



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**RESPUESTAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE  
*Rhizophagus intraradices* Y *Medicago sativa*  
ANTE CONTAMINACIÓN POR DIÉSEL**

**HERMINIA ALEJANDRA HERNÁNDEZ ORTEGA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2014**

La presente tesis, titulada: **Respuestas morfológicas y fisiológicas de *Rhizophagus intraradices* y *Medicago sativa* ante contaminación por diésel**, realizada por la alumna: **Herminia Alejandra Hernández Ortega**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



---

DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR



---

DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESORA



---

DRA. PAZ ALEJANDRA QUINTANAR ISAÍAS

ASESOR



---

DR. IGNACIO EDUARDO MALDONADO MENDOZA

ASESOR



---

DR. OSCAR GARCÍA BARRADAS

Montecillo, Texcoco, México, 10 de Marzo de 2014



La presente tesis “Respuestas morfológicas y fisiológicas de *Rhizophagus intraradices* y *Medicago sativa* ante contaminación por diésel”, formó parte del proyecto **SEP-CONACYT 79456**: “Simbiosis tripartita Rhizobium-Leguminosa-Micorriza arbuscular y sus respuesta a los hidrocarburos del petróleo”.

# RESPUESTAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE *Rhizophagus intraradices* Y *Medicago sativa* ANTE CONTAMINACIÓN POR DIÉSEL

Herminia Alejandra Hernández Ortega, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

Este estudio evaluó el crecimiento, cambios morfológicos, actividades fisiológicas y expresión de genes en *Medicago sativa* en respuesta al estrés por la contaminación con diésel, y por la inoculación del hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices*. Este trabajo fue dividido en cuatro capítulos que describen cuatro diferentes fases experimentales. El primer capítulo describe el efecto del diésel en el desarrollo y colonización de *R. intraradices*. El segundo capítulo presenta resultados relacionados con el crecimiento y la expresión de genes en respuesta al estrés oxidativo generado por la contaminación con diésel en *M. sativa*. El tercer capítulo describe los cambios anatómicos e hidráulicos de las plantas de *M. sativa* en presencia de diésel. El cuarto capítulo profundiza en los cambios anatómicos, hidráulicos y fisiológicos de *M. sativa* inoculada con *R. intraradices* en presencia de diésel, en donde la acumulación de superóxido y peróxido de hidrógeno fueron modificados por la simbiosis micorrízica. El hongo *R. intraradices* tiene tolerancia a la presencia del diésel al producir hifas y esporas. El umbral de la expresión de los genes evaluados en respuesta al estrés por la presencia de diésel puede estar por debajo de las concentraciones evaluadas y presentarse en un tiempo menor a la exposición al contaminante. El mecanismo de protección de *M. sativa* ante la presencia de diésel se relaciona con la construcción de más capilares conductores de un tamaño similar en la raíz, como lo indica el índice proporcional de flujo. Además, *R. intraradices* reduce de estrés oxidativo causado por la presencia de diésel, y mejora las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso en *M. sativa*. *Medicago sativa* en simbiosis con el hongo micorrízico arbuscular puede desarrollarse en sistemas contaminados con diésel, por lo que puede potencialmente emplearse en la fitorremediación de suelos contaminados, pero haciendo adecuaciones previas al suelo para favorecer su tolerancia y crecimiento.

**Palabras clave:** cambios anatómicos, estrés oxidativo, expresión génica, intercambio gaseoso.

# MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Rhizophagus intraradices* AND *Medicago sativa* UNDER DIESEL CONTAMINATION

Herminia Alejandra Hernández Ortega, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

This study evaluated the growth, morphological changes, physiological activities and gene expression in *Medicago sativa* in response to the stress induced by diesel contamination, and by the inoculation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus intraradices*. This dissertation was divided in four experimental stages (chapters). First chapter describes the effects of diesel on the development and colonization of *R. intraradices*. The second chapter shows results related to the growth and gene expression of *M. sativa* in response to oxidative stress induced by diesel contamination. The third chapter describes anatomical and hydraulic changes in *M. sativa* plants in the presence of diesel. The fourth chapter deepens in anatomical, hydraulic and physiological changes in *M. sativa* inoculated with *R. intraradices* in the presence of diesel, in which the accumulation of superoxide and hydrogen peroxide were differentially modified by the mycorrhizal condition. *Rhizophagus intraradices* showed hyphae and spore production under diesel contamination, indicating the fungal tolerance to this contaminant.. The threshold gene expression evaluated in response to diesel stress may stand in lower diesel concentrations or in shorter exposure to this contaminant. The protection mechanism of *M. sativa* in presence of diesel is related to building-up more capillary conductors of similar size in the root, as indicated by the proportional index flow. Moreover, *R. intraradices* reduces the oxidative stress caused by the presence of diesel, and improves the water relations and gas exchange in *M. sativa* plants. *Medicago sativa* in symbiosis with the arbuscular mycorrhizal fungus can develop under diesel-contaminated substrates, thus, by which they can be potentially used in phytoremediation of contaminated soils, but making previous soil adjustments.

**Keywords:** anatomical changes, oxidative stress, gene expression, gas exchange.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.

A CONACyT, por la beca proporcionada durante el periodo de Septiembre 2009-Agosto 2013 y por la oportunidad de participar en el proyecto SEP-CONACyT 79456.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por la formación y orientación académica, por confiar en mí y por todo su apoyo incondicional para la elaboración de esta tesis. Gracias por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por haberme aceptado como su estudiante durante la maestría y el doctorado.

A mi Consejo Particular: Dr. Alejandro Alarcón, Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Dra. Paz Alejandra Quintanar Isaías, Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza, Dr. Oscar García Barradas, por su incondicional ayuda y disposición a las consultas para mejorar el trabajo científico, por sus sugerencias y por su apoyo para la realización de esta tesis.

Al CIIDIR Sinaloa, por su apoyo durante mi estancia en sus instalaciones. Dr. Ignacio, Dra. Melina, Dra. Claudia, Dr. Carlos, Dr. Sergio, gracias por el uso de sus laboratorios. Juan Carlos, Dra. María Elena, Isela, Alicia, Karla, Damián, Glenda, Raquel, Alejandro, Daniel, Alejandra González, Rocío, Lucy, Arlene, Claudia María, Rey David, Areli, muchísimas gracias por todo su apoyo durante mi estancia en el CIIDIR y por su valiosa amistad.

A la familia López-Meyer, Dr. Ignacio, Dra. Melina, Daniel y Rebeca, gracias por todo su apoyo y amistad durante mi estancia en Guasave.

A Grisel y a la Sra. Silvia por su amistad y compañía durante mi estancia en guasave. Además, muchas gracias por sus consejos y por los momentos que pasamos juntas.

Al laboratorio de Maderas de la UAMI, Dra. Alejandra, Dra. Carmelita, Ana Teresa, Julieta, Gaby, Claudia, Berenice. Gracias a su apoyo y colaboración ya tenemos aceptada la primera publicación derivada del trabajo que realizamos juntas.

A la Dra. Alejandra Quintanar, por confiar en mí e interesarse en el tema de contaminación. Ale muchísimas gracias por todo tu apoyo, por tu valiosa amistad y sobre todo por el conocimiento que me has brindado.

Al Dr. Isaías, por su apoyo en el análisis estadístico de los datos presentados en el congreso de Ecología.

A los investigadores del Área de Microbiología: Dr. Juan José Almaraz, Dr. Jesús Pérez, Dr. Julián Delgadillo, M.C. María Encarnación Lara, por el espacio y apoyo brindado en los laboratorios de Fijación y de Micorrizas.

Al personal del Área de Microbiología por su apoyo en el laboratorio: Sr. Edmundo Martínez, Sr. Lorenzo Viana, Sr. Manuel Solano. A Rosario Galicia por todas sus atenciones y disponibilidad en cualquier trámite administrativo.

A mis compañeros y amigos que son muchísimos, por su valiosa amistad, por compartir alegrías, tristezas y logros personales. Espero seguir contando con todos ustedes: Claus, Vivian, Rosalba, Blanca, Esmeralda, Miguel Ángel, Virginia, Mario, Eliseo, Mariela, José Luis, Claudia De la Rosa, Alicia, Yessica, Francisco, Cristina Arteaga, Violeta, Elvia, Magda, Esther, Judith, Cristina Heredia, Yadira, Apolinar, Juan, Brigsania, Deysi, Faustino, Raúl, Laura, Salvador, Azaarel, Azucena, David, Tania, Gilberto, Eric, Lucio.

A Claus, Vivian y Ros por ser mis amigas, y porque me han alentado a seguir superándome.

A la Dra. Rosalva Garcia, por incursionarme en el estudio de los hongos micorrízicos.

A Remedios de la oficina de la coordinación de Postgrado, a la Licenciada Padilla y las secretarias que trabajan en la oficina de Servicios Académicos, por su apoyo, atención y disponibilidad en cualquier trámite administrativo.

A mis hermanos Hugo y Rogelio por su apoyo en parte de los experimentos de laboratorio, a mi papá por todas las noches que tuvo que recogerme en el colegio y a mi mamá por su paciencia.

## DEDICATORIAS

A DIOS, por permitirme estar con mis seres queridos y mis amigos, me has guiado por en el camino de la fe y me brindas las fuerzas necesarias para continuar con mi vida y lograr las metas que me he puesto.

A mis PADRES, por brindarme todo su cariño, por su trabajo y esfuerzo por darnos la mejor educación, gracias por compartir sus experiencias, por preocuparse porque seamos algo mejor en la vida, por acompañarnos en cada fase de nuestro desarrollo, y por darme la vida.

A mis HERMANOS: Antonio, Hugo y Rogelio. No somos los mejores hermanos pero siempre nos hemos apoyado en los momentos difíciles. Sigán progresando, siendo buenas personas y no dejen de luchar para salir adelante, porque vienen momentos difíciles para todos.

A mi sobrino Jesús Antonio, para que en el futuro tengas una fuente de inspiración y llegues a ser un profesionista.

A mis queridas AMIGAS: Claus, Vivian, Rosalba, Esmeralda, Virginia, Mariela, Alicia, Karla, Julieta y Grisela. Me han apoyado en los momentos más difíciles de mi vida, y a cada momento me motivan para seguir adelante.

Claus, más que amiga eres como mi hermana, siempre estás ahí para apoyarme, gracias por todos estos años de amistad.

A Luis Adrian, que de alguna forma has sido mi motivo de superación. Cuando siento que ya no puedo más, me acuerdo de ti y sigo luchando para lograr el triunfo. No olvides que siempre podrás contar conmigo y a donde quiera que vayas, Cuídate y se Feliz (Te Amo).

## CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
Objetivo General	3
Objetivos Particulares	3
Hipótesis General	4
Hipótesis Particulares	4
CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA	
La asociación planta-microorganismo ante contaminación con diésel, y su efecto en respuestas morfológicas y fisiológicas de plantas	5
Los combustibles y su impacto en el suelo	5
Los contaminantes orgánicos como inductores de estrés abiótico en plantas	8
Las plantas y su adaptación a la contaminación por hidrocarburos	12
Plantas útiles en procesos de fitorremediación	14
<i>Medicago sativa</i>	15
Asociación micorrízica	17
Hongos micorrízicos arbusculares	18
Asociación hongo micorrízico arbuscular-planta durante la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos	19
Discusión general de la revisión de literatura y justificación	21
CAPÍTULO IV.	
Desarrollo de <i>Rhizophagus intraradices</i> en cultivo monoxénico en presencia de diésel	23
Resumen	23
Abstract	24
Introducción	25
Material y Métodos	26
Establecimiento de cultivos monoxénicos en caja dividida	26
Establecimiento de cultivos en caja completa	26
Análisis estadístico	27
Resultados	27
Desarrollo de cultivo monoxénico en caja dividida	27
Desarrollo de cultivos monoxénicos en caja completa	28
Discusión	32

	Página
Conclusiones	34
<b>CAPÍTULO V.</b>	
Tolerancia y expresión génica de <i>Medicago sativa</i> en sustrato contaminado con diésel	35
Resumen	35
Abstract	36
Introducción	36
Material y Métodos	38
Establecimiento del experimento	38
Extracción de ARN total y cuantificación	39
Transcripción reversa	39
Cuantificación de ADNc	40
Cuantificación de los niveles de expresión de genes mediante PCR en tiempo real (qPCR)	40
Nivel de expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$	41
Diseño experimental y análisis estadístico	42
Resultados	42
Discusión	45
Conclusiones	48
<b>CAPÍTULO VI.</b>	
Efecto del diésel sobre la conductividad hidráulica y cambios morfológicos del cilindro vascular en <i>Medicago sativa</i>	49
Resumen	49
Abstract	50
Introducción	50
Material y Métodos	53
Establecimiento del experimento y condiciones de crecimiento	53
Medición de tamaño de la planta, flujo de agua, conductividad hidráulica ( $K_h$ ), conductividad hidráulica específica ( $K_s$ ) y porcentaje de pérdida de conductividad (PLC)	53
Medición del potencial hídrico en hoja ( $\Psi_h$ ) y del área foliar	55
Caracterización microscópica del sistema vascular en raíces	56
Diseño experimental y análisis estadístico	57
Resultados	57
Tamaño de la planta, área foliar, potencial hídrico de las hojas ( $\Psi_h$ ) y parámetros hidráulicos ( $K_h$ , $K_s$ , PLC)	57
Cambios anatómicos en el cilindro vascular de raíces primarias	59
Discusión	63

	Página
Conclusiones	66
<b>CAPÍTULO VII.</b>	
Efecto de la micorrización en la conductancia de agua, variables fotosintéticas y estrés oxidativo en plantas de <i>Medicago sativa</i> en contaminación por diésel	68
Resumen	68
Abstract	69
Introducción	70
Material y Métodos	72
Establecimiento del experimento y condiciones de crecimiento	72
Medición del tamaño de la planta, parámetros hidráulicos ( $k_{xilema}$ , $k_{estela}$ , $k_{foliar}$ ) e intercambio gaseoso	73
Medición del potencial hídrico en hoja ( $\Psi_h$ ) y del área foliar	74
Caracterización microscópica del sistema vascular en raíz, tallo y hoja	75
Evaluación de la formación de especies reactivas de oxígeno en raíces	75
Evaluación de la colonización micorrízica	76
Diseño experimental y análisis estadístico	76
Resultados	76
Variables de crecimiento, parámetros hidráulicos ( $k_{xilema}$ , $k_{estela}$ , $k_{foliar}$ ), potencial hídrico en la hoja e intercambio gaseoso	76
Cambios morfológicos en el tallo de <i>Medicago sativa</i>	81
Formación de especies reactivas de oxígeno en raíces	82
Colonización micorrízica	87
Discusión	88
Conclusiones	91
<b>CAPÍTULO VIII.</b>	
Discusión general de resultados y conclusiones generales	92
<b>LITERATURA CITADA</b>	96
<b>ANEXOS</b>	
Anexo I	112
Anexo II	113
Anexo III	126
Anexo IV	127
Anexo V	129

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 5.1. Oligonucleótidos utilizados en qPCR para el análisis de expresión diferencial	40
Cuadro 5.2. Expresión relativa de genes relacionados a estrés por diésel en plantas de alfalfa	45
Cuadro 6.1. Efecto de la contaminación por diésel en la longitud de la planta, área foliar, potencial hídrico ( $\Psi_h$ ) y porcentaje de pérdida de la conductividad (PLC) en plántulas de <i>Medicago sativa</i> , diez días después de la germinación	58
Cuadro 6.2. Efecto de la contaminación por diésel en la conductividad hidráulica ( $K_h$ ) y en la conductividad hidráulica específica ( $K_s$ ) en raíces de plántulas de <i>Medicago sativa</i> , diez días después de la germinación	59
Cuadro 6.3. Efecto de la contaminación por diésel en el diámetro de raíces y cilindro vascular, en el diámetro y número de vasos en el cilindro vascular y en el índice proporcional de flujo de plántulas de <i>Medicago sativa</i> , diez días después de la germinación	61
Cuadro 7.1. Peso seco, área foliar y altura en plantas de <i>Medicago sativa</i> establecidas en arena contaminada con diésel, 30 días después de la inoculación con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA)	77
Cuadro 7.2. Efecto de la contaminación por diésel en el diámetro de tallo y de la estela, y en el diámetro y número de vasos de xilema en la estela de plantas de <i>Medicago sativa</i> , 30 días después de la inoculación con <i>Rhizophagus intraradices</i> (HMA)	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1. Hojas trifoliadas y flores púrpuras durante el desarrollo de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	16
Figura 4.1. Efecto del diésel en el desarrollo de micelio extraradical de <i>Rhizophagus intraradices</i> en cultivo monoxénico, después de ocho semanas	28
Figura 4.2. Desarrollo de raíces transformadas de zanahoria sin colonizar y colonizadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> en caja Petri con medio M, después de 20 semanas de crecimiento	29
Figura 4.3. Peso de raíces transformadas de zanahoria ( <i>Daucus carota</i> ) después de 20 semanas de crecimiento en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de diésel	30
Figura 4.4. Colonización micorrizica en raíces transformadas de zanahoria ( <i>Daucus carota</i> ) colonizadas por <i>Rhizophagus intraradices</i> después de 20 semanas de crecimiento en ausencia o presencia de diésel	31
Figura 4.5. Efecto del diésel en el desarrollo de micelio extrarradical de <i>Rhizophagus intraradices</i> en cultivo monoxénico, después de 20 semanas	32
Figura 5.1. Peso seco de la parte aérea y de la raíz, altura de la planta y longitud de la raíz en plantas de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) crecidas en sustrato contaminado con diésel, después de 30 días	43
Figura 5.2. Número de hojas en plantas de alfalfa crecidas en sustrato contaminado con diésel, después de 30 días	44
Figura 6.1. Sistema de mangueras para la evaluación de conductividad hidráulica en raíces de <i>Medicago sativa</i>	54
Figura 6.2. Cortes transversales de raíz primaria de <i>Medicago sativa</i> crecidas bajo contaminación con diésel, teñidas con azul de toluidina	62
Figura 6.3. Efecto de la contaminación con diésel en el índice de flujo ( $IF = r^4 \cdot \text{número de vasos de xilema}$ ) en raíz primaria de <i>Medicago sativa</i> , diez días después de la germinación	63
Figura 7.1. Sistema de mangueras para la evaluación de la conductancia de agua en plantas de <i>Medicago sativa</i>	73
Figura 7.2. Conductancia de xilema, de estela y foliar en plantas de <i>Medicago sativa</i> establecidas en arena contaminada con diésel e inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> , después de 30 días de la inoculación	78

- Figura 7.3. Potencial hídrico en la hoja ( $\Psi_h$ ) y variables fotosintéticas medidas en plantas de *Medicago sativa* establecidas en arena contaminada con diferentes concentraciones de diésel a los 30 días después de la inoculación con *Rhizophagus intraradices* 80
- Figura 7.4. Detección fluorescente del anión superóxido ( $O_2^-$ ) con DHE usando microscopía confocal de barrido láser en raíces de *Medicago sativa* crecidas en contaminación con diésel, sin o con la inoculación del hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices* 83
- Figura 7.5. Perfil de intensidad de la fluorescencia de  $O_2^-$  a lo largo de la línea indicada en la raíz de *Medicago sativa* crecida en contaminación con diésel, sin o con la inoculación del hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices* 84
- Figura 7.6. Detección fluorescente del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con  $H_2DCF-DA$  usando microscopía confocal de barrido láser en raíces de *Medicago sativa* crecidas en contaminación con diésel, sin o con la inoculación del hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices* 85
- Figura 7.7. Perfil de intensidad de la fluorescencia de  $H_2O_2$  a lo largo de la línea indicada en la raíz de *Medicago sativa* crecida en contaminación con diésel, sin o con la inoculación del hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices* 86
- Figura 7.8. Colonización micorrízica de *Rhizophagus intraradices*, medida por tinción con azul de tripano en raíces de *Medicago sativa* 87

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo con hidrocarburos de petróleo es un problema ambiental, que está recibiendo atención y está motivando la creación de metodologías para la eliminación de estos compuestos tóxicos. La contaminación de suelos más importante es la ocasionada por los derrames de petróleo que genera la pérdida de ambientes y de la diversidad de microorganismos, especies vegetales y animales (Pérez *et al.*, 2002). Todos los procesos de remediación biológica aprovechan la capacidad degradativa de los microorganismos del suelo y en algunos casos también, la capacidad de destoxificación vía plantas. La fitorremediación se refiere al uso de las plantas con capacidad para extraer, inmovilizar o eliminar contaminantes.

Las plantas establecidas en suelos contaminados con hidrocarburos se ven limitadas en su crecimiento debido a la baja disponibilidad de agua y nutrientes (Merkl *et al.*, 2005a), lo cual afecta las respuestas fisiológicas de las plantas, ya que el agua es requerida como disolvente para sus actividades bioquímicas. Bajo condiciones naturales, la sequía es la principal causa del estrés hídrico de la planta (Xiong y Zhu, 2002). Sin embargo, al existir un problema de contaminación por petróleo en el suelo, el agua disponible para las plantas se ve reducida por el efecto hidrofóbico que causa el contaminante sobre las mismas (Morley *et al.*, 2005; Peña-Castro *et al.*, 2006).

La mayor parte de los estudios relacionados con la evaluación de la influencia de hidrocarburos en las plantas, está generalmente enfocada a los efectos que éstos compuestos tóxicos generan en el establecimiento y en el desarrollo de las plantas (Adedokun y Ataga, 2007; Nogueira *et al.*, 2011). Sin embargo, los trabajos realizados para la evaluación de los efectos tóxicos de los hidrocarburos del suelo, solo se han enfocado en la estructura morfoanatómica de

la planta (Maranho *et al.*, 2006; Inckot *et al.*, 2008) y en el potencial que las plantas tienen para favorecer la disminución de los contaminantes (Cheema *et al.*, 2010; Hamdi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012).

La inoculación de plantas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se ha enfocado a la evaluación de la ayuda que estos hongos proporcionan a la planta, principalmente, en la adquisición de nutrimentos y agua (Quoreshi y Khasa, 2008, Benabdellah *et al.*, 2011; Ruiz-Lozano *et al.*, 2012). Aunque la inoculación y los beneficios de HMA han sido evaluados exitosamente en varias plantas hortícolas, ornamentales y especies forestales, algunos estudios se han enfocado a entender el papel de HMA en las plantas establecidas en suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos (Verdin *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008a; Gao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). Por otra parte, la contaminación con hidrocarburos del petróleo (HP) genera estrés oxidativo en las plantas, incrementando los niveles de peróxido de hidrógeno en hojas y reduciendo la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las plantas al ser inoculadas con HMA tienen la capacidad de reducir el daño oxidativo generado por HP. Por lo que, en este trabajo se evaluó el efecto de la contaminación con diésel en el crecimiento de plantas, parámetros hidráulicos, cambios anatómicos y expresión de genes en plantas de *Medicago sativa*. Además, en este estudio se evaluaron los efectos de la inoculación de HMA, en el crecimiento, estado hídrico, intercambio gaseoso, y producción de especies reactivas de oxígeno en plantas de *Medicago sativa*.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### Objetivo General

- Evaluar el crecimiento, cambios morfológicos, actividades fisiológicas y expresión de genes en *Medicago sativa* en respuesta al estrés por la contaminación con diésel, y por la inoculación del hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices*.

#### Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto del diésel en la colonización y el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* en raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.) transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en cultivo monoxénico.
- Evaluar el efecto del diésel en el crecimiento de plantas de *Medicago sativa* y medir los niveles de expresión de los genes *APX-2*, *FeSOD*, *MnSOD*, *CuZnSOD* y *MHI* en hojas y raíces de plantas de *Medicago sativa* en respuesta a la contaminación por diésel.
- Determinar los cambios anatómicos y en la conductividad hidráulica de *Medicago sativa* por efecto de diferentes concentraciones de diésel.
- Evaluar el efecto de *Rhizophagus intraradices* en el crecimiento, estado hídrico, intercambio gaseoso, y producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en plantas de *Medicago sativa* en condiciones de estrés por diésel.

## Hipótesis General

- La contaminación con diésel disminuye el crecimiento, la actividad fisiológica y la expresión de genes en *Medicago sativa*, mientras que la inoculación del hongo micorrízico arbuscular atenúa el estrés inducido por el contaminante.

## Hipótesis Particulares

- El diésel disminuye la colonización y el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* en raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.) transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* en cultivo monoxénico.
- El diésel disminuye el crecimiento de plantas de *Medicago sativa*, mientras que la expresión de los genes *APX-2*, *FeSOD*, *MnSOD*, *CuZnSOD* y *MHI* en hojas y raíces de plantas de *Medicago sativa* incrementa en respuesta al estrés generado por el contaminante.
- El estrés hídrico inducido por el diésel provoca cambios anatómicos y en la conductividad hidráulica de raíces de *Medicago sativa*.
- La inoculación de *Rhizophagus intraradices* mejora el estado hídrico y el intercambio gaseoso, además de reducir la formación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y de peróxido de hidrógeno en plantas ( $H_2O_2$ ) de *Medicago sativa* bajo estrés por diésel.

## CAPÍTULO III

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### **La asociación planta-microorganismo ante contaminación con diésel, y su efecto en respuestas morfológicas y fisiológicas de plantas**

##### **Los combustibles y su impacto en el suelo**

La petroquímica es la base del desarrollo económico y social de México, y cada año se extraen cerca de un millón de toneladas de petróleo de yacimientos subterráneos, aunque desafortunadamente también es responsable de graves problemas ambientales (Bracho *et al.*, 2005). En los últimos años las causas que han generado problemas ambientales en suelos y ecosistemas acuáticos según CENAPRED (2001) son: 1) escaso mantenimiento de las instalaciones petroleras, 2) manejo inadecuado y abandono de materiales y residuos peligrosos, 3) explosiones en instalaciones de alto riesgo, y 4) derrames accidentales de hidrocarburos. Las estadísticas de la PROFEPA (2009) muestran que cada año en México ocurren en promedio 300 accidentes ambientales asociados con materiales y residuos peligrosos. Los compuestos peligrosos comúnmente involucrados en emergencias ambientales son el petróleo y sus derivados (gasolina, combustóleo, diésel, etc.), agroquímicos, gas LP y natural, entre otros.

De esta manera, la contaminación de ambientes naturales con sustancias derivadas del petróleo ha sido un tema principal en ecología. La migración de las sustancias del petróleo hacia los cuerpos de agua, el agua del suelo y el propio suelo puede tener serias consecuencias debido a la alta toxicidad y naturaleza carcinogénica de algunos componentes. Las sustancias derivadas del petróleo afectan los elementos abióticos y bióticos de un ecosistema. Por lo que, la contaminación del suelo con estos compuestos orgánicos derivados del petróleo es un grave

problema debido al daño que causan a todos los organismos vivos (Ziółkowska y Wyszowski, 2010).

Los efectos de la contaminación varían de acuerdo con el tipo y la cantidad de petróleo o de sus derivados, además de su concentración, tiempo de exposición, época del año, tipo de suelo, y especialmente la especie vegetal (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Brandt *et al.*, 2006; Kayode *et al.*, 2009; Kusic *et al.*, 2009). El contaminante puede ser absorbido por las plantas (Alkio *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005), además de alterar las propiedades del suelo (Li *et al.*, 1997; Chupakhina y Maslennikov, 2004; Peña-Castro *et al.*, 2006). Los compuestos orgánicos polares presentes en los hidrocarburos del petróleo, son probablemente responsables de la hidrorrepelencia en suelos contaminados, limitando así la absorción de agua por las plantas (Morley *et al.*, 2005; Peña-Castro *et al.*, 2006), lo cual se manifiesta como sequía fisiológica que interfiere con el aprovechamiento y la absorción de agua y nutrientes, y en el intercambio gaseoso (Adenipekun *et al.*, 2008; Omosum *et al.*, 2009). En consecuencia, estas sustancias pueden alterar la germinación de semillas (Adam y Duncan, 2002; Ogbo, 2009), y el crecimiento (Merkl *et al.*, 2004) y producción de biomasa (Sharifi *et al.*, 2007; Hernández-Ortega *et al.*, 2012). El tipo de contaminante afecta el crecimiento de las plantas de distinta manera; aunque los productos derivados del petróleo son fitotóxicos, su toxicidad no es la misma (Njoku *et al.*, 2009a, Ziółkowska y Wyszowski, 2010). Adedokun y Ataga (2007) encontraron diferencias en la germinación y crecimiento de *Vigna unguiculata* creciendo en suelo contaminado con petróleo crudo, gasolina y aceite de motor. En general, la presencia de hidrocarburos en el suelo interfiere negativamente en el desarrollo de la planta (Nogueira *et al.*, 2011). Sin embargo, la estructura morfo-anatómica de la planta puede también ser afectada por los hidrocarburos del suelo (Maranho *et al.*, 2006; Inckot *et al.*, 2008).

El diésel es un producto derivado del petróleo y constituye el principal origen de contaminación ambiental. El incremento del uso del diésel en los motores de autos y camiones, y en los generadores de luz ha dado lugar a un notable aumento en la demanda de este combustible (Ogbo, 2009). Por lo que, se han incrementado los derrames accidentales y la contaminación de los suelos agrícolas (Njoku *et al.*, 2009b). La degradabilidad del diésel depende de la estructura química de sus componentes. El diésel está principalmente compuesto de una mezcla compleja de hidrocarburos, la cual consiste del 75% de *n*-alcanos (C12-C26) y 25% de hidrocarburos aromáticos incluyendo los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Douglas *et al.*, 1992; Marchal *et al.*, 2003; Khalladi *et al.*, 2009; Njoku *et al.*, 2009a; Mackinon y Duncan, 2013). Los *n*-alcanos son más rápidamente degradables que los cicloalcanos e isoalcanos (cadenas de carbono ramificadas) que son comúnmente más recalcitrantes (Marchal *et al.*, 2003), mientras que los hidrocarburos de bajo peso molecular como por ejemplo, el combustóleo, son más tóxicos que los de alto peso molecular (Chaîneau *et al.*, 1997). Los componentes más tóxicos y persistentes del diésel son los hidrocarburos policíclicos aromáticos, debido a sus propiedades hidrofóbicas, recalcitrantes, carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas (Johnsen y Karlson, 2007; Patrolecco *et al.*, 2010; Wölz *et al.*, 2011).

El diésel es hidrofóbico y su movimiento en el perfil del suelo es altamente dependiente de las características del suelo, como el tamaño de partícula y el contenido de materia orgánica. La materia orgánica debido a su característica hidrofóbica se une al diésel y retarda su movimiento a través del suelo (Adam *et al.*, 2002). El diésel es uno de los combustibles más fitotóxicos que se encuentra en sitios contaminados, y sus efectos sobre las plantas son variables e inician después de la disrupción de la relación planta-agua en el suelo (Njoku *et al.*, 2009a). Además, la biomasa de la parte aérea y de la raíz es afectada; por ejemplo, Hou *et al.* (2001)

encontraron que la biomasa de la parte aérea de *Lolium perenne*, crecido en suelo contaminado con 5 mg g<sup>-1</sup> de diésel, fue reducida en más del 50% comparado con un control sin contaminante; mientras que la biomasa de la raíz no fue severamente afectada al mostrar sólo 20% de reducción. Otro estudio demostró que la reducción de la biomasa de la parte aérea de *Melilotus albus* fue del 80% en comparación con el control sin contaminar, mientras que la biomasa de la raíz se redujo en 40% dependiendo de la concentración de diésel (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). El establecimiento de plantas en suelos contaminados con diésel puede ser problemático si las concentraciones del combustible en el suelo son altas; sin embargo, los niveles de tolerancia dependerán de la especie vegetal con la que se trabaje (Adam y Duncan, 2002, 2003; Hernández, 2009; Kroening *et al.*, 2001). Además, el diésel afecta la fotosíntesis de las plantas por el daño causado a las clorofilas y a los fotosistemas. Por ejemplo, se ha demostrado que la concentración de clorofila disminuye linealmente con el incremento de la concentración de diésel, incluso a niveles bajos de contaminación (0.1-100 mg kg<sup>-1</sup>) (Green *et al.*, 1996; Njoku *et al.*, 2009a).

### **Los contaminantes orgánicos como inductores de estrés abiótico en plantas**

El principal efecto fisiológico por la presencia de contaminantes orgánicos en las plantas, es la reducción del crecimiento debido a la generación de estrés osmótico y estrés oxidativo. Durante el estrés osmótico el daño comienza inmediatamente después de que la concentración del contaminante en la rizosfera aumenta por encima del nivel de tolerancia de la planta, debido al efecto hidrofóbico que limita la disponibilidad del agua para las raíces, y como consecuencia se inhibe el crecimiento, se reduce la división y elongación celular, y se disminuye el área foliar y la tasa fotosintética (Njoku *et al.*, 2009b; Oguntimehin *et al.*, 2010). Un aspecto

secundario de la contaminación en plantas es el estrés inducido por la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las que se incluyen el radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), radical hidroperoxilo ( $HO_2^-$ ), radical peroxilo ( $RO_2^-$ ) y radical alcoxilo ( $RO^\cdot$ ) (Parent *et al.*, 2008; Garg y Manchanda, 2009; Gill y Tuteja, 2010).

Este daño oxidativo se manifiesta por la alteración de biomoléculas fundamentales como azúcares, lípidos, proteínas, ADN y vitaminas (Foyer y Noctor, 2005). Las ERO actúan sobre las cadenas laterales en los residuos aminoacídicos, fragmentando la proteína o formando uniones entre ellas (Therond *et al.*, 2000). Los ácidos grasos que no solo actúan como reserva metabólica sino que además forman parte de los fosfolípidos de la membrana y regulan la fluidez de ésta, son particularmente susceptibles al ataque por ERO generando la peroxidación de lípidos (Koca *et al.*, 2007). La peroxidación conlleva cambios importantes en la estructura y función de las membranas, alterando el potencial eléctrico, inhibiendo el transporte de metabolitos, modificando los receptores de hormonas y la producción de mensajeros químicos (Nandwal *et al.*, 2007). El estrés oxidativo también ocasiona la alteración y ruptura de la cadena de ADN, la cual reacciona con  $OH^\cdot$ , en donde se pueden originar mutaciones (Møller *et al.*, 2007). La acumulación de ERO durante el estrés provoca efectos adversos en la planta, por lo que ésta ha desarrollado mecanismos de defensa mediante la producción de un complejo sistema antioxidante conformado por moléculas enzimáticas y no enzimáticas que controlan el nivel de ERO, para mitigar y reparar el daño oxidativo celular (Miller *et al.*, 2008). Más aún, se ha avanzado en la implicación de las ERO en las plantas, como moléculas asociadas a la transducción de señales que se desencadenan ante las situaciones de estrés (Foyer y Noctor, 2009).

Los antioxidantes enzimáticos están constituidos por un conjunto de enzimas, localizadas en diferentes compartimentos celulares, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y las enzimas del ciclo Halliwell-Asada o ascorbato-glutation [ascorbato peroxidasa (APX), dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y glutatión reductasa (GR)] (Blokhina *et al.*, 2003). La SOD es una metaloenzima que lleva a cabo la eliminación del  $O_2^-$  mediante una reacción de dismutación (Rubio *et al.*, 2007). Existen tres tipos de SOD dependiendo del metal que utilizan como cofactor: cobre y zinc (CuZnSOD), manganeso (MnSOD) o hierro (FeSOD), los tres tipos de enzimas están localizadas en diferentes compartimentos de la célula. En general, las CuZnSOD se localizan en cloroplastos, peroxisomas y citosol, las MnSOD en mitocondrias y peroxisomas, y las FeSOD en cloroplastos (Alscher *et al.*, 2002).

La CAT es una hemoproteína tetramérica ampliamente distribuida en las plantas, elimina el  $H_2O_2$  sin requerir el aporte de poder reductor; contrario a las reacciones catalizadas por las peroxidasa, la CAT presenta baja afinidad por el  $H_2O_2$ , lo que determina que sea poco eficiente en la eliminación de concentraciones bajas de  $H_2O_2$ . En las plantas, la mayoría de las CAT están localizadas en los peroxisomas donde la concentración de  $H_2O_2$  es muy alta; sin embargo, está ausente en citoplasma y cloroplastos, donde la eliminación del  $H_2O_2$  es llevada a cabo por la APX y por otras POX (Corpas *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2010). Las POX pertenecen a una gran familia de enzimas que se encuentran en hongos, plantas y vertebrados. En plantas, el número de isoenzimas puede ser extremadamente alto, hasta 40 genes codifican para las POX en una planta, y varias modificaciones postranscripcionales y postransduccionales pueden generar otras isoformas (Balen *et al.*, 2003), además el patrón de expresión es específico del tejido (Hiraga *et al.*, 2000). Las POX catalizan la destrucción del  $H_2O_2$ , mientras que las peroxidasa

que oxidan guaiacol *in vitro*, se llaman de forma genérica guaiacol peroxidasas (GPX) y se localizan en citosol, vacuola, pared celular y apoplasto (Ghamsari *et al.*, 2007). Aparte de su función como antioxidantes, las peroxidasas pueden participar en diferentes procesos fisiológicos como: alargamiento de la célula, biosíntesis y degradación de lignina, catabolismo de auxinas, y respuesta de defensa a heridas (Yoshida *et al.*, 2003).

Entre los antioxidantes no enzimáticos destacan los carotenoides, tocoferoles, flavonoides, ascorbato y glutatión, que funcionan directamente como sistema de defensa antioxidante o indirectamente como cofactor de distintas actividades enzimáticas (Shao *et al.*, 2008). El ascorbato o vitamina C, en su forma reducida (AsA) juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo y en la respuesta al estrés en la planta (Debolt *et al.*, 2007). Es un compuesto reductor hidrosoluble abundante en plantas, identificado en distintos tipos de células, orgánulos y apoplasto, y actúa como cofactor de enzimas antioxidantes que destruyen diferentes ERO. El AsA influye en diversas actividades enzimáticas y reduce el daño oxidativo en una función sinérgica con otros antioxidantes (Foyer y Noctor, 2005). El glutatión es un triol tripéptido (ácido glutámico-glicina-cisteína), detectado en citosol, retículo endoplásmico, vacuola y mitocondria (Blokhina *et al.*, 2003), y su síntesis implica dos etapas dependientes de ATP, la primera catalizada por la enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa y la segunda por la glutatión sintetasa (Herrera *et al.*, 2007). El glutatión reducido (GSH) actúa destruyendo directamente ERO, o a través del ciclo ascorbato-glutatión; su función como antioxidante reside en el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el cual tras oxidarse establece un puente disulfuro con el grupo tiol de una segunda molécula de GSH para formar glutatión oxidado (GSSG), de esta forma elimina por reacción directa el  $\text{OH}^\cdot$ , el  $\text{O}_2^\cdot$  y radicales orgánicos, además participa en la reducción del DHA a AsA, mediante la reacción catalizada por la dehidroascorbato reductasa. La

función del GSH se hace más evidente en condiciones de estrés (Foyer *et al.*, 2001). También posee otras funciones como transporte y almacenamiento de azufre, control del estado redox de la célula, protección de los grupos tiol de las proteínas, participación en el ciclo celular, inducción de expresión de genes de defensa ante patógenos, percepción y respuesta en estrés abiótico actuando como sensor celular, producción de fitoquelatinas, desintoxicación de metales pesados y de compuestos xenobióticos (Foyer y Noctor, 2005).

