

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



Expresión de genes relacionados a estrés por plomo en *Pinus cembroides* inoculado con hongos endófitos

Por: Fátima Elizabeth de la Cruz Flores

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

Diciembre, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Expresión de genes relacionados a estrés por plomo en *Pinus*
cembroides inoculado con hongos endófitos

TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA


Por:

FATIMA ELIZABETH DE LA CRUZ FLORES


Aprobada por el Comité de Asesoría:




Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor Principal Interno



Dra. Rebeca Casique Valdés
Asesora Principal Externa



Dra. Susana González Morales
Coasesor



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Coasesor

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Expresión de genes relacionados a estrés por plomo en *Pinus cembroides*
inoculado con hongos endófitos

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Por:

FATIMA ELIZABETH DE LA CRUZ FLORES

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el
título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Presidente

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Vocal

Dra. Rebeca Casique Valdés

Vocal

Dra. Susana González Morales

Vocal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Derechos de Autor y Declaración de No Plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor Principal



Fatima Elizabeth de la Cruz Flores

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a **DIOS** por su presencia en mi vida y el amor que ha representado en cada faceta, sosteniendo mis sendas y decisiones. Especialmente por darme fuerza y sabiduría para cada etapa difícil e insostenible, trayendo paz y personas a mi vida que confirman su amor.

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, por haberme permitido tener una educación de calidad, brindándome la capacidad de obtener conocimientos para contribuir en la ciencia y el desarrollo del país.

A mi madre **Elsa Elizabeth Flores** quien nunca dudó de mi capacidad y me ha alentado durante mi vida a perseguir mis sueños, por su amor y entusiasmo que me impulsaron a continuar en la vida.

A mi hermana **Leonela**, por ser un apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por alentarme cuando más lo necesitaba y estar presente en cada logro y dificultades.

A mis tíos **María de Jesús y Mario García** quienes fueron un gran apoyo en la culminación de mis estudios, ayudándome a no desistir en mis sueños y metas.

A **Nicolas Greiner** por el apoyo que me brindó, manteniéndome en sus oraciones y sus palabras llenas de sabiduría, amor y compasión. Además de proyectarme la bondad de Dios en todo momento.

A la **Dra. Rebeca Casique** quien fue mi asesora en este proyecto, por darme la oportunidad de trabajar con ella, brindándome su total apoyo, comprensión y siendo siempre una persona cálida, mi mayor admiración para ella.

A la **Dra. Susana González Morales**, permitiéndome ser parte de este trabajo y siempre tener la disposición para resolver mis dudas y ayudarme cuando era necesario.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación es dedicado únicamente a **DIOS** quien me ha sostenido en cada momento de mi vida y la culminación de este proyecto es prueba de su fidelidad en mí. Manteniéndome enfocada a través de su amor y posicionándome en lugares donde nunca imaginé.

Confiada estoy en que su amor es infinito y me permitirá ir más allá de mi propio entendimiento.

Fíate de Jehová de todo tu corazón, y no te apoyes en tu propia prudencia. Reconócelo en todos tus caminos, y él enderezará tus veredas.

Proverbios 3: 5-6 (RVR1960)

TABLA DE CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. OBJETIVO GENERAL	5
IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	5
V. HIPOTESIS	5
VI. MARCO TEORICO	6
6.1 <i>Pinus cembroides</i>	6
6.2 Contaminación con metales pesados en plantaciones forestales	6
6.3 Estrés por plomo	7
6.4 Genes que se han estudiado para estudiar el estrés por plomo o metales pesados .	8
6.5 Hongos endófitos	9
6.6 Uso de los hongos endófitos para mejorar el rendimiento de los cultivos	11
6.7 Uso de los hongos endófitos para mitigar estrés por metales pesados	11
VII.MATERIALES Y MÉTODOS	13
7.1 Prueba de crecimiento <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ con microorganismos endófitos	13
7.2 Obtención de la plántula	14
7.3 Obtención del inóculo	15
7.4 Evaluación de la actividad enzimática	17
7.4.1 Proteínas totales	17
7.4.2 Prueba de catalasa	18
7.4.3 Glutation peroxidasa	19
7.4.4 Contenido de fenoles totales	20
7.5 Extracción de ARN.....	21
7.5.1 Purificación de ARN.....	22
7.5.2 Cuantificación y calidad de ARN	22
7.5.3 Calidad del ARN; Electroforesis horizontal de agarosa al 1%	22
7.5.4 Obtención de ADN complementario	23
7.5.5 PCR en tiempo real	23
VIII. RESULTADOS	26
8.1 Prueba de crecimiento radial <i>in vitro</i>	26

8.2 Perfil enzimático foliar	30
8.3 Perfil enzimático raíz	34
8.4 Expresión génica en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> tanto en follaje como raíz inoculadas con hongos endófitos e irrigadas con solución de Pb(NO₃)₂ al 0.1%.....	38
IX. DISCUSIÓN	39
X. CONCLUSIÓN.....	43
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos y agentes contaminantes estudiadas en plantas de variedad de especies e inoculadas con cepas fúngicas endófitas	12
Tabla 2. Tratamientos evaluados en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> en invernadero....	16
Tabla 3. Genes de pino reportados para evaluar la expresión por estrés sometido a salinidad / toxicidad por metales pesados	25
Tabla 4. Crecimiento radial de endófitos a diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$	27
Tabla 5. Cambio de expresión genica $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ en plántulas de <i>Pino cembroides</i> (follaje) inoculadas con hongos endófitos e irrigadas con solución de $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%	38
Tabla 6. Cambio de expresión génica $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ en plántulas de <i>Pino cembroides</i> (raíz) inoculadas con hongos endófitos e irrigadas con solución de $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación planta-endófito entre entornos de estrés biótico y abiótico (Lu et al., 2021)	10
Figura 2. Establecimiento de cultivo in vitro de hongos endófitos con diferentes concentraciones de nitrato de plomo.	13
Figura 3. Desinfección y siembra de la semilla de <i>Pinus cembroides</i> en invernadero .	14
Figura 4. Inoculación de hongos endófitos en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> inducidas al estrés por plomo	15
Figura 5. Irrigación de Pb(NO ₃) ₂ al 0.1 % en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> establecidas en invernadero	16
Figura 6. Curva de calibración para determinar proteínas.....	18
Figura 7. Curva de calibración para determinar catalasa	19
Figura 8. Curva de calibración para determinar glutatión peroxidasa.....	20
Figura 9. Curva de calibración para determinar fenoles totales.....	21
Figura 10. Prueba de expresión de genes en equipo StepOne™ de Applied Biosystems	24
Figura 11. Prueba de crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>Phialophora livistonae</i> a diferentes concentraciones de Pb(NO ₃) ₂	27
Figura 12. Prueba de crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>Cadophora</i> sp. a diferentes concentraciones de Pb(NO ₃) ₂	28
Figura 13. Prueba de crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>Nectriella pironii</i> a diferentes concentraciones de Pb(NO ₃) ₂	28
Figura 14. Prueba de crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>Sordaria hansenii</i> a diferentes concentraciones de Pb(NO ₃) ₂	29
Figura 15. Prueba de crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>Endoradiciella communi</i> a diferentes concentraciones de Pb(NO ₃) ₂	29
Figura 16. Comparación del contenido de proteínas en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.	30
Figura 17. Comparación del contenido de fenoles en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.	31
Figura 18. Comparación enzimática de la actividad catalasa en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.	32
Figura 19. Comparación de la actividad enzimática glutatión peroxidasa en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.	33
Figura 20. Comparación del contenido de proteínas en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.	34
Figura 21. Comparación del contenido de fenoles en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.....	35

Figura 22. Comparación enzimática de la actividad de catalasa en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.	36
Figura 23. Comparación de la actividad enzimática glutatión peroxidasa en plántulas de <i>Pinus cembroides</i> (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.	37

I. RESUMEN

La contaminación por metales pesados desencadena una serie de problemas que afectan al medio ambiente y las cadenas tróficas. La contaminación de suelos y ecosistemas forestales con metales pesados como el plomo (Pb), derivado de actividades antropogénicas como distritos de fundición y minería, genera en las plantas estrés oxidativo, provocando daño celular. El Pb es uno de los metales pesados más comunes en los suelos, se ha encontrado que genera un impacto negativo en las plantas y ocasiona pérdida de material genético e inhibe sus procesos fisiológicos. Por otra parte, algunos hongos endófitos han contribuido a la remediación de suelos contaminados por metales pesados. Sin embargo, estudios de contaminación por plomo en plantas del sector forestal, ha sido poco estudiado. En el presente estudio se ha enfatizado las respuestas a nivel molecular y bioquímico en plantas de pino piñonero (*Pinus cembroides*) inducidas al estrés por Pb e inoculadas con cepas endófitas. Para ello, se evaluaron los hongos endófitos *Cadophora* sp., *Endoradiciella communis*, *Nectriella pironii*, *Phialophora livistonae* y *Sordaria hansenii* aislados de pino piñonero a diferentes concentraciones de plomo *in vitro*. Así mismo, se evaluó el efecto de *Endoradiciella communis* y *Phialophora livistonae* en plántulas de pino piñonero irrigadas con nitrato de plomo como estrés inducido. Se evaluó la actividad enzimática y la expresión de cuatro genes: gen transportador de metales NRAMP, gen que codifica para enzima peroxidasa, gen de proteínas abundantes en la embriogénesis (LEA) y gen de la trehalosa-fosfato fosfatasa, asociado al metabolismo de la trehalosa. Se encontró que la cepa *Endoradiciella communis* y *Phialophora livistonae* presentaron mejor crecimiento en altas concentraciones de nitrato de plomo, aumentaron el contenido de fenoles en plántulas y promovieron la actividad de catalasa y glutatión peroxidasa. Se encontró una sobreexpresión de los genes de las proteínas LEA y transportador de metales al inocularse con *Phialophora livistonae* con y sin presencia de plomo, el hongo *Endoradiciella communis* sobreexpresó el gen de la trehalosa al irrigarse con plomo y ambos hongos sobreexpresaron el gen que codifica la enzima peroxidasa. En este trabajo

se demuestra que los hongos endófitos toleran altas concentraciones de plomo y modifican el metabolismo de la planta para la tolerancia al estrés por plomo.

II. INTRODUCCIÓN

México se considera el país con mayor diversidad de especies del género *Pinus*, al contar con 42% de las especies que existen en el mundo. Una de las especies ampliamente distribuidas es *Pinus cembroides* Zucc., calificado como el pino piñonero de mayor importancia económica en el país (Fuentes et al 2019). Los bosques de esta especie desempeñan una función importante en el ecosistema y en el ciclo hidrológico al evitar la erosión, favorecer la infiltración del agua y restablecer los mantos acuíferos subterráneos. Al mismo tiempo, es hábitat natural de la fauna silvestre, dado que el 90% del volumen de su semilla producida, constituye el alimento básico de muchas aves y mamíferos. La importancia maderera de *Pinus cembroides* es mínima, pero el piñón (semilla comestible) es de alto valor económico, al constituir 90% de la cosecha de piñones en la República Mexicana (Constata et al., 2009). Las investigaciones en sistemas terrestres han identificado los bosques como grandes sumideros de plomo (Pb) atmosférico, por lo que los organismos que habitan en el ecosistema forestal suelen estar expuestos a altas concentraciones de Pb (Zhou et al., 2019). La contaminación de suelos y ecosistemas forestales con metales es de gran importancia en áreas severamente contaminadas (como distritos de fundición y alrededores de grandes ciudades). Los metales de origen antropogénico están predominantemente ligados a la materia orgánica del suelo, sedimentos y a los oxihidróxidos de Fe, Mn y Al (Komárek et al 2007). Cuando las plantas están expuestas a metales pesados, sufren estrés oxidativo, lo que provoca daño celular. Los endófitos fúngicos han atraído un amplio interés en los últimos años debido a sus metabolitos secundarios distintivos con propiedades bioactivas que les ayudan a mantener su relación mutualista con los huéspedes y a aumentar la tolerancia a diversos problemas bióticos y abióticos (EL- khawaga et al., 2024). Los endófitos pueden mejorar el potencial de fitorremediación de las plantas ayudando en la absorción de nutrientes, produciendo fitohormonas y alterando las vías metabólicas de la planta para mejorar la tolerancia a los metales pesados. Algunos estudios han demostrado que los endófitos pueden reducir la fitotoxicidad del Pb promoviendo la actividad enzimática antioxidante, mejorando el secuestro de metales y mejorando la biomasa general de la planta en condiciones contaminadas (Manikandan et al., 2025).

Se ha descubierto que, en un ambiente contaminado con Pb, la planta desarrolla un mecanismo de defensa (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) para superar el estrés inducido por la toxicidad del metal, esto implica una red de enzimas, orgánulos y vías de señalización que se unen para reducir el daño causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gupta et al., 2024). Dado la grave problemática que representa la contaminación por metales pesados y su impacto en el área agrícola y forestal, así como las diversas alteraciones en los ecosistemas, en el presente estudio se realizó un esfuerzo por elucidar el efecto de los hongos endófitos en plántulas de pino piñonero estresadas por plomo.

III. OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta transcripcional de genes antioxidantes por exposición al plomo en *Pinus cembroides* inoculado con hongos endófitos.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Cultivar hongos endófitos en medio con diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ (0.001%, 0.002%, 0.02%, 0.05% y 0.1%) y determinar el diámetro de colonia de los hongos.

-Establecer un régimen de $Pb(NO_3)_2$ en el cultivo de *P. cembroides* en invernadero e inocularlo con hongos endófitos e identificar fenoles totales y la actividad de enzimas en pino relacionados a la tolerancia al estrés por plomo.

