleem, M. 2012.** “Macro-mineral status at three phenological stages of some range shrubs of Gadoon hills, district Swabi, Khyber Pukhtunkhwa. *Pakistan Pak J Bot* 44(2):711–716

- Shiqi, L., Yang, B., Kou, Y., Zeng, J., Wang, R., Xiao, Y., Li, F., Lu, Y., Mu, Y., Zhao, C. 2018.** Assessing the difference of tolerance and phytoremediation potential in mercury contaminated soil of a nonfood energy crop, *Helianthus tuberosus* L. (Jerusalem artichoke). *Peer J* 6:1–18.
- Sinha, S., Gupta, M., Chandra, P. 1997.** Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicol Environ Saf* 38(3):286–291
- Sobral-Souza, C. E., Leite, N. F., Cunha, F. A. B., Pinho, A. I., Costa, J. G. M., & Coutinho, H. D. M. 2014.** Evaluación de la actividad citoprotectora y antioxidante de los extractos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium soblealeum* Proença & Landrum contra metales pesados. *Revista Ciencias De La Salud*, 12(3), 401-409. <https://doi.org/10.12804/revsalud12.03.2014.08>
- Soto, C., Gutierrez, S., Rey, A., Gonzalez, E. 2010.** Biotransformacion de metales pesados presentes en lodos ribereños de los rios Bogota y Tunjuelo. *NOVA* 8:195–205
- StatSoft, 2000.** Correspondence analysis. Tulsa, StatSoft Inc 2000.
- Stohs, S. J., Bagchi, D. 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18(2):321–336.
- Tapia, A. y Araya, M. 2006.** Estrés oxidativo, prooxidantes y enfermedad de Crohn. *Revista Médica de Chile*. 134: 95-100.
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas, E., Ryu, J. y Sasaki, Y. 2000.** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.
- Tovar-Sánchez, E., Cervantes, T., Martinez, C., Rojas E., Valverde, M., Ortiz, L. y Mussali-Galante, P., 2012.** Comparison of two will rodent species as sentinels, of environmental contamination gradients by mine tailings. *Environmental Science Pollution Research*. 19: 1677-1686.
- Tovar-Sanchez, E., Cervantes-Ramirez, T., Castaneda-Bautista, J., Gomez-Arroyo, S., Ortiz-Hernandez, L., Sanchez-Salinas, E., Mussali-Galante, P. 2018.**



Response of Zea mays to multimetal contaminated soils: a multibiomarker approach. *Ecotoxicology* 27

- Tovar-Sanchez, E.**, Mussali Galante, P., Martinez-Pacheco, M., Ortiz Hernandez, M. L., Sanchez-Salinas, E., Olvera-Verona, A. **2016**. Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in an arsenic contaminated area in Morelos, Mexico. *Rev Int Contam Ambie* 32:101–117
- Tovar-Sanchez, E.**, Suarez-Rodriguez, R., Ramirez-Trujillo, A., Valencia-Cuevas, L., Hernandez-Plata, I., Mussali-Galante, P. **2019**. The use of biosensors for biomonitoring environmental metal pollution, In: Rinken T, Kivira K (ed) *Biosensors for Environmental Monitoring*. IntechOpen, London, UK. Pp
- Valverde, M.**, Ostrosky-Wegman, P., Rojas, M., Fortoul, T., Meneses, F., Ramírez, M., Díaz-Barriga, F. y Cebrian, M. **1999**. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Pública de México*. 41:109-113.
- Velasco, J.**, Rosa D., Solórzano G. y Volke T. **2004**. Primer informe del proyecto: evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Dirección General del Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. Instituto Nacional de Ecología-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 24-37 p.
- Velasco, T. J. A.**, de la Rosa, P. D. A., Ramirez, I. M. E., Volke, S. T. **2005**. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Mexico pp 1–36
- Vidali, M.** **2001**. Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- Vindas, R.**, Ortiz, F., Ramírez, V. y Cuenca, P. **2004**. Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 52: 601-609.
- Villasenor, J. L.**, Espinosa, J. F. **1998**. Catalogo de malezas de Mexico. Universidad Autonoma de Mexico, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y