### **Las plantas y su adaptación a la contaminación por hidrocarburos**

El transporte de agua es esencial para la fijación de carbono en las plantas terrestres. El transporte de agua normalmente ocurre en estado metaestable, es decir, mientras que el agua del xilema está bajo presión negativa de acuerdo con la teoría tensión-cohesión. Cuando los conductos de xilema contienen agua metaestable son propensos a la cavitación, evento que ocurre cuando la continuidad de una columna de agua se rompe y el aire desplaza el agua en un conducto del xilema. Prácticamente la evolución de todos los organismos terrestres (plantas y animales) depende de la fuente de alimento y energía, los cuales están relacionados al método precario por el cual se transporta el agua (Cai y Tyree, 2010).

La conductividad hidráulica, es uno de los principales parámetros que reflejan la capacidad de la raíz para absorber agua de la rizosfera (Li y Liu, 2010), y tiene una estrecha correlación con las relaciones hídricas de la planta en condiciones normales y en situaciones de estrés (Mu *et al.*, 2006). La cavitación inducida por estrés hídrico es una de las principales limitantes para el establecimiento de plantas en ambientes con baja disponibilidad de agua (McDowell *et al.*, 2008; Kursar *et al.*, 2009). La cavitación del xilema y el embolismo (saturación con aire o vapor de agua de los elementos xilemáticos) resultante, conducen a la

disminución de la conductividad hidráulica del órgano afectado (Gil-Pelegrin *et al.*, 2005; Ortega y Collazo, 2013). Esta reducción en la capacidad hidráulica influye en el estado hídrico foliar, impone limitaciones sobre el intercambio gaseoso de la hoja y en última instancia, el crecimiento y desarrollo de la planta (Davis *et al.*, 2002; Brodribb y Cochard, 2009). Aquellas especies adaptadas a ambientes secos o que han sufrido estrés hídrico son menos vulnerables a la cavitación y por lo tanto, mantienen la capacidad de transportar el agua a potenciales hídricos más negativos (Choat *et al.*, 2010). El balance de agua está determinado principalmente por la tasa de absorción de agua por las raíces, el transporte de agua a través de la planta y la pérdida de agua por transpiración (Marjanović *et al.*, 2005). En consecuencia, se considera que la raíz es un enlace crítico en el continuo suelo-planta-atmósfera (Javot y Maurel, 2002).

Como se ha mencionado, los hidrocarburos se unen a la superficie de las raíces creando un ambiente hidrofóbico limitando la absorción de agua, y la toxicidad de los compuestos del petróleo también limitan la respiración celular (Issoufi *et al.*, 2006). La contaminación con petróleo crudo afecta la emergencia de las plantas debido a una toxicidad directa del embrión o por el desarrollo de un ambiente anaeróbico e hidrofóbico en el suelo. El modo de acción de un contaminante orgánico en las raíces se atribuye a la disrupción celular como un efecto directo sobre la respiración mitocondrial o indirectamente a través del crecimiento y división celular (Issoufi *et al.*, 2006).

Los contaminantes orgánicos penetran en las células vegetales causando cambios significativos en los diferentes procesos metabólicos intracelulares. Esto se manifiesta en primer lugar en la activación de procesos inductivos dirigidos a la síntesis de enzimas responsables de la detoxificación de contaminantes (Sadunishvili *et al.*, 2009). Sin embargo, las plantas reaccionan de manera diferente a la contaminación del suelo por los hidrocarburos. La mayor parte de los

estudios indican que hay poco desarrollo de las plantas en suelos contaminados (Li *et al.*, 1997; Chupakhina y Maslennikov, 2004; Merkl *et al.*, 2005b; Achuba, 2006; White *et al.*, 2006a, 2006b; Omosum *et al.*, 2008; de Farias *et al.*, 2009) y que algunas sustancias derivadas del petróleo retardan la germinación de semillas (Ziółkowska y Wyszowski, 2010), aunque hay registro de mayor longitud radical e incluso recuperación de biomasa (Merkl *et al.*, 2005a). Además se han reportado cambios estructurales relacionados con mayor ramificación (Adam y Duncan, 1999), modificación en la forma de las células de la raíz (de Farias *et al.*, 2009; Omosum *et al.*, 2008; Sadunishvili *et al.*, 2009), reducción en la región meristemática (Inckot *et al.*, 2008; Ziółkowska y Wyszowski, 2010), reducción en la división celular de la raíz (Merkl *et al.*, 2004; Achuba, 2006), alteración en la estructura de los pelos radicales (Alkio *et al.*, 2005; Ziółkowska y Wyszowski, 2010), reducción de área foliar, alteración en la densidad estomática (Maranho *et al.*, 2006; Omosum *et al.*, 2008; Adenipekun *et al.*, 2008) y modificaciones en aspecto y espesura de la cera epicuticular (Omosum *et al.*, 2008). Estos cambios se han registrado en diferentes especies crecidas en suelo contaminado, y se considera que son parte de las adaptaciones que las plantas presentan para poder desarrollarse bajo estas condiciones de estrés.

### **Plantas útiles en procesos de fitorremediación**

La fitorremediación se refiere al uso de las plantas con capacidad para extraer, inmovilizar o eliminar los contaminantes (Tlustoš *et al.*, 2006). Las plantas capaces de crecer en suelos contaminados con hidrocarburos participan en su degradación a través de la rizosfera, estimulando el crecimiento de microorganismos rizosféricos, los cuales aumentan la actividad de la biomasa microbiana, permitiendo la aceleración de la degradación de los contaminantes

(Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006; Omosum *et al.*, 2009). Las plantas y sus raíces pueden influir indirectamente en la degradación de contaminantes mediante la alteración de las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo (Sangabriel *et al.*, 2006). La fitorremediación puede ser directa, donde las plantas actúan sobre el compuesto, o indirecta, donde éstas se utilizan para estimular microorganismos en la rizosfera (Muñoz *et al.*, 2010; Delgadillo-López *et al.*, 2011).

Algunas especies pueden tolerar y crecer en sustratos con hidrocarburos (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003; Pilon-Smits, 2005; Bona *et al.*, 2011; Hernández-Ortega *et al.*, 2012), y junto con los microorganismos asociados a la rizosfera pueden contribuir a la descontaminación del suelo favoreciendo la recuperación de áreas contaminadas (Siciliano y Germida, 1999; Tesar *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2003). Sin embargo, para seleccionar las especies vegetales con potencial para fitorremediación, es necesario identificar especies resistentes y comprender como reaccionan a dicha contaminación. Por lo tanto, el análisis morfoanatómico puede revelar si la planta presenta reacciones positivas o negativas en relación al estrés causado por la contaminación del suelo (Bona *et al.*, 2011).

En muchos estudios, gramíneas y leguminosas han sido seleccionadas por su potencial para favorecer la disminución de los contaminantes (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009; Cheema *et al.*, 2010; Hamdi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Las leguminosas son consideradas para la fitorremediación debido a su habilidad para fijar nitrógeno, por lo que no compiten con otros microorganismos y con plantas por el limitado suministro de nitrógeno disponible en sitios contaminados (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006; Issoufi *et al.*, 2006; Bento *et al.*, 2012).

### ***Medicago sativa***

La alfalfa tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Caúcaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán. Los persas introdujeron la alfalfa a Grecia

y de ahí pasó a Italia en el siglo IV a.C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa (Muller *et al.*, 2003).

La alfalfa es una planta perenne, vivaz y de porte erecto perteneciente a la familia Fabaceae y cuyo nombre botánico es *Medicago sativa* L. (SIAP-SAGARPA, 2010). La raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 5 metros de longitud) con numerosas raíces secundarias y posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos. Estos son delgados, erectos y muy consistentes para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias. Las hojas son trifoliadas, aunque las primeras verdaderas son unifoliadas, los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados, la flor característica de esta familia, es de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen de las axilas de las hojas (Figura 3.1). El fruto es una legumbre indehiscente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm de longitud (Del Pozo, 1983).



Figura 3.1. Hojas trifoliadas y flores púrpuras durante el desarrollo de alfalfa (*Medicago sativa*).

La alfalfa es uno de los cultivos más importantes en todo el mundo para usarse como forraje, ya que tiene el valor nutricional más alto de los cultivos forrajeros y debido a su gran plasticidad puede prosperar en regiones semiáridas, húmedas y subhúmedas (Mo *et al.*, 2011). Además, es una leguminosa con cierta tolerancia a la sequía, por lo que se usa para la rehabilitación de espacios degradados, y también contribuye a reducir ciertas plagas y enfermedades (Prosperi *et al.*, 2006). Por sus características bromatológicas y nutritivas, la alfalfa es el principal forraje que sustenta la producción de leche en el mundo (Vázquez-Vázquez *et al.*, 2010). La alfalfa ocupa el 57% (36, 000 ha) de la superficie sembrada en la región de la Comarca Lagunera (Godoy *et al.*, 2003). Por ser una especie perenne con raíces profundas la alfalfa puede tener un gran potencial para la remediación de contaminantes orgánicos, como los bifenilos policlorados y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Chekol *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008a, 2009; Teng *et al.*, 2010, 2011; Gao *et al.*, 2011). Muratova *et al.* (2003) sugieren que los exudados radicales de la alfalfa son ricos en ácidos orgánicos y nitrógeno mineral, y pueden promover el crecimiento de microorganismos en el suelo, incluyendo los degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

### **Asociación micorrízica**

La micorriza es una asociación típicamente mutualista entre diversos grupos de hongos con el sistema radical de las plantas (Flores-Vindas, 1999; Álvarez *et al.*, 2013). Las asociaciones micorrízicas existen en casi todas las plantas terrestres; sin embargo, esta simbiosis no es tan específica como aquella responsable de la fijación de nitrógeno atmosférico. Una planta puede tener varios hongos micorrízicos que colonizan la raíz y con ello, establecer la simbiosis (Coyne, 2000).

Existen tres grupos de micorrizas de importancia para los suelos agrícolas y forestales: las ectomicorrizas, las endomicorrizas, y las ectendomicorrizas (Coyne, 2000; Kaul, 2002; Álvarez *et al.*, 2013). Las endomicorrizas se dividen en varios tipos: micorriza ericoide, micorriza orquidoide y micorriza arbuscular (Dickison, 2000; Alarcón, 2007; Álvarez *et al.*, 2013).

### **Hongos micorrízicos arbusculares**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son considerados como un componente microbiano importante en la adaptación y nutrición de las plantas (Smith y Read, 1997; Álvarez *et al.*, 2013). En esta simbiosis el sistema radical suministra carbohidratos para el metabolismo de los HMA, lo cual permite su proliferación y ciclo de vida (Bago *et al.*, 2000). A cambio, los HMA proporcionan mejor absorción de nutrientes y agua a las plantas, vía micelio externo e interno (Smith y Read, 1997). La simbiosis de las plantas con los HMA, se caracteriza por la presencia de estructuras fúngicas específicas, llamadas arbusculos, que colonizan las células corticales de las raíces. Los arbusculos son las estructuras de interacción simbiótica en las cuales se lleva a cabo el intercambio metabólico bidireccional entre el hongo y la planta (Flores-Vindas, 1999; Coyne, 2000; Álvarez *et al.*, 2013).

Los HMA mejoran en general, el crecimiento de las plantas al favorecer la adquisición de nutrientes como fósforo y zinc (Jansa *et al.*, 2003; Quoreshi y Khasa, 2008), estimulan la fijación del nitrógeno en las plantas asociadas a bacterias fijadoras de nitrógeno (Mortimer *et al.*, 2008; Erman *et al.*, 2011), aumentan la tolerancia a las enfermedades en las plantas mejorando su nutrición y compitiendo con microorganismos patógenos por el espacio en las raíces de las plantas (Khalil *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2002; Elsen *et al.*, 2003; Fierro-Coronado *et al.*, 2013), inmovilizan algunos metales pesados y fertilizantes químicos (Vogel-Mikuš *et al.*, 2005; Huang

*et al.*, 2007; Redon *et al.*, 2008). Además, optimizan el uso del agua incrementando la tolerancia a la sequía (Marulanda *et al.*, 2003; Al-Karaki *et al.*, 2004; Benabdellah *et al.*, 2011; Ruiz-Lozano *et al.*, 2012), debido a la producción de glomalina se incrementa la formación de macroagregados mejorando la estructura del suelo y su fertilidad (Jeffries *et al.*, 2003), incrementan la tolerancia de las plantas a diferentes factores de estrés como salinidad, temperatura y plaguicidas (Zhu *et al.*, 2010; Abdel Latef y Chaoxing, 2011; Ipsilantis *et al.*, 2012; Campanelli *et al.*, 2013).

### **Asociación hongo micorrízico arbuscular-planta durante la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos**

La inoculación de plantas con HMA se ha enfocado en la evaluación de los beneficios que éstos proporcionan a la planta, principalmente, en la adquisición de nutrientes y agua (Caravaca *et al.*, 2005). Los beneficios directos están relacionados con el aumento en la adaptación y el crecimiento de la planta, incluyendo incrementos en la nutrición, y en la resistencia a estrés biótico y abiótico (Alarcón *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2008, Liu y Dalpé, 2009; Teng *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). Sin embargo, la simbiosis con HMA puede proporcionar importantes efectos en la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos (Cabello, 2001; Joner y Leyval, 2003a, 2003b; Verdin *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008a; Gao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). Además, los HMA tienen potencial para estabilizar contaminantes orgánicos como los hidrocarburos del petróleo (HP) (Kirk *et al.*, 2005).

Los HMA tienen la capacidad de aumentar actividades enzimáticas cuando se encuentran sometidas a contaminantes orgánicos (Liu *et al.*, 2004; Debiane *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009) e

inducir la resistencia de *Acacia angustissima*, *A. auriculiformis*, *A. holosericea*, *Cedrela odorata*, *Haematoxylum campechianum*, *Swietenia macrophylla*, *Tabebuia rosea*, *Zea mays*, *Brachiaria decumbens* ante el estrés causado por petróleo, diésel, biodiésel y antraceno (Tang *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2012; Pérez-Hernández *et al.*, 2013; Trejo *et al.*, 2013). Asimismo, los HMA mejoran el crecimiento de *Corchotus capsulari*, *Medicago sativa*, *Telfairia occidentalis* *Zea mays* ante concentraciones de antraceno, fenantreno, diésel y aceite de motor (Cheung *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Okon y Udofot, 2012).

Los efectos de los hidrocarburos sobre los HMA dependen de la especie de hongo, de la concentración y del tipo de contaminante. Así, el benzo(a)pireno, antraceno, fenantreno y diésel afectan la colonización, la longitud de hifas extrarradicales y la formación de esporas en cultivo *in vitro* con *Cichorium intybus* y en sustrato con *Medicago sativa*, *Melilotus albus* y *Casuarina equisetifolia* (Debiane *et al.*, 2008, 2009, 2011, 2012; Wu *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2012; Díaz-Martínez *et al.*, 2013). Las plántulas de *Medicago sativa* sometidas a benzo(a)pireno (0, 1, 10 y 100 mg kg<sup>-1</sup>), fenantreno (103 mg kg<sup>-1</sup>) y pireno (74 mg kg<sup>-1</sup>) e inoculadas con *Glomus caledonium*, *Glomus mosseae* y *Glomus etunicatum* degradaron estos contaminantes en un 87%, 98.6% y 88% respectivamente, en comparación con el tratamiento sin HMA (Liu *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2011). Otras especies como *Lolium multiflorum* inoculadas con *Glomus mosseae*, incrementaron la degradación de fenantreno y pireno (Yu *et al.*, 2011).

Algunos estudios con *Melilotus albus* demuestran que los HMA mejoran la biomasa vegetal, el contenido de nutrientes y la actividad antioxidante en plantas cultivadas en arena contaminada con diésel a una concentración de 7500 mg kg<sup>-1</sup>, cuya degradación fue mayor (47%) en plantas inoculadas con *Glomus* Zac-19 en comparación con las no inoculadas (29.8%) (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Además, *Glomus intraradices* puede tener efecto positivo sobre

las plantas hospederas disminuyendo la concentración de ERO por el incremento de la actividad de sistemas antioxidantes (Debiane *et al.*, 2008, 2009).

### **Discusión general de la revisión de literatura y justificación**

La contaminación con hidrocarburos del petróleo es un problema mundial y debido a que son compuestos recalcitrantes y tóxicos, es primordial aplicar técnicas de biorremediación para la recuperación de los suelos contaminados. Los métodos de fitorremediación de suelos en los últimos años han proporcionado grandes aportaciones en la remoción de contaminantes orgánicos, como los combustibles derivados del petróleo. Sin embargo, la contaminación por HP y su efecto en especies de leguminosas con capacidades para acumular y degradar contaminantes en simbiosis con microorganismos como bacterias fijadoras de nitrógeno y HMA, son aspectos poco estudiados. Además, las técnicas de fitorremediación de suelos se realizan generalmente con plantas de importancia agrícola o con especies de ciclos cortos (gramíneas y leguminosas), considerando principalmente la tolerancia y el crecimiento de las plantas. La información recabada sobre la asociación de especies vegetales con HMA indica excelentes cualidades de adaptación a sitios poco aptos para el desarrollo de las plantas. Es decir, el hongo le proporciona beneficios nutricionales y de absorción de agua para que la planta pueda incrementar la producción de biomasa, tanto de parte aérea como de raíz.

Recientemente se ha demostrado que la contaminación con HP genera estrés oxidativo en las plantas, incrementando los niveles de peróxido de hidrógeno en hojas y reduciendo la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las plantas al ser inoculadas con HMA tienen la capacidad de reducir el daño oxidativo generado por HP. Sin embargo, poco se conoce sobre los cambios anatómicos que los contaminantes orgánicos puedan generar en plantas de

leguminosas asociadas con HMA. Por otro lado, es de vital importancia conocer los mecanismos de respuesta de las leguminosas y de los HMA, de forma individual o en simbiosis, ante la contaminación por HP. Así, este trabajo consistió en evaluar el crecimiento, las actividades fisiológicas y expresión de genes de *Medicago sativa* en respuesta al estrés por la contaminación con diésel, así como evaluar el efecto de la inoculación de un hongo micorrízico arbuscular bajo condiciones de estrés causado por este contaminante.

## CAPÍTULO IV

### Desarrollo de *Rhizophagus intraradices* en cultivo monoxénico en presencia de diésel

#### RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) colonizan numerosas especies vegetales en todos los sistemas edáficos. En suelos contaminados con compuestos orgánicos varias especies vegetales se adaptan a estos sitios cuando son colonizadas por HMA; sin embargo, pocos estudios se han enfocado a evaluar el desarrollo de HMA ante contaminantes orgánicos. Este trabajo evaluó la tolerancia y el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* en medio contaminado con diésel. Las raíces transformadas de zanahoria colonizadas por *R. intraradices* fueron crecidas en cajas Petri con medio mínimo (M) solidificado, contaminado con diferentes concentraciones de diésel (1000 y 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), incubadas en oscuridad a 27 °C. Después de 20 semanas, se evaluó el peso seco de raíces, número de esporas y porcentaje de colonización. El diésel disminuyó significativamente la biomasa radical al incrementar la dosis. El porcentaje de colonización en raíces sin contaminar (control) alcanzó 37.5%, reduciendo significativamente en presencia del diésel. El número de esporas en el control fue alrededor de 5000 por caja Petri, observándose que por efecto del diésel; la esporulación se redujo 2.8 veces ante 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , y se inhibió completamente ante 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Los resultados dan mayor conocimiento sobre la toxicidad del diésel en los HMA.

**Palabras clave:** contaminante orgánico, raíz transformada, esporas, micelio extrarradical, colonización micorrízica arbuscular.

## CHATER IV

### Development of *Rhizophagus intraradices* in diesel-contaminated monoxenic cultures

#### ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonize several plant species in all soil systems. At soils contaminated with organic compounds, plant species have better adaptation when colonized by AMF; few studies have been focused on evaluating the development of AMF against organic pollutants. This study evaluated both tolerance and development of *Rhizophagus intraradices* established in diesel-contaminated medium. Transformed roots of carrot colonized with *Rhizophagus intraradices* were grown in Petri dishes with solidified minimal medium (M), contaminated with two concentrations of diesel (1000 and 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), and incubated in darkness at 27 °C. After 20 weeks, root dry weight, number of spores, and mycorrhizal colonization were evaluated. Increasing diesel concentrations significantly decreased root biomass. Mycorrhizal colonization of roots without diesel (control) was 37.5%, but, it was significantly reduced due to this contaminant. The number of spores in the control was about 5000 per Petri dish; in contrast, sporulation was significantly reduced 2.8 times at 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , but completely inhibited at 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . These results provides better knowledge about the toxic effects of diesel to AMF.

**Key words:** organic contaminant, transformed root, spores, extraradical mycelium, arbuscular mycorrhizal colonization.

## INTRODUCCIÓN

Los combustibles derivados del petróleo se han convertido en un tema de investigación de alto impacto en los últimos años debido a la toxicidad que generan en el ambiente. Los hidrocarburos del petróleo (HP) son el resultado de la combustión incompleta de combustibles fósiles, de procesos industriales y de incendios forestales (Johnsen y Karlson, 2007; Srogi, 2007; Bhalerao, 2013). La contaminación residual de los suelos por HP es motivo de preocupación debido a que éstos afectan adversamente la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas (Luhach y Chaudhry, 2012). Además, los HP se caracterizan por su toxicidad, su potencial cancerígeno y su persistencia por su baja solubilidad y biodisponibilidad (Verdin *et al.*, 2006; Srogi, 2007).

El uso de plantas colonizadas con HMA para la remediación de suelos contaminados con HP se enfoca en dos aspectos 1) mejorar el establecimiento y el desarrollo de plantas en suelos contaminados, y 2) incrementar la degradación de los hidrocarburos (Leyval *et al.*, 2002; Bhalerao, 2013). Sin embargo, el desarrollo de los HMA en diferentes especies vegetales es afectado negativamente cuando las plantas crecen en suelos contaminados con petróleo crudo (Cabello 1997), por la adición de suelo industrial contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (Leyval y Binet, 1998), o en arena con diésel (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Sin embargo, el desarrollo de HMA mostró un aumento en supervivencia y crecimiento de la planta en presencia de los hidrocarburos (Joner y Leyval, 2001; Hernández-Ortega *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, los HMA se han obtenido *in vitro* a partir de cultivos de raíces (Fortin *et al.*, 2002). Estos cultivos han permitido comprender mejor la función de los HMA y han proporcionado información básica de su citología, genética, fisiología, sistemática y filogenia (Declerck *et al.*, 2005). Además, el cultivo *in vitro* de raíces micorrizadas ha sido usado

para evaluar la toxicidad de plaguicidas (Wan *et al.*, 1998; Hillis *et al.*, 2008; Zocco *et al.*, 2008; Campagnac *et al.*, 2009, 2010), y de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el desarrollo y la colonización de HMA (Verdin *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2009). Por lo anterior, este trabajo evaluó el efecto del diésel en el desarrollo del hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices* en raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) en cultivo monoxénico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Establecimiento de cultivos monoxénicos en caja dividida**

Los cultivos monoxénicos de *Rhizophagus intraradices* ((N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler, 2010) se establecieron en raíces transformadas (línea DC2) de zanahoria (*Daucus carota* L.) crecidas en cajas de Petri con medio mínimo (M) descrito por Bécard y Fortin (1988) pero solidificado con Gel Rite® (ver Anexo I, Cuadro AI-4.1). Después de tres meses de cultivo, se tomaron segmentos de 2.5 cm de raíz colonizada y se colocaron en cajas de Petri dividida, que contenían medio M en el primer compartimento (compartimento radical, CR). Las cajas se mantuvieron en oscuridad a 27 °C por tres semanas. Posteriormente, a cada caja se le colocó en el segundo compartimento (compartimento fúngico, CF) medio M contaminado con diésel, o medio sin contaminar (control). Las concentraciones aplicadas del contaminante fueron 1000 y 10000 µL L<sup>-1</sup>. Los cultivos se mantuvieron a 27 °C en oscuridad por ocho semanas. Después de este tiempo se pesó el micelio extrarradical (hifas y esporas producidas en el CF).

### **Establecimiento de cultivos monoxénicos en caja completa**

A partir de cultivos monoxénicos de *Rhizophagus intraradices* ya establecidos con tres meses de desarrollo, previamente descritos, se tomaron fragmentos de 2.5 cm de raíz colonizada

y sin colonizar, y se colocaron a la mitad de la caja de Petri con medio M contaminado o sin contaminar con diésel, en concentraciones de 1000 y 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Las cajas se mantuvieron a 27 °C en oscuridad por 20 semanas. Después de este tiempo las cajas fueron evaluadas tomando en cuenta la producción de biomasa de raíces de zanahoria, se tomó el peso fresco de las raíces colonizadas y sin colonizar, y el peso seco de las raíces colonizadas. Además, se evaluó el porcentaje de colonización micorrízica y la producción de esporas.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó un experimento con un diseño completamente al azar con tres tratamientos (concentraciones de diésel) y cinco repeticiones. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y con una prueba de comparación de medias de Tukey,  $\alpha=0.05$  (SAS Institute Inc., 2002).

## **RESULTADOS**

### **Desarrollo de cultivos monoxénicos en caja dividida**

Después de ocho semanas, la presencia del diésel en el medio de cultivo afectó el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* (Figura 4.1A y B). La concentración de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  permitió el desarrollo de hifas extrarradicales y la producción de esporas, mientras que la concentración de 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$  redujo la formación de hifas y con ello, la producción de esporas. Además, el desarrollo de micelio extrarradical en el CF sin diésel fue significativamente mayor en comparación con lo obtenido en el CF con medio M contaminado (10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), donde el desarrollo de las hifas fue más lento (Figura 4.1C).

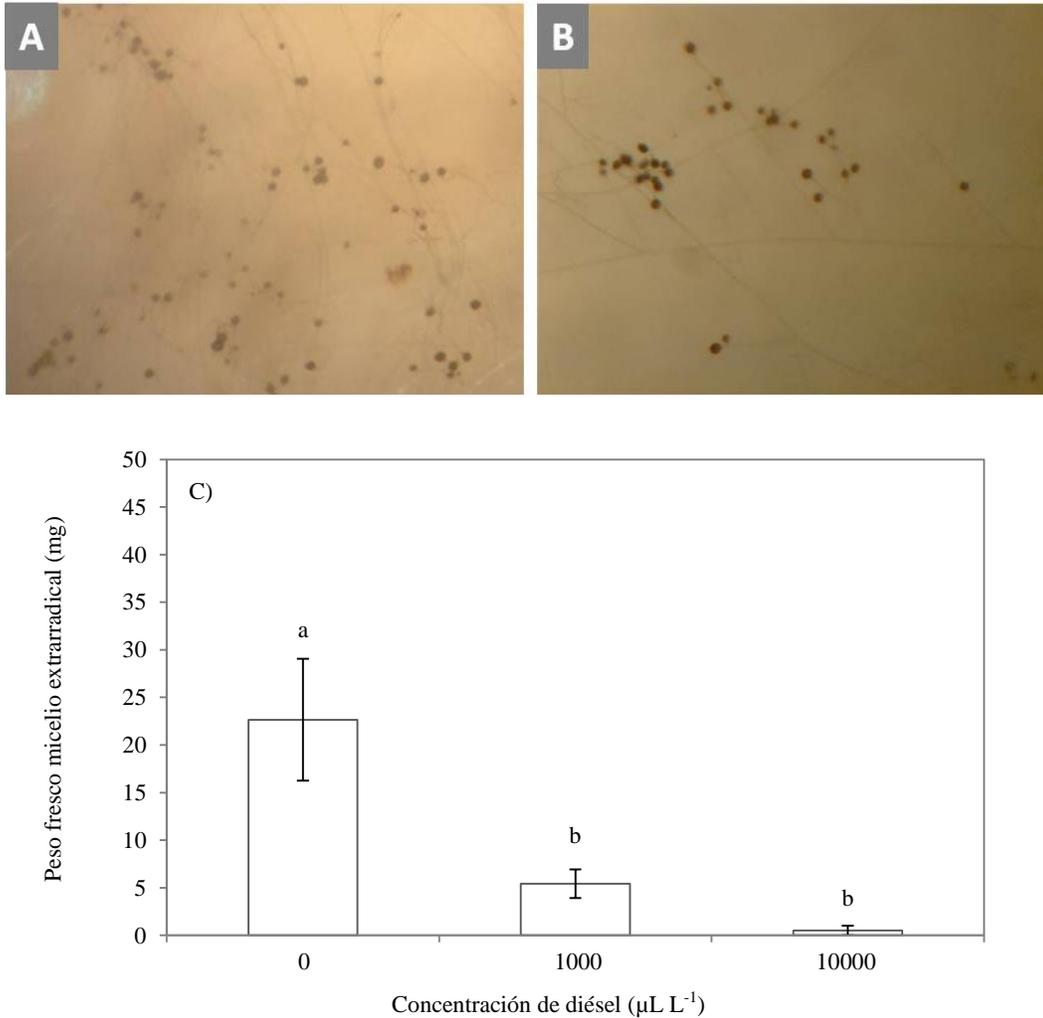


Figura 4.1. Efecto del diésel en el desarrollo de micelio extrarradical de *Rhizophagus intraradices* en cultivo monoxénico, después de ocho semanas. A) Compartimento fúngico con medio M sin contaminar. B) Compartimento fúngico con medio M contaminado con 1000  $\mu\text{L}$  de diésel  $\text{L}^{-1}$ . C) Peso fresco de micelio extrarradical (hifas + esporas). Los valores son promedio de cinco cajas de Petri  $\pm$  error estándar. Barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

### Desarrollo de cultivos monoxénicos en caja completa

Después de 20 semanas, la presencia de diésel en el medio de cultivo afectó el desarrollo de las raíces de zanahoria (Figura 4.2). El peso fresco de las raíces colonizadas y sin colonizar se redujo en 30% y 70% en promedio, ante las concentraciones de 1000 y 10000  $\mu\text{L}$   $\text{L}^{-1}$ ,

respectivamente (Figura 4.3A). El peso seco de raíces con HMA presentó una reducción de 50% y 90% cuando fueron crecidas en 1000 y 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 4.3B).

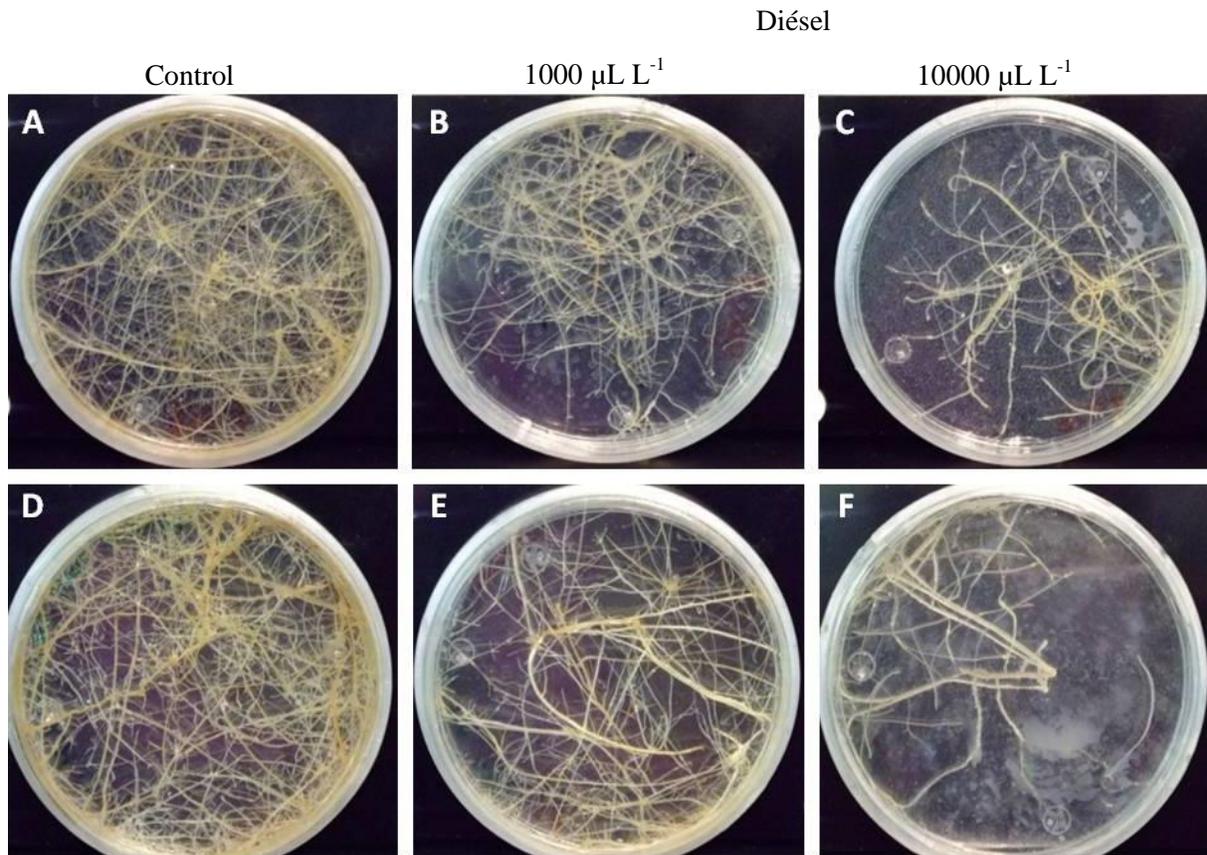


Figura 4.2. Desarrollo de raíces transformadas de zanahoria sin colonizar (A-C), y colonizadas con *Rhizophagus intraradices* (D-F) en caja de Petri con medio M, después de 20 semanas de crecimiento.

Las observaciones microscópicas de raíces de zanahoria teñidas con azul de tripano mostraron la presencia de hifas intrarradicales y esporas en raíz después de 20 semanas en medio contaminado y sin contaminar. El porcentaje de colonización por *R. intraradices* en raíces de zanahoria fue reducido por la presencia de diésel; la reducción de la colonización total fue del

19.6% y 90.3% en la concentración de  $1000 \mu\text{L L}^{-1}$  y  $10000 \mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 4.4). La presencia de hifas y esporas en raíces de zanahoria fue baja en la concentración de  $10000 \mu\text{L L}^{-1}$ . No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de colonización de hifas y esporas entre la concentración de  $1000 \mu\text{L L}^{-1}$  y el control (Figura 4.4).

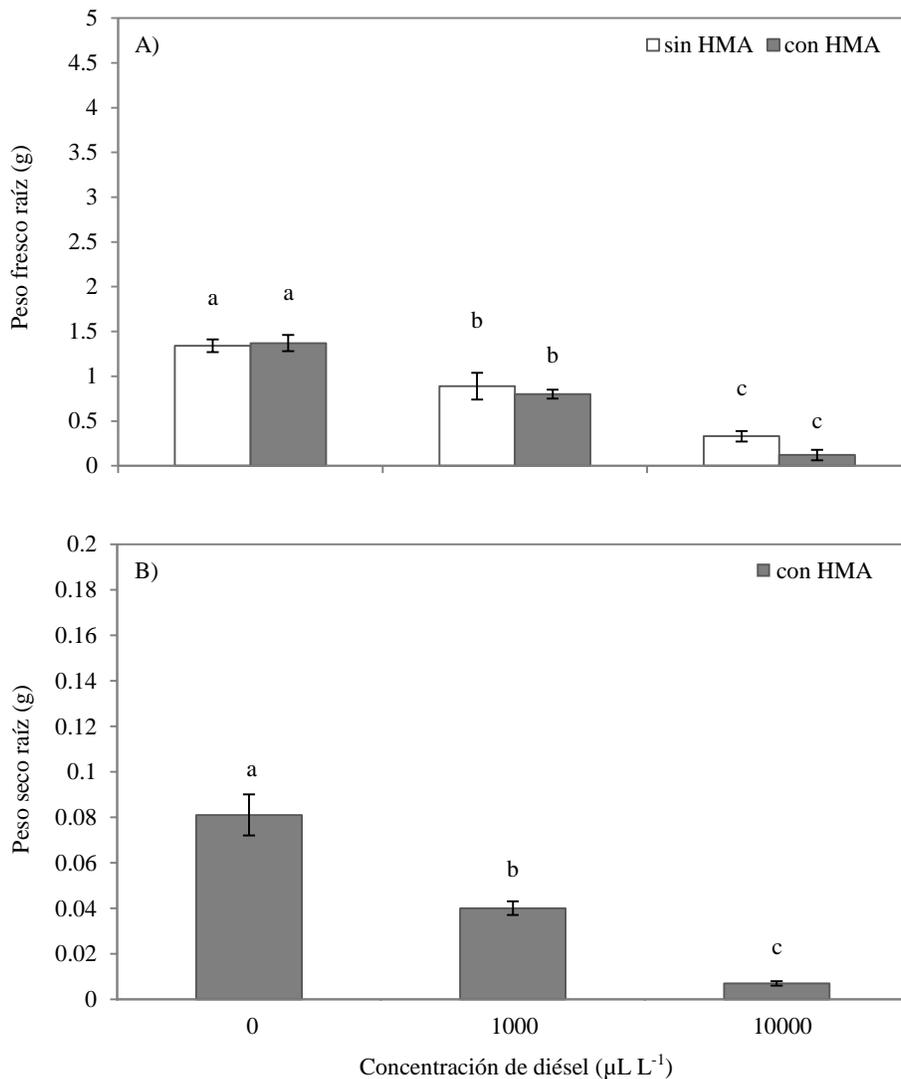


Figura 4.3. Peso de raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) después de 20 semanas de crecimiento en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de diésel. A) Peso fresco de raíces colonizadas y sin colonizar por *Rhizophagus intraradices* (HMA). B) Peso seco de raíces colonizadas por HMA. Los valores son promedio de cinco cajas de Petri  $\pm$  error estándar. Barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

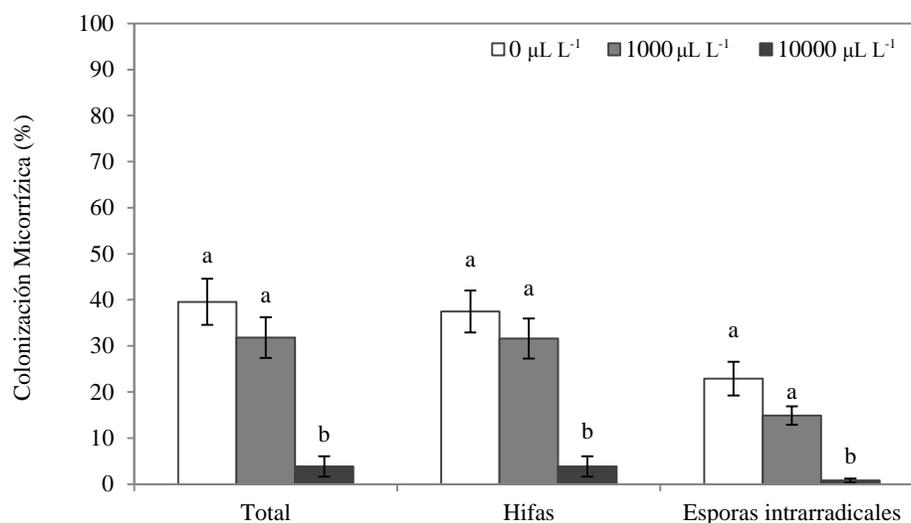


Figura 4.4. Colonización micorrizica en raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) colonizadas por *Rhizophagus intraradices* después de 20 semanas de crecimiento en ausencia (0) o presencia de diésel (1000 y 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). Los valores son promedio de cinco cajas de Petri  $\pm$  error estándar. Barras con distinta letra en cada estructura fúngica son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

La presencia de diésel en el medio de cultivo en caja completa también afectó el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* (Figura 4.5A y B). La concentración de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  permitió el desarrollo de hifas extrarradicales y la producción de esporas, mientras que en la concentración de 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$  se redujo la formación de hifas y no hubo formación de esporas (Figura 4.5C). El número promedio de esporas en el control fue de 5217 y en la concentración de 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$  fue de 1831 (Figura 4.5C).