-Establecer un régimen de $Pb(NO_3)_2$ en el cultivo de *P. cembroides* en invernadero e inocularlo con hongos endófitos y analizar la expresión de genes en pino relacionados a la tolerancia al estrés por plomo.

V. HIPOTESIS

Las especies de hongos endófitos usados en la inoculación de *Pinus cembroides* sometido a riego con plomo, generarán mayor respuesta transcripcional de genes, acumulación de fenoles y mayor actividad enzimática respecto al testigo.

VI. MARCO TEORICO

6.1 *Pinus cembroides*

El pino piñonero (*Pinus cembroides*) es una especie originaria de México, distribuida en 19 estados con mayor incidencia como Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Aguascalientes, Querétaro, Hidalgo, Zacatecas y Guanajuato. Crece en lugares con precipitación de 350 a 700 mm y laderas montañosas, lomeríos, cerros con pendientes secas y rocosas, así como la preferencia de climas secos y semicálidos. Es una especie tolerante a la sequía, resiste hasta ocho meses sin lluvia, crece en suelos pobres, pero bien drenados, pedregosos, calizos y calcáreos y soporta suelos con pH ácido o básico (Zárate et Al., 2021).

Los bosques de *P. cembroides* controlan la erosión del suelo, sobre todo en las zonas de mayor pendiente, favorecen la infiltración del agua ayudando a reestablecer los mantos acuíferos subterráneos; además, proporcionan la cobertura necesaria para diferentes especies de fauna silvestre, así como semillas y brotes tiernos que utilizan como alimento diferentes especies de aves y mamíferos (Zavaleta et al., 2012). En algunas localidades se utiliza la madera de *P. cembroides* como combustible y postes de cercas, sin embargo, ésta tiene un valor comercial bajo. La resina del árbol es extraída para utilizarla como materia prima en impermeabilizantes y como pegamento para ollas y canastas. Las personas que viven en las cercanías de bosques de *P. cembroides* llevan al ganado para que se alimente de los brotes de las ramas o de las plántulas. Las semillas son aprovechadas por las personas, debido a su alto valor nutricional, el cual comprende cerca del 19% de proteína, 60% de grasa y 14% de carbohidratos. La recolección y venta de las semillas es la actividad que genera más ganancias económicas a las personas que aprovechan este recurso (Díaz Cruz, 2016).

6.2 Contaminación con metales pesados en plantaciones forestales

Las actividades geológicas naturales, como desgastes de cerros y volcanes, constituyen una fuente de aportaciones importante de metales pesados al suelo. También las actividades antropogénicas como la industria minera, la cual está catalogada como

una de las actividades industriales más generadora de metales pesados. Los metales emitidos en estos procesos se acumulan en el suelo y otros compartimientos ambientales, incluso mucho después de que se hayan finalizado ciertas actividades. Entre los distintos metales pesados, el arsénico (As), el plomo (Pb), el cadmio (Cd) y el mercurio (Hg), se encuentran dentro de la lista del registro de sustancias tóxicas de la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (US EPA) (ATSDR 2022). En el suelo, pueden estar presentes como iones libres o disponibles, compuestos de sales metálicas solubles o bien, compuestos insolubles o parcialmente solubilizables como óxidos, carbonatos e hidróxidos (Prieto et al., 2009). La movilidad relativa de los elementos traza en suelos, es de suma importancia en cuanto a su disponibilidad y su potencial para lixiviarse de los perfiles del suelo hacia las aguas subterráneas y difiere de si su origen es natural o antrópico y, dentro de este último, al tipo de fuente antrópica (Burt et al., 2003).

Los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: la primera, quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo u ocupando sitios de intercambio; la segunda, específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo; la tercera, asociados con la materia orgánica del suelo y la cuarta, precipitados como sólidos puros o mixtos. Por otra parte, pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas; pueden pasar a la atmósfera por volatilización y pueden ser movilizados a las aguas superficiales o subterráneas. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (López, 2023).

6.3 Estrés por plomo

Todas las plantas absorben metales del suelo donde se encuentran, sin embargo, depende de la especie vegetal, de las características y contenido de metales del suelo. Las plantas pueden adoptar distintas estrategias frente a la presencia de metales en su entorno; unas basan su resistencia a los metales con la estrategia de una eficiente exclusión del metal, restringiendo su transporte a la parte aérea, otras, acumulan el metal

en la parte aérea en una forma no tóxica para la planta. La exclusión es más característica de especies sensibles y tolerantes a los metales, y la acumulación es más común de especies que aparecen siempre en suelos contaminados (Prieto et al., 2009). El Pb es uno de los contaminantes de metales pesados más comunes en los suelos, además este metal no tiene ningún propósito biológico en las plantas, aunque puede crear problemas morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. La distribución del Pb en el suelo se debe a combinaciones de factores que incluyen procesos químicos como reacciones de oxidación y reducción, adsorción de cationes en el complejo de intercambio, quelación por materia orgánica, óxidos metálicos y ciclado por la vegetación. Debido a su fuerte unión con materiales orgánicos y coloidales, el Pb en el suelo es soluble y, por lo tanto, está disponible para la absorción de las plantas. El pH del suelo juega un papel importante en la retención de Pb por los suelos. Un estudio dice que las plantas que crecen en el suelo absorben más Pb de suelos ácidos que alcalinos (Collin et al., 2022).

Según lo reportado por varios autores, el Pb puede causar diversos daños en las plantas y en diferentes grados de acumulación. En algunas especies, la acumulación de Pb, a medida que se aumenta las dosis en el suelo hasta niveles menores a 1000 mg de Pb kg⁻¹ de suelo, tiende a incrementarse rápidamente en los órganos de la planta que éstas no lo toleran y mueren. Los mecanismos de fitotoxicidad de Pb están relacionados con la permeabilidad de la membrana celular, reacciones de grupos sulfhidrilos (-SH) con cationes y afinidad para reaccionar con grupos fosfatos (Prieto et al., 2009).

6.4 Genes que se han estudiado para estudiar el estrés por plomo o metales pesados

Se han reportado estudios a nivel bioquímico y molecular de enzimas del estrés oxidativo en plantas de tomate como cultivo modelo, con la búsqueda de expresión de genes que codifican para superóxido dismutasa (SOD), isoflavona reductasa (IFR) y proteína tumoral controlada transcripcionalmente (TCTP). Se analizaron los genes IFR, TCTP y SOD para comprender mejor la respuesta de defensa de la planta contra el estrés oxidativo, y se encontró que TCTP parece tener una función protectora frente a estrés fitotóxico por la presencia de metales pesados, lo que puede explicar la alta expresión de

este gen bajo estrés por Pb en ambas partes de la planta de tomate (Pérez-Álvarez et al., 2021).

Se ha demostrado que la expresión del gen LEA es inducida por la deshidratación, baja temperatura, salinidad y exposición al ácido abscísico (ABA). Sin embargo, no se ha dilucidado la expresión del gen LEA en respuesta al estrés por metales pesados. En un estudio se investigó la expresión de un gen LEA (TaLEA1) de *T. androssowii* en respuesta al estrés por NaCl, ZnCl₂, CuSO₄ y CdCl₂. Para comprender las respuestas fisiológicas mediadas por LEA en las plantas durante el estrés por CdCl₂, se introdujo TaLEA1 en plantas de álamo mediante un método mediado por *Agrobacterium*. Se compararon los parámetros fisiológicos relacionados con el estrés entre las plantas transgénicas y las de tipo silvestre, demostrando que la inducción de TaLEA1 en hojas fue mucho mayor que en raíces bajo todos los estreses evaluados, incluidos los inducidos por ZnCl₂, CuSO₄, NaCl y CdCl₂; este hallazgo implica que la actividad de resistencia al estrés del gen TaLEA1 se observa principalmente en las hojas en lugar de las raíces (Gao et al. 2007).

Recientemente se estudió el papel de *Cenococcum geophilum* (CG) y *Suillus luteus* (SL) en la regulación de la tolerancia a la toxicidad por Cd en retoños de sauce (*Salix psammophila*), se identificaron distintos genes, entre ellos, los genes que codifican proteínas del ácido indolacético (IAA) que se regulan positivamente de forma significativa en árboles jóvenes colonizados con hongos en comparación con retoños de sauce sin inoculación con adición de Cd. Además, en la vía de biosíntesis y señalización de ABA, los genes se regularon positivamente bajo la inoculación con *C. geophilum* y la presencia de cadmio (Wang et al., 2025).

6.5 Hongos endófitos

Según Lu et Al., (2021), las plantas están habitadas internamente por una multitud de hongos que pueden trascender la barrera de las endodermis, liberarse del ataque de las señales inmunes de la planta, cruzar desde la corteza de la raíz hasta el sistema vascular y, posteriormente, prosperar como endófitos en los órganos de la planta. Los endófitos contribuyen a la movilización de nutrientes desde la materia orgánica compleja,

hasta la planta hospedante promoviendo así, el crecimiento de las plantas. Además, las redes complejas de hifas conectan los sistemas de raíces de plantas individuales regulando el flujo de nutrientes, la interacción competitiva entre y dentro de las especies de plantas, influyendo en aspectos ecológicos y coexistencia de la comunidad vegetal. Como organismos sésiles, las plantas siempre están bajo presión y desafíos constantes (Tariq et al., 2025), el hospedaje de endófitos en plantas es vital para la salud de las plantas en su entorno natural de modo que puedan hacer frente a muchos factores estresantes a lo largo de su vida.

Los hongos endófitos son promotores del crecimiento vegetal, ya que desempeñan un papel importante en el alivio del estrés abiótico en las plantas mejorando la tolerancia del huésped a ambientes adversos, como sequía, alta salinidad, frío, calor y estrés por metales pesados (Figura 1).

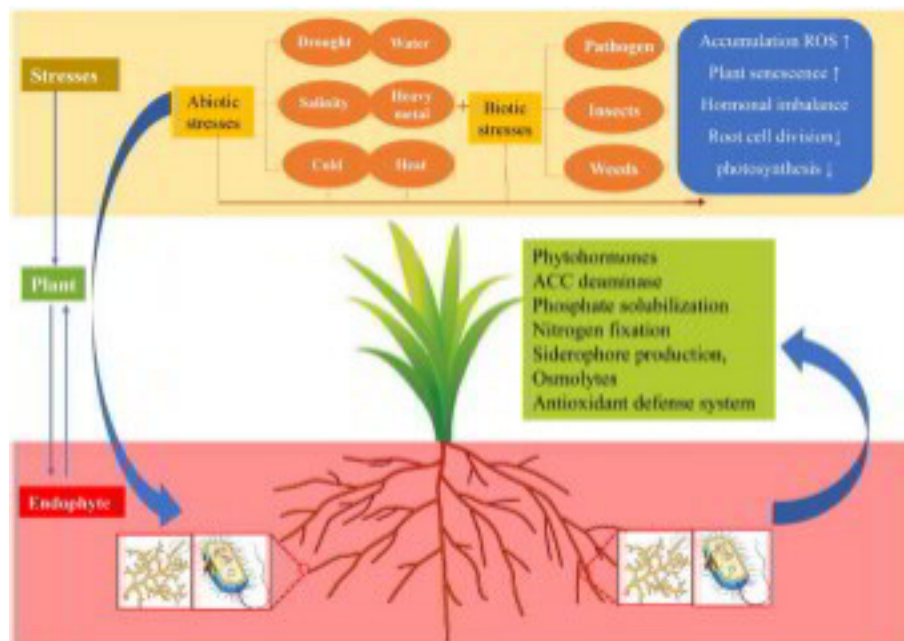


Figura 1. Relación planta-endófito entre entornos de estrés biótico y abiótico (Lu et al., 2021).

6.6 Uso de los hongos endófitos para mejorar el rendimiento de los cultivos

La toxicidad por metales pesados puede resultar en la pérdida del 25 al 80% de varios cultivos agrícolas ya que las raíces de las plantas son vulnerables al efecto tóxico del metal pesado, lo que lleva a un crecimiento radicular deficiente. La creciente demanda mundial de alimentos, impulsada por una población humana en constante expansión, requiere estrategias para mejorar la productividad agrícola y mitigar la pérdida de rendimiento de los cultivos causada por diversos factores de estrés (bióticos y abióticos). El estrés biótico es causado por fitopatógenos, plagas y nematodos, junto con el estrés abiótico como la sal, el calor, la sequía y los metales pesados, que plantean graves riesgos para la seguridad alimentaria y la productividad agrícola. Actualmente, los métodos tradicionales basados en productos químicos sintéticos han provocado daños ecológicos debido a impactos no deseados en organismos no objetivo y la aparición de microbios resistentes a ellos (Rashid et al., 2023). Los endófitos fúngicos demuestran capacidades para el manejo de las plantas contra el estrés biótico y abiótico mediante la mejora directa o indirecta de la inmunidad innata de las plantas, es decir, contribuyen a elevar las tasas de fotosíntesis, estimulan el crecimiento vegetal, facilitan la mineralización de nutrientes y, producen compuestos bioactivos, hormonas y enzimas mejorando así la productividad general y la resistencia de las plantas al estrés (Gowtham et al., 2024).