- Fondo de Cultura Económica. México Wu F, Zhang G, Dominy P (2003) Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ Exp Bot* 50(1):67–78.
- Villaseñor**, R. J. L. y Espinosa, G. F. J. **1998**. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Volke** S. T. y Velasco T. J. A. **2002**. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. SEMARNAT-INE, México D.F. 21 pp.
- Volke** S. T. L., Velasco T. J. A., De la Rosa P. D. A. y Solórzano O. G. **2004**. *Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*. SEMARNAT-INE. Dirección de Investigación en residuos y proyectos regionales. Primer informe. México. 44 pp.
- Yadav**, S. K. **2010**. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot* 76(2):167–179
- Yoon**, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L. Q. **2006**. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ* 368:456–464.
- Zafari**, S., Sharifi, M., Chashmi, N. A., Mur, L. A. **2016**. Modulation of Pb-induced stress in *Prosopis* shoots through an interconnected network of signaling molecules, phenolic compounds and amino acids. *Plant physiology and biochemistry*, 99, 11-20.
- Zar**, J. **2010**. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New-Jersey
- Zhang**, M. K., Liu, Z. Y. y Wang, H. **2010**. Use of single extraction methods to predict Bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41(7), 820-831.
- Zhou**, Q. X. y Song, Y. F. **2004**. *Principles and methods of contaminated soil remediation*: Science Press, Beijing p.568.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 05 de diciembre del 2022.

## VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **“Estudio ecotoxicológico de *Dodonaea viscosa* en jales de Huautla Morelos: marcadores morfológicos, genéticos, químicos y de bioacumulación”**, que presenta el **C. Joel Daniel Castañeda Espinoza**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección del DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ y codirección del DR. DAVID OSVALDO SALINAS SÁNCHEZ, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

### Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

Dr. Efraín Tovar Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (codirector de tesis, CIByC UAEM)

Dra. Patricia Mussali Galante (CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. María Luisa Castrejón Godínez (FCB UAEM)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2022-12-08 15:38:14 | Firmante**

sk56u9kNVhl/yv2HjPZYtQoBS7nml1ffSTyYY+g9CZ3bnNQMYb9ofasTdB06qMvF75pspvqaLqaSRahe8yTkP7RjF5Miex9W4AW2c/2JpYjbi/JldQE+pX1j6swYdq4QERxsFRboV8vMz5vJs46F4Qzh+N/WvtDsQanBhl44SvKytuLd/RSFR1sAqKpD1YtAsafn47zZr.JBk9wffsXtiGAeTeVyc81sY9eSEbtdq9KyMjKJ627+YCCQFpDN9HBkZmsgXQRO/f+wZBzmevdy aL.FisMuEOWVHF5YZ9YlmqfFMSFbrCQfx6tNt1WgoE+2n042wK9L1SYwi8PbxuOl2Q==

**DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ | Fecha:2022-12-08 21:48:06 | Firmante**

jjYztOTm51qj1hlocJCrQUZDxjwOzYhY+Sumz4OwdPQ0Kw6ZAbjllKMPRRJxB5gmyKMPUNT1ffzTKBNmhY0xEesGH9OVPWTu78kC7HDZSOYHETCZ1AqOlq27fsjUuZpU3hhzXqRmCPM4eH56ilmCBVSOUB3yBgKcJmAixcX7v6pE5xknTwIMEIEgy9Ilyk9clyDPx8EnVZRGMDNy6b6WmgPSax3jwRtGSraj6Emp2yCRPHSiteZod6VrNRqS6fviMuwpXez2nDxzNPHOnquS21eATrqbD5sFes4AAZr5+bf+4enmE7+W6cjb7XNE4JH9cDm3HiKHCf5yGMdBQ==

**MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-12-08 23:43:14 | Firmante**

RcYc2AeccE5OK64o4NzDywQZzCYSHGgg0cPDql2YduxxPH0x4PjnMjzxcRtH3VWVWILM5m/lqeOCBwo4qWV7QRGfK0loMl9tiTcoQjUV9Zn4U9d+hsTWsJnTgJxYWF2hBti4SnuS/y2XsBL1s49/+ZBGLRg1AMTS5aqBlQoBvc1zbm7rY3vOJMB3dzG9AxwF1yPRul4G6wWz7tB9GFDQ9lpgYlDicAPXY/JIUWhcKW6D3x4eroda7EMz5aCHVW4LbbPwxWWXy39v8nxzEzEYXPXZ/9DI04IEUEuVlPnzFhtKXFHV2GGdBghr08r3aYQVNWgZuGBelPu7uLtAngg==

**MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2022-12-09 10:02:40 | Firmante**

ESikQL07bgFAZdbODk00+IJC+1PS7zHODOIM9XHHya9mpBqFpNvX1Ypj9GYmjF4HgRepMXnF2sLM+RHIMHY9nfb1qIN+g6D1vYE8Ox8kXu9/YCMwj7gRDEKAmA2cjin+lbXyeUlwydHmBjluUICiWw8scNaW6J9DUeWU+jjGSbV29dcE44XeU5P9jak7W2t8nAkrgjFpFNtdLbo5BTHeV2cTnLMokUvk9UjluwYUdHgbmO66CfrOnEKmRchj1/uF9nh6MCMeogdDForQ7.Jah8UryWwzD1IXGOlqNtnLiQQt3r40sHCXUkHKNPP9HrzURVd/mvkBUFW0YLV9dlKw==

**EFRAIN TOVAR SANCHEZ | Fecha:2022-12-12 09:36:23 | Firmante**

ivQvrFTesxafSdlgXjp8wObNcmHnkQ/shSFT13a3oGIBfZ8D5cALAKMi0vbUnA9PMNm9nA0u19IrO/mByxMyFb+bZWYC+/jIGYfbqNCEt7x0ISIIVQtr3XZrkrZSNvixty7TCD7qZtOj09AR2P+ZVY0LxiA6MykyRi5MZAvjoA35DyDfllmXVCS0wovOrrOEXxQZi9Gmlyd2UOk7o4Uu7ZzxoCLYFMCa2amlD3qdF3kZPWawwhLjBfCR73+3PAeoPDo+kLLyJizeb3YpHiAtA2rEzxs3jKZnp1XPvnSDeK4r4urgP5yepVv03+7c3cYmNLDUQUx9F9goB4h+wgg==

**PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha:2022-12-12 11:51:13 | Firmante**

C3cSVt0ZEQQc2XlJhNNNT9Fv2VaHO3hh9XyydRk5BKSG0DOUw76KD/Vl8kIE4af0739UnPWpIxRyRgCcXrT+IPEd0ghpD3ZyFULyqw/3EijrE7Ez1iNEcn7RrRELbRluBsQHd42ZY3jlaRv7bTwwQ7vUISLkmeV3dP4JGbusC3hBMFCsv85RyKiWwFWh/4FSOKwTtsUqwbEtzsqaeviTOKcpZCtJx3QRHN3Fm+UCDntGvx6F1a1fHh30xxb6xCGjsq6XL0PQZ40n8bUZ8tllciUeTvZe+DmytCh1h/Pb2ioXbdKZXR0D7mAEKen9AH+t1qjG7VcUcNvFCLTN7b0A==

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-12-12 12:00:33 | Firmante**

hWBz2O0NHI31/r974X4lbnZzz9/qBlQK1a/Hssf+3mBMLHmQLGkEzfsrXYIHggfMp94IXaTYgu+AOaWYHel8X853gk27/nFsHT/0YDvjxhd0BHXYCqWZuIKFRVY+xOdcYIGXAUFWqfGJdKtWtJ39CgrHz6cjoPbBB8UETS3MHn5Nnlyi7/6JKrboB4sXnjnDhNMCDdnhqe7EUTNgRgGTg6rEATS+C8CxbwHkNQAJ0U/32KIFbQXxvp2BBi+5kCuy+daPneLPeZ1Z/purQisNi/hGs2JdghU2RfblKBjY498zVlKuzio4TikocpTrkebOb8JmsJxyiOTJfqq==

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



RPsmHD6Tt

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nIULRWE99qCtmRvcLDWrklbANmr1R7>