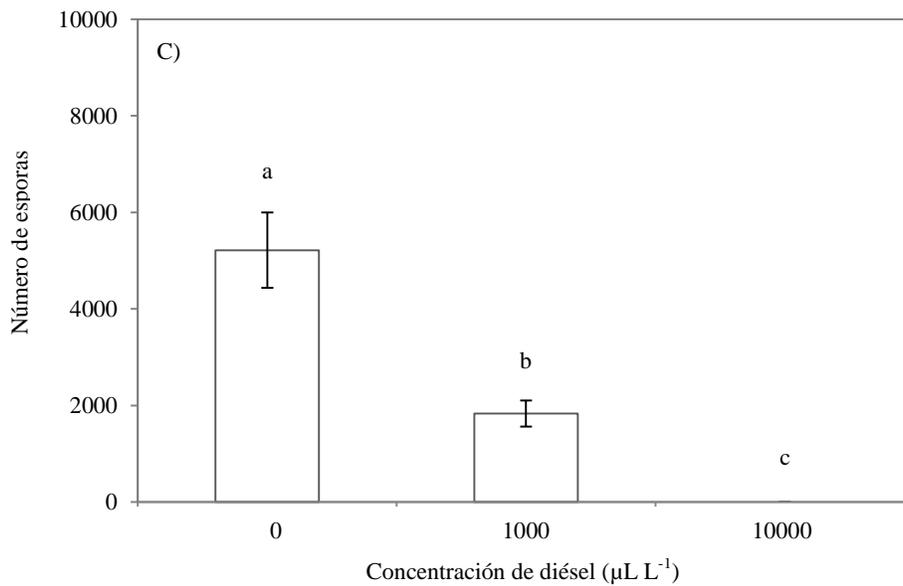
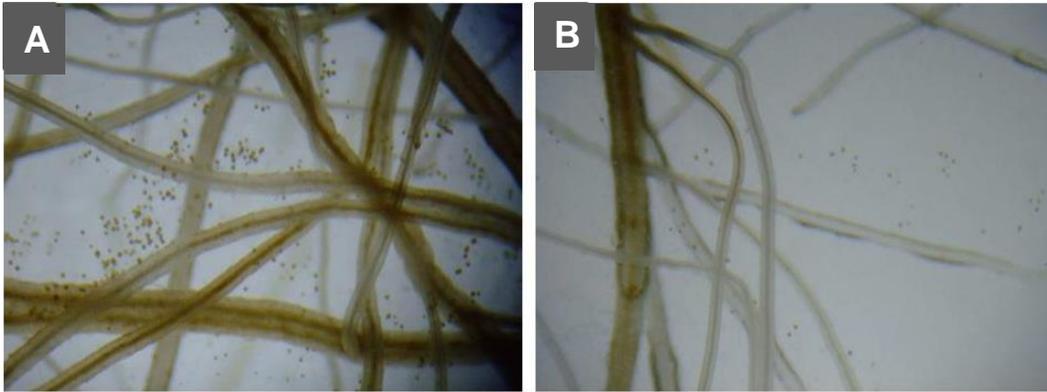


Figura 4.5. Efecto del diésel en el desarrollo de micelio extraradical de *Rhizophagus intraradices* en cultivo monoxénico, después de 20 semanas. A) control, medio M sin contaminar. B) medio M contaminado con 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . C) Número de esporas de *R. intraradices* en ausencia o presencia de diésel. Los valores son promedio de cinco cajas de Petri  $\pm$  error estándar. Barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

## DISCUSIÓN

El desarrollo de micelio (hifas extraradicales y esporas) por *R. intraradices* crecido en medio sin diésel fue significativamente mayor que en el medio contaminado, donde el desarrollo de las hifas fue más lento y estuvo acompañado por menor producción de esporas. Este efecto negativo en el desarrollo de micelio también se ha reportado para otros contaminantes, como

benzo(a)pireno y antraceno, donde se redujo el crecimiento de la hifa extrarradical (Debiane *et al.*, 2008, 2009, 2011).

El incremento de la concentración de diésel en el medio de cultivo redujo significativamente el peso seco de raíces transformadas de zanahoria colonizadas por *R. intraradices*. Este efecto por la presencia del contaminante está relacionado con los datos de Verdin *et al.* (2006), quienes reportaron una disminución en la biomasa de achicoria (*Chichorium intybus*) colonizada por *R. intraradices* en presencia de antraceno.

La reducción en el desarrollo de hifas extrarradicales, producción de biomasa de raíces y disminución de la colonización de HMA en raíces, también se ha reportado en cultivos monoxénicos con fungicidas (Wan *et al.*, 1998; Zocco *et al.*, 2008; Calonne *et al.*, 2010; Campagnac *et al.*, 2009, 2010).

Finalmente, bajo condiciones de cultivo monoxénico el incremento en la concentración de diésel redujo el desarrollo de hifas extrarradicales y con ello, disminuyó la producción de esporas, la cual fue inhibida en la concentración de 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . La reducción en el número de esporas se ha reportado en cultivos monoxénicos contaminados con antraceno y benzo(a)pireno (Verdín *et al.*, 2006; Debiane *et al.*, 2008, 2009, 2011). Estas observaciones también están relacionadas con otros estudios que reportaron efectos negativos por fungicidas y salinidad en cultivos monoxénicos de *Rhizophagus intraradices* y *R. irregulare* (Zocco *et al.*, 2008; Campagnac *et al.*, 2009, 2010; Calonne *et al.*, 2010; Campagnac y Khasa, 2014).

Los resultados mostraron que la presencia de diésel redujo significativamente la colonización micorrízica de raíces de zanahoria y el desarrollo de *R. intraradices*. La inhibición del desarrollo de HMA puede tener un impacto negativo en el establecimiento de la simbiosis micorrízica con su planta hospedera. Sin embargo, en las condiciones de contaminación

evaluadas, la micorrización y el crecimiento de *R. intraradices* (desarrollo de micelio extrarradical y formación de esporas intrarradicales) no fueron completamente inhibidos por el efecto tóxico del diésel.

Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones sobre los efectos de los contaminantes ambientales en las plantas se han realizado utilizando compuestos inorgánicos. Como consecuencia, los efectos tóxicos de muchos contaminantes orgánicos, tales como el diésel u otros hidrocarburos, han sido poco estudiados (Debiane *et al.*, 2009). Por lo tanto, este trabajo contribuye al conocimiento de la toxicidad de contaminantes orgánicos para la simbiosis entre las especies vegetales y los HMA.

## **CONCLUSIONES**

Los contaminantes orgánicos como el diésel afectan el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* en raíces de zanahoria, reduciendo la colonización en la planta por el hongo. Sin embargo, la presencia de hifas y esporas en medio M con diésel indica que los HMA tienen tolerancia a la presencia del contaminante en los cultivos monoxénicos. Los resultados obtenidos incrementan la información sobre la toxicidad de diésel en el desarrollo de HMA.

## CAPÍTULO V

### Tolerancia y expresión génica de alfalfa en sustrato contaminado con diésel

#### RESUMEN

Este capítulo describe los efectos del diésel en el crecimiento y en la expresión génica de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) ante concentraciones de 1000, 2500, 5000, 10000, 20000 y 35000 mg kg<sup>-1</sup>. Los genes evaluados pertenecen a la familia de la superóxido dismutasa relacionada con estrés oxidativo. Después de 30 días, el incremento en la concentración de diésel fue inversamente proporcional con la producción de biomasa en alfalfa, este efecto fue significativo a concentraciones mayores de 20000 mg kg<sup>-1</sup>. La altura de la parte aérea en alfalfa disminuyó significativamente con el incremento de la concentración de diésel, especialmente en concentraciones mayores de 5000 mg kg<sup>-1</sup>. No se presentó inducción o represión de los genes evaluados, pero la expresión relativa de los genes se encontró entre los límites de expresión de 0.5-2.0. Es posible que el umbral de la expresión de estos genes en respuesta al estrés por la presencia del diésel esté por debajo de las concentraciones evaluadas, o se presenten en un tiempo menor de la exposición al contaminante.

**Palabras clave:** ácido desoxirribonucleico complementario, contaminante orgánico, expresión relativa, superóxido dismutasa, PCR cuantitativo.

## CHAPTER V

### Tolerance and gene expression of lucerne in a substrate contaminated with diesel

#### ABSTRACT

The work describes the effects of diesel on growth and gene expression of lucerne plants (*Medicago sativa* L.), applied in concentrations of 1000, 2500, 5000, 10000, 20000 and 35000 mg kg<sup>-1</sup>. The evaluated genes corresponded to the superoxide dismutase family associated to oxidative stress. The increased diesel concentrations were inversely proportional to the plant biomass production, and this effect was more significant at concentrations greater than 20000 mg kg<sup>-1</sup>. The height of the aerial part also significantly decreased as diesel concentrations increased, especially at concentrations greater than 5000 mg kg<sup>-1</sup>. No induction nor repression of the genes was detected, but the relative expression of genes ranged between the expression limits 0.5-2.0. It is possible that the threshold for the gene expression in response to diesel stress is beneath the tested concentrations or may be occurred in a shorter period of diesel exposure.

**Key words:** deoxyribonucleic acid, organic contaminant, relative expression, superoxide dismutase, quantitative PCR.

#### INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por los derrames de petróleo es un problema ambiental que requiere la limpieza de los sitios contaminados (Bundy *et al.*, 2002). Los hidrocarburos presentes en el petróleo y sus derivados como el diésel, afectan adversamente la germinación de semillas y

el crecimiento de las plantas, que a su vez, estos parámetros son buenos indicadores de sanidad y crecimiento de especies vegetales en suelos con problemas de contaminación (Luhach y Chaudhry, 2012). El daño en las plantas por los contaminantes orgánicos también está relacionado con la alteración de la actividad antioxidante e inducen estrés oxidativo en las plantas establecidas en los suelos contaminados (Malallah *et al.*, 1998; Samina y Adams, 2002; Liu *et al.*, 2009; Ahammed *et al.*, 2012). También, la presencia de productos derivados del petróleo incrementa la producción de fitohormonas relacionadas a estrés (Luhach y Chaudhry, 2012), y que la acumulación de sustancias tóxicas o sus bioproductos en tejido vegetal, está relacionada con la disminución en el tamaño de las plantas y con ello menor producción de biomasa (Brandt *et al.*, 2006; Daniel-Kalio y Pepple, 2006; Adenipekun *et al.*, 2008).

La fitorremediación es una alternativa para la restauración del ambiente, considerada como una tecnología efectiva que utiliza los procesos naturales de las plantas y sus microorganismos asociados, para incrementar la degradación y la remoción de compuestos derivados del petróleo en el ambiente (Muratova *et al.*, 2012; Pilon-Smits, 2005). Las plantas poseen inherentemente la capacidad para destoxificar xenobióticos para su supervivencia (Pilon-Smits, 2005). Sin embargo, las mismas plantas sufren de fitotoxicidad ante niveles altos de contaminación causando una limitación en la capacidad de destoxificación de sus sistemas antioxidantes.

Las plantas al estar frente a condiciones de estrés han desarrollado mecanismos sofisticados para responder y adaptarse a tensiones inducidas por bajas temperaturas, sequía, salinidad y contaminantes orgánicos (Song *et al.*, 2012). Así, la exposición de plantas a ambientes adversos a menudo altera la expresión de numerosos genes, lo que resulta en cambios en los procesos moleculares, celulares y fisiológicos (Shinozaki *et al.*, 2003). Los factores de

transcripción que regulan la expresión de muchos genes funcionales, así como los genes que activan los antioxidantes enzimáticos, juegan un papel importante en la respuesta y la adaptación de las plantas a diversos tipos de estrés abiótico (Nakashima *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2011). Por consiguiente, el presente estudio evaluó el efecto del diésel en el crecimiento de plantas de *Medicago sativa* L. y midió los niveles de expresión de los genes *APX-2*, *FeSOD*, *MnSOD*, *CuZnSOD* y *MHI* en hojas y raíces de las plantas en respuesta a la contaminación por diésel.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Establecimiento del experimento**

Semillas de alfalfa fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10% y etanol al 70%, y colocadas en un tubo Falcon (50 mL) con sustrato (suelo-arena relación 1:1 p/p) contaminado con diésel y otras con sustrato sin contaminar. Para la contaminación de sustrato, se pesaron 1000 g de sustrato estéril al cual se adicionó diésel en las siguientes concentraciones: 1000, 2500, 5000, 10000, 20000 y 30000 mg kg<sup>-1</sup>. Al sustrato seco, se le agregaron 100 mL de acetona como disolvente con la cantidad de diésel correspondiente, con el fin de favorecer la impregnación homogénea del contaminante en el sustrato, el cual una vez contaminado se dejó reposar por cinco días.

En cada tubo Falcon se colocaron cinco semillas de alfalfa, y cada tratamiento consideró cuatro repeticiones. Después de 30 días de exposición al contaminante, las plantas fueron cosechadas y evaluadas para medir el peso seco de raíz y parte aérea, la altura de la parte aérea y el número de hojas, y la longitud de la raíz. Además, se tomó tejido de raíz y parte aérea para moler con N<sub>2</sub> líquido y guardar a -70 °C, para posteriormente hacer la extracción de ARN.

## **Extracción de ARN total y cuantificación**

Se tomaron 100 mg de tejido congelado y previamente molido en N<sub>2</sub> líquido, para realizar la extracción de ARN total mediante el kit comercial RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Cat No 74904), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el ARN se cuantificó mediante espectrofotometría, se utilizó un buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.0 para realizar una dilución 1:100 de la muestra y se midió su absorbancia a 260 nm. El cálculo de la concentración de ARN total se realizó mediante la siguiente ecuación (Barbas *et al.*, 2007):

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times 40 \mu\text{g mL}^{-1} \times \text{factor de dilución}$$

$$1 \text{ unidad de } A_{260} \text{ ssARN} = 40 \mu\text{g mL}^{-1}$$

## **Transcripción reversa**

Las reacciones de transcripción reversa se prepararon mezclando 500 ng de ARN total, 1  $\mu\text{L}$  oligo dT de anclaje TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTUN (IDT, IA, USA, 0.5 mg mL<sup>-1</sup>) en donde U=G/A/C y N=A/C/G/T, 1  $\mu\text{L}$  de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP's, 10 mM), en un volumen final de 12  $\mu\text{L}$  usando agua ultrapura (agua UP). La mezcla se incubó a 65 °C por 5 min, se transfirió a hielo por 2 min y se agregaron 0.25  $\mu\text{L}$  (10 unidades) de RNase out, un inhibidor de RNAsa (Invitrogen, Cat. No. 10777-019), 2  $\mu\text{L}$  DTT (0.1 M), 4  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 5X, 1.5  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura y se incubó a 42 °C por 2 min. Se adicionaron 0.25  $\mu\text{L}$  (50U) de enzima transcriptasa reversa Super Script II (200 U  $\mu\text{L}^{-1}$ , Invitrogen Cat No 1864-014), posteriormente se mezcló y centrifugó brevemente, y se incubó a 42 °C por 60 min. Después se incubó a 70 °C por 10 min, se colocó en hielo por 2 min y se almacenó a -20 °C.

## Cuantificación de ADNc

El ADNc obtenido de la reacción de transcriptasa reversa se cuantificó utilizando agua UP para realizar una dilución 1:100 de la muestra y se midió su absorbancia a 260 nm. El cálculo de la concentración de ADNc se realizó mediante la siguiente ecuación (Barbas *et al.*, 2007):

$$[\text{ADNc}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g mL}^{-1} \times \text{factor de dilución}$$

1 unidad de  $A_{260}$  dsADN es igual a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

## Cuantificación de los niveles de expresión de genes mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Los oligonucleótidos específicos de cada gen blanco para qPCR fueron diseñados utilizando el programa en línea Primer3, versión 4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Los oligonucleótidos se seleccionaron para un contenido óptimo de GC de ~50%, una longitud de ~20 pb y un producto de tamaño entre 50 y 200 pb (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1. Oligonucleótidos utilizados en qPCR para el análisis de expresión diferencial.

Gen blanco	Número Acceso GenBank	Nombre y secuencia del oligonucleótido
Ascorbato peroxidasa citosol ( <i>APX-2</i> )	AY054988	APX-1 5'-AGG AGT TGT TGG GTG GTG AG-3' APX-2 5'-AAC AAG TGG GCG GAA TAC AG-3'
Superóxido dismutasa Fe ( <i>FeSOD</i> )	AF377344	FeSOD-1 5'-GAG CTG GAG GCA CTC AAA TC-3' FeSOD-2 5'-CAT AAT TGG CTC CGA AGC AT-3'
Superóxido dismutasa Mn ( <i>MnSOD</i> )	AY145894	MnSOD-1 5'-TTCCTCAACCACCGTTAAGC-3' MnSOD-2 5'- CCTCCACCGTTGAAGTTGAT-3'
Superóxido dismutasa Cu-Zn ( <i>CuZnSOD</i> )	AF056621	CuZnSOD-1 5'-CAT AAT TGC TGA TGC CAA CG-3' CuZnSOD-2 5'-AGG CTC TCC CAA TGA CTG AA-3'
Helicasa 1 <i>M. sativa</i> ( <i>MHI</i> )	EF011022	MHI-1 5'-GAT TGG TCG TTC TGG ACG TT-3' MHI-2 5'-CAG CAA CAT TCA TTG GCA TC-3'
<i><math>\beta</math>-actina</i>	AA660796	ACTB-1 5'-GAC AAA TGG AAC TGG AAT GG-3' ACTB-2 5'-CAA TAC CGT GCT CAA TGG-3'
<i>G3PDH</i>	GQ398120.1	GPDH-1 5'-AAA CGT CTC GGT TGT TGA CC-3' GPDH-2 5'-GAA TAC CGC TCA GCT CCT TG-3'

El análisis de qPCR se llevó a cabo utilizando Syber Green qPCR Super Mix-UDG (Qiagen, Cat No 204074) en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen), usando el software Rotor Gene Q-Pure detector versión 1.7 para la obtención de los datos. La reacción fue llevada a cabo en un volumen total de 10  $\mu$ L con 5  $\mu$ L de 2X Super Mix-UDG, 2  $\mu$ mol de cada primer y 50 ng de ADNc. El programa de PCR consistió en: 95 °C por 5 min, 45 ciclos de 95 °C por 5 s y 60 °C por 10 s. Por último, se realizó una curva de disociación de 60 a 95 °C con un aumento de 1 °C en cada paso (esto para asegurar que los oligonucleótidos utilizados amplificaban un solo amplicón). Todas las reacciones se realizaron con tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas. Se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para calcular los niveles de expresión relativa usando como gen normalizador gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*G3PDH*) y  $\beta$ -actina.

Los valores de expresión relativa entre 2 y 0.5 (o de número de veces de inducción/represión de 2 a -2) fueron considerados como no diferentes a 1, es decir, no se representa un cambio en la expresión relativa. Este criterio es aún más estricto que el utilizado en otros trabajos en donde el umbral de expresión relativa es considerado en 1.5 del valor de expresión (Liu *et al.*, 2007). Con este criterio se aumenta la certeza de los resultados en cuanto a la expresión diferencial.

#### **Nivel de expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$**

La comparación de los niveles de expresión del gen de interés normalizado con un gen endógeno de referencia en una muestra de un tratamiento comparada con otro, se realiza mediante la siguiente ecuación aritmética (Livak y Schmittgen, 2001; Kubista *et al.*, 2006):

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Expresión relativa:  $2^{-[\Delta Ct \text{ muestra experimental} - \Delta Ct \text{ muestra control}]}$

Donde:

$\Delta Ct \text{ muestra experimental} = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen normalizador}$ , obtenidos de la amplificación en la muestra experimental.

$\Delta Ct \text{ muestra control} = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen normalizador}$ , obtenidos de la amplificación en la muestra control.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un experimento con un diseño completamente al azar, con tres tratamientos (concentraciones de diésel) y seis repeticiones. Para el análisis de la expresión génica, se tomaron tres réplicas técnicas de cada replica biológica, considerando solo tres réplicas biológicas por cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y con una prueba de comparación de medias de Tukey,  $\alpha=0.05$  (SAS Institute Inc., 2002).

### **RESULTADOS**

El peso seco de la parte aérea y de la raíz fue afectado por el tratamiento con diésel. Las plantas crecidas en sustrato contaminado presentaron menor peso seco en comparación con las crecidas en sustrato sin contaminar, esta reducción fue significativa en los tratamientos con 20000 y 35000 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 5.1). El aumento significativo del peso seco en la raíz solo se presentó en la concentración más baja, es decir, 1000 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 5.1).

La altura de las plantas de alfalfa fue inversamente proporcional a la adición de diésel en el sustrato, mientras que la longitud de la raíz no fue afectada por el gradiente de concentración del combustible (Figura 5.1). La altura de la planta sólo fue afectada

significativamente por los tratamientos de 5000 a 35000 mg kg<sup>-1</sup>. Para la longitud de la raíz sólo se encontró reducción en la concentración de 35000 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que en el resto de los tratamientos se presentó un aumento en la longitud de la raíz.

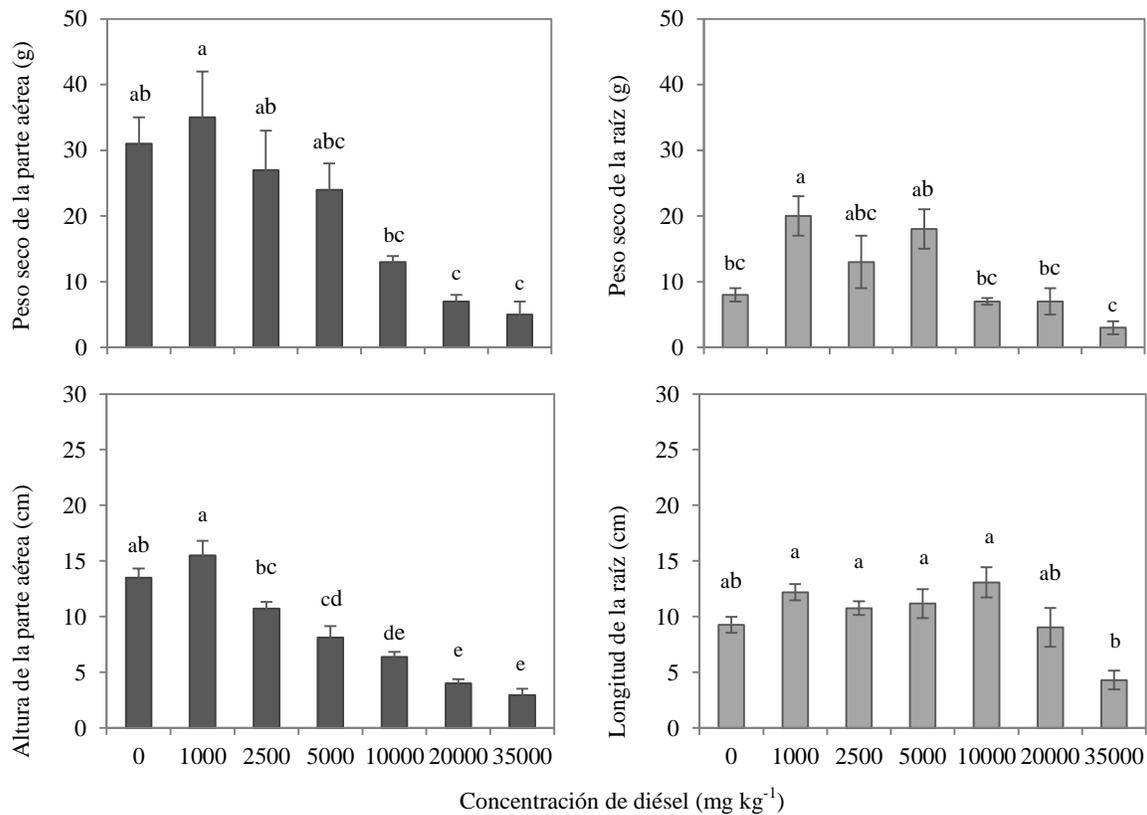


Figura 5.1. Peso seco de la parte aérea y de la raíz, altura de la planta y longitud de la raíz en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) crecidas en sustrato contaminado con diésel, después de 30 días. Barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ), promedio  $\pm$  error estándar, n= 6.

El diésel afectó significativamente el número de hojas ( $p \leq 0.05$ ). Las plantas que crecieron en sustrato con diésel presentaron menor número de hojas en comparación con las plantas crecidas en sustrato sin contaminar (ver Anexo II, Figura AII-5.1). La reducción significativa en el número de hojas se presentó en los tratamientos con 10000, 20000 y 35000 mg de kg<sup>-1</sup> (Figura 5.2).

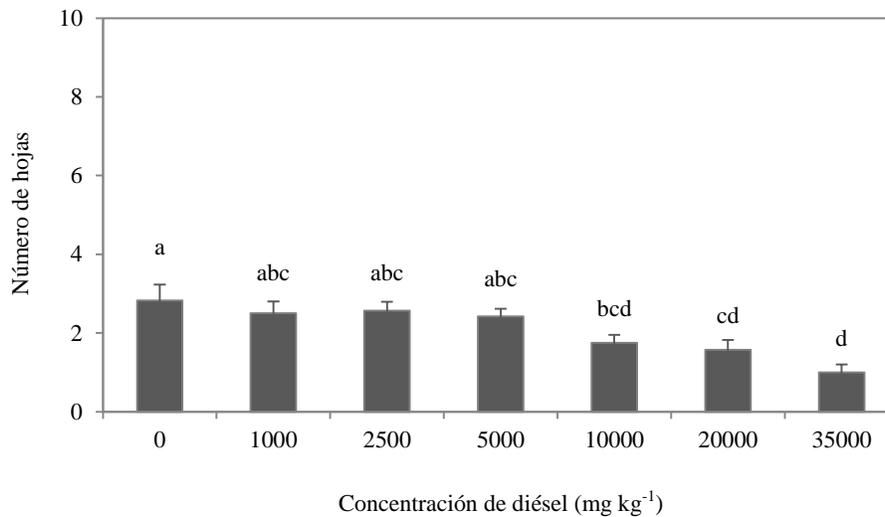


Figura 5.2. Número de hojas en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) crecidas en sustrato contaminado con diésel, después de 30 días. Barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ), promedio  $\pm$  error estándar, n= 6.

La expresión relativa de los genes en respuesta al estrés generado por la presencia del diésel en el sustrato fue analizada por la ecuación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los valores de expresión relativa obtenidos se muestran en el Cuadro 5.2, y las curvas de amplificación para cada par de oligonucleótidos y los valores de Ct obtenidos para cada gen se observan en el Anexo II. En los datos del cuadro se encontró que los genes *APX-2*, *FeSOD*, *MnSOD*, *CuZnSOD* y *MHI*, analizados tanto en hoja como en raíz, mostraron que en la mayoría de los casos se registraron cambios en su expresión relativa al control menores a 2 y mayores a 0.5. Estos valores han sido considerados en este trabajo como los límites del rango fuera del cual se considera un cambio significativo en la expresión relativa. Cuando la expresión diferencial de los genes analizados está dentro de este rango, significa que los genes no son inducidos ni reprimidos en las condiciones de contaminación estudiadas (Cuadro 5.2).

Sin embargo, el gen *FeSOD* en parte aérea a 1000 mg kg<sup>-1</sup>, presentó una inducción en la expresión del gen, con una expresión relativa de 3.66. Mientras que la expresión del gen *CuZnSOD* fue reprimida en todos los casos en hoja y en raíz en la concentración de 10000 mg kg<sup>-1</sup>, con una expresión relativa <0.5, tanto en la hoja como en la raíz.

Cuadro 5.2. Expresión relativa de genes relacionados a estrés por diésel en plantas de alfalfa. Los valores de expresión son obtenidos a partir de la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Gen	Raíz			Hoja		
	1000	10000	35000	1000	10000	35000
	mg kg <sup>-1</sup>					
<i>APX-2</i>	1.90 ± 0.11	0.92 ± 0.17	0.90 ± 0.23	1.20 ± 0.23	0.81 ± 0.05	1.02 ± 0.24
<i>FeSOD</i>	1.64 ± 0.38	1.20 ± 0.24	0.70 ± 0.15	<b>3.66</b> ± 0.27	0.91 ± 0.26	1.61 ± 0.13
<i>MnSOD</i>	1.35 ± 0.15	0.79 ± 0.11	1.26 ± 0.46	1.57 ± 0.21	1.05 ± 0.07	1.35 ± 0.10
<i>CuZnSOD</i>	0.80 ± 0.16	<b>0.37</b> ± 0.11	0.56 ± 0.20	<b>0.19</b> ± 0.04	<b>0.32</b> ± 0.08	<b>0.18</b> ± 0.04
<i>MHI</i>	1.64 ± 0.39	0.95 ± 0.32	0.70 ± 0.18	1.23 ± 0.11	1.12 ± 0.02	1.10 ± 0.14

Niveles de expresión menores a 0.5 se consideran como represión del gen y mayores a 2 se considera inducción del gen. Los valores son promedio de nueve replicas técnicas ± error estándar, Tukey  $\alpha=0.05$ .

## DISCUSIÓN

Los hidrocarburos del petróleo típicamente tienen efectos negativos en las plantas debido a la reducción en la disponibilidad y absorción de agua y nutrientes; por lo cual, se disminuye el crecimiento, la longitud de la raíz y la producción de biomasa y en algunos casos provocan la muerte de las plantas (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003; Sangabriel *et al.*, 2006; Reynoso-Cuevas *et al.*, 2008). Los resultados de este trabajo indican que la presencia de diésel redujo significativamente el peso seco de parte aérea y raíz en plantas de alfalfa. Resultados similares han sido descritos para plantas como *Brachiaria decumbens*, *Casuarina equisetifolia*, *Phaseolus vulgaris*, *Melilotus albus* y *M. sativa*, cuando fueron expuestas a diferentes

concentraciones de diésel (Saadoun y Al-Ghazawi, 2010; Hernández-Ortega *et al.*, 2012; Muratova *et al.*, 2012; Díaz-Martínez *et al.*, 2013; Shahsavari *et al.*, 2013; Trejo *et al.*, 2013). También se ha reportado reducción en la biomasa de especies como *Avena sativa*, *Brachiaria mutica*, *Cedrela odorata*, *Cyperus articulatus*, *Haematoxylum campechianum*, *M. sativa*, *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum*, *Swietenia macrophylla*, *Tabebuia rosea*, *Triticum aestivum*, *Vetiveria zizanioides*, *Zea mays* por efecto de la contaminación con petróleo y otras fracciones de hidrocarburos como fenantreno, fluoranteno, antraceno, pireno y benzo(a)pireno (Salanitro *et al.*, 1997; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Brandt *et al.*, 2006; Marti *et al.*, 2009; Ahammed *et al.*, 2012; Kummerová *et al.*, 2012, Ahammed *et al.*, 2013; Pérez-Hernández *et al.*, 2013).

La contaminación del sustrato con diésel provocó una reducción en la longitud de la raíz y en la altura de las plantas de *Medicago sativa*, y con ello una reducción en el número de hojas. El efecto del diésel en la reducción de altura de la planta y longitud de raíz está de acuerdo con lo reportado para plantas como *Casuarina equisetifolia*, *Festuca arundinacea*, *M. sativa*, *M. albus*, *Pennisetum glaucum*, *Sorghum vulgare*, *Vigna radiata* y *Z. mays* (Luach y Chaudhry, 2012; Díaz-Martínez *et al.*, 2013; Shahsavari *et al.*, 2013; Zarankimar *et al.*, 2013). Resultados similares han sido descritos para plantas como *Cedrela odorata*, *Haematoxylum campechianum*, *M. sativa*, *P. sativum*, *Swietenia macrophylla*, *Tabebuia rosea*, *Vinca rosea*, *Z. mays*, cuando fueron expuestas a otros hidrocarburos del petróleo (Martí *et al.*, 2009; Al-Qahtani, 2011; Kummerová *et al.*, 2012; Kummerová *et al.*, 2013; Pérez-Hernández *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la contaminación con hidrocarburos del petróleo inducen una sequía fisiológica en las plantas (Omosum *et al.*, 2009), generando una condición de estrés oxidativo. La atenuación de este estrés es favorecida por la actividad de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que poseen las plantas. Sin embargo, altas concentraciones de

diésel disminuyen la actividad de varias enzimas como peroxidasa, ácido ascórbico oxidasa y en menor cantidad la actividad de la catalasa (Wang *et al.*, 2011), lo que puede reflejarse en los niveles de transcripción de los genes correspondientes a estas enzimas. En los resultados obtenidos en este trabajo no se encontró inducción en la expresión de genes relacionados con el estrés por la contaminación de diésel.

La inducción de genes en respuesta a diversos agentes de estrés, como sequía, salinidad y contaminación con metales pesados e hidrocarburos, se ha reportado en un periodo corto de tiempo, incluso cuando el estrés se ha desarrollado solo en unas cuantas horas (Liu *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012). Bajo esta condición es probable que dentro de la evaluación de los genes en relación al estrés por diésel en plantas de *M. sativa*, no se haya observado una inducción de los genes evaluados, debido a que el tiempo de exposición al contaminante fue de 30 días. Sin embargo, sólo se observó la inducción del gen *FeSOD* en parte aérea en la concentración 1000 mg kg<sup>-1</sup>. Al respecto, trabajos con *Medicago truncatula* mostraron que la inducción en la expresión de genes *SOD* fue mayor en parte aérea que en la raíz, cuando la planta creció bajo estrés por salinidad y sequía (Macoevi *et al.*, 2011). Por otro lado, Hernández-Ortega *et al.* (2012) encontraron mayor actividad antioxidante en parte aérea de *Melilotus albus* que en raíces, cuando las plantas fueron sometidas a contaminación con diésel (7500 mg kg<sup>-1</sup>). Esto explicaría por qué bajo estrés por diésel en *Medicago sativa* se encontró la inducción del gen *FeSOD* en parte aérea.

Romero-Puertas *et al.* (2007) reportan que la contaminación con cadmio disminuyó fuertemente la actividad de las isoformas de CuZnSOD en hojas, la cual está relacionada con el contenido de proteína afectando la abundancia de los transcritos de *CuZnSOD*. Además, reportan que el cambio de estos transcritos puede estar determinado por la disponibilidad de Cu

y Zn, la cual puede ser reducida por la presencia de Cd. En un estudio previo con *Melilotus albus*, la presencia de diésel provocó la disminución del contenido de Cu y Zn (Hernández-Ortega *et al.*, 2012); lo anterior podría explicar por qué se presentó una represión del gen *CuZnSOD*, cuando las plantas de *Medicago sativa* estuvieron expuestas al diésel.

## CONCLUSIONES

El diésel al igual que otros productos derivados del petróleo afecta el crecimiento y el rendimiento de las plantas. En este estudio el desarrollo de la alfalfa (*Medicago sativa*) fue afectado por el diésel adicionado al sustrato, y disminuyó proporcionalmente con el incremento de la concentración del contaminante. También se puso de manifiesto que el umbral de la expresión de los genes *APX-2*, *CuZnSOD*, *FeSOD*, *MnSOD* y *MHI* en respuesta al estrés por la presencia del diésel esté por debajo de las concentraciones evaluadas, o se presenten en un tiempo menor de la exposición al contaminante. Será fundamental seguir investigando el umbral de expresión de genes en respuesta a estrés por la contaminación de diésel, así como la posible asociación con los microorganismos del suelo como una alternativa para la atenuación del estrés, e incrementar la tolerancia de las plantas en los suelos contaminados.

## CAPÍTULO VI

### Efecto del diésel sobre la conductividad hidráulica y cambios morfológicos del cilindro

#### vascular en *Medicago sativa*<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Esta investigación evaluó las respuestas hidráulicas de raíces en plántulas de *Medicago sativa* expuestas a diésel. Las semillas germinaron en tubos de ensayo con medio agar-agua al 1% contaminado con diésel (3000, 6000, 9000, 12000, 15000, 18000 y 21000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), e incluyendo tubos sin contaminar como controles (0  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). A los 10 días de crecimiento, las raíces fueron separadas de la parte aérea para determinar su anatomía, conductividad hidráulica ( $K_h$ ), conductividad hidráulica específica ( $K_s$ ), porcentaje de pérdida de conductividad (PLC), y el potencial hídrico de la hoja ( $\Psi_h$ ). Los cambios anatómicos en las raíces están relacionados con la pérdida del arreglo tetrarca de los vasos de xilema; sin embargo, el número de vasos de metaxilema aumentó en respuesta al diésel. El incremento en la concentración de diésel resultó en la disminución de los valores de  $K_h$  y  $K_s$ , así como en el incremento de los valores de PLC. La formación de más vasos de xilema como ajuste anatómico, en lugar de aumentar los valores de  $K_s$ , llevó a *Medicago sativa* al riesgo de la pérdida de la conductividad hidráulica.

**Palabras clave:** conductividad hidráulica, porcentaje de pérdida de conductividad, vasos de la estela de raíz.

---

<sup>1</sup>Capítulo aceptado para su publicación en la revista **Environmental and Experimental Botany** (ver Anexo V).

## CHAPTER VI

### Diesel effects on hydraulic conductivity and morphological changes of vascular cylinder in

#### *Medicago sativa*

#### ABSTRACT

This research evaluated the root hydraulic responses of *Medicago sativa* seedlings exposed to diesel. Seeds were germinated in test tubes with 1% water-agar contaminated with diesel (3000, 6000, 9000, 12000, 15000, 18000 and 21000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), and uncontaminated test tubes were also included as controls (0  $\mu\text{L L}^{-1}$ ). After 10 days of growth, roots were detached to determine their anatomy, hydraulic conductivity ( $K_h$ ), specific hydraulic conductivity ( $K_s$ ), percentage of loss conductivity (PLC), and leaf water potential ( $\Psi_{lw}$ ). Root anatomical changes were related to the loss of tetrarch arrangement of xylem vessels; however, the number of metaxylem vessels increased in response to diesel. Increasing diesel concentrations resulted in diminished  $K_h$  and  $K_s$  values, as well as enhanced PLC values. The formation of more xylem vessels as anatomical adjustment, instead of increasing  $K_s$  values, jeopardize plants due to the loss conductivity.

**Key words:** hydraulic conductivity, percent loss of conductivity, root stele vessels.

#### INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda de petróleo y de sus derivados a menudo propician accidentes y derrames, causando impactos ambientales negativos en suelos y agua (Muratova *et al.*, 2003; Bona *et al.*, 2011). Además, los efectos negativos de los derrames de petróleo dependen de la estacionalidad, así como del tipo y cantidad de los contaminantes (Merkl *et al.*,

2005b; Kayode *et al.*, 2009; Kisic *et al.*, 2009). El combustible diésel es considerado extremadamente tóxico para la salud humana debido a que es un compuesto hidrofóbico, recalcitrante, y tiene propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Johnsen y Karlson, 2007; Patrolecco *et al.*, 2010; Wölz *et al.*, 2011).