6.7 Uso de los hongos endófitos para mitigar estrés por metales pesados

Los endófitos fúngicos tienen mecanismos de quelación o acumulación de metales. En la Tabla 1, se observa los mecanismos que se han estudiado en algunas plantas modelo con la presencia de metales pesados. Los endófitos, mejoran la resistencia de las plantas a los metales pesados al aumentar el mecanismo antioxidante, lo que produce una desintoxicación que permite que la planta crezca en suelo contaminado. El papel de los simbiontes fúngicos beneficiosos en la acumulación y tolerancia a metales de las plantas se ha subestimado durante muchos años; sin embargo, ha atraído más interés recientemente. Los endófitos fúngicos afectan

positivamente a la vegetación de la siguiente manera: (1) indirectamente mediante la formación del suelo, lo cual es particularmente importante en entornos degradados y (2) directamente al ajustar la adaptación de la planta a la toxicidad de los metales y mejorar el rendimiento de la biomasa vegetal (Malgorzata et al., 2019).

Tabla 1. Mecanismos y agentes contaminantes estudiadas en plantas de variedad de especies e inoculadas con cepas fúngicas endófitas.

Cepa endófitas	Planta huésped	Metal Pesado	Mecanismos	Referencia
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	Pb	Mejora del crecimiento y capacidad de fitorremediación	Tiwari et al., 2023
<i>Piriformospora indica</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L.(Tabaco)	Cd	Tolerancia a metales pesados	Su et al., 2021
<i>Exophiala pisciphila</i>	<i>Zea mays</i> (Maíz)	Cd	Regulación y respuesta fisiológica	Wang et al., 2016
<i>Suillus granulatus</i> / <i>Pseudopyrenochaeta</i> sp.	<i>Pinus tabulaeformis</i>	Cd	Crecimiento y tolerancia al Cd	Zhou et al., 2024
<i>Funneliformis mosseae</i> / <i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Pb	Crecimiento, Respuesta enzimática	Yang et al., 2015

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Prueba de crecimiento *in vitro* con diferentes concentraciones de Pb (NO₃)₂ con microorganismos endófitos

Para la prueba de crecimiento *in vitro* con diferentes hongos endófitos, se probaron las cepas SF0504, CO81403, CO71403 y R02809 que corresponden a los hongos *Endoradiciella communis*, *Phialophora livistonae*, *Cyphellophora clematidis* y *Sordaria hansenii* respectivamente. Se probaron diferentes concentraciones de Pb(NO₃)₂ al 0.001%, 0.002%, 0.02%, 0.05% y 0.1% en medio PDA que corresponde a 6.25 ppm, 12.5 ppm, 125 ppm, 312 ppm y 625 ppm de plomo. Se colocó un explante de cada hongo mencionado de 0.5 cm de diámetro en el centro de la caja y se dejó incubar durante 14 días para identificar el crecimiento radial, para ello, se consideraron las medidas del ancho y de largo del crecimiento y se tomó un promedio de ambos valores para cada caja después del tiempo de incubación, la prueba se realizó por triplicado (Figura 2).



Figura 2. Establecimiento de cultivo *in vitro* de hongos endófitos con diferentes concentraciones de nitrato de plomo.

7.2 Obtención de la plántula

Para el desarrollo de la prueba en invernadero, se adquirió la semilla de pino piñonero de la Ascensión, Aramberri, Nuevo León del ciclo 2022. Se desinfectó por imbibición utilizando peróxido de hidrógeno al 4% durante 5 horas, se enjuagó y se puso a secar a temperatura ambiente (Figura 3). Para la siembra, la semilla se colocó en charolas de 77 cavidades utilizando una mezcla de peat moss: perlita (1:1) esterilizada a 120°C, 1.5 libras de presión por una hora. Dos meses después de la emergencia de la plántula, se trasplantaron a macetas de plástico de 12 cm de ancho por 10 cm de largo, con una mezcla de peat moss:perlita previamente esterilizado (1:1). Se destinaron 4 repeticiones de 5 plántulas por unidad experimental (20 plántulas por tratamiento). Las plántulas fueron irrigadas con los tratamientos mencionados en la Tabla 2.



Figura 3. Desinfección y siembra de la semilla de *Pinus cembroides* en invernadero.

7.3 Obtención del inóculo

Las cepas de hongos endófitos que se desarrollaron mejor a altas concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ se colocaron en medio de cultivo líquido Merlin-Norkans modificado (MNM) con la siguiente composición: glucosa (10 g/L), extracto de malta (3 g/L), extracto de levadura (1 g/L), fosfato dipotásico (0.5 g/L), sulfato de magnesio hexahidratado (0.15 g/L), y fosfato de amonio y potasio (0.5 g/L). En un matraz de 250 mL con 150 mL de medio MNM se colocaron 5 explantes de 0.5 cm de diámetro del crecimiento fúngico previamente obtenido en agar PDA de los hongos mencionados y se colocó en agitación durante 120 horas a 27°C, se realizó una serie de repeticiones para lograr suficiente inóculo para las plántulas. Las plántulas se inocularon quince días después del trasplante con 15 mL de medio de cultivo ajustado a 1.5×10^6 blastosporas/mL. La inoculación con los endófitos se realizó a los tres meses después del trasplante (Figura 4). Las plántulas se mantuvieron en invernadero durante 6 meses, se estuvieron irrigando con la dosis más elevada de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Figura 5); una vez transcurrido el tiempo, se colocaron en nitrógeno líquido para el análisis de enzimas y expresión de genes.

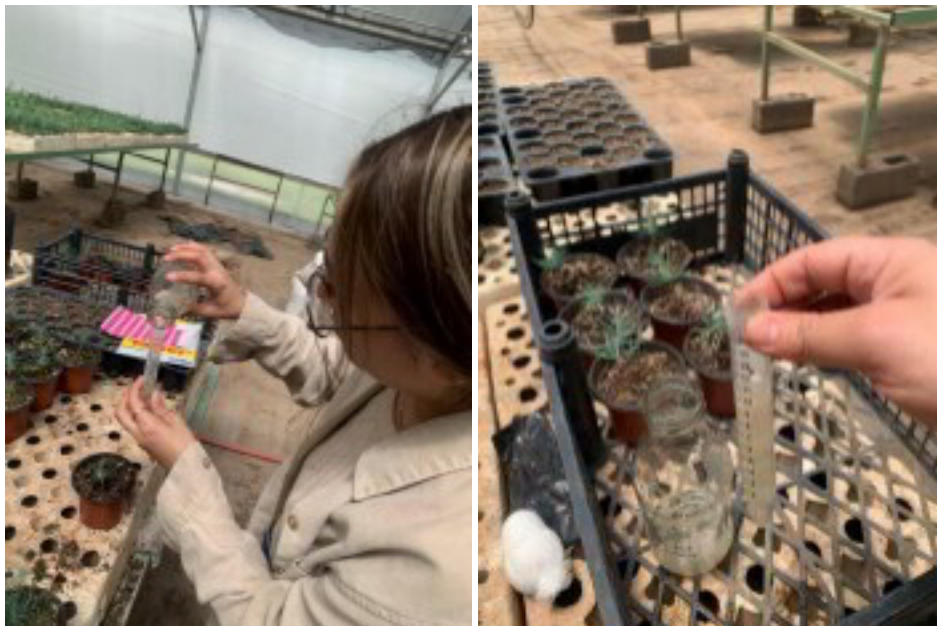


Figura 4. Inoculación de hongos endófitos en plántulas de *Pinus cembroides* inducidas al estrés por plomo.



Figura 5. Irrigación de $Pb(NO_3)_2$ al 0.1 % en plántulas de *Pinus cembroides* establecidas en invernadero.

Tabla 2. Tratamientos evaluados en plántulas de *Pinus cembroides* en invernadero.

Tratamiento	Hongo	Concentración de $Pb(NO_3)_2$
T1	<i>Endoradiciella communis</i>	0.1%
T2	<i>Phialophora livistonae</i>	0.1%
T3	ninguno	0.1%
T4	<i>Endoradiciella communis</i>	ninguna
T5	<i>Phialophora livistonae</i>	ninguna
T6	Testigo	ninguno

7.4 Evaluación de la actividad enzimática

Para la obtención de material vegetal, un día posterior al riego con los tratamientos mencionados, se separó de cada plántula la raíz y el follaje; para ello, se limpió el sustrato de la raíz y se colocó tanto la raíz como el tallo de cada tratamiento por separado en papel aluminio y se transportó en nitrógeno líquido al ultracongelador para mantener el material a -80°C . Las plántulas se cosecharon 6 meses después del trasplante, se molió usando nitrógeno líquido, la parte radicular y follaje de la planta considerando 5 plántulas por tratamiento. Para determinar la actividad enzimática, se usaron 200 mg de tejido molido y se colocó en un tubo de 2mL con 20 mg de polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA) para estabilizar la enzima, 1.5 mL de buffer de fosfatos 0.1M (pH 7.2), se homogenizó en vortex durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 12,500 rpm a 4°C . El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para realizar las determinaciones.

7.4.1 Proteínas totales

Se utilizó la técnica de Bradford por espectrofotometría para la cuantificación de proteínas. Se tomaron 100 μL del extracto y se colocó en un tubo de ensayo añadiendo 5 mL de reactivo de Bradford el cual se dejó reposar por 5 minutos. Una vez pasada la incubación, se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Model G10S, Waltham, MA, USA). Al mismo tiempo, se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino reportando los valores en mg/gr (Figura 6). Se realizó un total de 4 repeticiones por tratamiento.

La curva de proteínas se realizó con albúmina de suero bovino 10 ppm a 800 ppm.

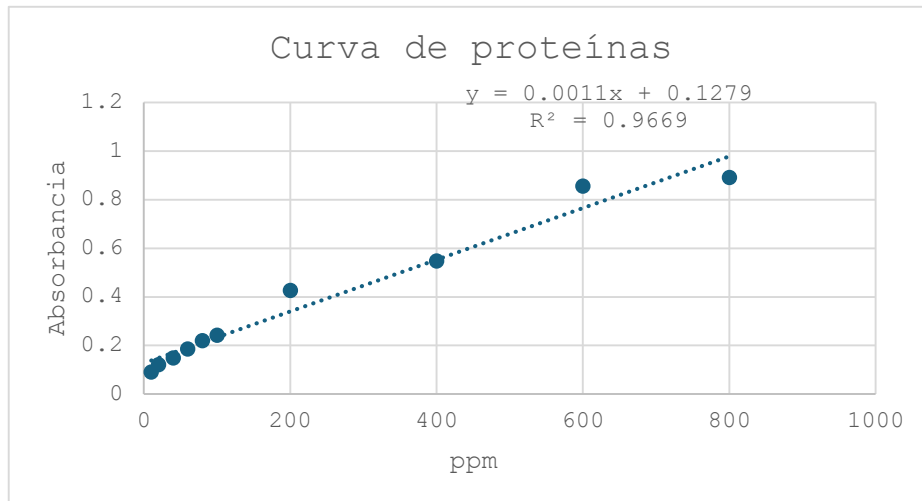


Figura 6. Curva de calibración para determinar proteínas.

7.4.2 Actividad catalasa

La actividad enzimática de la catalasa se cuantificó por espectrofotometría usando dos tiempos de reacción. El ensayo consistió en 100 uL del extracto vegetal con 900 uL de H₂O₂ 100mM y se le agregaron 400 uL de H₂SO₄ al 5% para detener la reacción (T0), para el tiempo 1, se tomaron 100 uL del extracto vegetal con 900 uL de H₂O₂ 100mM y se dejó actuar durante 1 minuto, transcurrido el tiempo, se añadieron 400 uL de H₂SO₄ al 5%. Tanto el tiempo 0 como el tiempo 1, se leyeron a 270 nm. Para este ensayo se realizó un blanco para cada muestra usada el cuál consistió en 100 uL del extracto vegetal, 900 uL de Buffer de fosfatos 0.1 M y 400 uL de H₂SO₄ al 5%. Las unidades de catalasa se expresaron como mM H₂O₂ min⁻¹/proteínas totales. Se realizó un total de 4 repeticiones por tratamiento. Para cuantificar las unidades de catalasa se realizó una curva de calibración con peróxido de hidrógeno de 10 a 100 mM (Figura 7).

Se Interpolaron las absorbancias en la ecuación obtenida en la curva de calibración y se usó la siguiente ecuación para determinar la actividad catalítica:

$$U = \frac{\text{Producto o sustrato} * \text{Volumen de reacción} * \text{Tiempo}}{\text{Proteínas totales mg g}^{-1}}$$

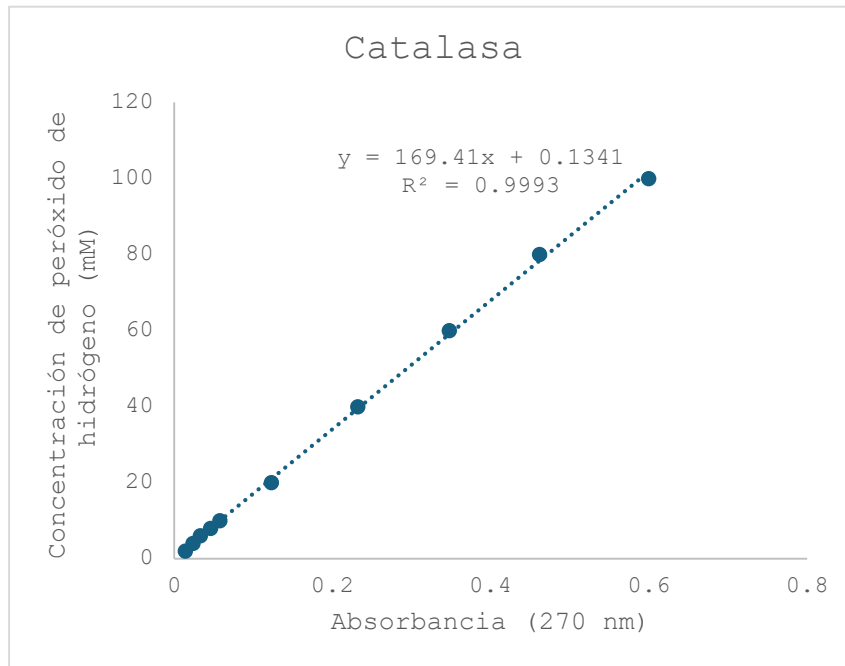


Figura 7. Curva de calibración para determinar catalasa.