Los hidrocarburos del petróleo (HP) en los suelos suelen dar lugar a una limitada disponibilidad de agua, oxígeno y nutrientes para las plantas (Adenipekun *et al.*, 2008). Por ejemplo, el diésel se compone principalmente de una mezcla compleja de *n*-alcanos (12C a 26C) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Douglas *et al.*, 1992; Khalladi *et al.*, 2009) que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hernández-Ortega *et al.*, 2012; Díaz-Martínez *et al.*, 2013). El diésel también puede causar estrés oxidativo debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Así, la presencia de HP en los suelos inhibe la germinación de semillas y limita el crecimiento y acumulación de biomasa de las plantas (Adam y Duncan, 2002; Chupakhina y Maslennikov, 2004; Merkl *et al.*, 2004, 2005a; Achuba, 2006; Issoufi *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006; White *et al.*, 2006a; Adedokun y Ataga, 2007; Sharifi *et al.*, 2007; Omosun *et al.*, 2008; de Farias *et al.*, 2009; Ogbo, 2009; Njoku *et al.*, 2009b; Saadoun y Al-Ghazawi, 2010), porque las plantas experimentan una sequía fisiológica debido a la limitada absorción de agua y al deterioro del intercambio gaseoso (Omosun *et al.*, 2009).

La morfología y anatomía de la planta también son afectadas por los HP en suelos (Maranho *et al.*, 2006; Inckot *et al.*, 2008); por ejemplo, el área foliar, la densidad de los estomas y el espesor de la cera epicuticular (Maranho *et al.*, 2006; Adenipekun *et al.*, 2008; Omosun *et al.*, 2008; Sadunishvili *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2011). En el caso de la raíces, se ha reportado que los HP alteran significativamente la tasa de división celular en los ápices radiculares, el tamaño de las regiones meristemáticas y la estructura de los pelos radicales (Merkl

*et al.*, 2004; Alkio *et al.*, 2005; Achuba, 2006; Inckot *et al.*, 2008; Ziólkowska y Wyszowski, 2010; Bona *et al.*, 2011). Además, los HP pueden alterar la forma y el tamaño del parénquima, y reducir los espacios intercelulares en el córtex del tallo y las raíces (Omosun *et al.*, 2008).

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una especie de leguminosa comúnmente utilizada para la rehabilitación de suelos altamente perturbados, y además tiene un buen potencial para la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos como los bifenilos policlorados y los HP (Chekol *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2010, 2011). Sin embargo, poco se sabe acerca de los cambios morfológicos y anatómicos de las plántulas de alfalfa en sistemas contaminados con HP. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios de investigación de modificaciones anatómicas de raíces en plantas se han relacionado con la contaminación por metales pesados (Azmat *et al.*, 2006; Ghelich y Zarinkamar, 2013), así como al estrés por sequía e inundaciones (Burnett *et al.*, 2005; Cortina *et al.*, 2008).

Varios estudios se han centrado en los cambios anatómicos inducidos por los HP en las raíces de *Sebastiania commersioniana*, *Schinus terebinthifolius*, *Pisum sativum* y *Zea mays*, y el aumento del diámetro de la raíz se asoció con un alto número de vasos del xilema (Bona *et al.*, 2011; Kummerová *et al.*, 2013). Mu *et al.* (2006) indicaron que los parámetros hidráulicos permiten la evaluación de la absorción de agua en las raíces primarias de *Zea mays* en condiciones normales y de estrés. Hacke y Sperry (2001) demostraron que el estrés hídrico induce mayor cavitación en los vasos del xilema de las raíces de plantas semi-leñosas en comparación con los tallos de arbustos del desierto. Sin embargo, no hay evidencia científica aun publicada que describa la conductividad hidráulica en raíces primarias en respuesta a la contaminación por HP. Por lo tanto, esta investigación probó la hipótesis de que el estrés hídrico inducido por la contaminación por diésel puede provocar cambios anatómicos y fisiológicos en

las raíces de *Medicago sativa*, mediante la evaluación del número de vasos de metaxilema y potencial hídrico para estimar la pérdida de la conductividad hidráulica.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Establecimiento del experimento y condiciones de crecimiento**

Se prepararon tubos Falcon (15 mL) con medio agar-agua (1%) contaminado con diésel a 3000, 6000, 9000, 12000, 15000, 18000 y 21000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , incluyendo tubos sin contaminar (controles). Cada tratamiento consistió de diez tubos de ensaye (réplicas). Las semillas de *Medicago sativa* se lavaron con una solución de detergente (1%) durante tres minutos, se enjuagaron con agua destilada, y se secaron sobre papel absorbente. Cinco semillas se sembraron en cada tubo de ensaye, y se colocaron en oscuridad para permitir la germinación de las semillas y el desarrollo de la radícula. Las unidades experimentales se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 25 °C, 80% HR y 12 h luz.

### **Medición de tamaño de la planta, flujo de agua, conductividad hidráulica ( $K_h$ ), conductividad hidráulica específica ( $K_s$ ) y porcentaje de pérdida de conductividad (PLC)**

Después de 10 días de crecimiento, las plántulas (n=15) se midieron para estimar su altura total (cm) y se cosecharon. Las plántulas se colocaron en cajas de Petri con agua, y las raíces y parte aérea fueron separados; una muestra de raíz (4-6 mm) y sin raíces laterales se cortó para medir los flujos correspondientes para la evaluación de la conductividad hidráulica. Cada segmento de raíz fue colocado en un sistema de mangueras flexibles (3 mm de diámetro) suministrado con un recipiente de agua desgasificada a 10 cm por encima de la muestra ( $\Delta h$ ) para generar un gradiente de presión (dP) (Figura 6.1).

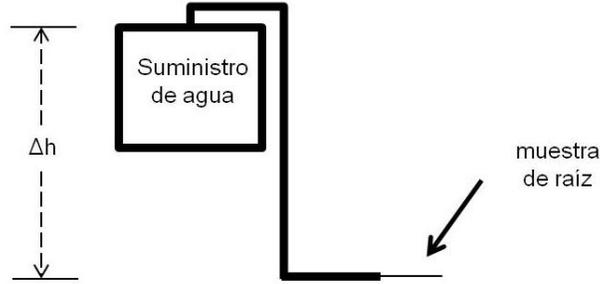


Figura 6.1. Sistema de mangueras para la evaluación de conductividad hidráulica en raíces de *Medicago sativa*.

El flujo inicial ( $F_i$ ) se estimó basándose en el tiempo que tardó en salir una gota de agua por el extremo de la muestra de raíz. La gota de agua se recolectó y se pesó. A través de cada segmento de raíz se hizo pasar agua desgasificada a presión para eliminar las burbujas de los vasos de xilema. Después de quitar las burbujas, el mismo procedimiento para estimar el flujo inicial se repitió para obtener el valor del flujo final ( $F_f$ ) utilizando la ecuación 1 (Tyree y Ewers, 1996).

$$\mathbf{F} = \mathbf{m}/\mathbf{t} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde  $\mathbf{F}$  es el flujo másico,  $\mathbf{m}$  es la masa del agua (kg) y  $\mathbf{t}$  es el tiempo que la gota de agua tomó para salir (s).

La conductividad hidráulica fue estimada con la ecuación 2 (Tyree y Ewers, 1996).

$$\mathbf{K}_h = \mathbf{F}/(\mathbf{dP}/\mathbf{dx}) \quad (\text{Ec. 2})$$

donde  $\mathbf{F}$  es el flujo másico estimado con la ecuación 1, y  $\mathbf{dP}/\mathbf{dx}$  es la caída de presión a través de  $x$  (longitud del segmento de raíz, m).

El área efectiva de conducción ( $A_{ec}$  en  $m^2$ ) de cada raíz fue determinada para estimar la conductividad específica inicial ( $K_{si}$ ) y final ( $K_{sf}$ ) usando la ecuación 3 (Sperry *et al.*, 1988; Tyree y Ewers, 1996).

$$K_s = K_h / A_{ec} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde  $A_{ec}$  es la media del área de cada capilar multiplicada por el número de vasos de metaxilema o protoxilema, de cada raíz para cada tratamiento.

Así, la  $K_{si}$  y la  $K_{sf}$  se determinaron para calcular el porcentaje de pérdida de conductividad, con base a la ecuación 4.

$$PLC = (K_{sf} - K_{si}) / K_{sf} \quad (\text{Ec. 4})$$

### **Medición del potencial hídrico en hoja ( $\Psi_h$ ) y del área foliar**

El potencial hídrico de la hoja ( $\Psi_h$ ) se midió utilizando un sistema de mangueras de plástico, que contenía un manómetro y émbolos, suministrado con agua desgasificada. El material vegetal utilizado para esta medición correspondió a la parte aérea separada de la raíz primaria. Las hojas y el tallo fueron encapsulados en puntas de micropipeta (10  $\mu\text{L}$ ) y cubiertos con papel oscuro. La cápsula se insertó en el sistema de mangueras (llenado con agua desgasificada) y el manómetro fue calibrado a cero. Se tiró del émbolo 1 para ejercer una fuerza de tensión en la columna de agua del xilema y permitir el movimiento del menisco hacia el final de la sección transversal de la parte aérea. Los meniscos removidos hacia la superficie correspondieron a la primera burbuja y ésta burbuja sirvió como un indicador para la lectura del manómetro. Para asegurarse de que el aire de la cápsula no afectó las lecturas, se realizaron 10 lecturas de  $\Psi_h$  con muestras encapsuladas con aire, con agua destilada o con aceite mineral, respectivamente. Esas lecturas de  $\Psi_h$  fueron consistentes (ver Anexo III, Cuadro AIII-6.1), indicando que ni el aire, ni el agua destilada o el aceite mineral entraron en el tejido de la planta a través de la hoja. El área foliar se estimó dibujando el contorno de la hoja (Rodés y Collazo, 2006).

## Caracterización microscópica del sistema vascular en raíces

Cada segmento de raíz usado para la medición del flujo de agua fue fijado en FAA (formaldehído 10 mL, ácido acético 5 mL, etanol 50 mL y agua destilada 35 mL) durante 48 h, se lavaron con agua destilada e infiltraron usando una solución de inclusión (Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T.<sup>™</sup>), para cortarlas a -20 °C con un micrótopo (Leica<sup>®</sup>). Cortes de raíz entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  se tiñeron con azul de toluidina, se deshidrataron y se montaron en resina de Entellan (Ruzin, 1999). A partir de cortes transversales de la raíz se determinaron el diámetro de la raíz, el diámetro mayor y menor del cilindro vascular, y el número y diámetro de los vasos de protoxilema y metaxilema. Adicionalmente se calculó el índice alométrico considerando la relación entre longitud total de la planta y el diámetro del cilindro vascular (LTP/DCV), para evaluar el impacto morfológico ocasionado por la contaminación de diésel.

De acuerdo a la ley de Hagen Poiseuille (Streeter y Wylie, 1987), el diámetro del vaso (d) impacta en la cantidad de agua que fluye a través de un capilar, por lo que este flujo (Q) está en función del radio (d/2) a la cuarta potencia para cada vaso ( $r^4$ ). Se calculó la media para  $r^4$  en cada vaso de metaxilema o protoxilema, multiplicando este valor por el número de vasos de cada zona (metaxilema o protoxilema) para cada raíz; así, se obtuvo el índice de flujo (IF=  $r^4$ \*numero de vasos). También se calculó un índice proporcional de flujo (IPF) que incluyó el índice de flujo de protoxilema y metaxilema, para evaluar el efecto del cambio en el diámetro y número de vasos de ambos tipos de xilema en el flujo de agua, de acuerdo a la ecuación 5.

$$\text{Índice proporcional de flujo (IPF)} = \text{IF}_{\text{mx}} / \text{IF}_{\text{px}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Por lo tanto, el IPF 1) indica que el flujo de agua está en función exponencial de r, por lo que un pequeño aumento en el diámetro de los vasos de metaxilema resulta en una diferencia dramática

en comparación con el flujo de protoxilema (Tyree y Ewers, 1996; Tyree y Zimmermann, 2002), y 2) representa el efecto de los cambios en el número de vasos.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se realizó usando un diseño completamente al azar, y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (SAS Institute Inc., 2002) y a una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). Además, se estimó el coeficiente de correlación de Pearson entre la longitud de la planta y el área foliar para  $\Psi_h$  y para PLC. Se realizó un análisis de regresión múltiple (Zar, 1984) para estimar las correlaciones significativas entre los parámetros anatómicos y potenciales hídricos con la pérdida de la conductividad hidráulica, utilizando el software estadístico NCSS (Hintze, 2000).

## **RESULTADOS**

### **Tamaño de la planta, área foliar, potencial hídrico de las hojas ( $\Psi_h$ ) y parámetros hidráulicos ( $K_h$ , $K_s$ , PLC)**

El tamaño de la planta y el área foliar de *M. sativa* disminuyeron significativamente en respuesta a la contaminación con diésel. El tamaño promedio de la planta, medido como longitud total, fue de 18.9 y 6.2 cm en plantas control y contaminadas con diésel, respectivamente. Por otra parte, en 21000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , el tamaño de las plantas se redujo en un 75% (Cuadro 6.1). La reducción promedio del área foliar debido a la contaminación por diésel fue de 22.4% en comparación con las plantas control (Cuadro 6.1).

La pérdida de la conductividad hidráulica (PLC) de las raíces del control se redujo en un 40%, y a medida que la concentración de diésel aumentó en el medio de crecimiento, el PLC

incrementó significativamente (Cuadro 6.1). Por ejemplo, la conductividad hidráulica de raíces tratadas con 12000, 15000, 18000 y 21000  $\mu\text{L L}^{-1}$  se redujo en 78.2, 71.8, 76.7 y 85%, respectivamente (Cuadro 6.1).

Cuadro 6.1. Efecto de la contaminación por diésel en la longitud de la planta, área foliar, potencial hídrico ( $\Psi_h$ ) y porcentaje de pérdida de la conductividad (PLC) en plántulas de *Medicago sativa*, diez días después de la germinación.

Diésel $\mu\text{L L}^{-1}$	Área foliar ( $\text{cm}^2$ )	Longitud total de la planta (cm)	LTP/DCV	$\Psi_h$ (MPa)	PLC (%)
0	0.62 a	19.4 a	1545.1 a	-0.0547 a	40.12 b
3000	0.59 ab	9.4 b	769.5 b	-0.0569 ab	49.41 b
6000	0.56 ab	7.7 c	634.0 bc	-0.0577 ab	46.49 b
9000	0.49 bc	6.1 d	516.3 cd	-0.0590 ab	47.65 b
12000	0.46 c	5.6 d	473.5 de	-0.0594 b	78.27 a
15000	0.45 c	4.9 e	369.2 def	-0.0604 b	71.86 a
18000	0.43 c	4.6 e	368.2 ef	-0.0604 b	76.78 a
21000	0.43 c	4.6 e	344.9 f	-0.0606 b	85.83 a
<b>Significancia:</b>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>coeficiente de correlación de Pearson (r):</b>					
<b>longitud total planta / <math>\Psi_h = 0.47</math></b>		<b>longitud total planta / PLC = -0.58</b>			
<b>área foliar / <math>\Psi_h = 0.40</math></b>		<b>área foliar / PLC = -0.44</b>			
<b>PLC / <math>\Psi_h = -0.32</math></b>					

Promedios con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ),  $n = 15$ .

El potencial hídrico de la hoja ( $\Psi_h$ ) fue más negativo al incrementar la contaminación de diésel en el medio de crecimiento, especialmente en concentraciones superiores a 9000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (Cuadro 6.1), sin embargo, a 12000  $\mu\text{L L}^{-1}$  el  $\Psi_h$  permaneció constante. Con base en el coeficiente de correlación de Pearson, la longitud de la planta y el área foliar se correlacionaron positivamente con  $\Psi_h$ , pero se correlacionaron negativamente con el PLC (Cuadro 6.1). Por otra parte, el PLC se explicó en 40% ( $p<0.0001$ ;  $\alpha=0.05$ ) por ambos parámetros anatómicos y

morfológicos y también por el  $\Psi_h$ . De este modo, el PLC también se relaciona con la limitación de agua causada por el diésel.

El aumento de la concentración de diésel redujo significativamente ( $p < 0.001$ ) la  $K_h$  y la  $K_s$ . La conductividad hidráulica inicial ( $K_{hi}$ ) se redujo de 32% al 86% en respuesta a la contaminación de diésel en comparación con el control. Se observó una respuesta similar en la conductividad hidráulica específica inicial ( $K_{si}$ ). Por lo tanto, la pérdida de la conductividad hidráulica debido a la contaminación de diésel osciló entre 25 y 90% (Cuadro 6.2).

Cuadro 6.2. Efecto de la contaminación por diésel en la conductividad hidráulica ( $K_h$ ) y en la conductividad hidráulica específica ( $K_s$ ) en raíces de plántulas de *Medicago sativa*, diez días después de la germinación.

Diésel $\mu\text{L L}^{-1}$	$K_h^{\S}$ ( $\text{kg s}^{-1} \text{ m MPa}^{-1}$ )		$K_s$ ( $\text{kg s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ )	
	inicial	final	inicial	final
<b>0</b>	2.15 a	3.79 a	5679.1 ab	9942.6 ab
<b>3000</b>	1.94 ab	3.49 a	5923.7 a	11116.2 a
<b>6000</b>	0.97 abc	1.95 a	2841.8 abc	5629.2 ab
<b>9000</b>	0.49 bc	0.97 a	1381.4 bc	2587.3 b
<b>12000</b>	0.29 c	1.59 a	1082.6 c	5708.2 ab
<b>15000</b>	0.74 abc	2.82 a	2061.3 bc	7780.0 ab
<b>18000</b>	0.34 c	1.73 a	902.1 c	4604.6 ab
<b>21000</b>	0.26 c	2.38 a	546.1 c	4815.7 ab
<b>Significancia:</b>	0.001	NS	0.001	0.01

$\S$  = valores expresados a la potencia  $10^{-5}$ . Promedios con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ),  $n = 15$ .

### Cambios anatómicos en el cilindro vascular de raíces primarias

La contaminación con diésel no produjo diferencias marcadas en el diámetro total de las raíces o del cilindro vascular; sin embargo, la concentración de 15000  $\mu\text{L L}^{-1}$  produjo mayor

diámetro de la raíz con respecto al control (Cuadro 6.3). Desde el punto de vista anatómico, las raíces del tratamiento control presentaron una estela tetraarca (Figura 6.2A,) mientras que el diésel (3000, 6000 y 9000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) causó formaciones irregulares (Figura 6.2B-D). Sin embargo, ante 12000  $\mu\text{L L}^{-1}$  se observó una estela triarca (Figura 6.2E), pero a medida que la concentración de diésel aumentó se observaron estelas irregulares (Figura 6.2F-H).

Los valores del diámetro del cilindro vascular (DCV) mostraron ligeramente un incremento hacia valores mayores de diésel. El impacto alométrico observado en la relación LTP/DCV muestra diferencias significativas entre el control y los tratamientos con diésel (Cuadro 6.1). Se observaron diferencias significativas en el diámetro o en el número de vasos de protoxilema y metaxilema, aunque estas diferencias no mostraron una tendencia clara entre los tratamientos (Cuadro 6.3).

Los valores de IPF mostraron diferencias entre los tratamientos, especialmente en las concentraciones de 18000 y 21000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , comparado con el control (Cuadro 6.3). Estos valores se atribuyen a un ajuste anatómico para compensar la falta de abastecimiento de agua. La Figura 6.3 muestra el comportamiento de los valores de IF en los vasos de metaxilema, los cuales fueron significativamente aumentados con el incremento de la concentración de diésel en el medio de cultivo, en contraste con los vasos de protoxilema. El cambio drástico en el valor de IF del metaxilema es una respuesta al ajuste anatómico que está ocurriendo conforme se incrementa la concentración de diésel.

Cuadro 6.3. Efecto de la contaminación por diésel en el diámetro de raíces y cilindro vascular, en el diámetro y número de vasos en el cilindro vascular y en el índice proporcional de flujo (IPF) de plántulas de *Medicago sativa*, diez días después de la germinación.

Diésel $\mu\text{L L}^{-1}$	Diámetro total de la raíz ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro del cilindro vascular ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro de vasos ( $\mu\text{m}$ )		Número de vasos en protoxilema (px) y metaxilema (mx)		IPF
			px	mx	px	mx	
0	365 b	124 ab	11.3abc	19.1 ab	8 a	11 b	11.47 bcd
3000	418 ab	125 ab	10.5bc	18.0 bc	6 b	10 b	14.43 abc
6000	430 ab	123 ab	11.4a	17.8 bc	8 ab	11 b	9.28 d
9000	386 ab	125 ab	10.3c	17.7 c	8 ab	13 ab	14.41 abc
12000	395 ab	118 b	10.4c	16.2 d	7 ab	11 b	9.93 cd
15000	467 a	137 a	10.7abc	17.8 bc	7 ab	12 ab	13.22 bcd
18000	438 ab	129 ab	10.8abc	18.5 abc	6 b	12 ab	16.40 ab
21000	437 ab	137 a	11.4 ab	19.5 a	6 b	14 a	19.15 a
<b>Significancia:</b>	NS	NS	0.001	0.001	0.05	0.001	0.001

Promedios con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ), n = 15. NS= no significativo.

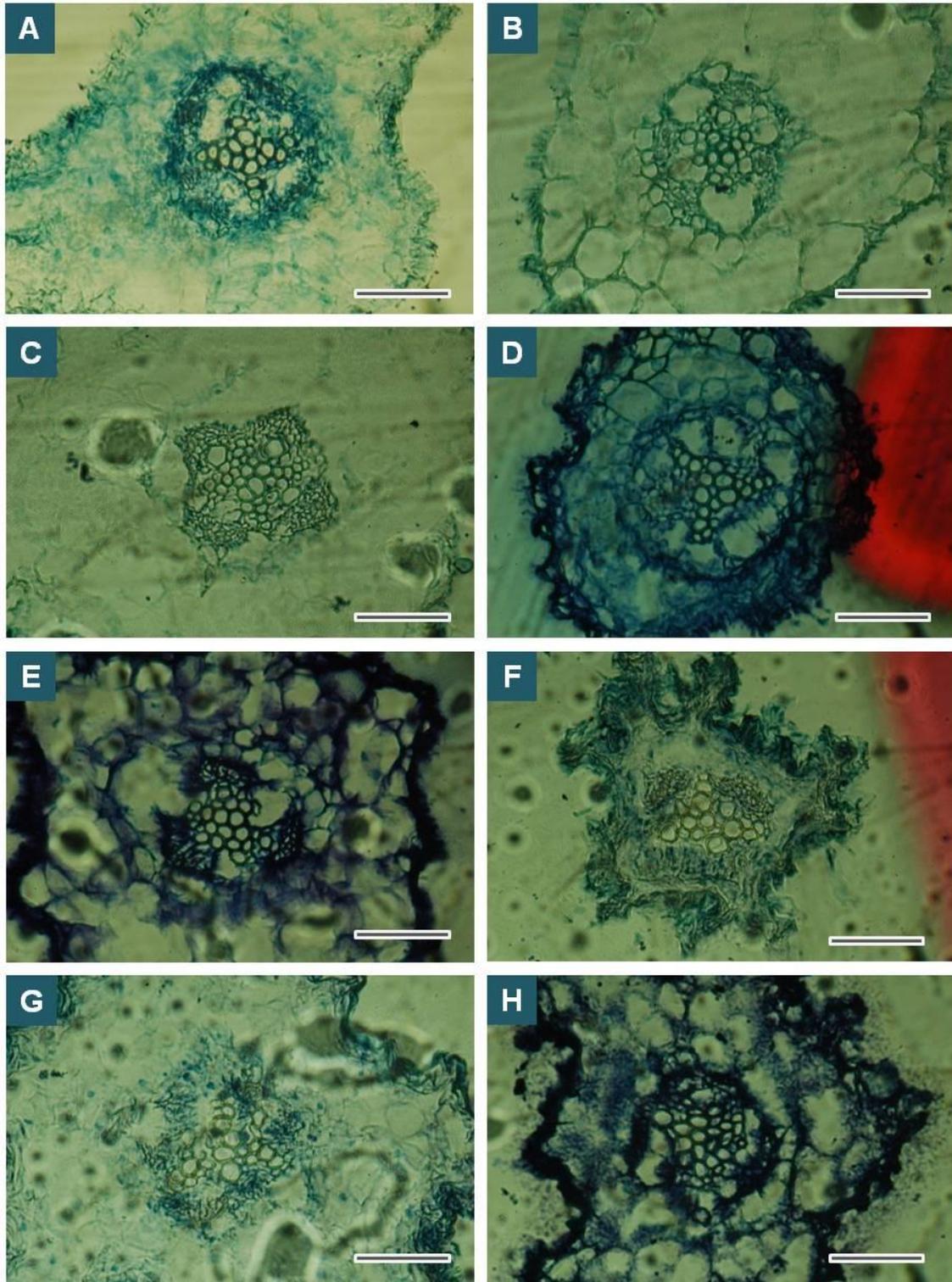


Figura 6.2. Cortes transversales de raíz primaria de *Medicago sativa* crecidas bajo contaminación con diésel, teñidas con azul de toluidina. A) Control, B) 3000, C) 6000, D) 9000, E) 12000, F) 15000, G) 18000 y H) 21000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Barra= 100  $\mu\text{m}$ .

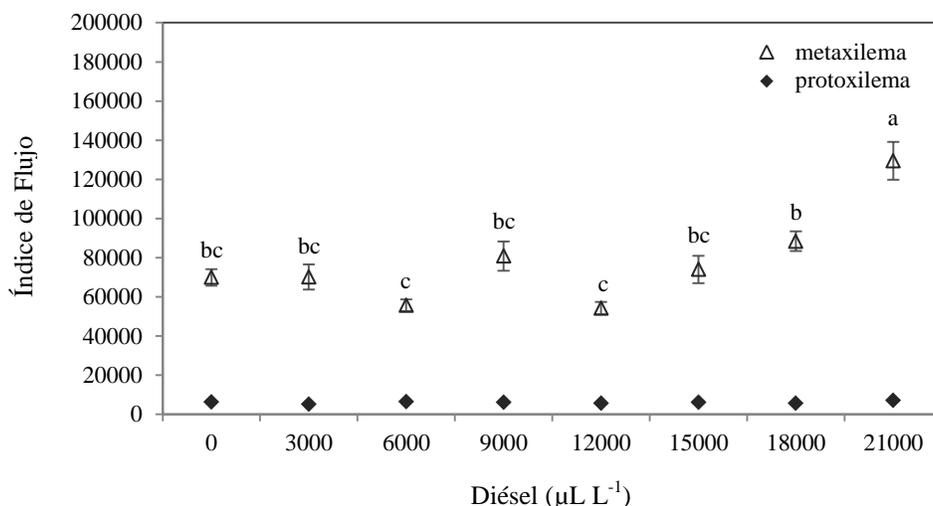


Figura 6.3. Efecto de la contaminación con diésel en el índice de flujo ( $IF = r^4 \cdot \text{numero de vasos de xilema}$ ) en raíz primaria de *Medicago sativa*, diez días después de la germinación. Barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ), medias  $\pm$  error estándar,  $n=15$  raíces.

## DISCUSIÓN

El cilindro vascular de las raíces de plántulas de diez días en el control mostró un arreglo tetraarca. Lo anterior es opuesto a la anatomía de la raíz reportada por Wolfanger (1932) y Basconsuelo *et al.* (2011), quienes caracterizaron raíces triarcas en *Medicago sativa* durante las primeras etapas de desarrollo. Además, Wolfanger (1932) y Seago y Fernando (2013) también reconocieron estos dos tipos de arreglos en el cilindro vascular en las raíces de *Medicago*, pero con pocos vasos. El presente estudio demostró que los cambios anatómicos ocurren en el cilindro vascular de la alfalfa en respuesta a la contaminación por diésel, y estos cambios están relacionados con la alteración del arreglo tetraarca a triarca en la concentración de  $12000 \mu\text{L L}^{-1}$ . Estos últimos cambios anatómicos son similares a los reportados por Ghelich y Zarinkamar (2013), quienes indicaron que la contaminación por plomo (Pb) dio lugar a cambios histoquímicos y ultraestructurales de *Medicago*, presumiblemente debido al desequilibrio

fitohormonal. Además, el aumento en el diámetro del cilindro ha sido reportado en otras especies de plantas, tales como *Glycine max*, *Zea mays* y *Pisum sativum* cultivadas bajo condiciones de sequía o en solución nutritiva contaminada con el hidrocarburo policíclico aromático fluoranteno (Makbul *et al.*, 2011; Kummerová *et al.*, 2013). Sin embargo, los resultados del presente estudio proporcionan una información más precisa sobre el impacto del diésel en el diámetro y en el número de vasos en las raíces de alfalfa.

Un estudio previo realizado por Merkl *et al.* (2005b) demostró que el diámetro de las raíces de *Brachiaria brizantha* y *Cyperus aggregatum* aumentó en suelo contaminado con petróleo crudo pesado. Esto último está de acuerdo con la respuesta observada en las raíces de *Medicago sativa* en contaminación con diésel, aunque estos cambios fueron menores. Desafortunadamente, no existen informes detallados sobre las modificaciones anatómicas de las raíces en respuesta a los contaminantes orgánicos, como el diésel, con los que se puedan comparar los resultados de este estudio.

La alfalfa no ajustó el diámetro de los vasos en respuesta a la contaminación por diésel; en contraste, las raíces construyeron más capilares conductores de un tamaño similar, como un ajuste anatómico. Sin embargo, este ajuste anatómico en lugar de aumentar los valores de  $K_s$ , llevó a la alfalfa a un mayor riesgo de la pérdida de conductividad, indicado por los valores del PLC y del IF (Cuadro 6.1 y Figura 6.3). Por otra parte, el índice proporcional de flujo (IPF) indica que el flujo másico aumentó en proporción a la concentración de diésel, debido a que el número de vasos en las raíces también incrementó con el aumento de la concentración del contaminante. Esta respuesta anatómica indica que *Medicago sativa*: 1) forma más capilares para equilibrar la conductividad hidráulica, impactando los valores de flujo másico estimados a partir del IPF y del IF (Cuadro 6.3, Figura 6.3), y 2) incrementa el diámetro del cilindro vascular como

resultado de lo anterior (Cuadro 6.1). Además, de acuerdo a los valores del IF parece que los vasos del metaxilema son más funcionales que los vasos del protoxilema. Adicionalmente, se observa que la relación LTP/DCV tiene un cambio significativo en la disminución de sus valores debido a la limitación de agua causada por la contaminación de diésel.

Los cambios observados en los valores del potencial hídrico son muy pequeños, y no explican la magnitud de la pérdida de la conductividad hidráulica observada en respuesta a las concentraciones de diésel; por lo tanto, el PLC no puede atribuirse a una sola variable. El análisis de regresión múltiple indica que el conjunto de parámetros anatómicos y morfológicos puede explicar el 40% de la pérdida de conductividad, que parece ser un fenómeno multifactorial. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que los valores de PLC pueden estar asociados a dos factores: medio de crecimiento (agar) y contaminación por diésel. Sin embargo, nuestro diseño experimental no nos permite medir la influencia de estos dos factores.

La conductividad hidráulica en las raíces de los tratamientos con 3000, 6000 y 9000  $\mu\text{L L}^{-1}$  fue similar a las raíces del tratamiento control, sugiriendo que la alfalfa se desarrolla sin fuertes cambios anatómicos en concentraciones de diésel relativamente bajas. Sin embargo, a concentraciones superiores a 12000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , se observaron cambios anatómicos y una pérdida drástica de la conductividad hidráulica, pero el análisis de regresión múltiple sugiere que tales cambios anatómicos y valores de PLC pueden estar correlacionados con el efecto del diésel (Cuadro 6.1).

Los valores de  $K_{hi}$  y  $K_{si}$  representan la cantidad real del flujo de agua que asciende a una presión determinada ponderada por la sección transversal de la raíz. La contaminación por diésel dio lugar a un estrés hídrico debido a que la absorción de agua por las raíces fue limitada. Esto último pudo haber causado cavitación, lo que podría explicar los valores del PLC.

Desafortunadamente, hay una carencia en la información de la anatomía de la raíz en plantas bajo contaminantes orgánicos, por lo tanto no se pueden discutir a mayor detalle los datos obtenidos. Sin embargo, Ghelich y Zarinkamar (2013) indican que el diámetro de los vasos vasculares de raíces de alfalfa aumentó en respuesta a la contaminación con plomo (Pb).

El uso de plantas con fines de fitorremediación implica entender su crecimiento y tolerancia a los contaminantes, pero las respuestas anatómicas y fisiológicas que las plantas tienen frente a tales condiciones de estrés no son bien conocidas. Por otra parte, las consecuencias a corto y largo plazo de la anatomía y el ajuste fisiológico de la planta deben ser investigadas a detalle. Por tal razón, se requieren esfuerzos adicionales de investigación para dilucidar el papel de la raíz en los cambios de la conductividad hidráulica en respuesta a la contaminación del suelo, tanto en el crecimiento y la adaptación de las plantas a la contaminación con HP, en el que microorganismos hidrocarbonoclastas o simbióticos pueden también desempeñar una función importante.

## **CONCLUSIONES**

Los estudios enfocados en dilucidar las respuestas anatómicas, estructurales e hídricas en órganos de plantas en presencia de hidrocarburos del petróleo son escasos. Este estudio proporciona más evidencia científica de los parámetros anatómicos e hidráulicos en las raíces de alfalfa crecidas en contaminación con diésel. El diésel provocó cambios internos asociados con una ligera reducción del tamaño de vasos, pero un incremento en el diámetro del cilindro vascular de raíces. Además, la contaminación de diésel ocasionó un aumento en el número de vasos de metaxilema, permitiendo valores del IF más altos que en los vasos de protoxilema. La alfalfa mostró un aumento en el IPF, y una reducción en la relación longitud total de la

planta/diámetro del cilindro vascular (LTP/DCV). Los valores de los parámetros hidráulicos disminuyeron, pero la pérdida de la conductividad incrementó de forma significativa a medida que aumentó la concentración de diésel. A pesar de haber logrado la germinación de las semillas y la emergencia de las plántulas, las concentraciones de diésel afectaron significativamente varios parámetros anatómicos y fisiológicos. Por lo tanto, el uso de alfalfa en los sistemas de fitorremediación puede no ser apropiado, sin considerar adecuaciones previas en los sustratos contaminados para favorecer la tolerancia y el crecimiento de esta especie vegetal.

## CAPÍTULO VII

### **Efecto de la micorriza arbuscular en la conductancia de agua, intercambio gaseoso, cambios anatómicos y estrés oxidativo en *Medicago sativa* en contaminación por diésel**

#### **RESUMEN**

Esta investigación evaluó el efecto de *Rhizophagus intraradices* (HMA) en el crecimiento, conductancia de agua, intercambio gaseoso (transpiración, fotosíntesis, conductancia estomática, y concentración interna de CO<sub>2</sub>), potencial hídrico de la hoja y producción de especies reactivas de oxígeno (superóxido, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en plantas de *Medicago sativa* bajo estrés por diésel. Las plantas de *M. sativa* fueron inoculadas con HMA y establecidas en arena contaminada o sin contaminar. Después de 30 días, el HMA en contaminación por diésel (12000, 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup>) produjo incrementos significativos en el peso seco de la parte aérea (>45%), en la altura (>25%) y en el área foliar (>50%) en comparación con las plantas sin HMA. El incremento en la concentración de diésel aumentó la conductancia de la estela y la conductancia foliar, independientemente del HMA. Ante 18000 mg kg<sup>-1</sup> los valores de la conductancia de la estela y la conductancia foliar en plantas con HMA fue significativamente menor con respecto a las plantas sin HMA. El diésel afectó significativamente (p≤0.05) el intercambio gaseoso y el potencial hídrico de las plantas con y sin HMA. El diésel provocó la acumulación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces, pero el HMA redujo su acumulación, a pesar de que la colonización por HMA fue disminuida. El HMA alivió el efecto tóxico del diésel al incrementar la biomasa y al reducir la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** peróxido de hidrógeno, fotosíntesis, *Rhizophagus intraradices*, potencial hídrico

## CHAPTER VII

### **Arbuscular mycorrhiza on water conductance, gas exchange, morphological changes and oxidative stress of *Medicago sativa* at diesel contamination**

#### **ABSTRACT**

This research evaluated the effects of *Rhizophagus intraradices* (AMF) on plant growth, water conductance, plant gas exchange (transpiration, photosynthesis, stomatal conductance, and internal concentration of CO<sub>2</sub>), leaf water potential and production of reactive oxygen species (superoxide, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in *Medicago sativa* under stress by diesel. Seedlings of *M. sativa*, were inoculated with the AMF, and established to either uncontaminated or contaminated sand. After 30 days, AMF-plants at diesel contamination (12000, 15000 and 18000 mg kg<sup>-1</sup>) significantly increased the shoot dry weight (>45%), height (>25%) and leaf area (>50%) when compared to non-AMF plants. Diesel increased the stele and leaf conductance in both conditions mycorrhization. At 18000 mg kg<sup>-1</sup>, both the stele and leaf conductance in AMF-plants were significantly lower in comparison to non-AMF plants. Regardless AMF inoculation, diesel contamination significantly affected (p≤0.05) plant gas exchange and leaf water potential. Diesel stress resulted in the accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the roots, but AMF-inoculation reduced such accumulation in spite of mycorrhizal colonization was affected by diesel. The AMF alleviated the toxic effects of diesel by enhancing plant biomass and reducing the formation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Keywords:** hydrogen peroxide, photosynthesis, *Rhizophagus*, hydric potential

## INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por los derrames de petróleo es un problema ambiental que requiere la limpieza de los sitios contaminados (Bundy *et al.*, 2002). Los hidrocarburos presentes en el petróleo y sus derivados como el diésel, afectan adversamente la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas (Luhach y Chaudhry, 2012).

Los hidrocarburos del petróleo tienen baja polaridad y son atraídos por las raíces de las plantas, creando una capa hidrofóbica alrededor de la raíz que limita la absorción de agua y nutrientes, y el intercambio de gases (Issoufi *et al.*, 2006; Pérez-Hernández *et al.*, 2013). Bajo estas condiciones las plantas sufren un desequilibrio metabólico generado por una condición de estrés oxidativo (Malallah *et al.*, 1998; Samina y Adams, 2002; Liu *et al.*, 2009; Ahammed *et al.*, 2012, 2013), que interrumpe la homeostasis celular (Mittler, 2002; Gill y Tuteja, 2010). Por lo tanto, los hidrocarburos del petróleo como el diésel, pueden inducir estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2013).

El estrés oxidativo es el efecto tóxico causado por sustancias químicas que son altamente reactivas (especies reactivas de oxígeno, ERO), producidas durante la reducción de oxígeno molecular (Halliwell, 2006), generando una perturbación del estado redox celular en favor de los pro-oxidantes (Mittler *et al.*, 2004). El peróxido de hidrógeno actúa como una molécula de señalización en la mediación de las respuestas de defensa contra el estrés biótico y abiótico. En condiciones fotosintéticas normales, el peróxido es subproducto de las rutas metabólicas en el peroxisoma (Liu *et al.*, 2009). Sin embargo, el peróxido puede difundirse a través de las membranas biológicas y dañar gravemente el metabolismo de las plantas en condiciones de estrés (Ashraf, 2009). Por lo tanto, la regulación del contenido de peróxido en las células es muy importante, especialmente durante condiciones de estrés que favorecen su

generación y acumulación (Bočová *et al.*, 2012). Al entrar en un estado de estrés las plantas deben reducir la producción de ERO mediante procesos relacionados con adaptaciones anatómicas y fisiológicas (Gechev *et al.*, 2006). Otro mecanismo de defensa se relaciona con moléculas antioxidantes para eliminar las ERO y la asociación con microorganismos del suelo para mitigar el estrés oxidativo (Hernández-Ortega *et al.*, 2012; Pérez-Hernández *et al.*, 2013).

Las especies vegetales predominantemente se asocian con hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Los HMA alteran las relaciones hídricas de la planta hospedera en condiciones de estrés por sequía, mediante la producción de hifas que acceden a los pequeños poros del suelo donde obtienen agua y con ello, mejoran la tolerancia de las plantas al déficit hídrico (Bárzana *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2012; Worchel *et al.*, 2013). En años recientes, se ha demostrado que los HMA regulan las propiedades hidráulicas de la raíz, incluyendo la conductividad hidráulica (Bárzana *et al.*, 2012; Birhane *et al.*, 2012). Además, se han sugerido varios mecanismos por los cuales los HMA pueden reducir el estrés hídrico, donde destacan: 1) mejorando la absorción directa y transferencia de agua a través de las hifas fúngicas hacia la planta hospedera, 2) favoreciendo los cambios en las propiedades de retención de agua del suelo, 3) mejorando el ajuste osmótico de las plantas, 4) mejorando el intercambio de gases en la planta y el uso eficiente de agua, o 5) protegiendo contra el daño oxidativo generado por el estrés hídrico (Kaya *et al.*, 2003; Ruiz-Lozano y Aroca, 2010; Birhane *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2012).

Los HMA son conocidos por mejorar la nutrición mineral y aumentar la resistencia de las plantas ante condiciones ambientales drásticas, como la contaminación por diésel (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de *Rhizophagus intraradices* en el crecimiento, estado hídrico, intercambio gaseoso, y producción

del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en plantas de *Medicago sativa* en condiciones de estrés por diésel.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Establecimiento del experimento y condiciones de crecimiento**

Se esterilizó arena y se contaminó con diésel en las siguientes concentraciones: 3000, 6000, 9000, 12000, 18000 y 21000 mg kg<sup>-1</sup>, considerando como testigo arena sin contaminar. A la arena, se le agregaron 100 mL de acetona como disolvente con la cantidad de diésel correspondiente, con el fin de favorecer la impregnación homogénea del contaminante, una vez contaminada la arena se dejó reposar por cinco días. De cada concentración de diésel se prepararon tres vasos de unicel de 250 mL (para la germinación de las semillas), y ocho vasos de unicel de 250 mL divididos en tres secciones (para el desarrollo de las plantas).

En cada uno de los vasos divididos se colocaron tres plántulas de 10 días de desarrollo, una por cada división. La mitad de las plántulas de cada tratamiento fueron inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices*, cuyo inóculo consistió de 50 mg de fragmentos de raíz colonizada con el hongo micorrízico (80% de colonización total) obtenidos de cultivo monoxénico de raíces transformadas de zanahoria. Los vasos se colocaron a temperatura ambiente, con 75% de humedad y fotoperiodo de 14 h, y se regaron diariamente con agua destilada y cada semana se les aplicó solución nutritiva Long Ashton (LANS; Hewitt, 1966; ver Anexo IV, Cuadro AIV-7.1), modificada para suministrar 11 µg de P mL<sup>-1</sup>, para evitar interferencias de este elemento con el establecimiento de la simbiosis micorrízica en las plántulas.

**Medición del tamaño de la planta, parámetros hidráulicos ( $k_{xilema}$ ,  $k_{estela}$  y  $k_{foliar}$ ) e intercambio gaseoso.**

Después de 30 días de la inoculación con *R. intraradices*, las plantas (n=10) se midieron para evaluar la longitud de la parte aérea (cm). Luego, las plantas se colocaron en cajas de Petri con agua, donde raíz y parte aérea fueron separados; la parte aérea se instaló en un sistema de mangueras flexibles de 3 mm de diámetro conectado a un contenedor de agua dentro de una balanza analítica (Figura 7.1), a 10 cm de altura del líquido a la planta ( $\Delta h$ ) para generar un gradiente de presión (dP). El flujo se calculó sobre la base del tiempo en el que 0.0001 g de agua eran absorbidos por la planta. El cálculo del flujo se determinó por la ecuación 1 (Tyree y Ewers, 1996).

$$F = m / t \quad (\text{Ec. 1})$$

donde **F** es el flujo másico, **m** se refiere a la masa del agua (kg) y **t** es el tiempo que la planta tomó para absorber el agua (s).

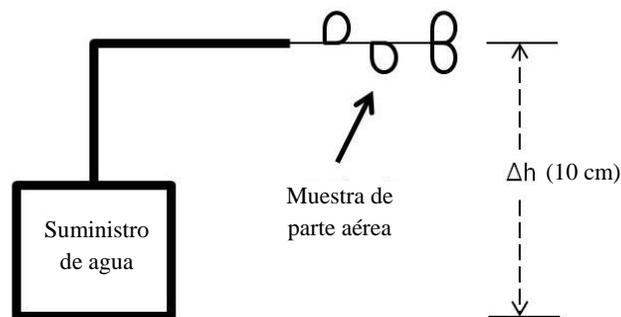


Figura 7.1. Sistema de mangueras para la evaluación de la conductancia de agua en plantas de *Medicago sativa*.

La conductancia del área real del xilema ( $k_{\text{xilema}}$ ) fue estimada por la ecuación 2, la conductancia de la estela ( $k_{\text{estela}}$ ) fue estimada por la ecuación 3, y la conductancia foliar ( $k_{\text{foliar}}$ ) se estimó mediante la ecuación 4.

$$k_{\text{xilema}} = F / \text{área real del xilema} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$k_{\text{estela}} = F / \text{área de la estela} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$k_{\text{foliar}} = F / \text{área foliar} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde  $F$  es el flujo másico estimado por la ecuación 1.

Durante la medición del flujo en las plantas, se midió con el medidor de fotosíntesis portátil CIRAS 2 (PP SYSTEMS): transpiración, fotosíntesis neta ( $P_n$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ).

### **Medición del potencial hídrico en hoja ( $\Psi_h$ ) y del área foliar**

El potencial hídrico de la hoja ( $\Psi_h$ ) se midió utilizando un sistema de mangueras de plástico, que contenía un manómetro y émbolos, suministrado con agua desgasificada. El material vegetal utilizado para esta medición correspondió a la parte aérea separada de la raíz primaria. Tanto hojas como tallos fueron encapsulados en puntas de micropipeta (10  $\mu\text{L}$ ) y cubiertos con papel oscuro. La cápsula se insertó en el sistema de mangueras (llenado con agua desgasificada) y el manómetro fue calibrado a cero. Se tiró del émbolo 1 para ejercer una fuerza de tensión en la columna de agua del xilema y permitir el movimiento del menisco hacia el final de la sección transversal de la parte aérea. Los meniscos removidos hacia la superficie correspondieron a la primera burbuja y ésta burbuja sirvió como un indicador para la lectura del manómetro. El área foliar se estimó dibujando el contorno de la hoja (Rodés y Collazo, 2006), y se obtuvo el peso seco de la parte aérea.

## **Caracterización microscópica del sistema vascular en tallos**

Cada segmento de tallo usado para la medición del flujo de agua de cada tratamiento fueron fijados en FAA (formaldehído 10 mL, ácido acético 5 mL, etanol 50 mL y agua destilada 35 mL) durante 48 h, se lavaron con agua destilada e infiltraron usando una solución de inclusión (Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T.<sup>™</sup>), para cortarlas a -20 °C con un micrótopo (Leica<sup>®</sup>). Además, los cortes del tallo entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  se tiñeron con azul de toluidina, se deshidrataron y se montaron en resina Entellan (Ruzin, 1999). Lo anterior para estimar el diámetro del tallo, el diámetro de la estela, y el diámetro y número de vasos de xilema a partir de cortes transversales.

## **Evaluación de la formación de especies reactivas de oxígeno en raíces**

La presencia de superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) fueron cuantificados por medio del análisis de la emisión de fluorescencia en imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido láser, utilizando el método de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  y DHE respectivamente (Sandalio *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2010; Swanson *et al.*, 2011). Esta evaluación se llevó a cabo para muestras de raíces control y raíces contaminadas, en plantas inoculadas con HMA y en plantas sin inocular. Las muestras de raíz se incubaron y montaron de acuerdo con Zafra *et al.* (2010). Después de la incubación, las muestras se lavaron y prepararon para observarse en microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 780NLO). Muestras equivalentes fueron tratadas con TMP eliminador de  $\text{O}_2^-$ , y con piruvato de sodio eliminador de  $\text{H}_2\text{O}_2$  antes del tratamiento con DHE o  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (modificado de Zafra *et al.*, 2010). También se prepararon controles negativos que fueron tratados con Tris-HCl o MES-KCl. Las señales fluorescentes se detectaron a partir de una longitud de onda de emisión de 515 nm y 560 nm para ambos reactivos químicos.

## **Evaluación de la colonización micorrízica**

Las raíces secundarias se colectaron para evaluar la colonización micorrízica mediante la técnica de tinción con azul de tripano por método de Phillips y Hayman (1970). La colonización se evaluó microscópicamente considerando los porcentajes de colonización por estructuras fúngicas presentes en las raíces (hifas, vesículas y arbusculos).

## **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó un experimento factorial 7x2 en un diseño completamente al azar, incluyendo 14 tratamientos con 12 repeticiones cada uno. Los factores fueron los siguientes: 7 niveles de contaminación con diésel (0, 3000, 6000, 9000, 12000, 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup>) y dos niveles de inoculación micorrízica (plantas con y sin HMA). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y con una prueba de comparación de medias de Tukey,  $\alpha=0.05$  (SAS Institute Inc., 2002).

## **RESULTADOS**

### **Variables de crecimiento, parámetros hidráulicos ( $k_{xilema}$ , $k_{estela}$ y $k_{foliar}$ ), potencial hídrico en la hoja e intercambio gaseoso.**

El peso seco de las plantas fue afectado significativamente ( $p \leq 0.001$ ) por el diésel y por la interacción diésel-HMA (Cuadro 7.1). Independientemente de la condición micorrízica, con el incremento de la concentración de diésel se disminuyó el peso seco de las plantas. Sin embargo, en plantas con HMA se observó un incremento del peso seco (>45%) en las concentraciones de 3000, 12000, 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup> en comparación con las plantas sin inocular (Cuadro 7.1). El área foliar y la altura de la planta también fueron afectadas significativamente ( $p \leq 0.001$ ) por

el diésel y por la interacción diésel-HMA (Cuadro 7.1). El aumento de la concentración del contaminante disminuyó la altura de la planta y el área foliar, en plantas con y sin HMA. Sin embargo, la inoculación con HMA incrementó la altura de las plantas (>25%) en las concentraciones de 12000, 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup>, y el área foliar (>50%) en las concentraciones de 3000, 12000, 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup>.

Cuadro 7.1. Peso seco, área foliar y altura en plantas de *Medicago sativa* establecidas en arena contaminada con diésel, 30 días después de la inoculación con *Rhizophagus intraradices* (HMA).

Diésel (mg kg <sup>-1</sup> )	Peso seco (mg)		Área foliar (cm <sup>2</sup> )		Altura (cm)	
	-HMA	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA	+HMA
0	8.51 a	13.50 a	6.25 a	7.07 a	8.49 a	9.63 a
3000	3.99 b	5.95 b	1.21 b	1.94 b	4.54 b	3.88 b
6000	4.75 b	4.73 b	1.92 b	1.81 b	4.40 b	4.68 b
9000	2.61 b	2.88 b	1.18 b	1.37 b	2.63 c	2.85 b
12000	1.79 b	2.95 b	0.79 b	1.22 b	2.02 c	2.77 b
15000	2.15 b	3.12 b	1.00 b	1.63 b	2.13 c	2.72 b
18000	1.73 b	2.76 b	0.69 b	1.30 b	1.74 c	2.86 b
<b>Significancia</b>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). n=10 plantas.

El diésel incrementó significativamente los valores de la  $k_{\text{estela}}$  y de la  $k_{\text{foliar}}$ , independientemente de la condición micorrízica, e incremento los valores de  $k_{\text{xilema}}$  en plantas sin HMA (Figura 7.2). En presencia de diésel los valores de la  $k_{\text{xilema}}$  en plantas con HMA fueron constantes y significativamente menores a los de plantas sin HMA (Figura 7.2A). De manera similar, el incremento en la concentración de diésel aumentó los valores de la  $k_{\text{estela}}$  y de la  $k_{\text{foliar}}$ , en ambas condiciones de micorrización. En la concentración de 18000 mg kg<sup>-1</sup> los valores de la  $k_{\text{estela}}$  y el de la  $k_{\text{foliar}}$  en plantas con HMA fue significativamente menor con respecto a las plantas sin HMA (Figura 7.2B y 7.2C).

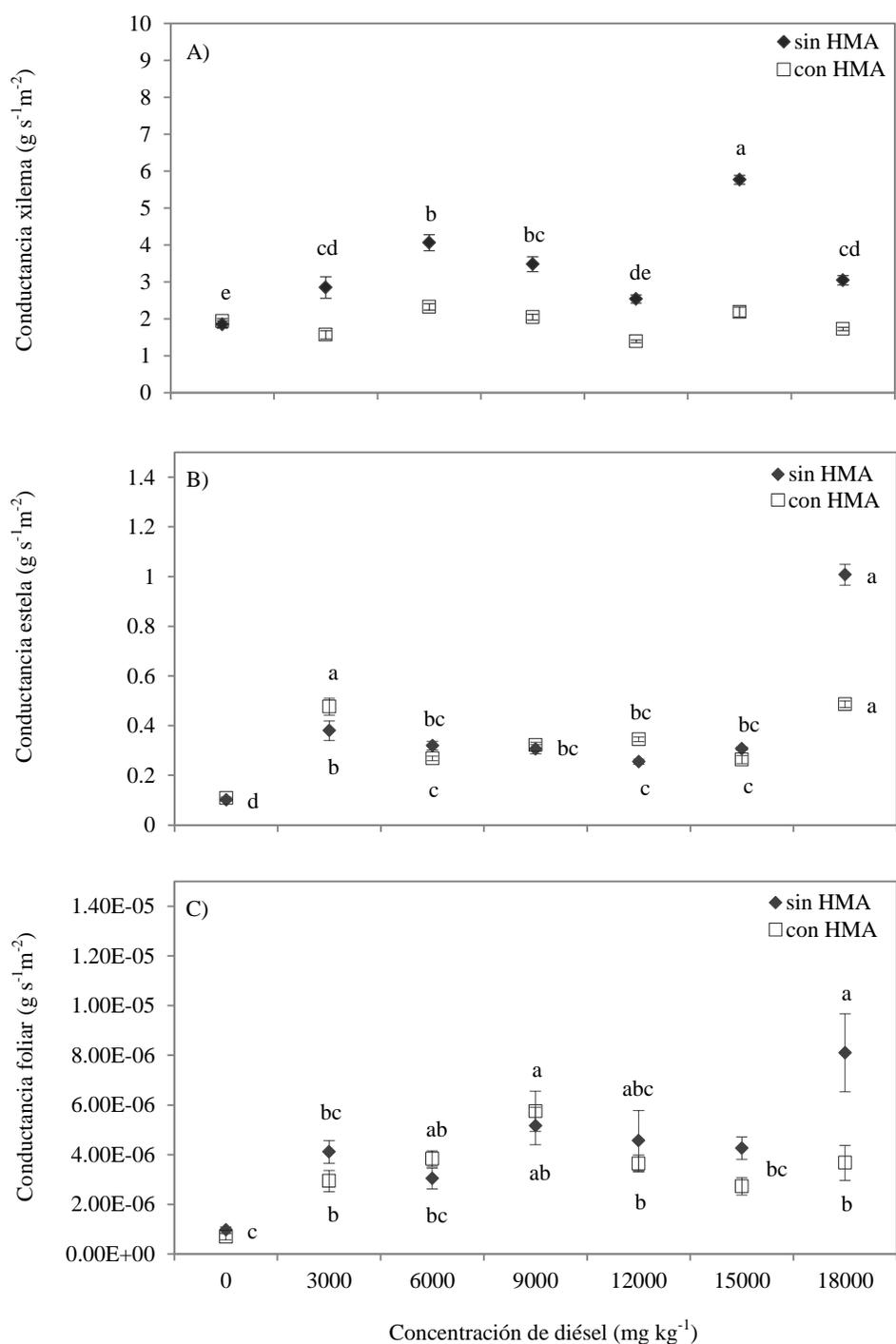


Figura 7.2. Conductancia de xilema, de estela y foliar en plantas de *Medicago sativa* establecidas en arena contaminada con diésel e inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (HMA), después de 30 días de la inoculación. Medias  $\pm$  error estándar, (Tukey  $\alpha=0.05$ ). n= 10.

La presencia de diésel afectó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el  $\Psi_h$  y las variables del intercambio gaseoso de las plantas (Figura 7.3). Los valores de  $\Psi_h$  en las plantas fueron menos negativos en ambas condiciones de micorrización. En el control y en las concentraciones de 6000, 12000 y 15000 mg kg<sup>-1</sup> los potenciales en plantas con HMA fueron menos negativos que en plantas sin HMA (Figura 7.3A). El aumento en la concentración de diésel también incremento la tasa de transpiración, independientemente de la condición micorrízica. Sin embargo, en las concentraciones de 3000, 9000 y 12000 mg kg<sup>-1</sup> las plantas sin inocular presentaron mayor tasa de transpiración en comparación con las plantas inoculadas. Solo en la concentración de 18000 mg kg<sup>-1</sup> las plantas con HMA presentaron una mayor transpiración con respecto a las plantas sin micorriza (Figura 7.3B).

En concentraciones mayores a 9000 mg kg<sup>-1</sup>, el diésel disminuyó la fotosíntesis neta en las plantas, independientemente de la micorrización. En las concentraciones de 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup> las plantas micorrizadas tuvieron mayor fotosíntesis, con respecto a las plantas sin HMA (Figura 7.3C). El incremento en la concentración de diésel también aumentó la conductancia estomática en las plantas sin HMA, mientras que en las plantas con HMA la conductancia estomática fue constante y menor con respecto a los valores de plantas sin micorrización. Solo en la concentración de 18000 mg kg<sup>-1</sup> la conductancia estomática en plantas micorrizadas fue mayor que en las plantas sin HMA (Figura 7.3D). En contraste, el uso eficiente del agua en las plantas con y sin micorrización, disminuyó en las concentraciones de 9000, 12000, 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup>. En las concentraciones de 3000 y 15000 mg kg<sup>-1</sup>, las plantas con HMA presentaron mayor uso eficiente de agua en comparación con plantas sin micorrización (Figura 7.3E). El contenido interno de CO<sub>2</sub> en las plantas de *M. sativa* incrementó con el aumento en la concentración de diésel, independientemente de la micorrización (Figura 7.3F).

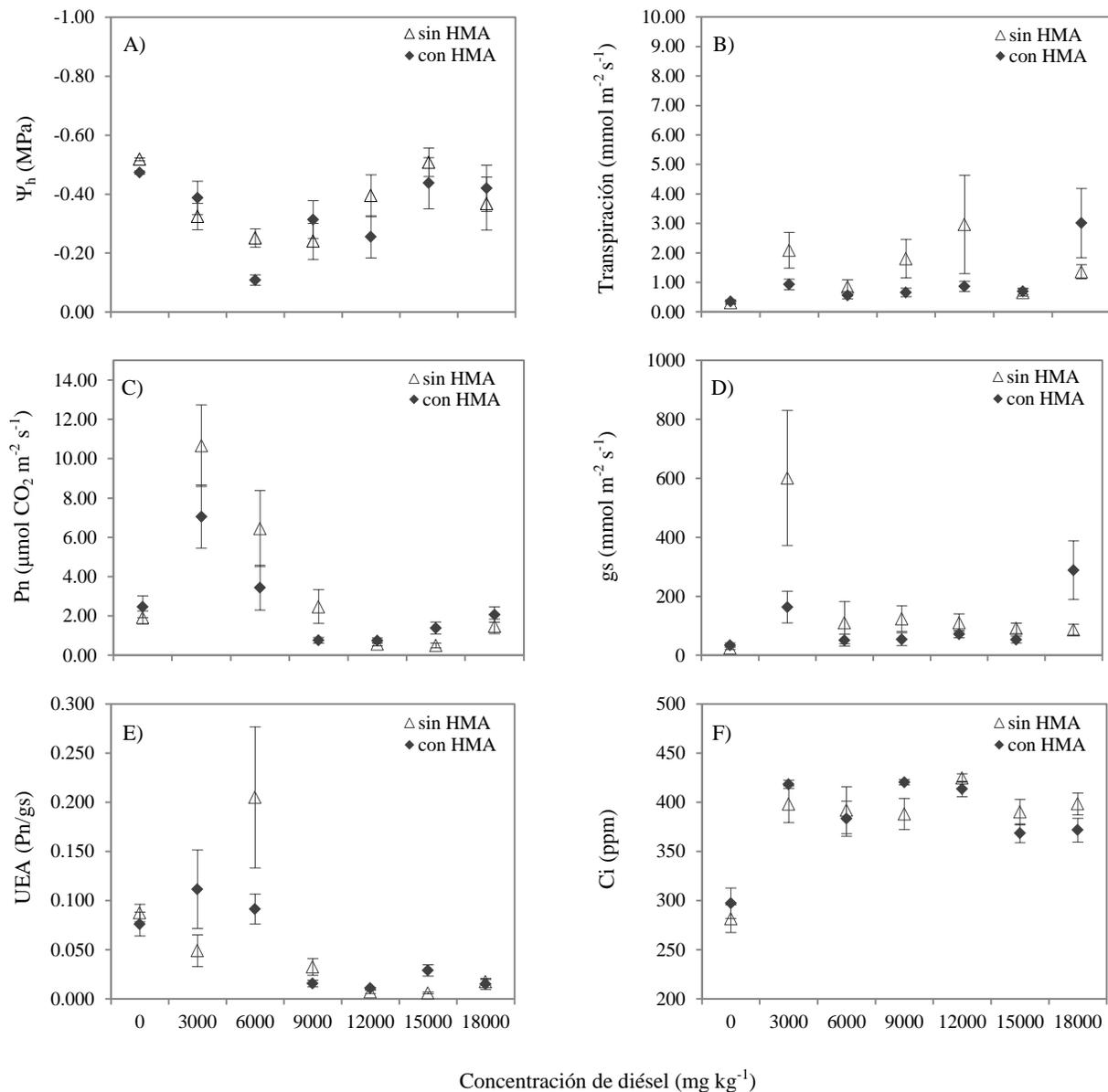


Figura 7.3. Potencial hídrico en la hoja ( $\Psi_h$ ) y variables fotosintéticas medidas en plantas de *Medicago sativa* establecidas en arena contaminada con diferentes concentraciones de diésel a los 30 días después de la inoculación con *Rhizophagus intraradices* (HMA). P<sub>n</sub>= fotosíntesis neta, g<sub>s</sub>= conductancia estomática, UEA= uso eficiente de agua,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{moles H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , C<sub>i</sub>= concentración interna de CO<sub>2</sub>. Los valores son medias de 10 plantas  $\pm$  error estándar, Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## Cambios morfológicos en el tallo de *Medicago sativa*

La contaminación con diésel disminuyó el diámetro total del tallo, el diámetro de la estela y el diámetro de los vasos de xilema en plantas de *M. sativa* en ambas condiciones de inoculación con *Rhizophagus intraradices* (Cuadro 7.2). Además, la inoculación con el HMA permitió que los diámetros de tallo, estela y vasos de xilema incrementaran en comparación con plantas sin inocular, en la mayor parte de las concentraciones de diésel. No hubo una tendencia clara en cuanto al número de vasos de xilema en las plantas sin HMA, mientras que en las plantas con HMA, el número de vasos aumentó al incrementar la concentración del contaminante (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.2. Efecto de la contaminación por diésel en el diámetro de tallo y de la estela, y en el diámetro y número de vasos de xilema en la estela de plantas de *Medicago sativa*, 30 días después de la inoculación con *Rhizophagus intraradices* (HMA).

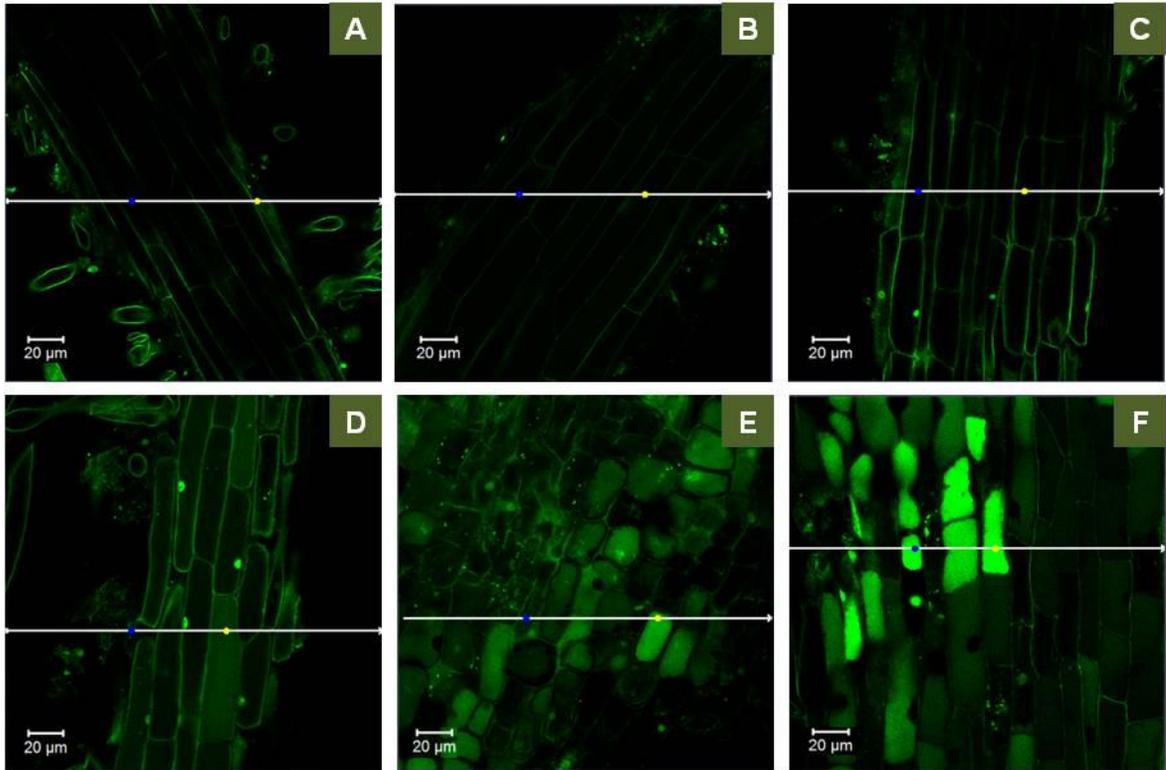
Diésel (mg kg <sup>-1</sup> )	Diámetro total del tallo (mm)		Diámetro de la estela (μm)		Diámetro de vasos del xilema (μm)		Número de vasos de xilema	
	-HMA	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA	+HMA	-HMA	+HMA
<b>0</b>	2.31	2.16	816	688	23.0	20.20	69	65
<b>3000</b>	1.10	1.14	376	352	16.40	19.20	70	102
<b>6000</b>	1.41	1.65	464	560	18.40	19.40	50	96
<b>9000</b>	1.27	1.54	480	504	16.0	20.60	79	94
<b>12000</b>	1.18	1.23	416	392	16.60	17.60	63	123
<b>15000</b>	1.26	1.37	400	448	14.60	17.60	40	78
<b>18000</b>	1.16	1.06	232	352	16.80	17.40	63	115

## **Formación de especies reactivas de oxígeno en raíces**

La acumulación del anión superóxido ( $O_2^-$ ) ocurrió en respuesta a estrés oxidativo por la presencia de diésel en plantas sin HMA (Figura 7.4). La incubación de raíces en DHE sólo produjo fluorescencia verde por la acumulación de  $O_2^-$  en las plantas sin HMA (Figura 7.4 E y F). Las raíces sin inocular mostraron altos niveles de fluorescencia, particularmente en los tratamientos con 15000 y 18000 mg  $kg^{-1}$  (Figura 7. 5E y F). No se detectó fluorescencia en las raíces control (sin diésel) inoculadas y sin inocular (Figura 7. 5A y G), en las raíces con HMA en los tratamientos con diésel (Figura 7.5H-L) y en las células corticales con la aplicación de eliminadores específicos para ERO (ver Anexo IV, Figura AIV-7.1)

El fluorocromo,  $H_2DCF-DA$ , detectó la presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la producción de fluorescencia verde en las raíces (Figura 7.6). Se observaron diferentes grados de intensidad de la fluorescencia en respuesta a la concentración de diésel (Figura 7.7). No se observó fluorescencia en las raíces del tratamiento sin diésel (control) de plantas inoculadas y plantas sin inocular (Figura 7.6 A y G); en contraste, las raíces del tratamiento con 15000 y 18000 mg  $kg^{-1}$  exhibieron mayor número de células fluorescentes en comparación con los demás tratamientos con diésel, independientemente de la inoculación con HMA (Figura 7.7 E, F, K y L). Sin embargo, el número de células fluorescentes y la intensidad de fluorescencia fue menor en raíces con HMA, en comparación con las plantas sin HMA (Figura 7.6 y 7.7).

RAÍCES DE PLANTAS SIN HMA



RAÍCES DE PLANTAS INOCULADAS CON HMA

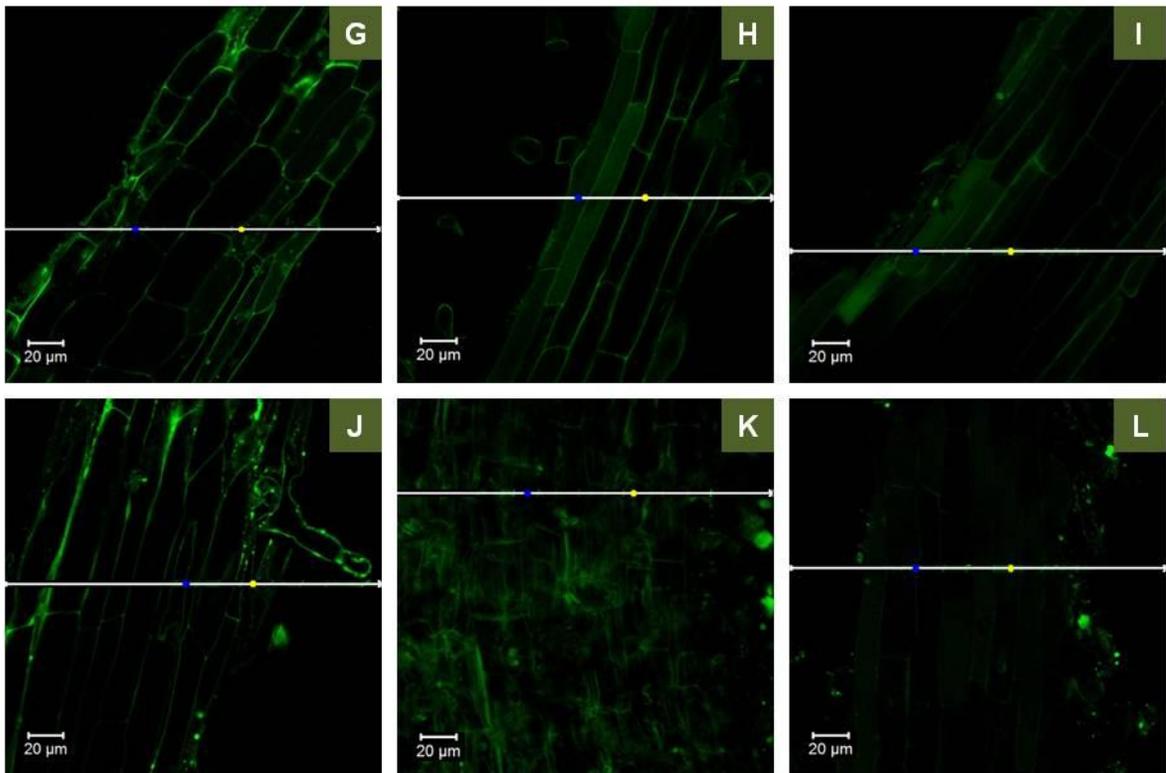


Figura 7.4. Detección fluorescente del anión superóxido ( $O_2^-$ ) con DHE usando microscopía confocal de barrido láser en raíces de *Medicago sativa* crecidas en contaminación con diésel, sin o con la inoculación del hongo micorrícico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices*. La presencia de  $O_2^-$  se muestra por la fluorescencia verde. A y G) control, B y H) 3000, C y I) 6000, D y J) 9000, E y K) 15000, F y L) 18000 mg  $kg^{-1}$ .

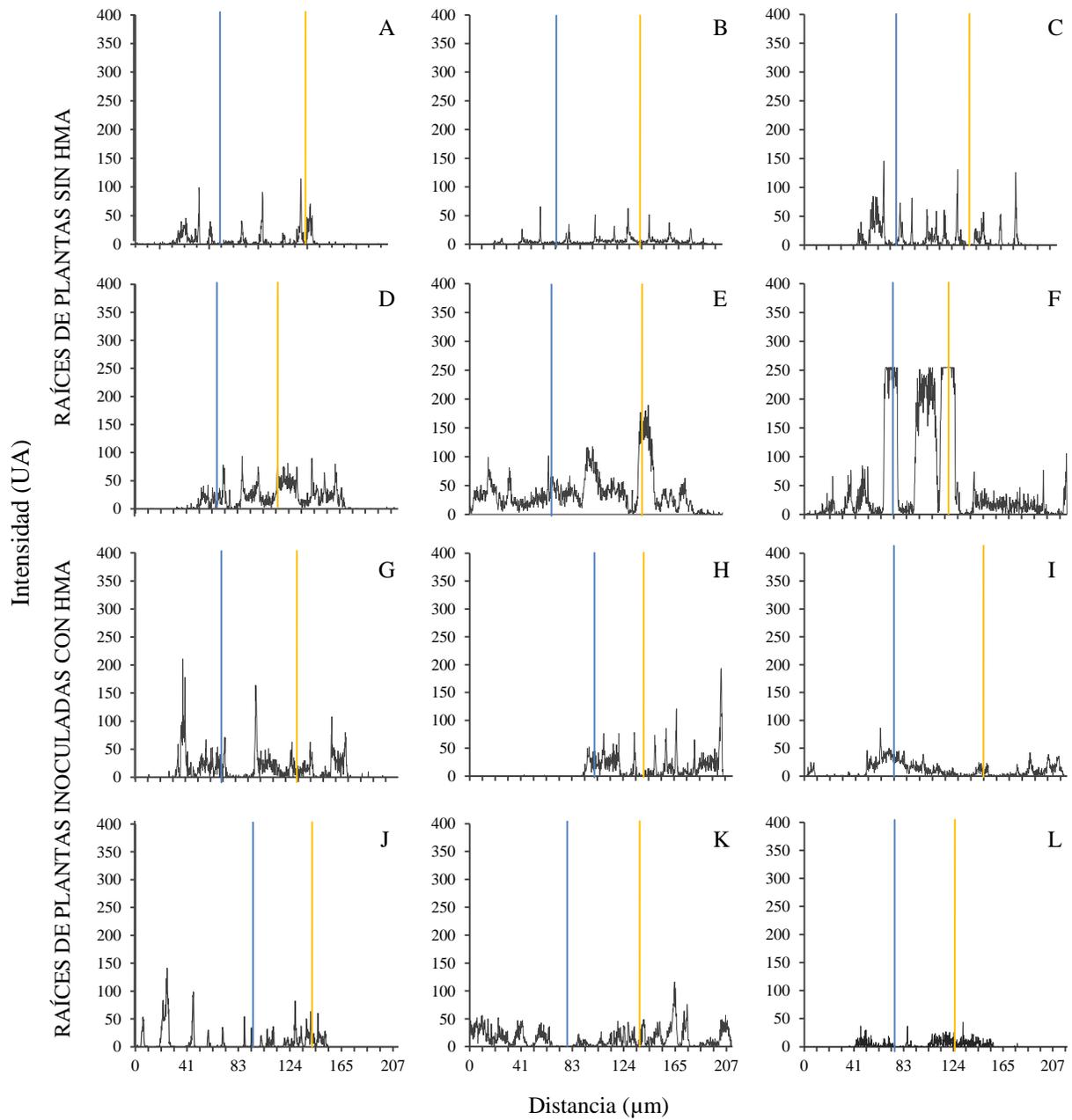
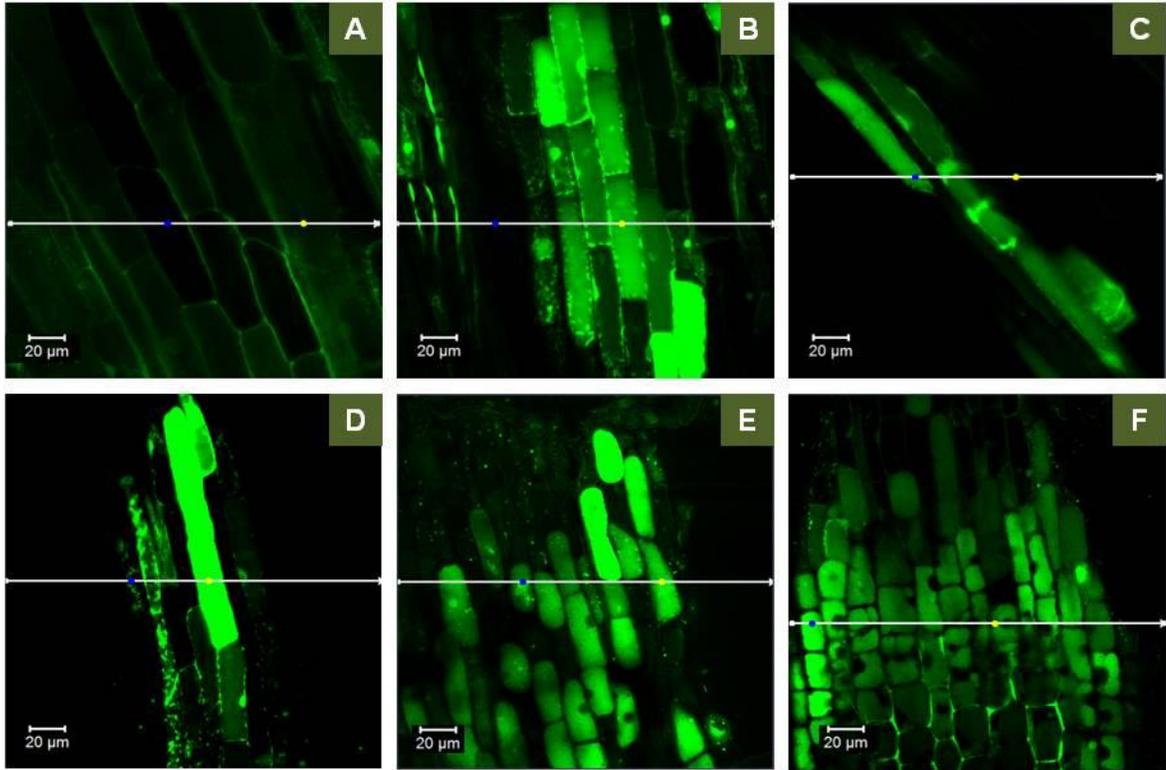


Figura 7.5. Perfil de intensidad de la fluorescencia de  $O_2^-$  a lo largo de la línea indicada en la raíz (ver figura 7.5) de *Medicago sativa* crecida en contaminación con diésel, sin o con la inoculación del hongo micorrícico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices*. A y G) control, B y H) 3000, C y I) 6000, D y J) 9000, E y K) 15000, F y L) 18000  $mg\ kg^{-1}$ . UA= unidades arbitrarias.