7.4.3 Glutación peroxidasa

Se utilizó el método por espectrofotometría usando H_2O_2 como sustrato, 200 μL del extracto para determinación de enzima se colocó en un tubo con la adición de 400 μL de glutatión reducido 0.1 M y 200 μL de Na_2HPO_4 0.067 M. Esta mezcla se calentó en un baño de agua a $25^\circ C$ durante 5 minutos, posterior a ello, 200 μL de H_2O_2 1.3mM se añadieron para empezar la reacción catalítica por 10 minutos. Al término de reacción se añadió 1 mL de ácido tricloroacético al 1% y la mezcla se colocó en baño de agua por 30 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm y 480 μL del sobrenadante se colocó en un tubo de ensaye con 2.2 mL de Na_2HPO_4 0.32 M y 320 μL del colorante 5,5 ditiobis-2 ácido nitro benzoico (1 mM) (DTNB) 1.0 mM para el desarrollo de color, la

absorbancia se determinó a 412 nm. La actividad enzimática se determinó con el decremento en glutatión peroxidasa (GSH) con el tiempo de reacción expresando mM de GSH min^{-1} total de proteínas $^{-1}$. Se realizó una curva de calibración con glutatión reducido, se realizó un total de 4 repeticiones por tratamiento. La curva de calibración de glutatión reducido se realizó de 0.02 a 1 mM (Figura 8). Los resultados se expresan como $U * \text{proteínas totales (mg g}^{-1})$ donde U es igual $\text{mM EQ de GSH} * \text{min}^{-1} \text{ proteínas totales}^{-1}$.

7.4.4 Contenido de fenoles totales

El ensayo se realizó con el extracto vegetal preparado como se indica en el paso anterior, en ensayo se preparó usando 200 uL del reactivo Folin-Ciocalteu 1M, 50 uL del extracto vegetal, 500 uL de Na_2CO_3 al 20% y 5 mL de agua destilada. El blanco consistió en los mismos reactivos, pero usando 50 uL de buffer de fosfatos en lugar del extracto vegetal. Las muestras se dejaron incubar a 45°C por 30 minutos y se leyeron en el espectrofotómetro a 750 nm. Los resultados se reportaron en $\mu\text{g/g}$. Al mismo tiempo se realizó una curva de calibración de ácido gálico siguiendo el protocolo descrito a una

Figura 8. Curva de calibración para determinar glutatión peroxidasa.
concentración de 100 a 1000 ppm de ácido gálico (Figura 9).

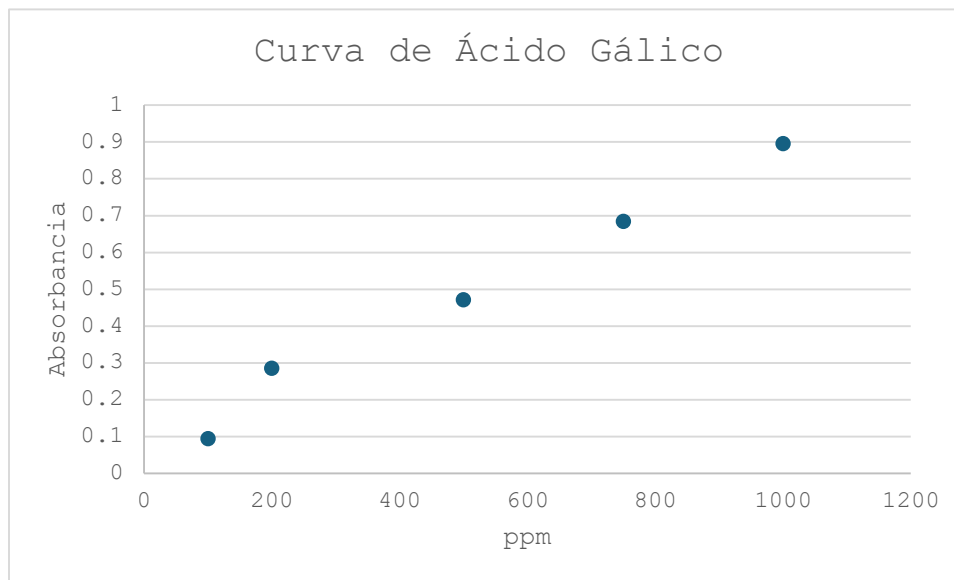


Figura 9. Curva de calibración para determinar fenoles totales.

7.5 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN tanto de follaje como de raíz, se procedió a utilizar el material molido con nitrógeno líquido resguardado a -80°C . Se siguió el protocolo de Chang et al., (1993) modificado, se tomaron 200 mg de tejido vegetal o raíz según sea el caso y se agregó 1mL de buffer de extracción calentado a 65°C (2% CTAB, 2% PVP, 100mM (Tris-HCl pH 8.0), 25 mM EDTA, 2.0 M NaCl, 0.5 g/L spermedina, 2% B-mercaptoetanol), se mezcló dos veces por inversión y se realizó dos veces la extracción usando el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 al centrifugar por 5 minutos a 10,000 rpm. El sobrenadante se colocó en un tubo estéril de 2 mL y se agregó $\frac{1}{4}$ de volumen de LiCl 10M y se mezcló. El RNA se dejó precipitar toda la noche a 4°C y se centrifugó a 10,000 rpm por 20 minutos. Se disolvió la pastilla en 500 uL de buffer SSTE (NaCl 1.0M, 0.5% SDS, Tris-HCl (pH 8.0) 10mM, EDTA (pH 8.0) 1mM). Se añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo previamente estéril y se agregaron dos volúmenes de alcohol etílico grado molecular para precipitar el RNA a -80°C durante 30 minutos o 2 horas a -20°C . Se

centrifugó 20 minutos para recuperar el RNA, se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla. Se resuspendió con 50 uL de agua al 0.1% de dietil policarbonato (DEPC).

7.5.1 Purificación de ARN

Se utilizó el kit de DNAase I Sigma para la purificación del ARN, se tomaron 8 uL de ARN y se le agregaron 12 uL de DNAase I reaction buffer, se dejó incubar durante 5 minutos y se le agregaron 4 uL de stop buffer. A partir de este ARN purificado, se obtuvo el ADN complementario.

7.5.2 Cuantificación y calidad de ARN

Para identificar si la calidad de ARN fue la correcta, el ARN se diluyó 1:100, para ello, se tomaron 2 µl del ARN obtenido y se mezclaron con 198 µl de agua inyectable estéril. El ARN se mezcló gentilmente subiendo y bajando con una pipeta. Se esperó a que las burbujas se aclararan y se utilizó agua inyectable estéril en la celda de referencia (en blanco), se midió la absorbancia a 280 nm y 260 nm.

Se calcularon los valores de A280 y A260 en donde la concentración de ADN en ng/µL = $A_{260} \times 100$ (factor de dilución) $\times 50$ (factor de conversión) y el cociente A_{260}/A_{280} para identificar la pureza (contaminación con proteínas), se realizó al dividir el A260 corregido por el A280 corregido.

7.5.3 Calidad del ARN; Electroforesis horizontal de agarosa al 1%

Para la preparación del gel de agarosa al 1% se disolvieron 0.45 g de agarosa en 150 mL de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M) en un vaso de precipitado, para su homogeneización se utilizó una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine para la formación de los pozos (evitando dejar burbujas en el gel). Se dejó solidificar el gel durante 15 a 20 minutos y se removió el peine. Para la preparación de las muestras

de carga, sobre una tira de papel parafilm se colocó una gota (1 μL) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de red gel), y se colocaron 5 μL del ADN de una muestra y 4 μL de marcador molecular 100 pb marca Axygen, posteriormente se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces con ayuda de una micropipeta. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90-95 volts por 45 minutos. Una vez pasado el tiempo otorgado, se logró la visualización de las bandas correspondientes a cada gen, esto con ayuda del Transiluminador de luz UV. EL objetivo del gel fue ver dos bandas claras del ARN obtenido.

7.5.4 Obtención de ADN complementario

Se usó el kit cDNA de Sensifast TM 1, usando 1 μg de ARN, para la síntesis de ADN complementario, se tomaron 16 μL de reacción de ARN, se añadieron 4 μL de iScript RT supermix (BioRad 1708841) a 16 μL de reacción de ARN (total $\sim 20 \mu\text{l}$).

Para el protocolo de reversa transcriptasa, se realizó un cebado: 5 min a 25 °C, transcripción inversa: 30 min a 42 °C, inactivación de RT: 5 min a 85 °C. Se conservó el cADN a -20 °C para realizar la PCR cuantitativa en tiempo real.

7.5.5 PCR en tiempo real

Para la prueba de expresión de genes, se utilizó cDNA a partir del RNA de raíz y follaje por tratamiento (se obtuvieron 3 repeticiones por tratamiento), se utilizó el kit Forget Me Not qPCR el cual cuenta con Sybr green como fluoróforo, Se usaron 10 μL del Master Mix que incluye la Taq polimerasa, 0.2 μL de cebador forward, 0.2 μL de cebador reverse, 0.4 μL de ROX, 0.5 μL de cDNA y 6.7 μL de H_2O .

En la Figura 10 se muestra el equipo StepOne™ de Applied Biosystems, utilizado realizar la reacción de PCR en tiempo real mediante el método de curva relativa estándar, utilizando Sybr Green como señal de fluorescencia. El programa de qPCR consistió en 10 min a 95 °C, 40 ciclos de PCR, 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. El nivel medio de expresión de los genes mencionados en la Tabla 3, se registró como RQ. Según el diseño de Hernández-Hernández et al., (2018).



Figura 10. Prueba de expresión de genes en equipo StepOne™ de Applied Biosystems.

Tabla 3. Primers de los genes de pino reportados para evaluar la expresión por estrés sometido a salinidad / toxicidad por metales pesados.

Gene	Secuencia (5' a 3')	Región que codifica	Referencia
<i>ACT-1F</i>	CAGTGTCTGGATTGGAGGTTTC	B-actina (gen endógeno)	Chen et al., 1996
<i>ACT-1R</i>	TCTGTGGACGATGGAAGGAC	B-actina (gen endógeno)	Chen et al., 1996
<i>Nramp3-F</i>	AAGGAATTGCTGCTAGGGCT	Proteína 3 de macrófagos asociada a la resistencia natural (NRAMP3)/Transportador de metales NRAMP (1-4)	Warren et al., 2022
<i>Nramp3-R</i>	CACCAGAGCTGAGTGGAGAA	Proteína 3 de macrófagos asociada a la resistencia natural (NRAMP3) /Transportador de metales NRAMP (1-4)	Warren et al., 2022
<i>LEA8-1-F</i>	CCAGTACCATCTGCAGAGAC	Proteínas abundantes en la embriogénesis (LEA)	Xu et al., 2021
<i>LEA8-1-R</i>	GTAACCCTGGGCATTTGGCTG	Proteínas abundantes en la embriogénesis (LEA)	Xu et al., 2021
<i>TPPD-F</i>	GAACTTGATCTGGACATGGC	Gen de la trehalosa-fosfato fosfatasa (TPPD) asociado al metabolismo de la trehalosa	Xu et al., 2021
<i>TPPD-R</i>	CACTGTGGAACGCATCGTATC	Gen de la trehalosa-fosfato fosfatasa (TPPD) asociado al metabolismo de la trehalosa	Xu et al., 2021
<i>PER1-F</i>	CGATTGCTTCGTTAATGGC	Gen que codifica para enzima peroxidasa	Xu et al., 2021
<i>PER1-R</i>	CGGAATCGCGAGCAGCAATG	Gen que codifica para enzima peroxidasa	Xu et al., 2021

7.6. Análisis de datos

Los datos de crecimiento radial *in vitro*, contenido de proteínas, enzimas y contenido de fenoles, se analizaron mediante un análisis de varianza usando el software estadístico R. En el caso de visualizar diferencias significativas, las medias se separaron por la prueba de Duncan con un alfa de 0.05 usando el paquete agricolae del programa R.

Para el caso de expresión génica, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis en el software estadístico R.

VIII. RESULTADOS

8.1 Prueba de crecimiento radial *in vitro*

En la Tabla 4 se muestran los resultados de crecimiento radial *in vitro* al evaluar diferentes cepas a distintas concentraciones de $Pb(NO_3)_2$, donde en todos los tratamientos se encontraron diferencias altamente significativas. *Phialophora livistonae*, toleró altas concentraciones de plomo destacando que conforme la concentración de plomo iba en aumento, su capacidad de crecimiento no se vio perjudicada en un grado tan alto con respecto al testigo (Figura 11). Por otra parte, encontramos datos que fluctúan constantemente, tal es el caso de *Cadophora* sp., *Nectriella pironii* y *Sordaria hansenii* (Figura 12-14) las cuales conforme ocurría un aumento de metal pesado sus datos no reflejaban una relación uniforme, en cambio el hongo *Endoradiciella communis* (Figura 15) tuvo una respuesta positiva, adaptándose al mayor porcentaje de plomo.

Tabla 4. Crecimiento radial de endófitos a diferentes concentraciones de Pb (NO₃)₂.