RAÍCES DE PLANTAS SIN HMA



RAÍCES DE PLANTAS INOCULADAS CON HMA

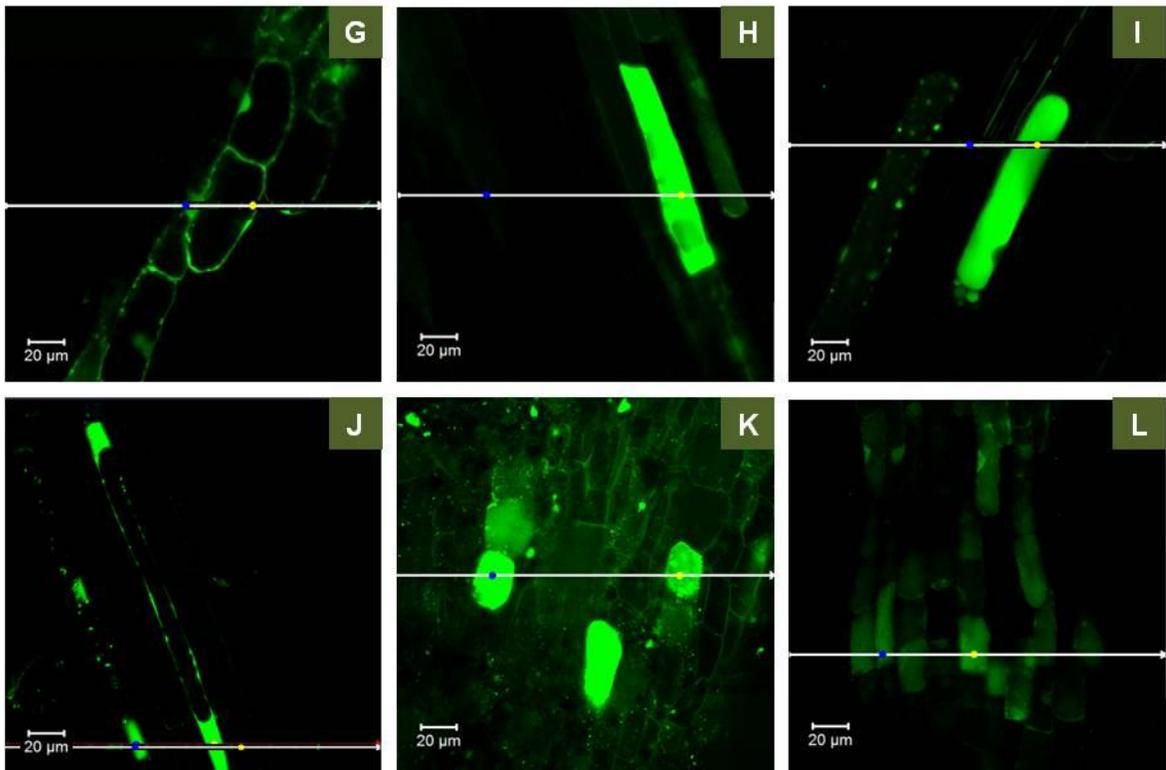


Figura 7.6. Detección fluorescente del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con  $H_2DCF$ -DA usando microscopía confocal de barrido láser en raíces de *Medicago sativa* crecidas en contaminación con diésel, sin o con la inoculación del hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices*. La presencia de  $H_2O_2$  se muestra por la fluorescencia verde. A y G) control sin diésel, B y H) 3000, C y I) 6000, D y J) 9000, E y K) 15000, F y L) 18000  $mg\ kg^{-1}$ .

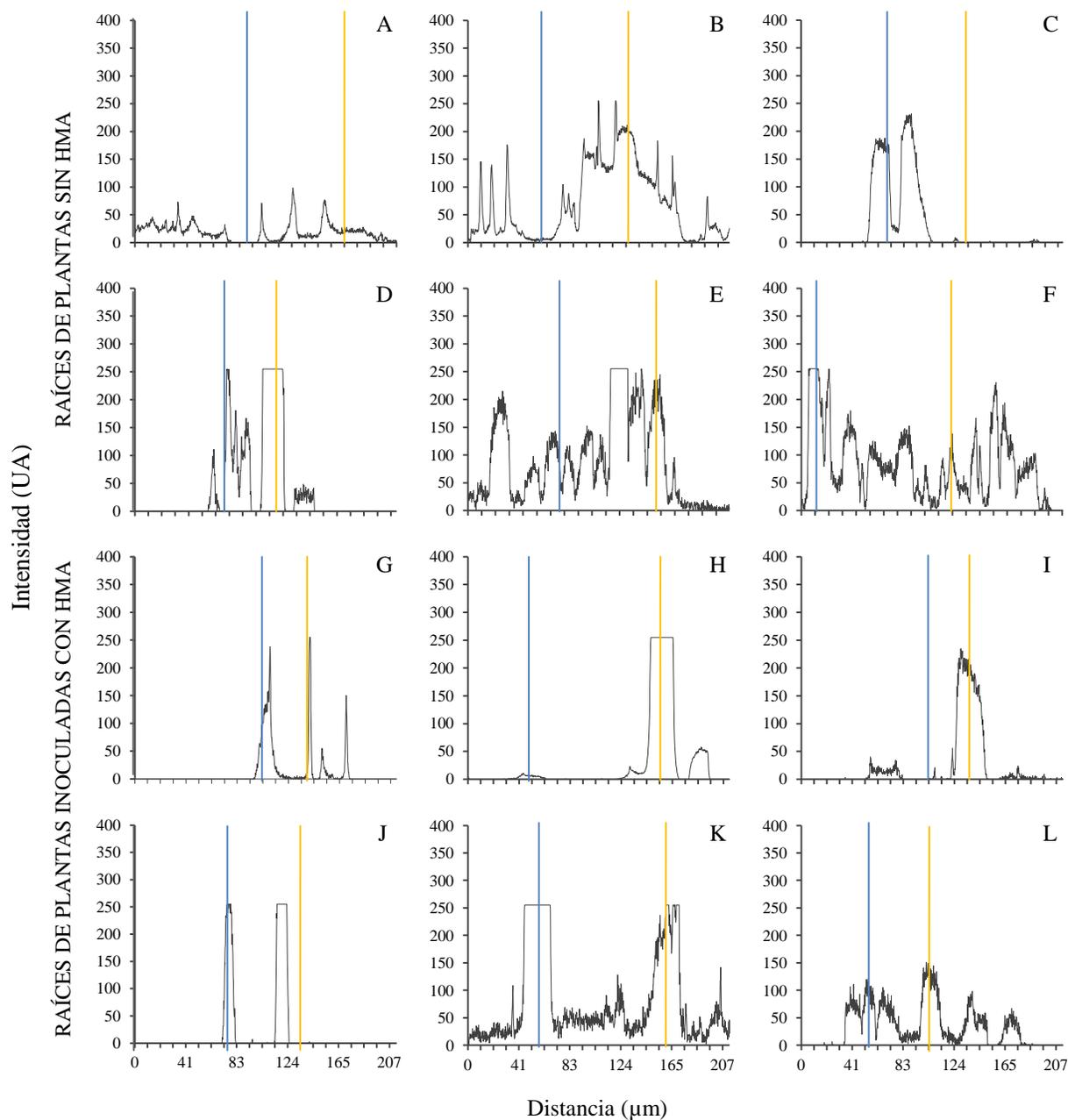


Figura 7.7. Perfil de intensidad de la fluorescencia de  $H_2O_2$  a lo largo de la línea indicada en la raíz (ver figura 7.7) de *Medicago sativa* crecida en contaminación con diésel, sin o con la inoculación de l hongo micorrícico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices*. A y G) control sin diésel, B y H) 3000, C y I) 6000, D y J) 9000, E y K) 15000, F y L) 18000  $mg\ kg^{-1}$ . UA= unidades arbitrarias.

## Colonización micorrízica

La contaminación con diésel tuvo efectos significativos ( $p \leq 0.05$ ) en la colonización micorrízica arbuscular. Después de 30 días la colonización radical medida por tinción con azul de tripano, disminuyó debido a la contaminación con diésel (Figura 7.8A). Además, el diésel disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el desarrollo de estructuras fúngicas (Figura 7.8B), mostrando una reducción en la presencia de hifas (>45%), vesículas (>75%) y arbusculos (>60%) en las concentraciones mayores a 9000 mg kg<sup>-1</sup>.

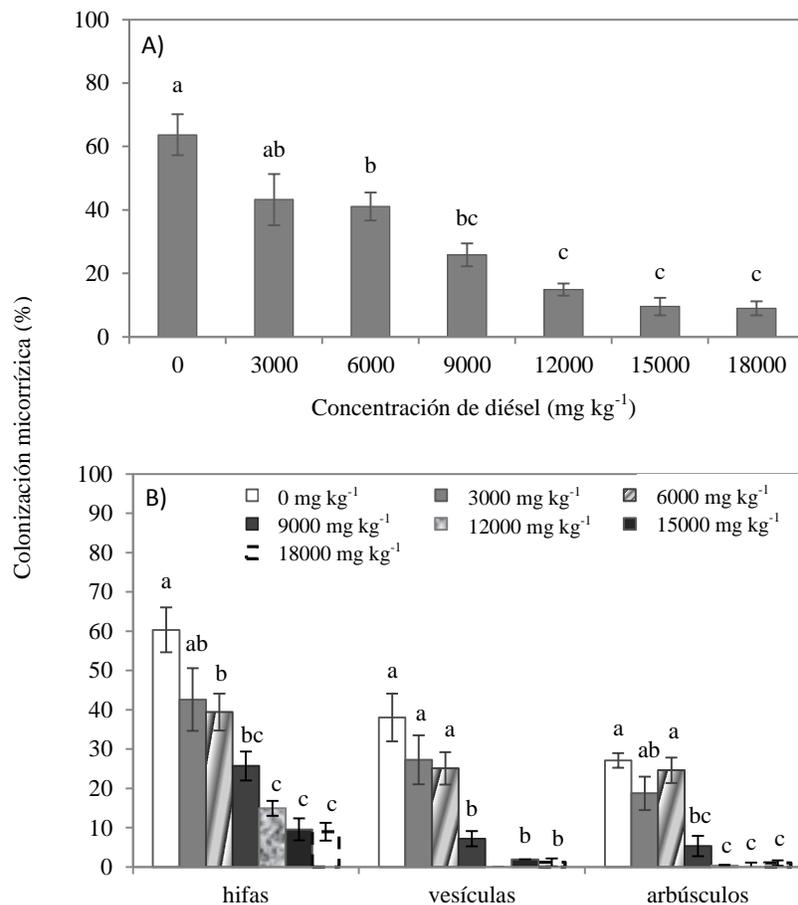


Figura 7.8. Colonización micorrízica de *Rhizophagus intraradices*, medida por tinción con azul de tripano en raíces de *Medicago sativa*, 30 días después de la inoculación con HMA. A) Colonización micorrízica total en raíces de *M. sativa* en contaminación con diésel. Barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ). B) Efecto del diésel en el desarrollo de estructuras fúngicas en raíces de *M. sativa*. Barras con distinta letra en cada estructura fúngica son estadísticamente diferentes. Los valores son promedio de 10 plantas  $\pm$  error estándar.

## DISCUSIÓN

El peso seco, la altura y el área foliar en las plantas de *Medicago sativa* independientemente de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*, disminuyó por efecto de la contaminación con diésel. Sin embargo, las plantas con HMA incrementaron el peso seco, la altura y el área foliar, principalmente en concentraciones mayores a 12000 mg kg<sup>-1</sup>, en comparación con plantas sin HMA. Se ha demostrado que la inoculación de HMA puede incrementar la biomasa vegetal en plantas de *Melilotus albus* y *Zea mays* cultivadas en sustrato con diésel (Tang *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2012) y en plantas de *Brachiaria decumbens* crecidas en arena con biodiésel (Trejo *et al.*, 2013), como se observó en esta investigación para *Medicago sativa*, donde las concentraciones de diésel fueron similares a las evaluadas por estos autores. También se han reportado incrementos en el peso seco de la raíz y de la parte aérea en *Medicago sativa* por la inoculación con *Glomus etunicatum*, cuando las plantas crecieron en contaminación con fenantreno y con el insecticida DDT (Wu *et al.*, 2008a, 2008b).

La colonización por HMA a menudo está acompañada del incremento en el intercambio gaseoso de las plantas hospedantes (Zhu *et al.*, 2011). En el presente estudio, las plantas de *M. sativa* inoculadas con *R. intraradices* en condiciones de contaminación por diésel en las concentraciones de 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup>, presentaron mayores valores en la fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la transpiración, en comparación con las plantas sin HMA. Esto indica, que la simbiosis con HMA incrementa la capacidad de intercambio de gases por el aumento de la asimilación de CO<sub>2</sub> y los flujos de transpiración (Zhu *et al.*, 2011). El incremento del intercambio gaseoso por la presencia de HMA, también se ha reportado en otras condiciones de estrés como altas temperaturas, salinidad y sequía (van Rooyen *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2006;

Wu y Xia, 2006; Sheng *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado ampliamente que en condiciones de sequía la inoculación de HMA en las plantas incrementa la transpiración, la Pn, la gs, y el UEA (Kaya *et al.*, 2003; Bárzana *et al.*, 2012; Birhane *et al.*, 2012; Saraswati *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012), así como se observó en esta investigación bajo contaminación por hidrocarburos.

En hidráulica el potencial hídrico es la fuerza requerida para mover una molécula de agua en el interior de las plantas y la diferencia de estos potenciales desde el suelo hasta las hojas, son la fuerza motora del ascenso del agua en las plantas vasculares (Pallardy, 2008). La simbiosis con *R. intraradices* permitió a la planta tener  $\Psi_h$  menos negativos en comparación con plantas sin HMA en el tratamiento sin diésel y en las concentraciones de 6000, 12000 y 15000 mg diésel  $\text{kg}^{-1}$ . La disminución en los valores de  $\Psi_h$  por efecto de la inoculación de HMA en contaminación por diésel, también se ha reportado en *Sorghum bicolor* y *Zea mays* en condiciones de estrés por sequía (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004; Cho *et al.*, 2006). Con  $\Psi_h$  menos negativos las plantas pueden conducir una mayor cantidad de agua, como se observó con el incremento de la conductancia de la estela y la conductancia foliar.

El tallo de plantas de *M. sativa* a los 30 días después de la inoculación con *R. intraradices*, mostró cambios morfológicos por efecto de la contaminación con diésel. Los cambios se mostraron principalmente en el diámetro del tallo, en el diámetro de la estela, y en el diámetro y número de vasos de xilema, lo cual está relacionado con el incremento en la conductancia del xilema ( $k_{\text{xilema}}$ ) y la conductancia de la estela ( $k_{\text{estela}}$ ). Estos cambios morfológicos son similares a los reportados en otras especies de plantas, tales como *Brachiaria brizantha*, *Cyperus aggregatum*, *Glicine max*, *Zea mays* y *Pisum sativum* cultivadas bajo condiciones de sequía y bajo contaminación con fluoranteno y petróleo crudo (Merkl *et al.*,

2005b; Makbul *et al.*, 2011; Kummerová *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen estudios detallados sobre modificaciones anatómicas en plantas con o sin HMA, en respuesta a los contaminantes orgánicos, como el diésel, con los que se puedan comparar los resultados obtenidos. No obstante, fue evidente que *R. intraradices* produjo incrementos en el número de vasos de xilema cuando las plantas están sometidas a estrés por la contaminación de diésel.

La brillantez de las células es una consecuencia de la fluorescencia verde de H<sub>2</sub>DCF-DA y DHE, y está directamente relacionada a la presencia de estrés oxidativo (Figura 7.7). Como se esperaba, el presente trabajo confirma la existencia de estrés oxidativo en *M. sativa*, el cual se ve reflejado en la acumulación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células de las raíces afectadas por la contaminación con diésel; ambas ERO mostraron mayor acumulación en el tejido cortical ante concentraciones de 15000 y 18000 mg kg<sup>-1</sup>. De forma análoga, el incremento en los niveles de acumulación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también fue registrado por otros investigadores usando microscopía confocal en raíces de *M. sativa* y *Pisum sativum* expuestas a cadmio y plomo (Ortega-Villasante *et al.*, 2005, Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006; Malecka *et al.*, 2012). Como contribución, el presente trabajo demuestra que la inoculación con *Rhizophagus intraradices* disminuyó los niveles de acumulación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las raíces. La reducción en la acumulación de ERO en *M. sativa* por efecto de la inoculación, demuestra la protección del hongo contra el estrés oxidativo generado por el diésel. Se ha reportado que *R. intraradices* puede tener efectos positivos sobre las plantas hospederas disminuyendo la concentración de ERO, por el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes (Debiane *et al.*, 2008, 2009). Además, el efecto positivo en la disminución de la concentración de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas por la inoculación con HMA, se ha reportado en *Citrus tangerine* y *Poncirus trifoliata* bajo estrés por sequía (Wu *et al.*, 2006a, 2006b).

La presencia de diésel redujo la colonización total en el sistema radical de *M. sativa*, siendo significativa en concentraciones mayores de 6000 mg kg<sup>-1</sup>. Algunos reportes indican el efecto negativo de los hidrocarburos del petróleo en la colonización micorrízica, en donde muestran que el incremento en la concentración de éstos hidrocarburos disminuye la colonización por HMA (Gaspar *et al.*, 2002; Rabie *et al.*, 2004; Verdin *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2008a). La disminución en la colonización de las raíces por el hongo debido a la presencia de diésel, puede disminuir el desarrollo y la nutrición de las plantas afectando sus respuestas fisiológicas ante el estrés ocasionado por la presencia del contaminante (Tang *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Sin embargo, la reducción en la colonización micorrízica en *M. sativa* no disminuyó la biomasa de las plantas, el intercambio gaseoso, y la protección contra el estrés oxidativo generado por la contaminación de diésel.

## CONCLUSIONES

El diésel genera ajustes en las dimensiones y número de elementos conductores del tallo de alfalfa, lo que se refleja en el incremento de los valores de conductancia hidráulica en las plantas de *Medicago sativa* independientemente de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*, en el tamaño del tallo y en los parámetros del intercambio gaseoso. Las concentraciones de diésel reducen la colonización de *R. intraradices* en *M. sativa*, generando una disminución en la producción de biomasa y alteraciones en el intercambio gaseoso de la planta. Sin embargo, este trabajo demuestra que los hongos micorrízicos arbusculares tienen un papel importante en la reducción de estrés oxidativo causado por la presencia de diésel, además de que mejoran las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso en la plantas de *M. sativa*.

## CAPÍTULO VIII

### Discusión general de resultados y conclusiones generales

El uso de plantas con fines de fitorremediación implica entender las respuestas anatómicas y fisiológicas que son determinantes para su crecimiento y adaptación en presencia de contaminantes en el suelo. Sin embargo, estas respuestas que las plantas tienen frente a tales condiciones de estrés no son bien conocidas. Por tal razón, se evaluó el efecto del diésel sobre el crecimiento, cambios anatómicos, conductividad hidráulica y expresión de genes en respuesta a estrés oxidativo, en plantas de *Medicago sativa*.

El incremento en la concentración de diésel disminuyó el peso seco de la parte aérea y de la raíz, la altura de la planta, y la longitud de la raíz, el número de hojas y con ello el área foliar. La mayoría de las concentraciones de diésel produjo una reducción del diámetro de los vasos de protoxilema y de los vasos de metaxilema en el cilindro vascular, excepto en la concentración de 21000 mg kg<sup>-1</sup> donde el diámetro de ambos tipos de vasos de xilema fue mayor en comparación con el tratamiento sin diésel. La presencia del diésel también redujo el número de vasos de protoxilema, y la relación alométrica entre la longitud total de la planta y el diámetro del cilindro vascular. Como consecuencia de la reducción en el diámetro y en el número de vasos de xilema, el incremento del diésel redujo la conductividad hidráulica y la conductividad hidráulica específica en las plantas, además, el porcentaje de la pérdida de conductividad aumentó y los valores del potencial hídrico en hoja ( $\Psi_h$ ) fueron más negativos. Con  $\Psi_h$  más negativos las plantas conducen menor cantidad de agua, mostrando una reducción en la conductividad hidráulica ( $K_h$ ) y en la conductividad hidráulica específica ( $K_s$ ). El diésel

incrementó el diámetro de la raíz y el diámetro del cilindro vascular en las concentraciones de 15000, 18000 y 21000 mg kg<sup>-1</sup>, y el índice proporcional de flujo en las concentraciones de 3000, 9000, 15000, 18000 y 21000 mg kg<sup>-1</sup>.

La atenuación del estrés oxidativo es favorecida por la actividad de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que poseen las plantas. Sin embargo, altas concentraciones de diésel disminuyen la actividad de varias enzimas antioxidantes, generando cambios en los niveles de transcripción de los genes correspondientes a estas enzimas. En los resultados obtenidos en este trabajo, después de 30 días de exposición al contaminante sólo se encontró inducción del gen *FeSOD* en la parte aérea ante 1000 mg kg<sup>-1</sup>, y una represión del gen *CuZnSOD* en la raíz ante 10000 mg kg<sup>-1</sup> y en la hoja en todas las concentraciones de diésel. Con base a estos resultados, es posible que el umbral de la expresión de los genes evaluados en respuesta al estrés por la presencia de diésel esté por debajo de las concentraciones evaluadas, o se presenten en un tiempo menor de exposición al contaminante.

En resumen, el mecanismo de protección de *M. sativa* ante la presencia de diésel se relaciona con la construcción de más capilares conductores de un tamaño similar en la raíz, como lo indica el índice proporcional de flujo, el cual aumentó en proporción a la concentración de diésel. Sin embargo, las consecuencias a corto y largo plazo de la anatomía y el ajuste fisiológico de la planta, deben ser investigadas a detalle.

La leguminosa *Medicago sativa* L. puede germinar y desarrollarse en sistemas contaminados con diésel, por lo que puede potencialmente emplearse en la fitorremediación de suelos contaminados, considerando adecuaciones previas a los suelos para favorecer la tolerancia y el crecimiento de esta especie vegetal.

El diésel reduce la colonización y el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* en raíces de zanahoria en cultivo monoxénico, indicado por la disminución en la formación de hifas extrarradicales y con ello la producción de esporas en la concentración de 10000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Sin embargo, la producción de hifas y esporas en presencia de diésel indica que este hongo micorrízico arbuscular (HMA) tiene tolerancia a la presencia del contaminante, vislumbrando su utilización en simbiosis con las plantas dirigidas a los procesos de fitorremediación.

Las plantas de *M. sativa* establecidas en arena contaminada con diésel redujeron su tasa fotosintética y su uso eficiente de agua, aunque mostraron incrementos en la transpiración, en la conductancia estomática y en el contenido de  $\text{CO}_2$ , independientemente de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*. Sin embargo, las plantas con HMA presentaron mayor intercambio gaseoso en comparación con plantas sin HMA. Esto indica, que la simbiosis micorrízica arbuscular proporciona alta capacidad de intercambio de gases por el aumento de la asimilación de  $\text{CO}_2$  y de los flujos de transpiración.

Por otro lado, los principales cambios anatómicos en las plantas en presencia del diésel fueron el diámetro del tallo, el diámetro de la estela, y el diámetro y número de vasos de xilema, lo cual está relacionado con el incremento en la conductancia del xilema ( $k_{\text{xilema}}$ ) y en la conductancia de la estela ( $k_{\text{estela}}$ ). Además, es evidente que *R. intraradices* incrementa el número de vasos de xilema cuando las plantas están sometidas a estrés por la contaminación de diésel.

El diésel es un contaminante capaz de generar estrés oxidativo en las plantas de *M. sativa*, indicado por la acumulación de superóxido y peróxido de hidrógeno en las células corticales de la raíz. Sin embargo, las plantas colonizadas por *R. intraradices* presentaron menor acumulación de estas dos especies reactivas de oxígeno.

Este trabajo demuestra que *R. intraradices* tiene un papel importante en la reducción de estrés oxidativo en su hospedante causado por la presencia de diésel, y con ello mejorar las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso en la plantas. Además, esta investigación representa uno de los primeros reportes acerca de la influencia de los hongos micorrízicos arbusculares en la atenuación de los efectos tóxicos del diésel hacia *Medicago sativa* evaluando algunas respuestas fisiológicas, anatómicas, hidráulicas y de estrés oxidativo. No obstante, se requieren futuras investigaciones para entender mejor los mecanismos de protección que los HMA proveen a las plantas expuestas a diésel o a otros hidrocarburos del petróleo.

## LITERATURA CITADA

- Abdel Latef AAH, Chaoxing H. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae* 127: 228-233.
- Achuba E. 2006. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *The Environmentalist* 26: 17-20.
- Adam G, Duncan HJ. 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health* 21: 353-357.
- Adam G, Duncan H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution* 120: 363-370.
- Adam G, Duncan H. 2003. The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa* L.) plants. *Environmental Geochemistry and Health* 25: 123-130.
- Adam G, Gamoh K, Morris DG, Duncan H. 2002. *The Science of the Environment* 286: 15-25.
- Adedokun OM, Ataga AE. 2007. Effects of amendments and bioaugmentation of soil polluted with crude oil, automotive gasoline oil, and spent engine oil on the growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Scientific Research and Essay* 2: 147-149.
- Adenipekun CO, Oyetunji OJ, Kassim LS. 2008. Effect of spent engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius* Linn. *Environmentalist* 28: 446-450.
- Ahammed GJ, Gao CJ, Ogwenjo JO, Zhou YH, Xia XJ, Mao WH, Shi K, Yu JQ. 2012. Brassinosteroids induce plant tolerance against phenanthrene by enhancing degradation and detoxificación in *Solanum lycopersicum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 28-36.
- Ahammed GJ, Choudhary SP, Chen S, Xia X, Shi K, Zhou Y, Yu J. 2013. Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene-cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. *Journal of Experimental Botany* 64: 199-213.
- Alarcón A. 2007. Micorriza arbuscular. En: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (eds), *Microbiología Agrícola*. Trillas, México. pág. 90-119.
- Alarcón A, Davies DTJr, Autenrieth RL, Zuberer DA. 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 10: 251-263.
- Al-Karaki G, McMichel B, Zak J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14: 263-269.
- Al-Qahtani MRA. 2011. Effect of oil refinery sludge on plant growth and soil properties. *Research Journal of Environmental Sciences* 5: 187-193.
- Alkio M, Tabuchi TM, Wang X, Colón-Carmona A. 2005. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany* 421: 2983-2994.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Álvarez SFJ, Sánchez GI, Guadarrama CP, Collazo OM, Ortega DE. 2013. Mutualismo planta-microorganismo: simbiosis. En: Márquez GJ, Collazo OM, Martínez GM, Orozco AS, Vázquez SS (eds.), *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México. pág. 283-290. ISBN: 978-607-02-2705-9.

- Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27: 84-93.
- Azmat R, Haider S, Askari S. 2006. Phytotoxicity of Pb: effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9: 979-984.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949-957.
- Balen B, Krsnik-Rasol M, Simeon-Rudolf V. 2003. Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 160: 1401-1406.
- Barbas CF III, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. 2007. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* doi: 10.1101/pdb.ip47.
- Bárzana G, Aroca R, Paz JA, Chaumont F, Martínez-Ballesta, Carvajal M, Ruíz-Lozano JM. 2012. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Annals of Botany* 109: 1009-1017.
- Basconsuelo S, Grosso M, Molina MG, Malpassi R, Kraus T, Bianco C. 2011. Comparative root anatomy of papilionoid legumes. *Flora* 206: 799-807.
- BeCARD G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211-218.
- Benabdellah K, Abbas Y, Abourouh M, Aroca R, Azcón R. 2011. Influence of two bacterial isolates from degraded and non-degraded soils and arbuscular mycorrhizae fungi isolated from semi-arid zone on the growth of *Trifolium repens* under drought conditions: Mechanisms related to bacterial effectiveness. *European Journal of soil Biology* 47: 303-309.
- Bento RA, Saggin-Júnior OJ, Pitard RM, Stralioatto R, Ribeiro SEM, de Lucena TSR, Teixeira GLFH, Martins LF, Torres VAG. 2012. Selection of leguminous trees associated with symbiont microorganisms for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 223: 5659-5671.
- Bhalerao SA. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi: a potential biotechnological tool for phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *International Journal of Science and Nature* 4: 1-15.
- Birhane E, Sterck FJ, Fetene M, Bongers F, Kuyper TW. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* 169: 895-904.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Bočová B, Huttová J, Liptáková L, Mistrík I, Ollé M, Tamás L. 2012. Impact of short-term cadmium treatment on catalase and ascorbate peroxidase activities in barley root tips. *Biologia Plantarum* 56: 724-728.
- Bona C, da Silva MYB, de Rezende IM, Santos GO, de Souza LA, Inckot RC. 2011. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 25: 277-285.

- Bracho M, Díaz L, Soto LM. 2005. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. *Biológico* 38: 1-9.
- Brandt R, Merkl N, Schultze-Kraft R, Infante C, Broll G. 2006. Potential of vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) for phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils in Venezuela. *International Journal of Phytoremediation* 8: 273-284.
- Brodribb TJ, Cochard H. 2009. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology* 149: 575-584.
- Bundy JG, Paton GJ, Campbell CD. 2002. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *Journal of Applied Microbiology* 92: 276-288.
- Burnett SE, Pennisi SV, Thomas PA, van Iersel MW. 2005. Controlled drought effects morphology and anatomy of *Salvia splendens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 775-781.
- Cabello N. 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Fems Microbiology Ecology* 22: 233-236.
- Cabello MN. 2001. Mycorrhizas and hydrocarbons. En: Gadd GM (ed), *Fungi in Bioremediation*. British Mycological Society, Cambridge, UK. pág. 456-471
- Cai J, Tyree MT. 2010. The impact of vessel size on vulnerability curves: data and models for within-species variability in saplings of aspen, *Populus tremuloides* Michx. *Plant, Cell and Environment* 33: 1059-1069.
- Calonne M, Fonatine J, Debiane D, Laurelle F, Grandmoungin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2010. Propiconazole toxicity on the non-target organism, the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregular*. *Fungicides*, Odile Carisse (Ed.), ISBN: 978-953-307-266-1, InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/fungicides/propiconazole-toxicity-on-the-non-targetorganism-the-arbuscular-mycorrhizal-fungus-glomus-sp>
- Campagnac E, Khasa DP. 2014. Relationship between genetic variability in *Rhizophagus irregularis* and tolerance to saline conditions. *Mycorrhiza* 24: 121-129.
- Campagnac E, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A, Laurelle F, Durand R, Grandmoungin-Ferjani A. 2009. Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus interaradices*. *Mycorrhiza* 19: 365-374.
- Campagnac E, Lounès-Hadj Sahraoui A, Debiane D, Fontaine J, Laurelle F, Garçon G, Verdin A, Durand R, Shirali P, Grandmoungin-Ferjani A. 2010. Arbuscular mycorrhiza partially protect chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* 20: 167-178.
- Campanelli A, Ruta C, de Mastro G, Morone-Fortunato I. 2013. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating salt stress in *Medicago sativa* L. var. icon. *Symbiosis* 59: 65-76.
- Caravaca F, Alguacil MM, Hernández JA, Roldán A. 2005. Involvement of antioxidant enzyme and nitrate reductase activities during water stress and recovery of mycorrhizal *Myrtus communis* and *Phillyrea angustifolia* plants. *Plant Science*. 169:191-197.
- CENAPRED. 2001. "Diagnostico de Peligros e Identificación de Riesgos de Desastres en México", 2001; CENAPRED, Sistema Nacional de Protección Civil, Secretaría de Gobernación; Talleres Gráficos de México, diciembre 2001, 225p.
- Chaîneau CH, Morel JL, Oudot J. 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality* 26: 1478-1483.

- Cheema SA, Khan MI, Shen C, Tang X, Farooq M, Chen L, Zhang C, Chen Y. 2010. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *Journal of Hazardous Materials* 177: 384-389.
- Chekol T, Vough LR, Chaney RL. 2004. Phytoremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils: the rhizosphere effect. *Environment International* 30: 799-804.
- Chen L, Liu X, Zhang X, Liu S, Wei J, Xu G. 2013. Response characteristics of seed germination and seedling growth of *Acorus tatarinowii* under diesel stress. *Plant Soil* 368: 355-363.
- Cheung KC, Zhang JY, Deng HH, Ou YK, Leung HM, Wu SC, Wong MH. 2008. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Bioresource Technology* 99: 2148-2155.
- Cho K, Toler H, Lee J, Ownley B, Stutz JC, Moore JL, Augé RM. 2006. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology* 163: 517-528.
- Choat B, Drayton WM, Brodersen C, Matthews MA, Shackel KA, Wada H, Mcelrone AJ. 2010. Measurement of vulnerability to water stress-induced cavitation in grapevine: a comparison of four techniques applied to a long-veined species. *Plant, Cell and Environment* 33: 1502-1512.
- Chupakhina GN, Maslennikov PV. 2004. Plant adaptation to oil stress. *Russian Journal of Ecology* 35: 290-295.
- Corpas FJ, Barroso JB, del Rio LA. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 145-150.
- Cortina J, Green JJ, Baddeley JA, Watson CA. 2008. Root morphology and water transport of *Pistacia lentiscus* seedlings under contrasting water supply: a test of the pipe stem theory. *Environmental and Experimental Botany* 62: 343-350.
- Coyne M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Paraninfo, Barcelona, España. pág. 342-455.
- Daniel-Kalio LA, Pepple SF. 2006. Effect of bonny light crude oil pollution of soil on the growth of dayflower (*Commelina benghalensis* L.) in the Niger Delta, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 10: 111-114.
- Davis SD, Ewers FW, Sperry JS, Portwood KA, Crocker MC, Adams GC. 2002. Shoot dieback during prolonged drought in *Ceanothus* (Rhamnaceae) chaparral of California: a possible case of hydraulic failure. *American Journal of Botany* 89: 820-828.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Grandmoungin-Ferjani A, Shirali P, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany* 64: 120-127.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmoungin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry* 70: 1421-1427.
- Debiane D, Calonne M, Fontaine J, Laurelle F, Grandmoungin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2011. Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology* 115: 782-792.
- Debiane D, Calonne M, Fontaine J, Laurelle F, Grandmoungin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2012. Benzo[a]pyrene induced lipid changes in the monoxenic arbuscular mycorrhizal chicory roots. *Journal of Hazardous Materials* 209-210: 18-26.

- Debolt S, Melino V, Ford CM. 2007. Ascorbato as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany* 99: 3-8.
- Declerck S, Strullu DJ, Fortin JA. 2005. *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer, Berlin Heidelberg New York. ISBN-13 978-3-540-24027-3.
- de Farias V, Maranhão LT, de Vasconcelos EC, Carvalho FMAS, Lacerda LG, Azevedo JAM, Pandey A, Soccol CR. 2009. Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. *Applied Biochemistry Biotechnology* 157: 10-22.
- Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Sunropical Agroecosystems* 14: 597-612.
- Del Pozo M. 1983. La alfalfa, su cultivo y aprovechamiento. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España. 380p.
- Díaz-Martínez ME, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Almaraz-Suarez JJ, García-Barradas O. 2013. Crecimiento de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Revista de Biología Tropical* 61: 1039-1052.
- Dickison WC. 2000. Integrative plant anatomy. Academic Press, USA. pág. 142-157.
- Douglas GS, McCarthy KJ, Dahlen DT, Seavey JA, Steinhauer EG, Prince RC, Elmendorf DL. 1992. The use of hydrocarbon analyses for environmental assessment and remediation. En: Calabrese EJ, Kostecki PT (eds). Contaminated soils: diesel fuel contamination. Lewis Publishers, Inc. Michigan, U.S.A. pág. 1-22.
- Elsen A, Baimey H, Swennen R, De Waele D. 2003. Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant and Soil* 256: 303-313.
- Erman M, Demir S, Ocağ E, Tüfenkçi Ş, Oğuz F, Akköprü A. 2011. Effects of Rhizobium, arbuscular mycorrhiza and whey applications on some properties in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed conditions 1-yield, yield components, nodulation and AMF colonization. *Field Crops Research* 122: 14-24.
- Fan S, Li P, Gong Z, Ren W, He N. 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere* 71: 1593-1598.
- Ferrera-Cerrato R, Rojas-Avelizapa NG, Poggi-Varaldo HM, Alarcón A, Cañizares-Villanueva RO. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos Del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48: 179-187.
- Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Mendoza-López MR, Sangabriel W, Trejo-Aguilar D, Cruz-Sánchez S, López-Ortiz C, Delgadillo-Martínez J. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41: 817-826.
- Fierro-Coronado RA, Castro-Moreno MG, Ruelas-Ayala RD, Apodaca-Sánchez MA, Maldonado-Mendoza IE. 2013. Induced protection by *Rhizophagus intraradices* against *Fusarium* wilt of tomato. *Interciencia* 38: 48-53.
- Flores-Vindas E. 1999. La planta: estructura y función. Volumen 2. Libro Universitario Regional, Costa Rica. pág. 369-390.
- Fortin JA, Bécard G, Declerck S, Dalpé Y, St-Arnaud M, Coughlan AP, Piché Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany* 80: 1-20.