Pb(NO ₃) ₂	<i>Phialophora livistonae</i>	<i>Endoradiciella communis</i>	<i>Cadophora</i> sp.	<i>Nectriella pironii</i>	<i>Sordaria hansenii</i>
0.001%	3.84±0.38 a	8.00±0.0 a	2.17±0.28 bc	2.93±0.67 a	2.45±0.38 a
0.002%	3.92±0.03 a	7.67±0.58 a	1.85±0.26 c	2.98±0.13 a	2.45±0.05 a
0.020%	2.17±0.08 b	7.43±0.81 a	2.37±0.12 b	1.67±0.12 a	1.43±0.06 b
0.050%	2.6±1.02 ab	7.67±0.58 a	2.95±0.31 a	2.75±0.10 b	2.55±0.13 a
0.100%	2.2±0.48 b	4.23±0.73 b	1.73±0.23 c	1.78±0.06 b	1.92±0.21 ab
Test	3.96±0.35 a	8.00±0.00 a	3.07±0.28 a	2.97±0.03 a	2.52±0.25 a
ANOVA	0.000923 ***	1.71e-05 ***	0.000101 ***	0.000113 ***	0.000147 ***



Figura 11. Prueba de crecimiento radial *in vitro* de *Phialophora livistonae* a diferentes concentraciones de Pb (NO₃)₂.

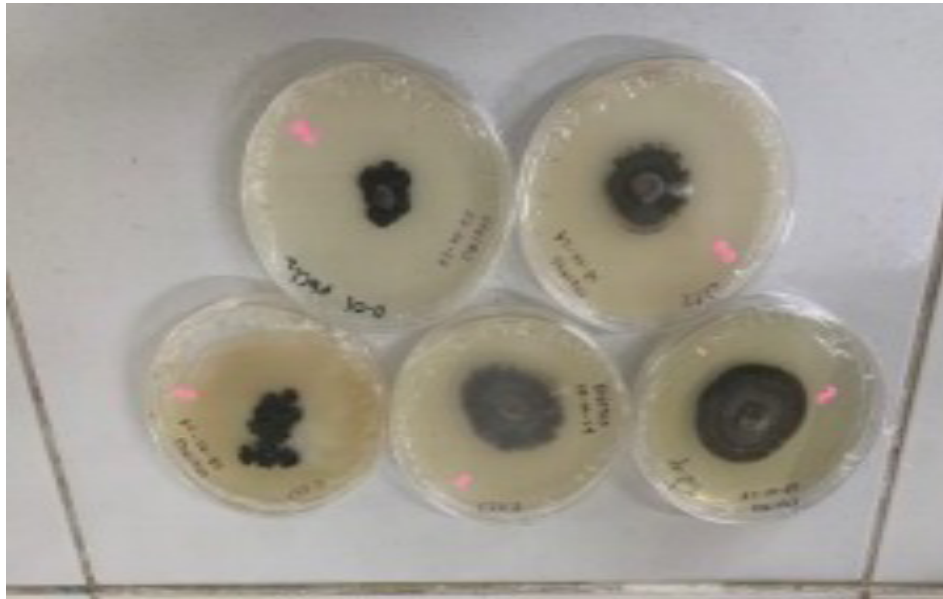


Figura 12. Prueba de crecimiento radial *in vitro* de *Cadophora* sp. a diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$.

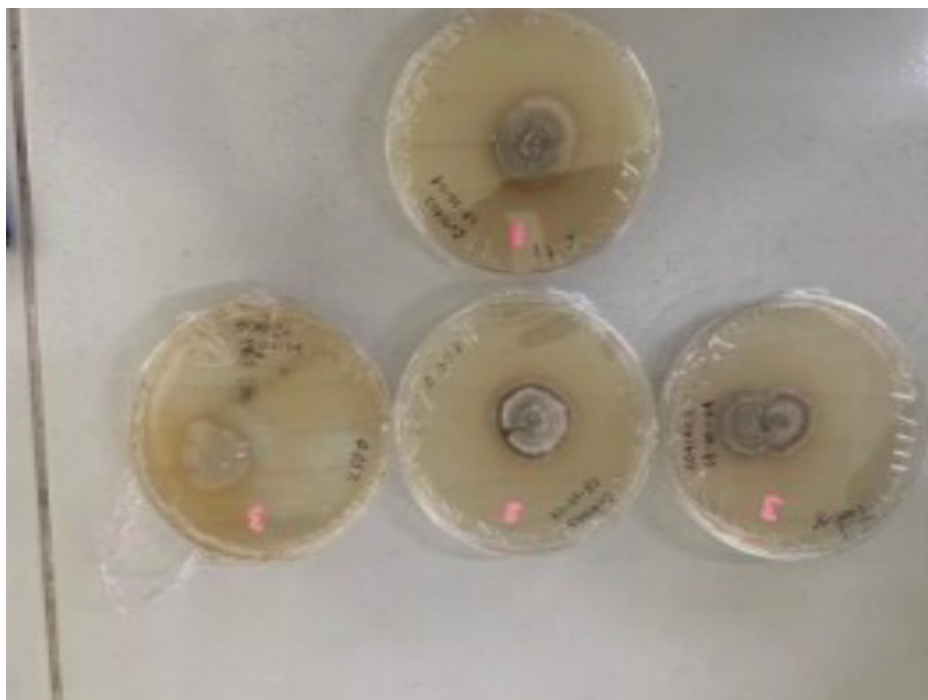


Figura 13. Prueba de crecimiento radial *in vitro* de *Nectriella pironii* a diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$.

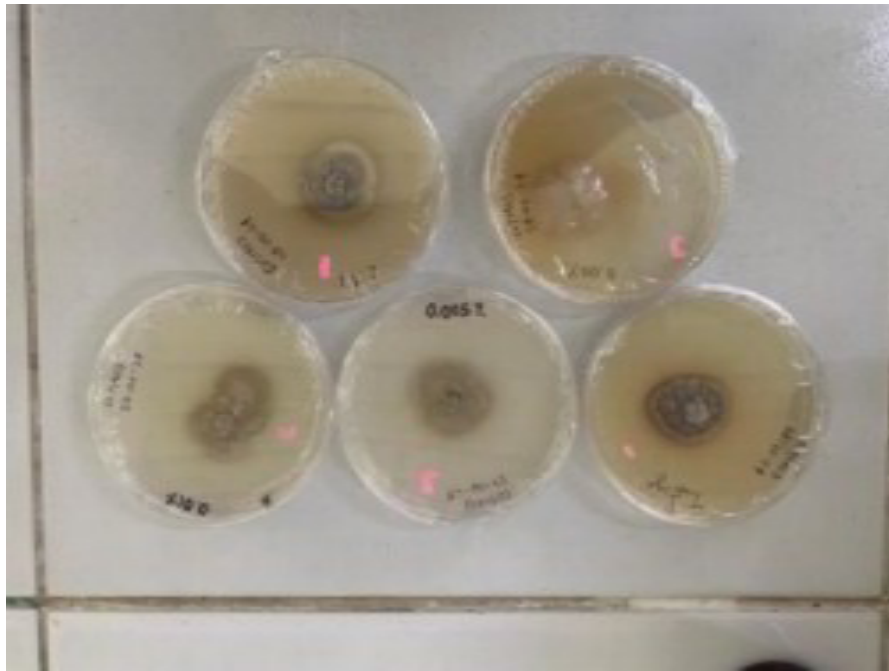


Figura 14. Prueba de crecimiento radial *in vitro* de *Sordaria hansenii* a diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$.



Figura 15. Prueba de crecimiento radial *in vitro* de *Endoradiciella communi* a diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$.

8.2 Perfil enzimático foliar

Se encontró que no hubo diferencias significativas en la cantidad de proteínas del testigo con aquellas plántulas que fueron irrigadas con plomo (Figura 16), sin embargo se observa que los tratamientos inoculados con cepas endófitas y adición de plomo indujeron un menor contenido de proteínas en follaje con respecto al testigo.

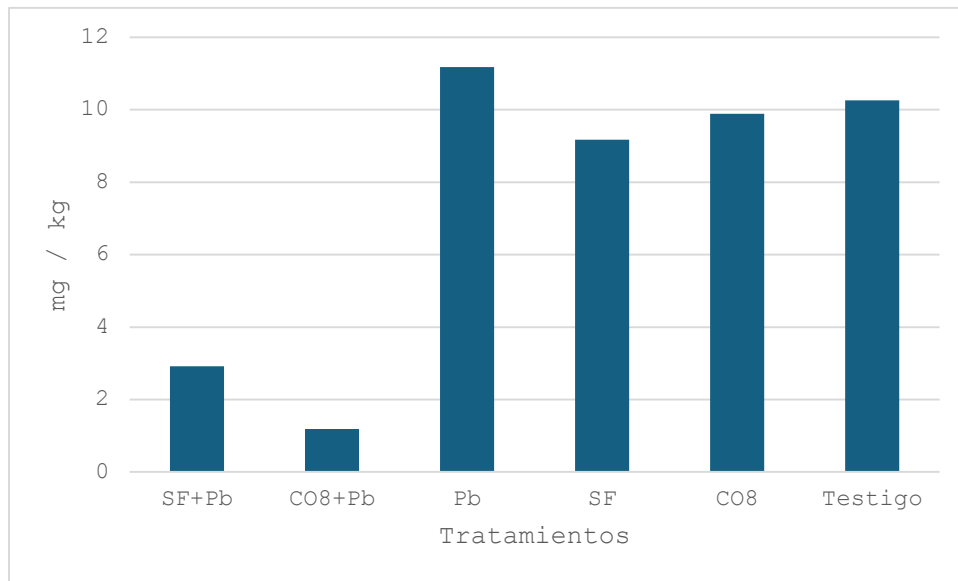


Figura 16. Comparación del contenido de proteínas en plántulas de *Pinus cembroides* (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%.

Los datos arrojan que las plántulas inoculadas con hongos endófitos e irrigadas con plomo presentaron mayor contenido de fenoles a nivel foliar con respecto al testigo, reportando SF + Pb en un 64.81 % y CO8+ Pb 60.64% (Figura 17), sin embargo, si comparamos de forma individual a plántulas que solo contenían el metal pesado o el hongo endófito notamos que no existen diferencias significativas.

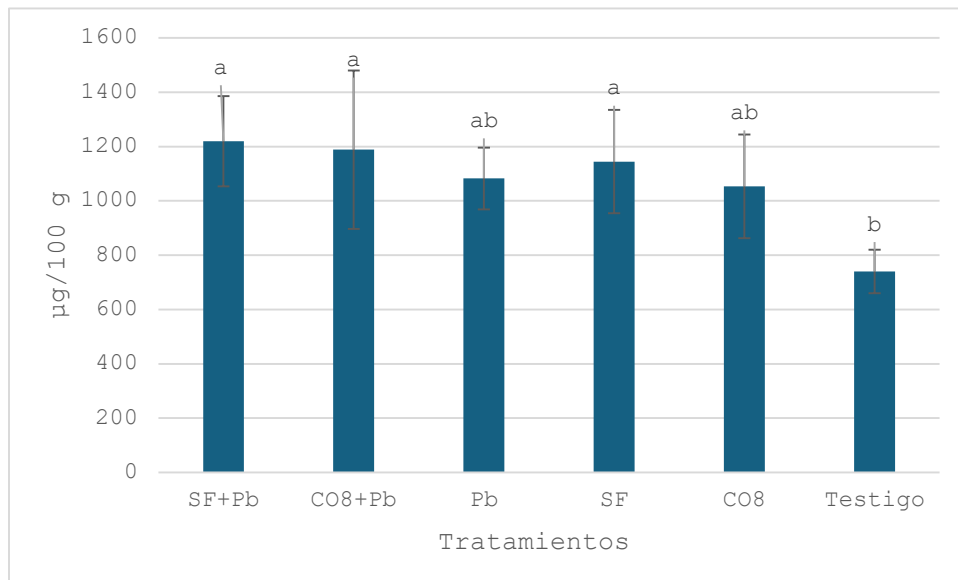


Figura 17. Comparación del contenido de fenoles en plántulas de *Pinus cembroides* (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%.

Los datos arrojados en la actividad catalasa de tratamientos inducidos al estrés e inoculados con cepas de endófitos en comparación al testigo (Figura 18), muestran de forma muy notoria que la cepa de *Endoradiciella communis* presentó contenidos más altos, expresando el 1492.03% respecto al testigo, indicando su alta tolerancia al estrés en hoja.

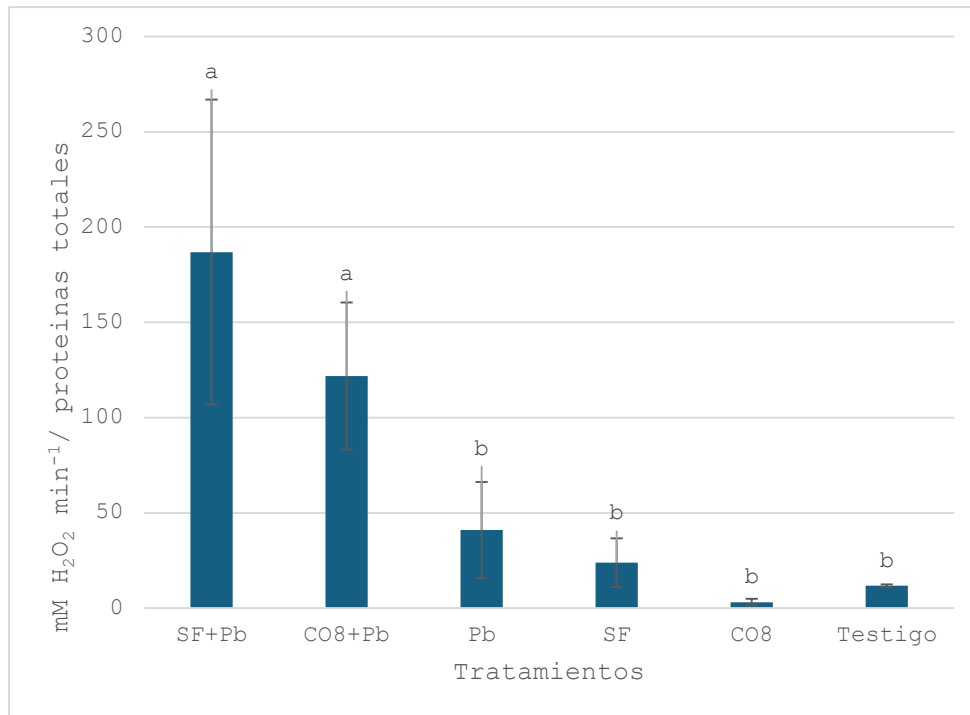


Figura 18. Comparación enzimática de la actividad catalasa en plántulas de *Pinus cembroides* (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con Pb (NO₃)₂ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con Pb (NO₃)₂ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con Pb (NO₃)₂ al 0.1%.

En cuanto a la actividad de glutatión peroxidasa se ve reflejado que *Phialophora livistonae* presenta diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 19), aunque encontramos que dicha cepa endófito al ser inoculada sin la presencia de metal pesado no arroja datos tan elevados, siendo proporcional a *Endoradiciella communis* y al testigo respectivamente.

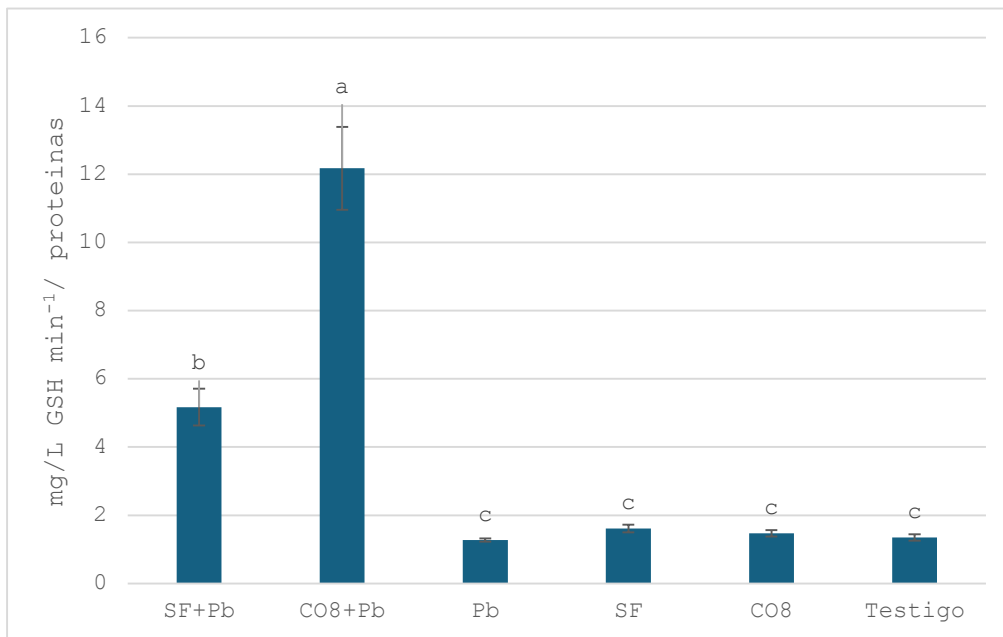


Figura 19. Comparación de la actividad enzimática glutatión peroxidasa en plántulas de *Pinus cembroides* (follaje) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%.

8.3 Perfil enzimático raíz

Para todos los metabolitos evaluados se encontraron diferencias altamente significativas respecto a los tratamientos evaluados.

La inoculación de *P. cembroides* con los hongos endófitos *Endoradiciella communis* (SF) y *Phialophora livistonae* (CO8) y la consecuente irrigación con plomo, indujo una respuesta metabólica diferencial y acentuada en la raíz de las plántulas. El contenido de proteínas se vio drásticamente reducido en los tratamientos combinados SF+Pb y CO8+Pb alcanzando los niveles más bajos de todos los grupos y siendo estadísticamente inferiores al control y al tratamiento de plomo. En contraste, los tratamientos de hongos endófitos por sí solos, mostraron el contenido de proteínas más alto (Figura 20).

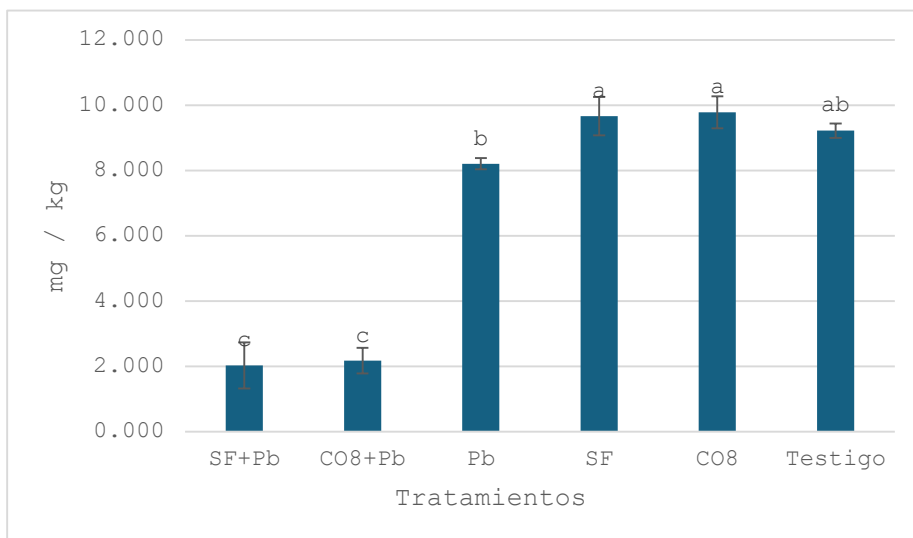


Figura 20. Comparación del contenido de proteínas en plántulas de *Pinus cembroides* (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%.

De manera notoria, el contenido de fenoles se incrementó significativamente en los tratamientos combinados, con SF+Pb presentando el valor más alto en un 1485.62% (más de 1500 ug), la sola exposición con plomo incrementó los fenoles respecto al testigo confirmando el estrés abiótico en un 548. 69% (Figura 21). Sin embargo, la acumulación fue máxima en presencia de los endófitos.

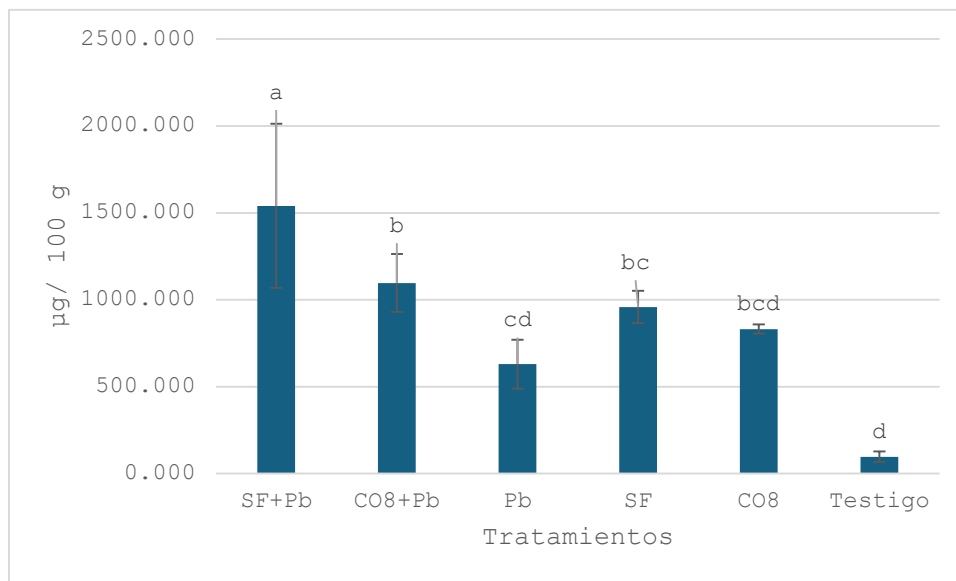


Figura 21. Comparación del contenido de fenoles en plántulas de *Pinus cembroides* (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%.

Los resultados de la actividad de catalasa (CAT) (Figura 22) indican que dicha actividad se incrementó masivamente en los tratamientos donde las plántulas fueron expuestas tanto a los hongos endófitos como al plomo. Registrando el 3020.60% en el caso de SF+ Pb y 2722.02% para plántulas inoculadas con CO8 + Pb respecto al testigo. En contraste, el tratamiento de únicamente plomo solo exhibió una actividad de CAT basal o casi nula, similar a la actividad de CAT en el testigo y los tratamientos de hongos endófitos en sí.

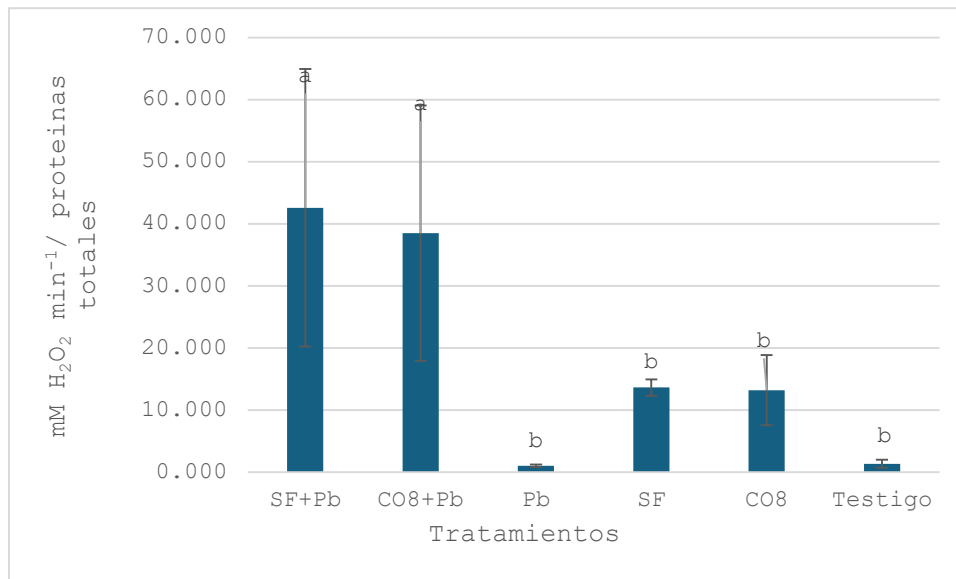


Figura 22. Comparación enzimática de la actividad de catalasa en plántulas de *Pinus cembroides* (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%.

La actividad de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) se incrementó exponencialmente en los tratamientos combinados (Figura 22 y Figura 23). La exposición de plomo no indujo la GPX.

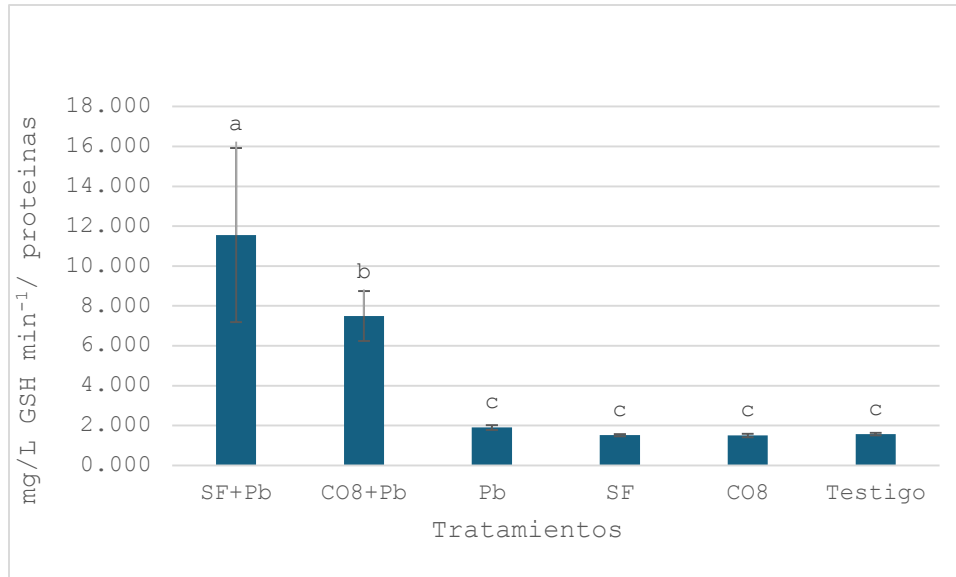


Figura 23. Comparación de la actividad enzimática glutatión peroxidasa en plántulas de *Pinus cembroides* (raíz) inoculado con hongos endófitos e irrigadas con plomo.

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (LSD, $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar. SF=plantas inoculadas con *Endoradiciella communis*, CO8= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae*, SF + Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, Pb= plantas irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%, CO8 + Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con Pb (NO_3)₂ al 0.1%.

8.4 Expresión génica en plántulas de *Pinus cembroides* tanto en follaje como raíz inoculadas con hongos endófitos e irrigadas con solución de $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%.

En la Tabla 5 se muestra el cambio en la expresión génica de follaje de plántulas de pino piñonero al ser tratadas con nitrato de plomo al 0.1%. Se encontró que no hubo diferencias significativas en el cambio de la expresión del gen *NRAMP* y *PER* en comparación con *LEA8* y *TPPD*. El hongo *Phialophora livistonae* por sí solo aumentó la expresión de *LEA8* y también cuando fue irrigado en combinación con plomo. Para el gen *TPPD*, hubo una sobre expresión del gene en las plantas inoculadas con *E. communis* en combinación con plomo.