- Foyer CH, Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28: 1056-1071.
- Foyer CH, Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 11: 861-905.
- Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S. 2001. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* 6: 486-492.
- Gao Y, Li Q, Ling W, Zhu X. 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials* 185: 703-709.
- Garg N, Manchanda G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane?. *Plant Biosystems* 143: 81-96.
- Gaspar ML, Cabello MN, Cazan MC, Pollero RJ. 2002. Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza* 12: 55-59.
- Gechev TS, Breusegem FV, Stone JM, Denev I, Laloi C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28: 1091-1101.
- Ghamsari L, Keyhani E, Golkhoo S. 2007. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal* 11: 137-146.
- Ghelich S, Zarinkamar F. 2013. Histological and ultrastructure changes in *Medicago sativa* response to lead stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2: 20-29.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive species oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gil-Pelegrin E, Aranda I, Peguero-Pina JJ, Vilagrosa A. 2005. El continuo suelo-planta-atmósfera como um modelo integrador de la ecofisiología forestal. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* 14: 358-370.
- Godoy AC, Pérez GA, Torres ECA, Hermosillo LJ, Reyes JI. 2003. Uso de agua, producción de forraje y relaciones hídricas en alfalfa con riego por goteo subsuperficial. *Agrociencia* 37: 107-115.
- Green BT, Wiberg CT, Woodruff JL, Miller EW, Poage VL, Childress DM, Feulner JA, Prosch SA, Runkel JA, Wanderscheid RL, Wierma MD, Yang X, Choe HT, Mercurio SD. 1996. Phytotoxicity observed in *Tradescantia* correlates with diesel fuel contamination in soil. *Environmental and Experimental Botany* 36: 313-321.
- Hacke UG, Sperry JS. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 4: 97-115.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Hamdi H, Benzarti S, Aoyama I, Jedidi N. 2012. Rehabilitation of degraded soils containing aged PAHs based on phytoremediation with alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Biodeterioration and Biodegradation* 67: 40-47.
- Hernández OHA. 2009. Efecto del diesel en la morfología radicular de *Melilotus albus* y sus respuestas fisiológicas en simbiosis micorrízica arbuscular. Tesis de Maestra en Ciencias, Colegio de Postgraduados.
- Hernández-Ortega HA, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado HA, Mendoza-López MR. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status,

- and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *Journal of Environmental Management* 95: S319-S324.
- Herrera K, Cahoon RE, Kumaran S, Jez JM. 2007. Reaction mechanism of glutathione synthetase from *Arabidopsis thaliana*: site-directed mutagenesis of active residues. *Journal of Biological Chemistry* 282: 17157-17165.
- Hewitt EJ. 1966. The composition of the nutrient solution. En: Hewitt EJ. (ed), Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham UK. pág. 187-246.
- Hillis DG, Antunes P, Sibley PK, Klironomos JN, Solomon KR. 2008. Structural responses of *Daucus carota* root-organ cultures and the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, to 12 pharmaceuticals. *Chemosphere* 73: 344-352.
- Hintze L. 2000. NCSS. NCSS, LLC. Kaysville, Utah. Copyright © All Rights Reserved. www.ncc.com (revisado, Septiembre, 2013).
- Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T, Ohashi Y. 2000. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *Febs Letters* 47: 245-250.
- Hou FSL, Milke MW, Leung DWM, MacPherson DJ. 2001. Variations in phytoremediation performance with diesel-contaminated soil. *Environmental Technology* 22: 215-222.
- Hu YQ, Liu S, Yuan HM, Li J, Yan DW, Zhang JF, Lu YT. 2010. Functional comparison of catalase genes in the elimination of photorespiratory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using promoter- and 3'-untranslated region exchange experiments in the *Arabidopsis cat2* photorespiratory mutant. *Plant, Cell and Environment* 33: 1656-1670.
- Huang H, Zhang S, Shan X-g, Chen B-D, Zhu Y-G, Bell JNB. 2007. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on the accumulation and metabolism of atrazine in maize (*Zea mays* L.) and atrazine dissipation in soil. *Environmental Pollution* 146: 452-457.
- Inckot RC, Bona C, de Souza LA, Santos GO. 2008. Anatomia das plântulas de *Mimosa pilulifera* (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. *Rodriguésia* 59: 513-524.
- Ipsilantis I, Samourelis C, Karpouzias DG. 2012. The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 45: 147-155.
- Issoufi I, Rhykerd RL, Smiciklas KD. 2006. Seedling growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil. *Journal of Agronomy and Crop Science* 192: 310-317.
- Jansa J, Mozafar A, Frossard E. 2003. Long-distance transport of P and Zn through the hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus in symbiosis with maize. *Agronomie* 23: 481-488.
- Javot H, Maurel C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany* 90: 301-313.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea J-M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37: 1-16.
- Johnsen AR, Karlson U. 2007. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 533-543.
- Joner EJ, Leyval C. 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10: 155-159.
- Joner EJ, Leyval C. 2003a. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie* 23: 495-502.

- Joner EJ, Leyval C. 2003b. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science and Technology* 37: 2371-2375.
- Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI. 2010. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show?. *Biochemical Journal* 428: 183-190.
- Kaul TN. 2002. Biology and conservation of mushrooms. Science Publishers, India. pág: 46-55.
- Kaya C, Higgs D, Kirnak H, Tas I. 2003. Mycorrhizal colonization improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions. *Plant and Soil* 253: 287-292.
- Kayode J, Olowoyo O, Oyediji A. 2009. The effects of used engine oil pollution on the growth and early seedling performance of *Vigna unguiculata* and *Zea mays*. *Research Journal of Soil Biology* 1: 15-19.
- Khalil GA, Cetina AVM, Ferrera-Cerrato R, Velásquez MJ, Pérez MCA, Larqué SM. 2001. Hongos micorrízicos arbusculares como componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp. en gladiola. *Terra* 19: 259-264.
- Khalladi R, Benhabiles O, Bentahar F, Moulai-Mostefa N. 2009. Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. *Journal of Hazardous Materials* 164: 1179-1184.
- Kirk JL, Moutoglis P, Klironomos J, Lee H, Trevors JT. 2005. Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. *Plant and Soil* 270: 23-30.
- Kisic I, Mesic S, Basic F, Brkic V, Mesic M, Durn G, Zgorelec Z, Bertovic L. 2009. The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma* 149: 209-216.
- Koca H, Bor M, Özdemir F, Türkan I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 60: 344-351.
- Kroening SJ, Leung DWM, Greenfield LG, Galilee C. 2001. Losses of diesel oil by volatilization and effects of diesel oil on seed germination and seedling growth. *Environmental Technology* 22: 1113-1117.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125.
- Kummerová M, Zezulka Š, Váňová L, Fišerová. 2012. Effect of organic pollutant treatment on the growth of pea and maize seedlings. *Central European Journal of Biology* 7: 159-166.
- Kummerová M, Zezulka Š, Babula P, Váňová L. 2013. Root response in *Pisum sativum* and *Zea mays* under fluoranthene stress: morphological and anatomical traits. *Chemosphere* 90: 665-673.
- Kursar TA, Engelbrecht BM, Burke A, Tyree MT, Omari BE, Giraldo JP. 2009. Tolerance to low leaf water status of tropical tree seedlings is related to drought performance and distribution. *Functional Ecology* 23: 93-102.
- Leyval C, Binet P. 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Environmental Quality* 27: 402-407.
- Leyval C, Joner EJ, del Val C, Haselwandter K. 2002. Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. En: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwanter K, (eds). *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhäuser Verlag, Switzerland. pág: 175-186.

- Li QM, Liu BB. 2010. Comparison of three methods for determination of root hydraulic conductivity of maize (*Zea mays* L.) root system. *Agricultural Sciences in China* 9:1438-1447.
- Li X, Feng Y, Sawastsky N. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of biorremediated soils. *Plant and Soil* 192: 219-226.
- Liu A, Dalpé Y. 2009. Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular mycorrhizal leek plants. *International Journal of Phytoremediation* 11: 39-52.
- Liu SL, Luo YM, Cao ZH, Wu LH, Ding KQ, Christine P. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health* 26: 285-293.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529-544.
- Liu H, Weisman D, Ye Y, Cui Huang Ya, Colón-Carmona, Wang Z. 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 176: 375-382.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Luhach J, Chaudhry S. 2012. Effect of diesel contamination on seed germination and growth of four agricultural crops. *Universal Journal of Environmental Research and Technology* 2: 311-317.
- Luo H, Li H, Zhang X, Fu J. 2011. Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology* 20: 770-778.
- Macoevi A, Balestrazzi A, Confalonieri M, Buttafava A, Carbonera D. 2011. The *TFIIS* and *TFIIS-like* genes from *Medicago truncatula* are involved in oxidative stress response. *Gene* 470: 20-30.
- Mackinon G, Duncan HJ. 2013. Phytotoxicity of branched cyclohexanes found in the volatile fraction of diesel fuel on germination of selected grass species. *Chemosphere* 90: 952-957.
- Makbul S, Saruhan GN, Durmuş N, Güven S. 2011. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. *Turkish Journal of Botany* 35: 369-377.
- Malallah G, Afzal M, kurian M, Gulshan S, Dhamsi MSI. 1998. Impact of oil pollution on some desert plants. *Environment International* 24: 919-924.
- Malecka A, Piechalak A, Mesinger A, Hanć A, Barańkiewicz D, Tomaszewska B. 2012. Antioxidative defense system in *Pisum sativum* roots exposed to heavy metals (Pb, Cu, Cd, Zn). *Polish Journal of Environmental Studies* 31: 1721-1730.
- Maranho LT, Galvão F, Preussler KH, Bolzon MGI, Kuniyoshi YS. 2006. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. *Acta Botanica Brasilica* 20: 615-624.
- Marchal R, Penet S, Solano-Serena F, Vandecasteele JP. 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology* 58: 441-448.
- Marjanović Ž, Uehlein N, Kaldenhoff R, Zwiazek JJ, Weiß M, Hampp R, Nehls U. 2005. Aquaporins in poplar: What a difference a symbiont makes!. *Planta* 222: 258-268.
- Marulanda A, Azcón R, Ruiz-Lozano JM. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119: 526-533.

- Martí MC, Camejo D, Fernández-García N, Rellán-Álvarez R, Marques S, Sevilla F, Jiménez A. 2009. Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *Journal of Hazardous Materials* 171: 879-885.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezzer EA. 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. *New Phytologist* 178: 719-739.
- Merkl N, Schultze-Kraft R, Infante C. 2004. Phytoremediation in the tropics—the effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal* 8: 177-184.
- Merkl N, Schultze-Kraft R, Infante C. 2005a. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 165: 195-209.
- Merkl N, Schultze-Kraft R, Infante C. 2005b. Phytoremediation in the tropics-influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution* 138: 86-91.
- Miller G, Shulaev V, Mittler R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133: 481-489.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Mo Y, Liang G, Shi W, Xie J. 2011. Metabolic responses of alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaves to low and high temperature induced stresses. *African Journal of Biotechnology* 10: 1117-1124.
- Møller IM, Jensen PE, Hanson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Morley CP, Mainwaring KA, Doerr SH, Douglas P, Llewellyn CT, Dekker LW. 2005. Organic compounds at different depths in a sandy soil and their role in water repellency. *Australian Journal of Soil Research* 43: 239-249.
- Mortimer PE, Pérez-Fernández MA, Valentine AJ. 2008. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1019-1027.
- Mu Z, Zhang S, Zhang L, Liang A, Liang Z. 2006. Hydraulic conductivity of whole root system is better than hydraulic conductivity of single root in correlation with the leaf water status of maize. *Botanical Studies* 47: 145-151.
- Muller MH, Prosperi JM, Santoni S, Ronfort J. 2003. Inferences from mitochondrial DNA patterns on the domestication history of alfalfa (*Medicago sativa*). *Molecular Ecology* 12: 2187-2199.
- Muñoz CLN, Nevárez MGV, Ballinas CML, Peralta PMR. 2010. Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica* 1: 1-8.
- Muratova A, Hübner T, Narula N, Wand H, Turkovskaya O, Kusch P, Jahn R, Merbach W. 2003. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological Research* 158: 151-161.
- Muratova AY, Golubev SN, Dubrovskaya EV, Pozdnyaskova NN, Panchenko LV, Pleshakova EV, Chernyshova MP, Turkovskaya OV. 2012. Remediating abilities of different plant

- species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. *Applied Soil Ecology* 56: 51-57.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stress in *Arabidopsis* and Grasses. *Plant Physiology* 149: 88-95.
- Nandwal AS, Kukreja S, Kumar N, Sharma PK, Jain M, Mann A, Singh S. 2007. Plant water, status, ethylene evolution  $N_2$  fixing efficiency, antioxidant activity and lipid peroxidation in *Cicer arietinum* L. nodules as affected by short term salinization and desalinization. *Journal of Plant Physiology* 164: 1161-1169.
- Njoku KL, Akinola MO, Ige TO. 2009a. Comparative effects of diesel fuel and spent lubricating oil on the growth of *Zea mays* (Maize). *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3: 428-434.
- Njoku KL, Akinola MO, Taiwo BG. 2009b. Effect of gasoline diesel fuel mixture on the germination and the growth of *Vigna unguiculata* (Cowpea). *African Journal of Environmental Science and Technology* 3: 466-471.
- Nogueira L, Inckot RC, Santos GO, de Souza LA, Bona C. 2011. Phytotoxicity of petroleum-contaminated soil and bioremediated soil on *Allophylus edulis*. *Rodriguésia* 62: 459-466.
- Ogbo EM. 2009. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants-*Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology* 8: 250-253.
- Oguntimehin I, Eissa F, Sakugawa H. 2010. Negative effects of fluoranthene on the ecophysiology of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill) fluoranthene mists negatively affected tomato plants. *Chemosphere* 78: 877-884.
- Okon IE, Udofor EE. 2012. Response of *Telfairia occidentalis* (Hook) to arbuscular mycorrhizal fungi and *Gliricidia sepium* leaves manure in spent engine oil contaminated soil. *World Journal of Agricultural Sciences* 8: 20-25.
- Omosum G, Markson AA, Mbanasor O. 2008. Growth and anatomy of *Amaranthus hybridus* as affected by different crude oil concentrations. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 3: 70-74.
- Omosum G, Edeoga HO, Markson AA. 2009. Anatomical changes due to crude oil pollution and its heavy metals component in three *Mucuna* species. *Recent Research in Science and Technology* 1: 264-269.
- Ortega DE, Collazo OM. 2013. Absorción y ascenso del agua. En: Márquez GJ, Collazo OM, Martínez GM, Orozco AS, Vázquez SS (eds.), *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México. pág: 283-290. ISBN: 978-607-02-2705-9.
- Ortega-Villasante C, Rellán-Álvarez R, del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany* 56: 2239-2251.
- Pallardy S. G. 2008. *Physiology of wood plants*. 3a. ed. Ed. Academic Press is an imprint of Elsevier, USA. pág: 288-294. ISBN: 978-0-12-088765-1
- Parent C, Capelli N, Dat J. 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies* 331: 255-261.
- Patrolecco L, Ademollo N, Capri S, Pagnotta R, Polesello S. 2010. Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere* 81: 1386-1392.

- Perez VJ, García EG, Esparza GF. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avances y Perspectiva* 21: 297-300.
- Pérez-Hernández I, Ochoa-Gaona S, Achroeder RHA, Rivera-Cruz MC, Geissen V. 2013. Tolerance of four tropical tree species to heavy petroleum contamination. *Water, Air, and Soil Pollution* 224: 1637. doi: 10.1007/s11270-013-1637-7.
- Peña-Castro JM, Barrera-Figueroa EB, Fernández-Linares L, Ruizmedrano R. 2006. Isolation and identification of up-regulate genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. *Plant Science* 170: 724-731.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Porcel R, Ruíz-Lozano JM. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55: 1743-1750.
- PROFEPA. 2009. Análisis nacional de emergencias ambientales en el periodo 2005-2009. En sistema de emergencias ambientales <[http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/211/1/mx/analisis\\_nacional\\_de\\_emergencias\\_ambientales.html](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/211/1/mx/analisis_nacional_de_emergencias_ambientales.html)>. Consulta Octubre de 2013.
- Prosperi JM, Jenezewski E, Angevain M, Ronfort J. 2006. Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 843-856.
- Quiñones-Aguilar EE, Ferrera-Cerrato R, Gavi-Reyes F, Fernández-Linares L, Rodríguez-Vázquez R, Alarcón A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37: 585-594.
- Quoreshi AM, Khasa DP. 2008. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on root colonization, growth, and nutrient uptake of aspen and balsam poplar. *Biomass and Bioenergy* 32: 381-391.
- Rabie GH. 2004. Using wheat-mungbean plant system and arbuscular mycorrhiza to enhance in-situ bioremediation. *Food, Agriculture and Environment* 2: 381-390.
- Redon P-O, Béguiristain T, Leyval C. 2008. Influence of *Glomus intraradices* on Cd partitioning in a pot experiment with *Medicago truncatula* in four contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2710-2712.
- Reynoso-Cuevas L, Gallegos-Martínez ME, Cruz-Sosa F, Gutiérrez-Rojas M. 2008. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology* 99: 6379-6385.
- Rivera BF, Mier T, Camacho AD, Valdés M. 2002. Manejo de la mosquita blanca en invernadero con *Verticillium lecanii* en plantas de frijol micorrizadas con *Glomus intraradices*. *Terra* 20: 147-152.
- Rivera-Cruz MC, Trujillo-Narcía A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29: 369-376.
- Rodés GR, Collazo OM. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. UNAM, México. ISBN: 970-32-3313-9.
- Rodríguez Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM. 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.)

- roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant, Cell and Environment* 29: 1532-1544.
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM. 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* 164: 1346-1357.
- Rubio MC, Becana M, Sato S, James EK, Tabata S, Spaink HP. 2007. Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 262-275.
- Ruiz SM, Muñoz HY, Vázquez LB, Cuéllar ON, Polón PR, Ruiz LJM. 2012. La simbiosis micorrízica arbuscular en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a estrés hídrico. Parte I. Mejora la respuesta fisiológica. *Cultivos tropicales* 33: 47-52.
- Ruiz-Lozano JM, Aroca R. 2010. Host Response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. En: Koltai H, Kapulnik Y (eds). *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Springer, Berlin. pág: 239-256. doi: 10.1007/978-90-481-9489-6.
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Bárzana G, Azcón R, Aroca R. 2012. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance: state of the art. En: Aroca R (ed.), *Plant responses to drought stress*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pág: 335-362.
- Ruzin S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. New York.
- Saadoun I, Al-Ghazawi Z. 2010. Toxicity of diesel fuel towards plant seeds as reflected by seed germination outcomes, sprout length and fresh weight. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 8: 167-172.
- Sadunishvili T, Kvesitadze E, Betsiashvili M, Kuprava N, Zaalishvili G, Kvesitadze G. 2009. Influence of hydrocarbons on plant cell ultrastructure and main metabolic enzymes. *World Academy of Science Engineering and Technology* 57: 271-276.
- Salanitro JP, Dorn PB, Huesemann MH, Moore KO, Rhodes IA, Jackson LMR, Vipond TE, Western MM, Wisniewski HL. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology* 31: 1768-1380.
- Samina S, Adams WA. 2002. The fate of diesel hydrocarbons in soils and their effect on the germination of perennial ryegrass. *Environmental Toxicology* 17: 49-62.
- Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río LA. 2008. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide *in vivo* in plant tissues. *Methods in Enzymology* 440: 397-409.
- Sangabriel W, Ferrera-Cerrato R, Trejo-Aguilar D, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez JS, López-Ortiz C, Delgadillo-Martínez J, Alarcón A. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22: 63-73.
- Saraswati P, Purnomo WD, Mawikere NL. 2012. The effectiveness of AM fungal in improving the tolerance of sweet potato plants to drought stress. *International Conference on Agricultural, Environment and Biological Sciences*. pág: 55-58.
- SAS Institute Inc. 2002. *The SAS system for windows*, ver 9.0 SAS Institute Inc, Cary, North Carolina. USA.
- Seago Jr. JL, Fernando DD. 2013. Anatomical aspects of angiosperm root evolution. *Annals of Botany* 112: 223-238.

- Shahsavari E, Adetutu EM, Anderson PA, Ball AS. 2013. Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 224: 1495. doi: 10.1007/s11270-013-1495-3.
- Shao HB, Chu LY, Lu ZH, Kang CM. 2008. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* 4: 8-14.
- Sharifi M, Sadeghi Y, Akbarpour M. 2007. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. *International Journal of Environmental Science and Technology* 4: 463-470.
- Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F, Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18: 287-296.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 410-417.
- SIAP-SAGARPA. 2010. Cultivos de interés. En agricultura <[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1&Itemid=2](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=2)>. Consulta Noviembre de 2012.
- Siciliano SD, Germida JJ. 1999. Enhanced phytoremediation of chlorobenzoates in rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 299-305.
- Singer AC, Crowley DE, Thompson IP. 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* 21: 123-130.
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego. 605p.
- Smith MJ, Flowers TH, Duncan HJ, Alder J. 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution* 141: 519-525.
- Song S, Chen Y, Zhao M, Zhang WH. 2012. A novel *Medicago truncatula* HD-Zip gene, *MtHB2*, is involved in abiotic stress responses. *Environmental and Experimental Botany* 80: 1-9.
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT. 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment* 11: 35-40.
- Srogi K. 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* 5: 169-195.
- Streeter VL, Wylie EB. 1987. *Mecánica de los fluidos*. 8a ed. McGraw-Hill, USA.
- Swanson SJ, Choi WG, Chanoca A, Gilroy S. 2011. In vivo imaging of Ca<sup>2+</sup>, pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 273-297.
- Tan BL, Sarafis V, Beattie GAC, White Itajaí R, Darley EM, Spooner-Hart R. 2005. Localization and movement of mineral oil in plants by fluorescence and confocal microscopy. *Journal of Experimental Botany* 56: 2755-2763.
- Tang M, Chen H, Huang JC, Tian ZQ. 2009. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 936-940.
- Teng Y, Luo Y, Sun X, Tu C, Xu L, Liu W, Li Z, Christie P. 2010. Influence of arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* on phytoremediation by alfalfa of an agricultural soil contaminated with weathered PCBs: a field study. *International Journal of Phytoremediation* 12: 516-533.

- Teng Y, Shen Y, Luo Y, Sun X, Sun M, Fu D, Li Z, Christie P. 2011. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 186: 1271-1276.
- Tesar M, Reichenauer T, Sessitsch A. 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1883-1892.
- Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. 2000. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care* 3: 373-384.
- Tlustoš P, Száková J, Hrubý J, Hartman I, Najmanová J, Nedělník J, Pavlíková D, Batysta M. 2006. Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant Soil and Environment* 52: 413-423.
- Trejo D, Moreira C, Bañuelos I, Lara L, Aloafita G, Reyes A. 2013. Effect of diesel and biodiesel on the growth of *Briachiararia decumbens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 16: 391-398.
- Tyree MT, Ewers FW. 1996. Hydraulic architecture of woody tropical plants. En: Mulkey SM, Chazdon RL, Smith AP. (Eds.). *Tropical plant ecophysiology*. Chapman and Hall, New York, pág: 217-243.
- Tyree MT, Zimmermann MH. 2002. *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer, Germany.
- van Rooyen M, Valentine A, Archer E. 2004. Arbuscular mycorrhizal colonization modifies the water relations of young transplanted grapevines (*Vitis*). *South African Journal for Enology and Viticulture* 25: 37-42.
- Vázquez-Vázquez C, García-Hernández JL, Salazar-Sosa E, Murillo-Amador B, Orona-Castillo I, Zúñiga-Tarango R, Rueda-Puente EO, Preciado-Rangel P. 2010. Rendimiento y valor nutritivo de forraje de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con diferentes dosis de estiércol bovino. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1: 363-372.
- Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Grandmougin-Ferjani A, Durand R. 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* 16: 397-405.
- Vogel-Mikuš K, Drobne D, Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution* 133: 233-242.
- Wan MT, Rahe JE, Watts RG. 1998. A new technique for determining the sublethal toxicity of pesticides to the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 1421-1428.
- Wang J, Liu X, Zhang X, Liang X, Zhang W. 2011. Growth response and phytoremediation ability of *Reed* for diesel contaminant. *Procedia Environmental Sciences* 8: 68-74.
- Wang MC, Chen YT, Chen SH, Chang-Chien SW, Sunkara SV. 2012. Phytoremediation of pyrene contaminated soils amended with compost and planted with ryegrass and alfalfa. *Chemosphere* 87: 217-225.
- White JC, Ross DW, Gent MPN, Eitzer BD, Incorvia MMJ. 2006a. Effect of mycorrhizal fungi on the phytoextraction of weathered *p,p*-DDE by *Cucurbita pepo*. *Journal of Hazardous Materials B137*: 1750-1757.
- White PM, Wolf DC, Thoma GJ, Reynolds CM. 2006b. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 169: 207-220.

- Wolfanger WC. 1932. Vascular system of young plants of *Medicago sativa*. Botanical Gazette 94: 152-167.
- Wölz J, Schulze T, Varel UL, Fleig M, Reifferscheid G, Brack W, Kühlers D, Braunbeck T, Hollert H. 2011. Investigation on soil contamination at recently inundated and non-inundated sites. Journal of Soils and Sediments 11: 82-92.
- Worchel ER, Giauque HE, Kivlin SN. 2013. Fungal symbionts alter plant drought response. Microbial Ecology 65: 671-678.
- Wu QS, Xia RX. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. Journal of Plant Physiology 163: 417-425.
- Wu QS, Zou YN, Xia RX. 2006a. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. European Journal of Soil Biology 42: 166-172.
- Wu QS, Xia RX, Zou YN. 2006b. Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. Journal of Plant Physiology 163: 1101-1110.
- Wu N, Zhang S, Huang H, Christie P. 2008a. Enhanced dissipation of phenanthrene in spiked soil by arbuscular mycorrhizal alfalfa combined with non-ionic surfactant amendment. Science of the Total Environment 394: 230-236.
- Wu N, Zhang S, Huang H, Shan X, Christie P, Wang Y. 2008b. DDT uptake by arbuscular mycorrhizal alfalfa and depletion in soil as influenced by soil application of a non-ionic surfactant. Environmental Pollution 151: 569-575.
- Wu N, Huang H, Zhang S, Zhu YG, Christie P, Zhang Y. 2009. Phenanthrene uptake by *Medicago sativa* L. under the influence of an arbuscular mycorrhizal fungus. Environmental Pollution 157: 1613-1618.
- Wu FY, Yu XZ, Wu SC, Lin XG, Wong MH. 2011. Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. Journal of Hazardous Materials 187: 341-347.
- Xiong L, Zhu JK. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant, Cell and Environment 25: 131-139.
- Xu SY, Chen YX, Lin KF, Chen XC, Lin Q, Li F, Wang ZW. 2009. Removal of pyrene from contaminated soils by white clover. Pedosphere 19: 265-272.
- Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A, Shinmyo A. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 665-670.
- Yu XZ, Wu SC, Wu FY, Wong MH. 2011. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. Journal of Hazardous Materials 186: 1206-1217.
- Zafra A, Rodríguez-García MI, Alché JD. 2010. Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. Biomed Central Plant Biology 10: 36. doi: 10.1186/1471-2229-10-36.
- Zar JH. 1984. Biostatistical analysis. 2a. ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Zarankimar F, Reypour F, Soleimanpour S. 2013. Effect of diesel fuel contaminated soil on the germination and the growth of *Festuca arundinacea*. Research Journal of Chemical and Environmental Sciences 1: 37-41.

- Zhu X, Song F, Xu H. 2010. Influence of arbuscular mycorrhiza on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity of maize plants under temperature stress. *Mycorrhiza* 20: 325-332.
- Zhu XC, Song FB, Liu SQ, Liu TD. 2011. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on photosynthesis and water status of maize under high temperature stress. *Plant Soil* 346: 189-199.
- Zhu XC, Song FB, Liu SQ, Liu TD, Zhou X. 2012. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant Soil and Environment* 58: 186-191.
- Ziółkowska A, Wyszowski M. 2010. Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants. *Ecological Chemistry and Engineering S* 17: 73-82.
- Zocco D, Fontaine J, Lozanova E, Renard L, Bivort C, Durand R, Grandmougin-Ferjani, A, Declerck S. 2008. Effects of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research* 112: 592-601.

## ANEXO I

Cuadro AI-4.1. Constitución del medio mínimo (M) modificado (Capítulo IV).

Solución “stock”	Cantidad de reactivo en peso (g L <sup>-1</sup> )	Cantidad de solución stock para preparar 1L (mL)
<b>Solución stock A</b>		5.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	107.24	
KNO <sub>3</sub>	16.00	
KCl	13.00	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.96	
<b>Solución stock B</b>		1.00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	288.00	
<b>Solución stock C</b>		0.50
❖ Almacenar a 4 °C y en frasco ámbar		
EDTA Na-Fe	16.00	
<b>Solución stock D</b>		0.10
KI	7.50	
<b>Solución stock E</b>		0.50
❖ Almacenar a -20 °C		
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	30.00	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	13.25	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7.50	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.65	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.012	
<b>Solución stock F</b>		1.00
❖ Almacenar a -20 °C		
❖ Esterilizar por filtración		
Tiamina HCl	0.10	
Piridoxina HCl	0.10	
Ácido nicotínico	0.50	
Mio-inositol	50.00	
Glicina	3.00	
<b>Sacarosa</b>	10.00	
<b>Gel Rite</b>	3.00	

(Bécard y Fortin, 1988)

## ANEXO II



Figura AII-5.1. Aspecto de las respuestas de tolerancia y crecimiento en plantas de *Medicago sativa* en sustrato contaminado con diferentes concentraciones de diésel, después de 30 días (Capítulo V).

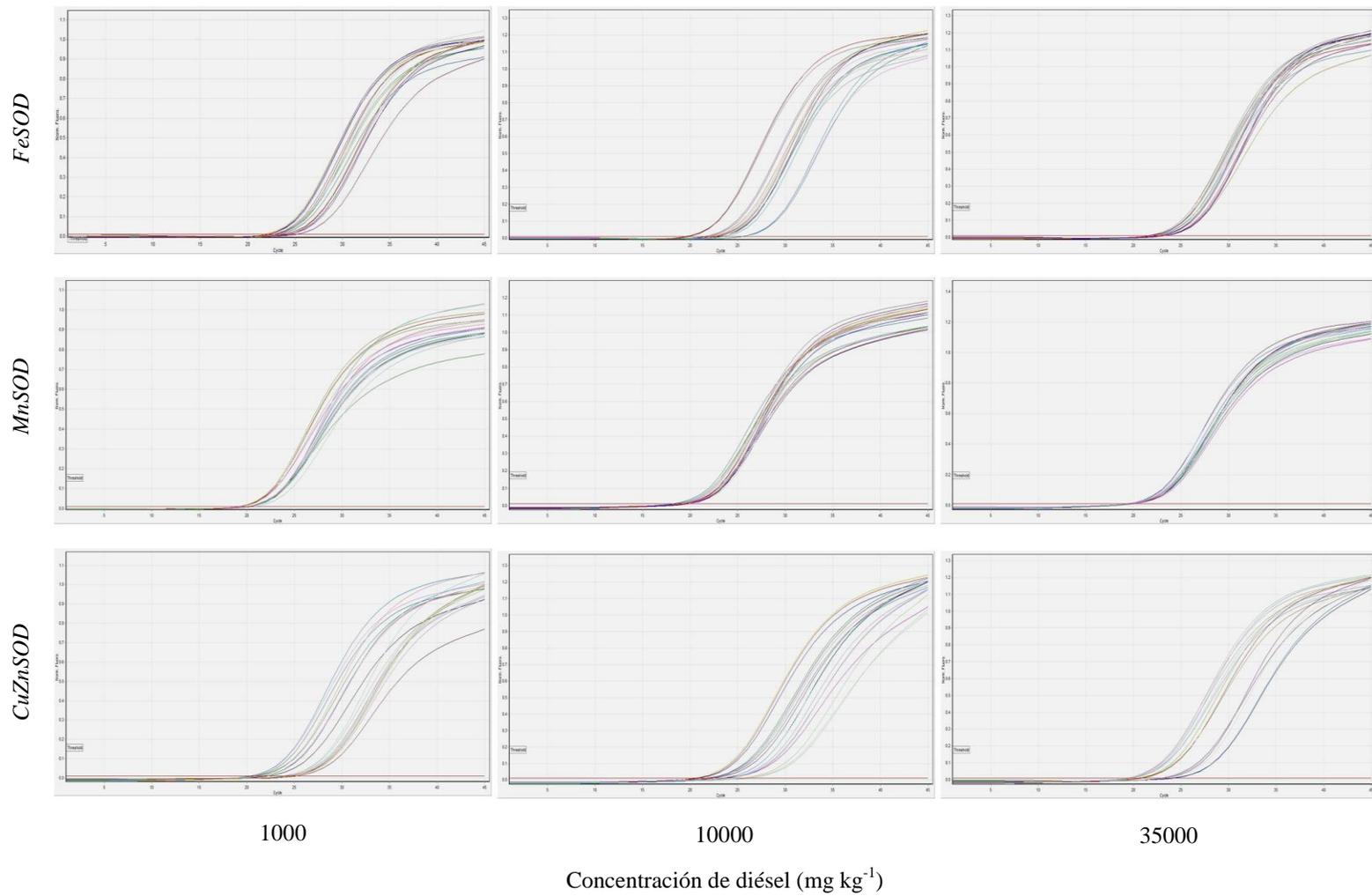


Figura AII-5.2. Curvas de amplificación de los oligonucleótidos diseñados en la parte aérea de *Medicago sativa* (Capítulo V).

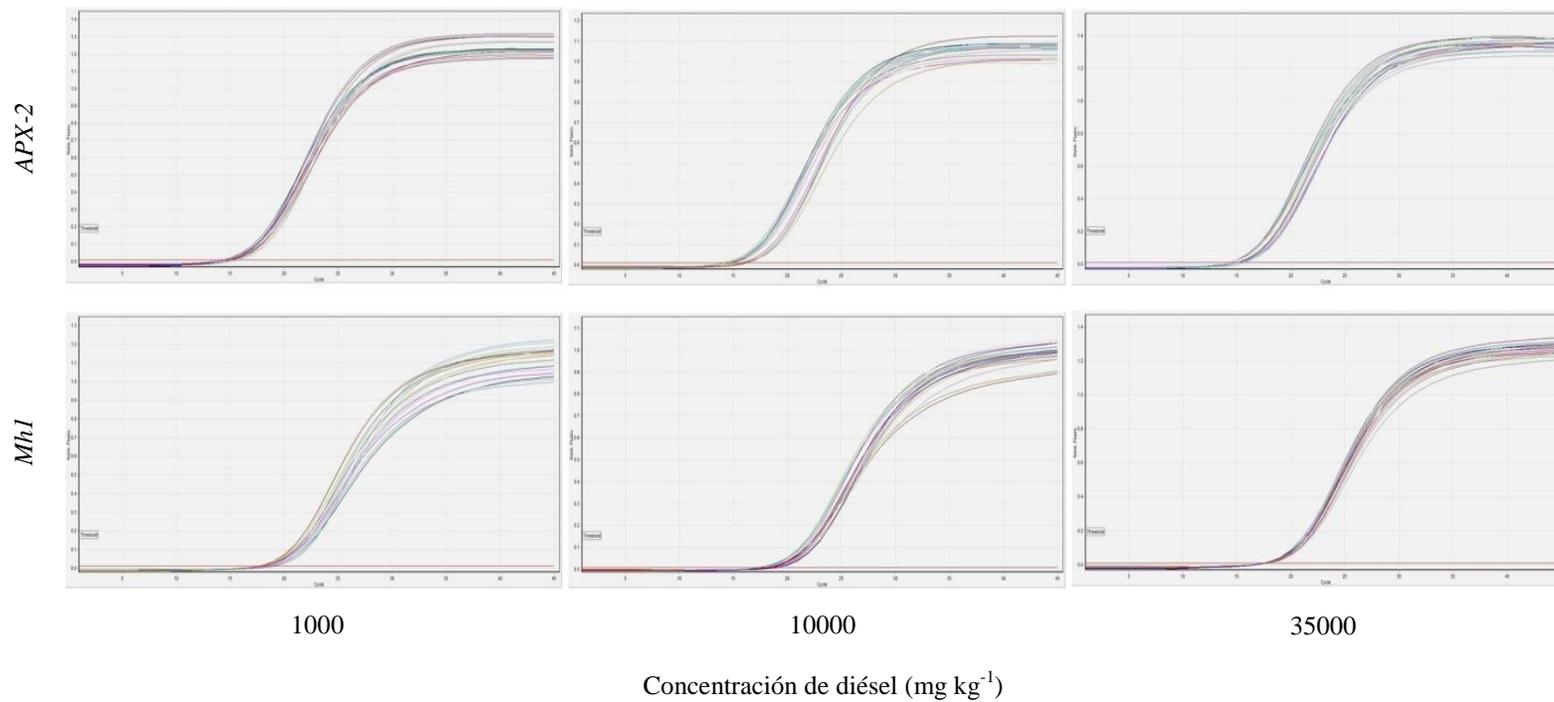


Figura AII-5.3. Curvas de amplificación de los oligonucleotidos diseñados en la parte aérea de *Medicago sativa* (Capítulo V).