Tabla 5. Cambio de expresión genica $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ en plántulas de *Pinus cembroides* (follaje) inoculadas con hongos endófitos e irrigadas con solución de $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%.

	LEA8	TPPD	NRAMP	PER
CO8	7997.36±5323.93	0.46±0.36	68514.34±39573.52	4.91±1.80
SF	9.77±8.77	0.30±0.18	124.63±73.14	0.24±0.19
Pb	48.49±13.73	1.85±1.11	48.33±13.14	23.15±18.27
SF+Pb	71.51±62.98	283516.8±194334.00	116.42±32.20	128.6±76.99
CO8+Pb	96.66±50.13	0.72±0.57	3.06±1.80	382.79±222.56
Testigo	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Kruskal-Wallis p-value	0.009954	0.03264	0.06296	0.103

En cuanto a la expresión de genes a nivel de raíz en plántulas de *Pinus cembroides*, se encontró que todos los tratamientos fueron altamente significativos. Se encontró que para el gene *LEA8* el hongo *P. livistonae* en combinación con plomo fue el que se sobre expresó en mayor proporción y al ser inoculado sin plomo, este se inhibió. Se encontró que en plántulas irrigadas únicamente con plomo, hubo una expresión de gen *TPPD* y *PER*, mientras que *NRAMP* y *LEA8* se inhibió. Cuando se combinó el hongo *E. communis* con plomo, sobreexpresó el gene *TPPD* y *NRAMP* en comparación al testigo, mientras

que *P. livistonae*, inhibió la expresión de TPPD, NRAMP y PER cuando se combinó con plomo.

Tabla 6. Cambio de expresión génica $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ en plántulas de *Pino cembroides* (raíz) inoculadas con hongos endófitos irrigadas con solución de $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%

	LEA8	TPPD	NRAMP	PER
CO8	0.001±0.0006	21.63±18.25	0.213±0.18	0.198±0.24
SF	0.019±0.017	0.0123±0.011	0.369±0.24	0.103±0.10
Pb	0.007±0.006	5.583±1.19	0.555±0.62	1.27±0.97
SF+Pb	0.003±0.002	232431.93±56527.41	9.01±8.30	7.20±6.20
CO8+Pb	7.30±8.01	0.65±0.539	0.05±0.02	0.096±0.049
Testigo	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Kruskal-Wallis p-value	0.01356	0.007432	0.02537	0.03356

IX. DISCUSIÓN

Con la intención de conocer la capacidad de crecimiento y adaptabilidad del microorganismo en concentraciones de metal pesado, se lograron observar los datos de crecimiento radial según la concentración de Pb, por lo que es posible deducir que la cepa *E. communis* tuvo una adaptabilidad de absorción más elevada en comparación al resto de los hongos inoculados e incluso con respecto a la mayor concentración de Pb. En cuanto a las plántulas irrigadas con plomo, se observó el contenido total de proteínas en follaje de los diferentes tratamientos, destacando que CO8 + Pb (Tratamiento inoculado con *Phialophora livistonae* e irrigada con Pb), la cantidad de proteínas es mucho menor en comparación con el testigo reflejando que *Phialophora livistonae* hace una función de inhibición ante la presencia del metal pesado, esto es debido a que cuando una planta incrementa su contenido total de proteínas bajo exposición a metales pesados, puede indicar una activación de mecanismos de defensa, mitigando el efecto del estrés por plomo, reduciendo la necesidad de una respuesta proteica elevada. Dicho de otro

modo, la asociación simbiótica parece proteger a las plantas, probablemente mediante mecanismos de inmovilización del metal o mejora de la absorción de nutrientes esenciales. Por otro lado, los tratamientos SF, CO8 y Testigo (sin plomo) mantuvieron valores intermedios (9–10 ppm), sin diferencias significativas entre sí, lo cual indica que la presencia de los hongos no altera negativamente el metabolismo proteico en ausencia de estrés.

Se ha reportado que los antioxidantes no enzimáticos como los fenólicos eliminan radicales dañinos, las plantas necesitan estos metabolitos secundarios para defenderse y eliminar radicales dañinos bajo estrés de metales pesados, en un estudio con *S. lycopersicum* se produjeron mayores cantidades de fenoles y flavonoides en plantas inoculadas con plantas asociadas a *P. lilacinus* (Hongo endófito inoculado). Los resultados revelaron que las plantas inoculadas con *P. lilacinus* aumentaron la cantidad de contenido total de fenoles (Musa et al. 2023). De esta manera es posible comparar con los resultados arrojados en la Figura 17 y Figura 21 referente a follaje y raíz en *Pinus cembroides*, donde se obtuvo también mayor contenido de fenoles en los tratamientos inoculados con las cepas de hongos endófitos e irrigadas con Pb respectivamente.

Es importante indicar que hubo un aumento de la actividad catalasa ante concentraciones de Pb sin ningún endófito, sin embargo, al comparar con los tratamientos que contienen las cepas endófitas y concentraciones de plomo, estos fueron más elevados, de forma similar se arrojaron datos en un estudio bajo estrés con cadmio en plantas de maíz (*Zea mays*). En particular, la mejora considerable de las actividades de CAT en plantas inoculadas con hongos septados oscuros (DSE) (*E. pisciphila*), en todas las concentraciones de Cd, implica el papel crucial que tiene esta enzima en la protección de las plantas inducida por DSE contra el estrés oxidativo. Las propiedades antioxidantes de las hojas del maíz inoculado con DSE difirieron del control no inoculado, lo que sugiere que los hongos DSE como *P. livistonae* usado en este estudio, puede ser capaz de regular los genes que codifican enzimas antioxidantes, proporcionando protección contra especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wang et al 2016).

En los últimos años, un número creciente de estudios han indicado que GPX (gluatió peroxidasa) funciona tanto en la detección como en la eliminación de

hidroperóxido, y también interactúa específicamente con proteínas asociadas para conferir oxidación inducida por peróxido. Yang et al. (2015), estudiaron el estrés por plomo en la planta *Robinia pseudoacacia L.* e inocularon diferentes hongos micorrízicos quienes confirieron protección a la planta y tolerancia ante concentraciones de metal pesado, así mismo se destacó la reacción enzimática obteniendo resultados de glutatión peroxidasa más elevados respecto al testigo, de la misma forma en este estudio se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos SF+Pb= plantas inoculadas con *Endoradiciella communis* irrigada con $Pb(NO_3)_2$ al 0.1% y CO8+Pb= plantas inoculadas con *Phialophora livistonae* irrigadas con $Pb(NO_3)_2$ al 0.1%, determinando que la simbiosis generada con las cepas endófitas mejora la reacción enzimática ayudando a la planta a reducir el daño oxidativo causado por la concentración de plomo.

Las proteínas LEA (proteínas abundantes en la embriogénesis tardía) se expresan y acumulan en gran medida en las plantas durante la etapa de deshidratación de las semillas, así como en respuesta a condiciones de déficit hídrico y otros entornos adversos (French et al 2018). La exposición a condiciones adversas suele causar estrés oxidativo y la generación de ROS en las plantas, las proteínas LEA pueden reducir directamente el estrés oxidativo eliminando las ROS e indirectamente reducir su producción al secuestrar los iones metálicos que las generan en las células deshidratadas (Gao et. al 2012). De acuerdo con la literatura es posible deducir la expresión del gen LEA en este estudio, por lo tanto, se encontró que dicho gen se presentó en plántulas que contenían *Phialophora livistonae* + Pb a nivel foliar, la expresión del gen LEA nos indica que efectivamente la cepa de *Phialophora livistonae* tiene la capacidad para reducir el estrés en plantas forestales aportando una simbiosis entre la planta y el huésped en presencia de metales pesados, generando una respuesta positiva. La baja expresión en SF + Pb sugiere que *E. communis* no activa esta vía en tejido radical, en contraste con lo observado en el follaje, donde este gen mostró una alta inducción.

La trehalosa 6-fosfato (Tre6P) denominado TPPD en este estudio, intermediario de la biosíntesis de trehalosa, es un metabolito de señalización esencial que vincula el crecimiento y desarrollo de las plantas con el metabolismo del carbono (Kerbler et. al 2023). Aparte de funcionar como una fuente de carbono (de reserva) y un componente

estructural en bacterias, hongos e invertebrados, la trehalosa también funciona como un importante protector contra el estrés de las proteínas y las membranas durante condiciones adversas como la deshidratación, la alta salinidad, la hipoxia y la falta de nutrientes (Vandesteene et al., 2012). Por lo tanto, se encontró que el gen TPPD se expresó con mayor proporción en las plántulas inoculadas con *Endoradiciella communis* e inoculadas con plomo SF + Pb ($232,431.93 \pm 56,527.41$), por lo tanto, es posible deducir que el hongo logró generar una protección en la plántula permitiendo que su crecimiento no se viera afectado aún ante la presencia de metal pesado, comprendiendo el gran potencial que el endófito presenta. Este resultado indica que *E. communis* activa de manera muy marcada la vía de la trehalosa en condiciones de estrés por Pb, posiblemente para mantener la integridad osmótica y reducir la generación de ROS (Zafar et al. 2024; Elkelish et al., 2025). Esta sobreexpresión sugiere que *E. communis* activa intensamente la vía osmoprotectora de la trehalosa en raíces cuando el metal está presente, promoviendo la acumulación de este disacárido para mantener la homeostasis celular y la protección de proteínas frente al estrés por metales pesados (Sarkar y Sadhukhan et al., 2022).

Las proteínas transportadoras de iones metálicos (es decir, los transportadores de metales NRAMP) desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de diversos iones metálicos en los diferentes compartimentos celulares, ya sea expulsando metales tóxicos del citosol al exterior celular o permitiendo su secuestro en compartimentos intracelulares (Wei et. al 2016). En contraste con un estudio anterior se encontraron los efectos de la inoculación con *Rhizophagus intraradices* (Ri) bajo estrés por Cd sobre el crecimiento del arroz, la absorción de Cd junto con otros elementos y la expresión de genes de transporte de Cd, incluyendo *OsNRAMP1/5*, al tener presente que la inactivación de *OsNRAMP5* han demostrado que la pérdida de este gen reduce significativamente la acumulación de Cd en las raíces y los granos mientras que la sobreexpresión de *OsNRAMP5* promueve el transporte de Cd a las células de la raíz, pero disminuye significativamente la acumulación de Cd en las partes aéreas y los granos del arroz (Bao et. al 2025). En este estudio encontramos que plántulas inoculadas con *Phialophora livistonae* y bajo estrés con plomo mostraron un índice bajo de la expresión de este gen por lo tanto es posible

deducir que reduce de forma significativa la presencia de metal pesado en raíz, tal como se muestra en la Tabla 6, mientras que plántulas inoculadas con *Endoradiciella communis* y estresadas con plomo presentan una expresión mucho mayor del gen NRAMP tanto a nivel foliar como radicular.

Estudios han demostrado que las proteínas PRX desempeñan funciones cruciales en diversos procesos fisiológicos de las plantas, como la formación de lignina y liposomas, la reticulación de proteínas de la pared celular, el metabolismo de auxinas, el crecimiento celular y la elongación. Además, los genes *PRX* (*PER*) también pueden aumentar la resistencia al estrés al modular los niveles de especies reactivas de oxígeno en las plantas (Luo et.al 2024). De acuerdo a los datos mostrados en las Tablas 5 y 6, demuestran que las plántulas que se mantuvieron irrigadas con Pb e inoculadas con cepas de hongos endófitos presentaron una expresión mayor del gen PER, mostrando una inducción notable en el tratamiento CO8 + Pb (382.79 ± 222.56) y en menor medida en SF + Pb (128.6 ± 76.99), mientras que los demás tratamientos se mantuvieron cercanos al control.

X. CONCLUSIÓN

Este estudio aporta una nueva perspectiva ante la contaminación por metales pesados, específicamente en plantas forestales mitigando el impacto que trae como consecuencia al inhibir procesos fisiológicos. Los resultados más relevantes de esta investigación muestran que las cepas de endófitos seleccionadas de *Endoradiciella communis* y *Phialophora livistonae* respectivamente, generaron una respuesta transcripcional de forma positiva en plantas de *Pinus cembroides* induciendo a la protección de estrés oxidativo (ROS) ante el efecto simbiótico proporcionado entre la planta y el hongo, así mismo, genes de interés tuvieron una sobreexpresión por estrés ante metales pesados, tal es el caso del gen *PER* generando una respuesta de resistencia ante el estrés oxidativo y mejorando los procesos internos de la planta. Por otra parte, ante la respuesta del gen *TPPD* sugiere que la cepa de endófito refleja una alta tolerancia ante la presencia de metales pesados que se han registrado como tóxicos o que no aportan una relación positiva en plantas. La investigación demostró que la

presencia de estos contaminantes no solo afecta los procesos fisiológicos esenciales de las plantas, sino que también limita su capacidad de crecimiento, desarrollo y supervivencia.