Cuadro AII-5.1. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *FeSOD* en raíz (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.76	16.78	0.05	16.02	15.95	0.06	16.83	16.86	0.04
c1 act	16.84			15.94			16.89		
c1 act	16.75			15.90					
c2 act	16.98	16.95	0.06	18.59	18.63	0.10	17.56	17.52	0.04
c2 act	16.89			18.55			17.49		
c2 act	16.99			18.74			17.51		
c3 act	16.08	16.20	0.11	15.25	15.26	0.06	16.71	16.73	0.02
c3 act	16.22			15.32			16.75		
c3 act	16.30			15.20			16.72		
t1 act	16.02	16.08	0.05	17.77	17.74	0.03	16.85	16.88	0.04
t1 act	16.12			17.71			16.85		
t1 act	16.10			17.74			16.93		
t2 act	15.22	15.25	0.03	16.53	16.69	0.15	16.65	16.63	0.01
t2 act	15.27			16.82			16.62		
t2 act	15.26			16.71			16.63		
t3 act	15.94	15.98	0.04	15.16	15.11	0.05	15.99	15.99	0.01
t3 act	15.97			15.12			15.97		
t3 act	16.02			15.06			15.99		
c1 gpdh	22.69	22.78	0.15	22.04	21.86	0.17	22.50	22.36	0.13
c1 gpdh	22.70			21.81			22.25		
c1 gpdh	22.95			21.71			22.32		
c2 gpdh	21.97	21.72	0.24	20.57	20.73	0.27	21.42	21.41	0.03
c2 gpdh	21.50			20.57			21.37		
c2 gpdh	21.69			21.03			21.43		
c3 gpdh	24.00	23.96	0.06	22.86	22.81	0.06	23.85	24.20	0.31
c3 gpdh	23.89			22.81			24.43		
c3 gpdh	23.99			22.75			24.32		
t1 gpdh	23.04	23.00	0.09	23.47	23.47	0.24	19.81	20.13	0.28
t1 gpdh	23.08			23.71			20.35		
t1 gpdh	22.90			23.24			20.23		
t2 gpdh	22.62	22.59	0.16	22.26	22.95	0.98	21.21	21.25	0.12
t2 gpdh	22.42			23.64			21.39		
t2 gpdh	22.74						21.16		
t3 gpdh	23.68	23.41	0.23	19.39	19.41	0.02	19.79	19.93	0.28
t3 gpdh	23.23			19.42			19.75		
t3 gpdh	23.33			19.43			20.26		
c1 gen	22.14	21.96	0.36	21.42	21.33	0.11	21.42	21.35	0.06
c1 gen	21.54			21.21			21.34		
c1 gen	22.20			21.36			21.30		
c2 gen	22.22	22.34	0.10	22.52	22.52	0.15	22.09	22.06	0.07
c2 gen	22.38			22.68			22.12		
c2 gen	22.42			22.37			21.98		
c3 gen	22.36	22.62	0.22	21.45	21.48	0.11	22.30	22.40	0.33
c3 gen	22.74			21.39			22.76		
c3 gen	22.75			21.60			22.12		
t1 gen	23.31	23.58	0.34	23.12	23.08	0.04	22.08	22.01	0.08
t1 gen	23.97			23.05			22.02		
t1 gen	23.48			23.06			21.92		
t2 gen	20.53	20.68	0.14	23.70	23.43	0.37	21.32	21.18	0.12
t2 gen	20.81			23.17			21.08		
t2 gen	20.69						21.15		
t3 gen	20.91	20.88	0.12	19.01	18.92	0.10	21.05	21.02	0.05
t3 gen	20.76			18.81			21.05		
t3 gen	20.98			18.94			20.97		

Cuadro AII-5.2. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *MnSOD* en raíz (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.76	16.78	0.05	16.95	16.91	0.16	17.50	17.48	0.02
c1 act	16.84			17.05			17.47		
c1 act	16.75			16.73			17.46		
c2 act	16.98	16.95	0.06	17.11	17.15	0.06	17.57	17.57	0.05
c2 act	16.89			17.22			17.61		
c2 act	16.99			17.12			17.52		
c3 act	16.08	16.20	0.11	16.92	16.90	0.06	16.90	16.92	0.11
c3 act	16.22			16.94			17.04		
c3 act	16.30			16.83			16.83		
t1 act	16.02	16.08	0.05	17.82	17.68	0.21	17.48	17.36	0.23
t1 act	16.12			17.77			17.52		
t1 act	16.10			17.43			17.10		
t2 act	15.22	15.25	0.03	16.31	16.33	0.09	16.77	16.90	0.13
t2 act	15.27			16.44			16.90		
t2 act	15.26			16.26			17.02		
t3 act	15.94	15.98	0.04	14.56	14.54	0.03	16.67	16.70	0.03
t3 act	15.97			14.54			16.69		
t3 act	16.02			14.51			16.74		
c1 gpdh	22.69	22.78	0.15	21.45	21.66	0.39	21.63	21.61	0.03
c1 gpdh	22.70			22.10			21.59		
c1 gpdh	22.95			21.43					
c2 gpdh	21.97	21.72	0.24	20.53	20.68	0.13	20.19	20.22	0.05
c2 gpdh	21.50			20.73			20.26		
c2 gpdh	21.69			20.77					
c3 gpdh	24.00	23.96	0.06	23.47	23.59	0.43	23.30	23.25	0.05
c3 gpdh	23.89			23.24			23.20		
c3 gpdh	23.99			24.07			23.26		
t1 gpdh	23.04	23.00	0.09	22.43	22.85	0.46	19.56	19.41	0.16
t1 gpdh	23.08			23.35			19.24		
t1 gpdh	22.90			22.78			19.43		
t2 gpdh	22.62	22.59	0.16	19.79	19.75	0.04	20.84	20.82	0.03
t2 gpdh	22.42			19.75			20.80		
t2 gpdh	22.74			19.70					
t3 gpdh	23.68	23.41	0.23	18.75	18.65	0.18	19.21	19.25	0.05
t3 gpdh	23.23			18.75			19.23		
t3 gpdh	23.33			18.44			19.31		
c1 gen	18.98	19.05	0.10	19.12	19.18	0.08	18.72	18.83	0.09
c1 gen	18.99			19.15			18.87		
c1 gen	19.16			19.27			18.88		
c2 gen	19.04	19.30	0.24	19.21	19.29	0.07	19.85	19.94	0.13
c2 gen	19.36			19.31			20.04		
c2 gen	19.50			19.36					
c3 gen	18.97	19.19	0.22	19.44	19.46	0.06	21.80	21.80	
c3 gen	19.41			19.53					
c3 gen	19.19			19.42					
t1 gen	18.96	19.03	0.08	20.11	20.09	0.12	18.95	18.97	0.04
t1 gen	19.11			19.96			19.01		
t1 gen	19.02			20.20			18.95		
t2 gen	17.93	17.99	0.14	18.55	18.51	0.07	18.73	18.59	0.28
t2 gen	17.88			18.54			18.26		
t2 gen	18.15			18.42			18.77		
t3 gen	18.11	18.15	0.15	17.41	17.37	0.04	18.07	18.17	0.10
t3 gen	18.03			17.34			18.17		
t3 gen	18.32			17.35			18.26		

Cuadro AII-5.3. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *CuZnSOD* en raíz (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.76	16.78	0.05	17.60	17.66	0.1	16.83	16.86	0.04
c1 act	16.84			17.77			16.89		
c1 act	16.75			17.60					
c2 act	16.98	16.95	0.06	17.80	17.80	0.05	17.56	17.52	0.04
c2 act	16.89			17.75			17.49		
c2 act	16.99			17.85			17.51		
c3 act	16.08	16.20	0.11	16.93	16.89	0.05	16.71	16.73	0.02
c3 act	16.22			16.91			16.75		
c3 act	16.30			16.83			16.72		
t1 act	16.02	16.08	0.05	17.64	17.62	0.03	16.85	16.88	0.04
t1 act	16.12			17.59			16.85		
t1 act	16.10			17.64			16.93		
t2 act	15.22	15.25	0.03	17.05	17.02	0.08	16.65	16.63	0.01
t2 act	15.27			17.08			16.62		
t2 act	15.26			16.93			16.63		
t3 act	15.94	15.98	0.04	15.14	15.10	0.03	15.99	15.99	0.01
t3 act	15.97			15.09			15.97		
t3 act	16.02			15.08			15.99		
c1 gpdh	22.69	22.78	0.15	22.35	22.11	0.34	22.50	22.36	0.13
c1 gpdh	22.70			22.25			22.25		
c1 gpdh	22.95			21.72			22.32		
c2 gpdh	21.97	21.72	0.24	20.88	20.92	0.06	21.42	21.41	0.03
c2 gpdh	21.50			21.00			21.37		
c2 gpdh	21.69			20.90			21.43		
c3 gpdh	24.00	23.96	0.06	23.25	23.18	0.13	23.85	24.20	0.31
c3 gpdh	23.89			23.26			24.43		
c3 gpdh	23.99			23.04			24.32		
t1 gpdh	23.04	23.00	0.09	22.54	22.53	0.13	19.81	20.13	0.28
t1 gpdh	23.08			22.39			20.35		
t1 gpdh	22.90			22.65			20.23		
t2 gpdh	22.62	22.59	0.16	21.02	20.86	0.16	21.21	21.25	0.12
t2 gpdh	22.42			20.83			21.39		
t2 gpdh	22.74			20.71			21.16		
t3 gpdh	23.68	23.41	0.23	19.20	18.84	0.31	19.79	19.93	0.28
t3 gpdh	23.23			18.69			19.75		
t3 gpdh	23.33			18.64			20.26		
c1 gen	22.91	22.98	0.11	22.17	22.51	0.30	22.60	22.87	0.23
c1 gen	22.92			22.66			22.95		
c1 gen	23.11			22.71			23.04		
c2 gen	23.75	23.99	0.42	23.37	23.55	0.18	24.95	25.27	0.33
c2 gen	23.75			23.57			25.60		
c2 gen	24.48			23.73			25.27		
c3 gen	24.25	23.95	0.26	23.66	23.49	0.15	24.14	24.10	0.19
c3 gen	23.85			23.37			23.89		
c3 gen	23.75			23.44			24.26		
t1 gen	24.69	24.88	0.45	25.11	25.60	0.49	24.31	24.86	0.78
t1 gen	24.56			26.09			25.41		
t1 gen	25.40			25.59					
t2 gen	23.75	23.39	0.34	23.55	23.49	0.23	24.73	24.45	0.27
t2 gen	23.36			23.68			24.19		
t2 gen	23.07			23.24			24.42		
t3 gen	23.58	23.60	0.06	22.89	22.79	0.08	23.68	23.64	0.32
t3 gen	23.67			22.73			23.30		
t3 gen	23.56			22.75			23.95		

Cuadro AII-5.4. Datos de Ct (treshold cycle) del gen APX-2 en raíz (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.76	16.78	0.05	16.02	15.95	0.06	16.83	16.86	0.04
c1 act	16.84			15.94			16.89		
c1 act	16.75			15.90					
c2 act	16.98	16.95	0.06	18.59	18.63	0.10	17.56	17.52	0.04
c2 act	16.89			18.55			17.49		
c2 act	16.99			18.74			17.51		
c3 act	16.08	16.20	0.11	15.25	15.26	0.06	16.71	16.73	0.02
c3 act	16.22			15.32			16.75		
c3 act	16.30			15.20			16.72		
t1 act	16.02	16.08	0.05	17.77	17.74	0.03	16.85	16.88	0.04
t1 act	16.12			17.71			16.85		
t1 act	16.10			17.74			16.93		
t2 act	15.22	15.25	0.03	16.53	16.69	0.15	16.65	16.63	0.01
t2 act	15.27			16.82			16.62		
t2 act	15.26			16.71			16.63		
t3 act	15.94	15.98	0.04	15.16	15.11	0.05	15.99	15.99	0.01
t3 act	15.97			15.12			15.97		
t3 act	16.02			15.06			15.99		
c1 gpdh	22.69	22.78	0.15	21.02	21.01	0.05	22.50	22.36	0.13
c1 gpdh	22.70			21.06			22.25		
c1 gpdh	22.95			20.97			22.32		
c2 gpdh	21.97	21.72	0.24	20.02	20.04	0.02	21.42	21.41	0.03
c2 gpdh	21.50			20.04			21.37		
c2 gpdh	21.69			20.06			21.43		
c3 gpdh	24.00	23.96	0.06	22.72	22.69	0.15	23.85	24.20	0.31
c3 gpdh	23.89			22.53			24.43		
c3 gpdh	23.99			22.83			24.32		
t1 gpdh	23.04	23.00	0.09	21.64	21.65	0.01	19.81	20.13	0.28
t1 gpdh	23.08			21.65			20.35		
t1 gpdh	22.90						20.23		
t2 gpdh	22.62	22.59	0.16	19.40	19.44	0.10	21.21	21.25	0.12
t2 gpdh	22.42			19.36			21.39		
t2 gpdh	22.74			19.55			21.16		
t3 gpdh	23.68	23.41	0.23	18.68	18.67	0.02	19.79	19.93	0.28
t3 gpdh	23.23			18.64			19.75		
t3 gpdh	23.33			18.68			20.26		
c1 gen	14.48	14.49	0.01	13.48	13.51	0.03	14.27	14.27	0.01
c1 gen	14.49			13.53			14.25		
c1 gen	14.50			13.52			14.28		
c2 gen	14.77	14.69	0.06	15.17	15.15	0.03	14.95	14.96	0.01
c2 gen	14.66			15.11			14.97		
c2 gen	14.66			15.15			14.97		
c3 gen	14.56	14.60	0.04	12.87	12.87	0.01	14.39	14.39	0.01
c3 gen	14.61			12.87			14.40		
c3 gen	14.63			12.86					
t1 gen	13.72	13.62	0.28	14.29	14.51	0.41	14.22	14.22	0.04
t1 gen	13.30			14.26			14.26		
t1 gen	13.84			14.98			14.19		
t2 gen	13.96	12.97	0.02	13.49	13.50	0.01	13.61	13.61	0.01
t2 gen	12.99			13.50			13.62		
t2 gen	12.96			13.50			13.59		
t3 gen	13.19	13.19	0.01	12.72	13.00	0.48	13.45	13.29	0.29
t3 gen	13.19			12.73			12.95		
t3 gen	13.18			13.56			13.46		

Cuadro AII-5.5. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *MHI* en raíz (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	17.80	17.68	0.36	16.85	16.83	0.02	16.83	16.86	0.04
c1 act	17.95			16.83			16.89		
c1 act	17.28			16.82					
c2 act	17.97	18.01	0.04	17.10	17.10	0.01	17.56	17.52	0.04
c2 act	18.06			17.10			17.49		
c2 act	18.00			17.08			17.51		
c3 act	17.91	17.60	0.27	16.70	16.69	0.05	16.71	16.73	0.02
c3 act	17.43			16.63			16.75		
c3 act	17.46			16.73			16.72		
t1 act	16.90	16.97	0.07	17.79	17.74	0.07	16.85	16.88	0.04
t1 act	16.98			17.77			16.85		
t1 act	17.04			17.67			16.93		
t2 act	16.28	16.18	0.09	16.95	16.87	0.07	16.65	16.63	0.01
t2 act	16.12			16.83			16.62		
t2 act	16.15			16.82			16.63		
t3 act	16.27	16.34	0.1	14.41	14.45	0.05	15.99	15.99	0.01
t3 act	16.41			14.49			15.97		
t3 act	16.37						15.99		
c1 gpdh	31.10	30.96	0.35	21.45	21.66	0.39	22.50	22.36	0.13
c1 gpdh	31.22			22.10			22.25		
c1 gpdh	30.56			21.43			22.32		
c2 gpdh	29.50	28.69	1.08	20.53	20.68	0.13	21.42	21.41	0.03
c2 gpdh	29.11			20.73			21.37		
c2 gpdh	27.47			20.77			21.43		
c3 gpdh	32.08	33.41	1.17	23.47	23.59	0.43	23.85	24.20	0.31
c3 gpdh	34.28			23.24			24.43		
c3 gpdh	33.88			24.07			24.32		
t1 gpdh	30.04	30.69	1.33	22.43	22.85	0.46	19.81	20.13	0.28
t1 gpdh	32.22			23.35			20.35		
t1 gpdh	29.81			22.78			20.23		
t2 gpdh	31.20	30.75	0.71	19.79	19.75	0.04	21.21	21.25	0.12
t2 gpdh	29.93			19.75			21.39		
t2 gpdh	31.13			19.70			21.16		
t3 gpdh	31.11	31.82	0.62	18.75	18.65	0.18	19.79	19.93	0.28
t3 gpdh	32.21			18.75			19.75		
t3 gpdh	32.15			18.44			20.26		
c1 gen	18.11	18.10	0.03	17.77	17.63	0.24	17.61	17.64	0.03
c1 gen	18.07			17.76			17.66		
c1 gen	18.13			17.35			17.65		
c2 gen	19.10	19.03	0.07	18.98	18.99	0.04	19.21	19.07	0.13
c2 gen	18.96			18.96			18.98		
c2 gen	19.04			19.03			19.02		
c3 gen	18.69	18.80	0.10	18.19	18.13	0.15	17.98	18.00	0.04
c3 gen	18.80			18.25			17.98		
c3 gen	18.90			17.96			18.05		
t1 gen	18.03	17.90	0.21	18.33	18.23	0.08	18.18	18.15	0.04
t1 gen	18.02			18.22			18.10		
t1 gen	17.65			18.16			18.16		
t2 gen	17.08	17.08	0.00	17.94	17.88	0.05	17.97	18.08	0.09
t2 gen	17.08			17.85			18.11		
t2 gen				17.85			18.14		
t3 gen	17.25	17.29	0.04	16.20	16.17	0.03	17.07	17.09	0.04
t3 gen	17.31			16.17			17.06		
t3 gen	17.32			16.15			17.12		

Cuadro AII-5.6. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *FeSOD* en parte aérea (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.82	16.79	0.03	16.69	16.71	0.02	16.55	16.60	0.05
c1 act	16.75			16.71			16.64		
c1 act	16.79			16.73			16-60		
c2 act	16.59	16.57	0.02	16.16	16.14	0.05	15.76	15.82	0.06
c2 act	16.54			16.08			15.82		
c2 act	16.56			16.17			15.89		
c3 act	17.46	17.36	0.22	16.99	16.90	0.08	16.59	16.61	0.06
c3 act	17.51			16.90			16.68		
c3 act	17.10			16.82			16.57		
t1 act	18.24	18.13	0.27	17.11	17.25	0.26	16.58	16.60	0.04
t1 act	17.82			17.08			16.58		
t1 act	18.32			17.55			16.65		
t2 act	17.48	17.49	0.01	17.62	17.72	0.12	16.77	16.81	0.04
t2 act	17.49			17.68			16.80		
t2 act	17.50			17.85			16.85		
t3 act	15.92	16.36	0.38	17.58	17.64	0.05	16.64	16.63	0.01
t3 act	16.56			17.67			16.63		
t3 act	16.61			17.67			16.61		
c1 gpdh	14.04	14.11	0.14	13.81	13.83	0.05	13.96	14.15	0.18
c1 gpdh	14.27			13.89			14.31		
c1 gpdh	14.02			13.80			14.18		
c2 gpdh	13.86	13.85	0.04	12.80	12.81	0.01	13.88	13.78	0.09
c2 gpdh	13.89			12.80			13.76		
c2 gpdh	13.81			12.82			13.71		
c3 gpdh	14.57	14.55	0.02	13.84	13.83	0.06	14.45	14.37	0.07
c3 gpdh	14.54			13.77			14.38		
c3 gpdh	14.55			13.89			14.30		
t1 gpdh	15.44	15.49	0.04	14.54	14.58	0.06	13.65	13.64	0.02
t1 gpdh	15.51			14.65			13.62		
t1 gpdh	15.51			14.55			13.66		
t2 gpdh	15.53	15.48	0.08	14.40	14.46	0.06	14.61	14.77	0.27
t2 gpdh	15.38			14.48			14.62		
t2 gpdh	15.52			14.51			15.08		
t3 gpdh	13.22	13.37	0.24	16.07	15.84	0.28	14.30	14.30	0.03
t3 gpdh	13.65			15.91			14.33		
t3 gpdh	13.25			15.53			14.28		
c1 gen	23.77	23.94	0.15	22.45	22.44	0.22	23.37	23.35	0.09
c1 gen	23.99			22.22			23.43		
c1 gen	24.05			22.65			23.25		
c2 gen	22.85	23.11	0.34	19.99	19.91	0.16	21.78	21.93	0.20
c2 gen	22.97			20.03			22.16		
c2 gen	23.50			19.73			21.84		
c3 gen	24.43	24.74	0.46	22.50	22.83	0.31	23.49	23.44	0.09
c3 gen	24.51			23.11			23.48		
c3 gen	25.26			22.89			23.33		
t1 gen	23.19	23.13	0.16	25.67	25.69	0.04	22.64	22.73	0.25
t1 gen	23.25			25.66			23.01		
t1 gen	22.95			25.73			22.55		
t2 gen	22.34	22.66	0.28	22.31	21.98	0.36	21.70	21.86	0.16
t2 gen	22.79			21.60			21.85		
t2 gen	22.84			22.02			22.02		
t3 gen	21.88	22.13	0.22	23.26	23.42	0.32	22.80	22.85	0.05
t3 gen	22.26			23.80			22.87		
t3 gen	22.26			23.21			22.90		

Cuadro AII-5.7. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *MnSOD* en parte aérea (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.82	16.79	0.03	16.69	16.71	0.02	16.55	16.60	0.05
c1 act	16.75			16.71			16.64		
c1 act	16.79			16.73			16-60		
c2 act	16.59	16.57	0.02	16.16	16.14	0.05	15.76	15.82	0.06
c2 act	16.54			16.08			15.82		
c2 act	16.56			16.17			15.89		
c3 act	17.46	17.36	0.22	16.99	16.90	0.08	16.59	16.61	0.06
c3 act	17.51			16.90			16.68		
c3 act	17.10			16.82			16.57		
t1 act	18.24	18.13	0.27	17.11	17.25	0.26	16.58	16.60	0.04
t1 act	17.82			17.08			16.58		
t1 act	18.32			17.55			16.65		
t2 act	17.48	17.49	0.01	17.62	17.72	0.12	16.77	16.81	0.04
t2 act	17.49			17.68			16.80		
t2 act	17.50			17.85			16.85		
t3 act	15.92	16.36	0.38	17.58	17.64	0.05	16.64	16.63	0.01
t3 act	16.56			17.67			16.63		
t3 act	16.61			17.67			16.61		
c1 gpdh	14.04	14.11	0.14	13.94	13.94	0.07	13.96	14.15	0.18
c1 gpdh	14.27			13.87			14.31		
c1 gpdh	14.02			14.00			14.18		
c2 gpdh	13.86	13.85	0.04	13.84	13.88	0.05	13.88	13.78	0.09
c2 gpdh	13.89			13.94			13.76		
c2 gpdh	13.81			13.86			13.71		
c3 gpdh	14.57	14.55	0.02	14.50	14.54	0.05	14.45	14.37	0.07
c3 gpdh	14.54			14.59			14.38		
c3 gpdh	14.55			14.53			14.30		
t1 gpdh	15.44	15.49	0.04	14.87	14.82	0.05	13.65	13.64	0.02
t1 gpdh	15.51			14.79			13.62		
t1 gpdh	15.51			14.79			13.66		
t2 gpdh	15.53	15.48	0.08	14.50	14.53	0.04	14.61	14.77	0.27
t2 gpdh	15.38			14.52			14.62		
t2 gpdh	15.52			14.58			15.08		
t3 gpdh	13.22	13.37	0.24	15.91	15.72	0.18	14.30	14.30	0.03
t3 gpdh	13.65			15.55			14.33		
t3 gpdh	13.25			15.70			14.28		
c1 gen	20.46	20.37	0.11	19.20	19.15	0.30	20.32	20.23	0.10
c1 gen	20.39			19.43			20.26		
c1 gen	20.25			18.83			20.13		
c2 gen	19.54	19.70	0.48	18.56	18.45	0.23	19.58	19.61	0.17
c2 gen	20.24			18.62			19.79		
c2 gen	19.32			18.19			19.45		
c3 gen	20.52	20.47	0.05	19.45	19.41	0.14	19.82	20.14	0.30
c3 gen	20.48			19.25			20.42		
c3 gen	20.42			19.51			20.18		
t1 gen	20.43	20.62	0.32	19.86	19.97	0.10	20.08	19.91	0.16
t1 gen	20.99			20.01			19.76		
t1 gen	20.44			20.06			19.89		
t2 gen	20.24	20.39	0.13	19.57	19.70	0.25	19.75	19.86	0.10
t2 gen	20.46			19.98			19.87		
t2 gen	20.48			19.54			19.95		
t3 gen	19.60	19.52	0.08	20.04	20.00	0.04	20.03	19.77	0.25
t3 gen	19.46			19.96			19.53		
t3 gen	19.49			20.00			19.73		

Cuadro AII-5.8. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *CuZnSOD* en parte aérea (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.99	16.96	0.03	16.83	16.82	0.07	16.59	16.63	0.05
c1 act	16.93			16.88			16.68		
c1 act	16.96			16.74			16.63		
c2 act	16.15	16.17	0.07	15.98	16.01	0.06	15.80	15.86	0.07
c2 act	16.25			15.97			15.85		
c2 act	16.12			16.08			15.93		
c3 act	17.09	17.29	0.29	16.87	16.83	0.04	16.63	16.65	0.06
c3 act	17.15			16.83			16.72		
c3 act	17.62			16.79			16.60		
t1 act	18.13	18.15	0.06	16.88	16.89	0.02	16.62	16.64	0.04
t1 act	18.22			16.89			16.61		
t1 act	18.11			16.91			16.68		
t2 act	17.41	17.45	0.04	17.69	17.68	0.03	16.81	16.85	0.04
t2 act	17.49			17.65			16.84		
t2 act	17.46			17.71			16.89		
t3 act	16.39	16.40	0.03	17.59	17.63	0.03	16.67	16.66	0.01
t3 act	16.43			17.64			16.66		
t3 act	16.37			17.66			16.65		
c1 gpdh	13.87	13.90	0.03	13.83	13.78	0.05	13.81	13.83	0.05
c1 gpdh	13.89			13.73			13.89		
c1 gpdh	13.92			13.77			13.80		
c2 gpdh	13.67	13.73	0.05	13.66	13.64	0.07	12.80	12.81	0.01
c2 gpdh	13.74			13.56			12.80		
c2 gpdh	13.77			13.69			12.82		
c3 gpdh	14.54	14.49	0.06	13.84	13.98	0.26	13.84	13.83	0.06
c3 gpdh	14.43			14.28			13.77		
c3 gpdh	14.49			13.82			13.89		
t1 gpdh	15.52	15.42	0.08	14.45	14.50	0.05	13.98	13.96	0.04
t1 gpdh	15.38			14.55			13.92		
t1 gpdh	15.37			14.49			13.99		
t2 gpdh	15.30	15.35	0.06	14.41	14.42	0.03	14.96	15.14	0.16
t2 gpdh	15.35			14.46			15.26		
t2 gpdh	15.41			14.41			15.19		
t3 gpdh	13.69	13.70	0.02	15.83	15.86	0.03	14.48	14.38	0.18
t3 gpdh	13.73			15.90			14.18		
t3 gpdh	13.69			15.85			14.48		
c1 gen	20.26	20.51	0.26	20.63	20.67	0.32	19.79	19.90	0.15
c1 gen	20.50			20.36			20.07		
c1 gen	20.78			21.01			19.84		
c2 gen	21.19	21.33	0.41	22.52	22.09	0.38	19.76	19.62	0.12
c2 gen	21.01			21.83			19.57		
c2 gen	21.79			21.92			19.54		
c3 gen	22.35	21.85	0.44	21.82	21.88	0.21	21.02	20.83	0.17
c3 gen	21.63			22.11			20.77		
c3 gen	21.57			21.71			20.70		
t1 gen	23.96	24.15	0.42	23.88	23.63	0.22	25.59	24.75	0.74
t1 gen	23.85			23.56			24.20		
t1 gen	24.63			23.45			24.46		
t2 gen	24.17	24.51	0.29	25.88	25.87	0.30	23.36	23.67	0.36
t2 gen	24.71			25.57			24.07		
t2 gen	24.64			26.16			23.57		
t3 gen	25.37	24.98	0.35	24.02	23.96	0.13	22.69	22.97	0.25
t3 gen	24.71			24.04			23.07		
t3 gen	24.86			23.80			23.14		

Cuadro AII-5.9. Datos de Ct (treshold cycle) del gen APX-2 en parte aérea (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.82	16.79	0.03	16.69	16.71	0.02	16.55	16.60	0.05
c1 act	16.75			16.71			16.64		
c1 act	16.79			16.73			16-60		
c2 act	16.59	16.57	0.02	16.16	16.14	0.05	15.76	15.82	0.06
c2 act	16.54			16.08			15.82		
c2 act	16.56			16.17			15.89		
c3 act	17.46	17.36	0.22	16.99	16.90	0.08	16.59	16.61	0.06
c3 act	17.51			16.90			16.68		
c3 act	17.10			16.82			16.57		
t1 act	18.24	18.13	0.27	17.11	17.25	0.26	16.58	16.60	0.04
t1 act	17.82			17.08			16.58		
t1 act	18.32			17.55			16.65		
t2 act	17.48	17.49	0.01	17.62	17.72	0.12	16.77	16.81	0.04
t2 act	17.49			17.68			16.80		
t2 act	17.50			17.85			16.85		
t3 act	15.92	16.36	0.38	17.58	17.64	0.05	16.64	16.63	0.01
t3 act	16.56			17.67			16.63		
t3 act	16.61			17.67			16.61		
c1 gpdh	14.04	14.11	0.14	13.94	13.94	0.07	13.96	14.15	0.18
c1 gpdh	14.27			13.87			14.31		
c1 gpdh	14.02			14.00			14.18		
c2 gpdh	13.86	13.85	0.04	13.84	13.88	0.05	13.88	13.78	0.09
c2 gpdh	13.89			13.94			13.76		
c2 gpdh	13.81			13.86			13.71		
c3 gpdh	14.57	14.55	0.02	14.50	14.54	0.05	14.45	14.37	0.07
c3 gpdh	14.54			14.59			14.38		
c3 gpdh	14.55			14.53			14.30		
t1 gpdh	15.44	15.49	0.04	14.87	14.82	0.05	13.65	13.64	0.02
t1 gpdh	15.51			14.79			13.62		
t1 gpdh	15.51			14.79			13.66		
t2 gpdh	15.53	15.48	0.08	14.50	14.53	0.04	14.61	14.77	0.27
t2 gpdh	15.38			14.52			14.62		
t2 gpdh	15.52			14.58			15.08		
t3 gpdh	13.22	13.37	0.24	15.91	15.72	0.18	14.30	14.30	0.03
t3 gpdh	13.65			15.55			14.33		
t3 gpdh	13.25			15.70			14.28		
c1 gen	15.26	15.25	0.02	14.93	14.84	0.10	15.09	15.09	0.01
c1 gen	15.28			14.74			15.08		
c1 gen	15.23			14.84			15.09		
c2 gen	14.50	14.49	0.01	14.64	14.50	0.24	14.34	14.36	0.02
c2 gen	14.50			14.22			14.39		
c2 gen	14.48			16.64			14.36		
c3 gen	15.06	14.76	0.26	14.62	14.72	0.09	14.39	14.40	0.02
c3 gen	14.62			14.75			14.38		
c3 gen	14.61			14.79			14.42		
t1 gen	15.87	15.85	0.03	16.10	16.12	0.03	15.79	15.60	0.32
t1 gen	15.82			16.10			15.23		
t1 gen	15.86			16.15			15.78		
t2 gen	15.20	15.19	0.07	15.59	15.62	0.07	14.46	14.43	0.03
t2 gen	15.25			15.58			14.43		
t2 gen	15.12			15.70			14.39		
t3 gen	15.07	15.06	0.01	16.20	16.05	0.20	15.12	15.14	0.05
t3 gen	15.06			15.91			15.12		
t3 gen	15.06						15.20		

Cuadro AII-5.10. Datos de Ct (treshold cycle) del gen *MHI* en parte aérea (Capítulo V).

Name	1000			10000 diésel (mg kg <sup>-1</sup> )			35000		
	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.	Ct	Rep. Ct	Rep. Ct Std. Dev.
c1 act	16.82	16.79	0.03	16.69	16.71	0.02	16.55	16.60	0.05
c1 act	16.75			16.71			16.64		
c1 act	16.79			16.73			16-60		
c2 act	16.59	16.57	0.02	16.16	16.14	0.05	15.76	15.82	0.06
c2 act	16.54			16.08			15.82		
c2 act	16.56			16.17			15.89		
c3 act	17.46	17.36	0.22	16.99	16.90	0.08	16.59	16.61	0.06
c3 act	17.51			16.90			16.68		
c3 act	17.10			16.82			16.57		
t1 act	18.24	18.13	0.27	17.11	17.25	0.26	16.58	16.60	0.04
t1 act	17.82			17.08			16.58		
t1 act	18.32			17.55			16.65		
t2 act	17.48	17.49	0.01	17.62	17.72	0.12	16.77	16.81	0.04
t2 act	17.49			17.68			16.80		
t2 act	17.50			17.85			16.85		
t3 act	15.92	16.36	0.38	17.58	17.64	0.05	16.64	16.63	0.01
t3 act	16.56			17.67			16.63		
t3 act	16.61			17.67			16.61		
c1 gpdh	14.04	14.11	0.14	13.94	13.94	0.07	13.96	14.15	0.18
c1 gpdh	14.27			13.87			14.31		
c1 gpdh	14.02			14.00			14.18		
c2 gpdh	13.86	13.85	0.04	13.84	13.88	0.05	13.88	13.78	0.09
c2 gpdh	13.89			13.94			13.76		
c2 gpdh	13.81			13.86			13.71		
c3 gpdh	14.57	14.55	0.02	14.50	14.54	0.05	14.45	14.37	0.07
c3 gpdh	14.54			14.59			14.38		
c3 gpdh	14.55			14.53			14.30		
t1 gpdh	15.44	15.49	0.04	14.87	14.82	0.05	13.65	13.64	0.02
t1 gpdh	15.51			14.79			13.62		
t1 gpdh	15.51			14.79			13.66		
t2 gpdh	15.53	15.48	0.08	14.50	14.53	0.04	14.61	14.77	0.27
t2 gpdh	15.38			14.52			14.62		
t2 gpdh	15.52			14.58			15.08		
t3 gpdh	13.22	13.37	0.24	15.91	15.72	0.18	14.30	14.30	0.03
t3 gpdh	13.65			15.55			14.33		
t3 gpdh	13.25			15.70			14.28		
c1 gen	17.81	17.96	0.16	18.69	18.40	0.26	17.80	17.68	0.11
c1 gen	18.13			18.31			17.61		
c1 gen	17.94			18.20			17.62		
c2 gen	17.49	17.63	0.13	17.64	17.74	0.10	17.69	17.64	0.04
c2 gen	17.65			17.74			17.62		
c2 gen	17.76			17.85			17.62		
c3 gen	18.40	18.21	0.24	18.53	18.49	0.12	17.64	17.71	0.06
c3 gen	18.31			18.58			17.76		
c3 gen	17.94			18.35			17.71		
t1 gen	18.95	18.85	0.09	19.04	18.98	0.08	17.84	17.81	0.03
t1 gen	18.77			18.89			17.79		
t1 gen	18.84			19.02			17.82		
t2 gen	18.61	18.40	0.21	18.78	18.77	0.02	18.07	17.95	0.10
t2 gen	18.19			18.74			17.88		
t2 gen	18.40			18.79			17.90		
t3 gen	17.38	17.39	0.05	19.10	19.18	0.14	17.81	17.75	0.05
t3 gen	17.35			19.11			17.75		
t3 gen	17.45			19.34			17.70		

### ANEXO III

Cuadro AIII-6.1. Evaluación del potencial hídrico ( $\Psi_h$ ) en muestras encapsuladas en diferentes condiciones (Capítulo VI).

Plántula	Agua	Aceite mineral	Aire*
1	60	58	58
2	60	60	60
3	60	60	62
4	60	60	60
5	60	60	60
6	62	60	60
7	60	60	60
8	60	60	62
9	57	60	57
10	58	58	58
<b>Promedio <math>\pm</math> error estándar</b>	<b>59.7 <math>\pm</math> 0.42</b>	<b>59.6 <math>\pm</math> 0.27</b>	<b>59.7 <math>\pm</math> 0.52</b>

\*Sellado con aceite mineral. No hubo diferencia significativa entre los promedios (Tukey,  $\alpha=0.05$ ),  $n= 10$ .

## ANEXO IV

Cuadro AIV-7.1. Composición de la solución Long Ashton modificada (Capítulo VII).

Solución “stock”	Cantidad de reactivo en peso (g L <sup>-1</sup> )	Cantidad de solución stock para preparar 1 L (mL)
KNO <sub>3</sub>	80.8	5.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	73.6	5.0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	188.8	5.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	36.8	1.25 para 10.25 µg mL <sup>-1</sup> 2.50 para 20.50 µg mL <sup>-1</sup> 5.00 para 41.00 µg mL <sup>-1</sup>
Elementos traza		1.0
Solución de citratos (Adicionar antes de la fertilización)		5.0
<hr/>		
<b>Solución “stock” elementos traza</b>		
❖ Aforar a 1 000 mL con agua destilada		
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.69	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25	
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.29	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.10	
NaCl	5.90	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.088	
<hr/>		
<b>Solución “stock” de citratos:</b>		
❖ Aforar a 1 000 mL con agua destilada desionizada		
❖ Agitar por unos minutos y llevar a autoclave para completar la dilución		
❖ Almacenar en refrigeración		
Citrato férrico (FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	4.9	
Ácido cítrico (H <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O)	4.9	

Hewitt (1966)

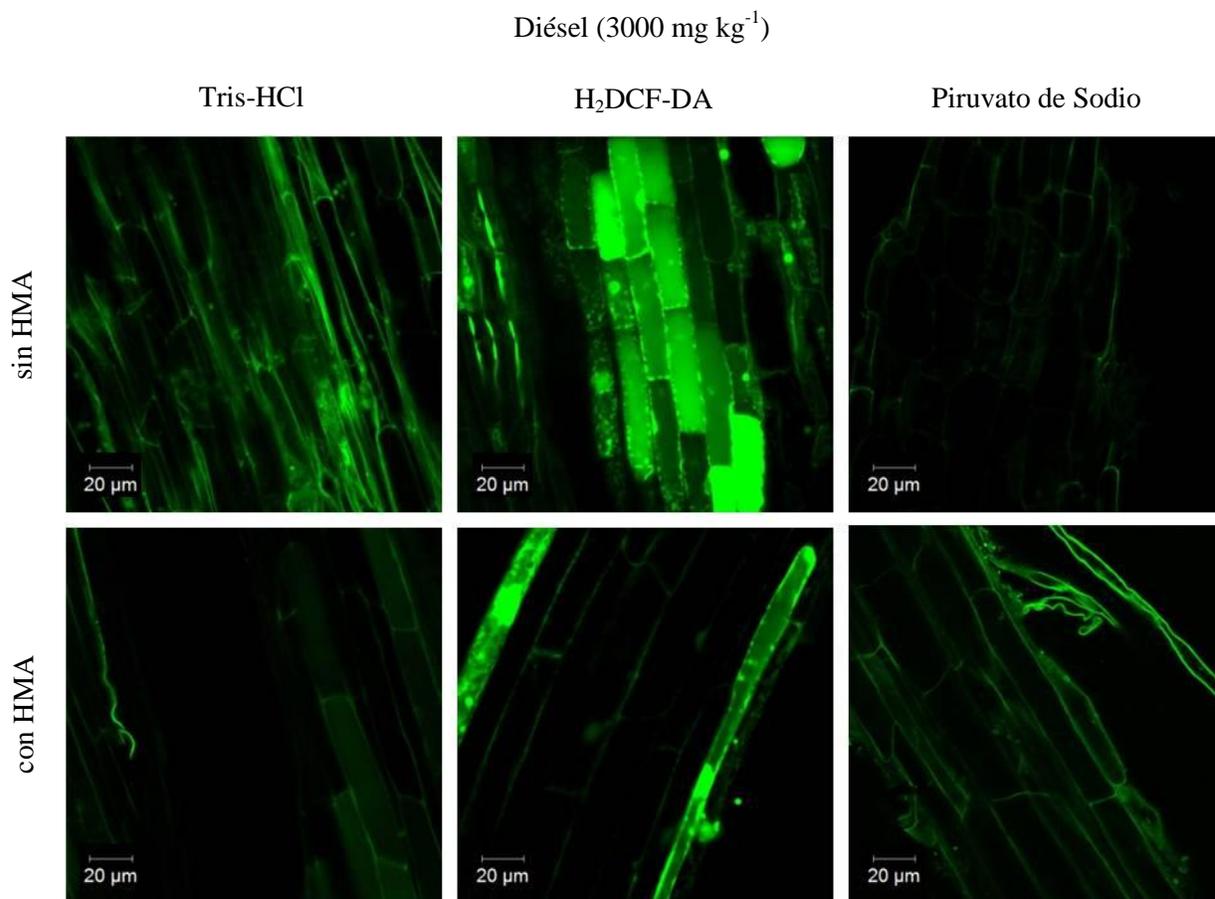


Figura AIV-7.1. Detección fluorescente del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con H<sub>2</sub>DCF-DA usando microscopía confocal de barrido láser en raíces de *Medicago sativa* crecidas en contaminación con diésel, la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestra por la fluorescencia verde. Las secciones de raíces tratadas con Tris-HCl y con Piruvato de Sodio (eliminador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no mostraron fluorescencia.

## ANEXO V

From: **EEB** <[eeb@jussieu.org](mailto:eeb@jussieu.org)>  
Date: Wed, Mar 26, 2014 at 4:55 PM  
Subject: Your Submission EEB-D-13-00514R3  
To: [aalarconcp@gmail.com](mailto:aalarconcp@gmail.com)

Ms. Ref. No.: EEB-D-13-00514R3  
Title: Diesel effects on root hydraulic conductivity and morphological changes of the vascular cylinder in *Medicago sativa*  
Environmental and Experimental Botany

Dear Dr Alejandro Alarcon ,

I am very pleased to confirm that your paper "Diesel effects on root hydraulic conductivity and morphological changes of the vascular cylinder in *Medicago sativa*" has been accepted for publication in Environmental and Experimental Botany.

Your patient cooperation to improve your manuscript is appreciated.

With kind regards,

Jean-Claude Kader  
Editor-in-Chief  
Environmental and Experimental Botany