Las respuestas transcripcionales observadas en *P. cembroides* indicaron que la interacción simbiótica con estos hongos activó mecanismos de defensa asociados a la protección contra el estrés oxidativo. En conjunto, estos hallazgos resaltan la importancia de los hongos endófitos como agentes biotecnológicos con potencial para ser utilizados en programas de restauración ecológica y fitorremediación en zonas afectadas por contaminación metálica. Asimismo, se abre la puerta a futuras investigaciones que profundicen en los mecanismos moleculares implicados y en la aplicación práctica de estas asociaciones simbióticas en diversas especies forestales. Esta aportación no solo amplía el conocimiento científico en torno al papel de los endófitos en el estrés abiótico, sino que también establece un fundamento sólido para su uso sustentable en la conservación de los ecosistemas boscosos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2022). *Substance Priority List (SPL): Top 275 Most Suspected Hazardous Substances*. <https://www.atsdr.cdc.gov/programs/substance-priority-list.html>
2. Alarcón Cueva, S. J., & Tapia Amores, N. S. (2021). *Evaluación de la presencia de metales pesados en suelos afectados por incendios forestales en una zona del Distrito Metropolitano de Quito* (Bachelor's thesis).
3. Bao, X., Liu, J., Qiu, G., Chen, X., Zhang, J., Wang, H., Zhang, Q. y Guo, B. (2025). Efecto de *Rhizophagus intraradices* en la absorción de cadmio y la expresión del gen *OsNRAMP5* en arroz. *International Journal of Molecular Sciences* , 26 (4), 1464. <https://doi.org/10.3390/ijms26041464>
4. Burt, R., Wilson, M.A., Keck, T.J., Dougherty, B.D., Strom, D.E. & Lindahl, J.A. (2003). *Trace Element Speciation in Selected Smelter-Contaminated Soils in Anaconda and Deer Lodge Valley, Montana, USA*. *Advances in Environmental Research*, 8(1), 51-67 [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00140-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00140-5)
5. Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11, 113–116 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
6. Chen, H., Yang, Z., Hu, Y., Tan, J., Jia, J., Xu, H., & Chen, X. (2016). Reference genes selection for quantitative gene expression studies in *Pinus massoniana* L. *Trees*, 30, 685-696.
7. Collin Samuel, Amritha Baskar, Deepthi Mariam Geevarghese, Mohamed Niyaz Vellala Syed Ali, Praveena Bahubali, Rajan Choudhary, Vladislav Lvov, Gabriel Ibrahim Tovar, Fedor Senatov, Sivasankar Koppala, Sasikumar Swamiappan, Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects in plants: A review, *Journal of Hazardous Materials Letters*. Volume 3, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2022.100064>.
8. Constante García, Vicenta, Villanueva Díaz, José, Cerano Paredes, Julián, Cornejo Oviedo, Eladio H., & Valencia Manzo, Salvador. (2009). Dendrocronología de *Pinus cembroides* Zucc. y reconstrucción de precipitación estacional para el Sureste de Coahuila. *Ciencia forestal en México*, 34(106), 17-39. Recuperado en

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-35862009000200002&lng=es&tlng=es.

9. Díaz Cruz E. (2016), Estructura del arbolado y regeneración de *Pinus cembroides* después de una infestación de *Dendroctonus mexicanus* y de cortas de saneamiento. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Forestales <http://eprints.uanl.mx/14373/1/1080244654.pdf>
10. Elkelish, A., Alhudhaibi, A.M., Hossain, A.S. *et al.* Alleviating chromium-induced oxidative stress in *Vigna radiata* through exogenous trehalose application: insights into growth, photosynthetic efficiency, mineral nutrient uptake, and reactive oxygen species scavenging enzyme activity enhancement. *BMC Plant Biol* **24**, 460 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05152-y>
11. EL-khawaga, Hend, Mustafa Abeer E, El khawaga Maie, Mahfouz Amira Y, Daigham Ghadir E. Efecto bioestimulante del endofítico *Aspergillus flavus* AUMC 16068 y sus respectivos exopolisacáridos en la tolerancia al estrés por plomo de la planta *Triticum aestivum* . *Representante científico* 14 , 11952 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61936-0>
12. French-Pacheco L, Cuevas-Velazquez CL, Rivillas-Acevedo L, Covarrubias AA, Amero C. Metal-binding polymorphism in late embryogenesis abundant protein AtLEA4-5, an intrinsically disordered protein. *PeerJ*. 2018 Jun 7;6 <https://peerj.com/articles/4930/>
13. Fuentes-Amaro, Sandra L., Legaria-Solano, Juan P., & Ramírez-Herrera, Carlos. (2019). ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Pinus cembroides* DE LA REGIÓN CENTRAL DE MÉXICO. *Revista fitotecnia mexicana*, 42(1), 57-65. Epub 20 de agosto de 2019. Recuperado en 14 de octubre de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000100057&lng=es&tlng=es.
14. Gao, C., Wang, C., Zheng, L., Wang, L. y Wang, Y. (2012). Un gen *LEA* regula la tolerancia al cadmio mediante la mediación de respuestas fisiológicas. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares* , 13 (5), 5468-5481. <https://doi.org/10.3390/ijms13055468>

15. Gowtham, HG, Hema, P., Murali, M., Shilpa, N., Nataraj, K., Basavaraj, GL, Singh, SB, Aiyaz, M., Udayashankar, AC y Amruthesh, KN (2024). Endófitos fúngicos como mitigadores del estrés biótico y abiótico en plantas de cultivo. *Revista de Hongos* , 10 (2), 116. <https://doi.org/10.3390/jof10020116>
16. Gupta M, Dwivedi V, Kumar S, Patel A, Niazi P, Yadav VK. Lead toxicity in plants: mechanistic insights into toxicity, physiological responses of plants and mitigation strategies. *Plant Signal Behav.* 2024 <https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2365576>
17. Gupta, M., Dwivedi, V., Kumar, S., Patel, A., Niazi, P., & Yadav, V. K. (2024). Lead toxicity in plants: mechanistic insights into toxicity, physiological responses of plants and mitigation strategies. *Plant Signaling & Behavior*, 19(1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2024.2365576>
18. Hernández-Hernández H, Juárez-Maldonado A, Benavides-Mendoza A, et al (2018) Chitosan-PVA and Copper Nanoparticles Improve Growth and Overexpress the SOD and JA Genes in Tomato Plants under Salt Stress. *Agronomy* 8:175. doi: 10.3390/agronomy8090175
19. Jun Zhou, Buyun Du, Zhangwei Wang, Wantong Zhang, Lei Xu, Xingjun Fan, Xiaoli Liu, Jing Zhou. Distributions and pools of lead (Pb) in a terrestrial forest ecosystem with highly elevated atmospheric Pb deposition and ecological risks to insects. *Science of The Total Environment*. Volume 647, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.091>
20. Kerbler SM, Armijos-Jaramillo V, Lunn JE, Vicente R. The trehalose 6-phosphate phosphatase family in plants. *Physiol Plant.* 2023 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38148193/>
21. Komárek Michael, Vladislav Chrastný, Jana Štíhová. Metal/metalloid contamination and isotopic composition of lead in edible mushrooms and forest soils originating from a smelting area. *Environment International*, Volume 33, Issue 5, 2007, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.02.001>.
22. López Aguiar Jeniffer Lisset (2023) "Remediación de suelos contaminados con cadmio empleando *Cecropia peltata* L. (guarumo) asociado con carbón activados" Quevedo. UTEQ.

- <https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/67a7f53f-0430-49d6-bb73-9337804b7512/content>
23. Lu, H., Wei, T., Lou, H., Shu, X. y Chen, Q. (2021). Una revisión crítica sobre el mecanismo de comunicación en las interacciones entre plantas y hongos endófitos para afrontar el estrés biótico y abiótico. *Journal of Fungi* , 7 (9), 719. <https://doi.org/10.3390/jof7090719>
 24. Luo W, Liu J, Xu W, Zhi S, Wang X, Sun Y. Molecular Characterization of Peroxidase (PRX) Gene Family in Cucumber. *Genes* (Basel). 2024 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39457369/>
 25. Malgorzata Domka Agnieszka, Rozpaadek Piotr, Turnau Katarzyna. Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity. Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Kraków, Poland Volume 10 - 2019 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00371>
 26. Manikandan, S.K., Elnaggar, A., Ahmady, I.M. *et al.* Endophytic *Pantoea agglomerans* enhances lead phytoremediation and stress resilience of *Calotropis procera* in hydroponic system. *Sci Rep* 15, 26712 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-04558-4>
 27. Musa, M., Jan, FG, Hamayun, M., Jan, G., Khan, SA, Rehman, G., Ali, S. y Lee, I.-J. (2023). Un aislado fúngico endofítico, *Paecilomyces lilacinus*, produce metabolitos secundarios bioactivos y promueve el crecimiento de *Solanum lycopersicum* bajo estrés por metales pesados. *Agronomía* , 13 (3), 883. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030883>
 28. Pérez-Álvarez et al. Enzimas oxidativas, plantas de tomate con plomo. *Ecosist. Recur. Agropec.* 8(3): e3163, 2021 <https://doi.org/10.19136/era.a8n3.3163>
 29. Prieto Méndez, J., González Ramírez, C. A., Román Gutiérrez, A. D., & Prieto García, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29-44.
 30. Prieto-Méndez, U. and González-Ramírez, C., Román-Gutiérrez, A., Prieto-García, F., 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados

- provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), pp. 29–44. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/25>
31. Rashid, A., Schutte, B. J., Ulery, A., Deyholos, M. K., Sanogo, S., Lehnhoff, E. A., & Beck, L. (2023). Heavy Metal Contamination in Agricultural Soil: Environmental Pollutants Affecting Crop Health. *Agronomy*, 13(6), 1521. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061521>
32. Sarkar, A. K., & Sadhukhan, S. (2022). Imperative role of trehalose metabolism and trehalose-6-phosphate signaling on salt stress responses in plants. *Physiologia Plantarum*, 174(1), e13647.
33. Su Z, Zeng Y, Li X, Perumal AB, Zhu J, Lu X, Dai M, Liu X, Lin F. The Endophytic Fungus Piriformospora Indica-Assisted Alleviation of Cadmium in Tobacco. *J Fungi* (Basel). 2021 Aug 20;7(8):675. <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/8/675>
34. Tariq, A., Tanvir, A., Barasarathi, J. *et al.* Endófitos: actores clave para la agricultura sostenible: mecanismos, perspectivas ómicas y futuro. *Plant Growth Regul* (2025). <https://doi.org/10.1007/s10725-025-01370-y>
35. Tiwari, P. y Bae, H. (2023). Tendencias en el aprovechamiento del microbioma endofítico vegetal para la mitigación de metales pesados: Una perspectiva. *Plants*, 12 (7), 1515. <https://doi.org/10.3390/plants12071515>
36. Vandesteene L, López-Galvis L, Vanneste K, Feil R, Maere S, Lammens W, Rolland F, Lunn JE, Avonce N, Beeckman T, Van Dijck P. Expansive evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in Arabidopsis 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22855938/>
37. Wang L, Yang B, Wang H, Shi J, Dong J, Zhao X, Qin G, He X, Wang M. Transcriptome analysis unveils the functional effects of ectomycorrhizal fungal colonization on cadmium tolerance of willow saplings. *Front Microbiol*. 2025 Mar 18;16:1570200. doi: 10.3389/fmicb.2025.1570200. PMID: 40170923; PMCID: PMC11958716.
38. Wang, J.-I, Li Tao, Liu G, Smith J, Zhao Z . Desentrañando el papel del endófito septado oscuro (DSE) que coloniza el maíz (*Zea mays*) bajo estrés por cadmio: aspectos fisiológicos, citológicos y genéticos. *Sci. Rep.* 6 , 22028; doi: 10.1038/srep22028 (2016). <https://www.nature.com/articles/srep22028#Bib1>

39. Warren, A., Michael, P., & Nkongolo, K. (2022). Nickel translocation, toxicity, and its effect on the expression of genes associated with nickel resistance in red pine (*Pinus resinosa*). *Ecological Genetics and Genomics*, 25, 100148.
40. Wei Yun-Fang, Tao Li, Ling-Fei Li, Jun-Ling Wang, Guan-Hua Cao, Zhi-Wei Zhao, Functional and transcript analysis of a novel metal transporter gene EpNramp from a dark septate endophyte (*Exophiala pisciphila*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.008>
41. Xu, H., Gao, X., & Yu, C. (2021). Physiological and transcriptomic analysis of *Pinus massoniana* seedling response to osmotic stress. *Biol. Plantarum*, 65, 145-156.
42. Yang Yurong, Han Xiaozhen, Lian Yang, Gosh Amith, Chen Jie, Tang Ming. The Combined Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Lead (Pb) Stress on Pb Accumulation, Plant Growth Parameters, Photosynthesis, and Antioxidant Enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. December 23, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145726>
43. Zafar, S., Khan, I.M., Ashraf, M.A. *et al.* Insights into trehalose mediated physiological and biochemical mechanisms in *Zea mays* L. under chromium stress. *BMC Plant Biol* **24**, 783 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05514-6>
44. Zárata-Castrejón José, González-Pacheco Blanca, Ruiz-Nieto Jorge, ÁvilaRamos Laura, Ávila-Ramos Fidel (2021). El árbol *Pinus cembroides* como alternativa para reforestar ciudades, parques y jardines. *Abanico Agroforestal*. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/202.1>
45. Zavaleta Huerta, Elizabeth, y Cruz-Jiménez, Héctor, y Márquez Ramírez Juan. "Potencial de infiltración de agua de lluvia a partir de la retención de una planta forestal." *Foresta Veracruzana*, vol. 14, no. 1, 2012, pp.23-28. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49724122004>
46. Zhou Yong, Zheng Yanyan, Pengwei LI, Lingjie XU, Qiang FU. Ectomycorrhizal fungi and dark septate endophyte inoculation improve growth and tolerance of *Pinus tabulaeformis* under cadmium stress, *Pedosphere*, Volume 34, Issue 2, 2024, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002016023001017?via%3Dihub>