



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Marco Antonio Reyes Maldonado
Matrícula: 2172034063

Informe final de servicio social

Julio 2022 - Noviembre 2023

Licenciatura en Biología

**COLONIZACIÓN *IN VITRO* DE HONGOS ENDÓFITOS SEPTADOS OSCUROS
PROCEDENTES DE RESIDUOS MINEROS**

Asesor interno:
Dr. Facundo Rivera Becerril (UAM-X)

Asesor externo:
Dra. Cynthia Romero Guido (BUAP)

Ciudad de México, a 15 de abril de 2024

Resumen

Se investigó la interacción entre dos hongos endófitos septados oscuros, procedentes de residuos mineros contaminados con metales pesados, y *Nicotiana tabacum* (tabaco) como modelo vegetal. El objetivo fue evaluar el efecto de los hongos *Alternaria alternata* y *Colletotrichum* spp. en el crecimiento de las plantas en presencia de cadmio, un contaminante frecuente en residuos mineros y suelos. Se puso en marcha una metodología de desinfección de semillas, germinación, siembra e inoculación fúngica de las plántulas de tabaco. Se llevaron a cabo análisis de raíces, hipocótilos y biomasa total para evaluar el crecimiento vegetal y la colonización fúngica en un periodo de 30 días, en medio Murashige & Skoog, a temperatura ambiente y fotoperiodo natural. Los resultados revelaron que *A. alternata* demostró ser un patógeno letal para las plantas de tabaco desde el momento de la germinación. En contraste, *Colletotrichum* spp. mostró un efecto beneficioso, al promover un mayor crecimiento radicular, el más elevado número de pelos radiculares y una aparente mejora en la salud vegetal. Aun cuando los resultados no fueron estadísticamente significativos, *Colletotrichum* manifestó un efecto protector en las plantas con respecto al cadmio a diferencia de las plantas no inoculadas y en presencia del metal. Los resultados, por tanto, apuntan hacia el potencial beneficioso de *Colletotrichum* spp. en la promoción del crecimiento vegetal, y en situaciones de estrés por metales pesados. El estudio resalta la importancia de investigar las interacciones planta-hongo para comprender mejor su papel en el crecimiento vegetal y en posibles estrategias de fitorremediación.

1. Introducción

La rizosfera es la porción del suelo que está en contacto e influencia directa con las raíces de las plantas. Es un ambiente particular en la biosfera donde se resguarda una elevada diversidad microbiana, fundamental para la salud de las plantas. Los sistemas radicales de las plantas se encuentran en interacción constante con los diversos organismos que habitan la rizosfera (bacterias, hongos, protozoos, virus, nemátodos y artrópodos). En particular, se reconoce como fundamental la acción conjunta existente entre las plantas, las bacterias y los hongos (Wężowicz et al. 2017). Estas interacciones pueden ser beneficiosas para las plantas de manera directa al otorgarles mejoras en la captación de nutrientes, acceso a hormonas estimuladoras del crecimiento y aumento de la permeabilidad de la raíz, o de manera indirecta gracias a la modificación de las condiciones bioquímicas del suelo, la captura de compuestos tóxicos y el aumento de la capacidad de resistencia a infecciones patógenas mediante el principio de exclusión competitiva (Ochoa et al. 2010). Diferentes grupos fúngicos habitan en la rizosfera. A pesar de la reconocida importancia y marcado estudio de los hongos micorrízico arbusculares, existen pocos trabajos que describen las relaciones existentes entre los hongos endófitos septados oscuros y los sistemas radicales que colonizan, tanto en condiciones naturales como bajo condiciones de laboratorio.

En una revisión reciente, Jumpponen y Trappe (2008), definieron a los hongos endófitos septados oscuros (ESO) como ascomicetos estériles o con conidios que colonizan las raíces de plantas vivas sin causar efectos negativos aparentes. Sin embargo, es un grupo fúngico poco definido que se utiliza siempre que exista melanización y presencia de hifas septadas que colonizan las raíces, ya sea intercelular o intracelularmente. Los hongos ESO se

encuentran presentes en todas latitudes y altitudes en el mundo, aunque son más abundantes en sustratos con baja disponibilidad de nutrimentos, en climas áridos y semiáridos.

Los estudios experimentales sugieren que los hongos ESO pueden actuar como patógenos latentes, pues se puede estimular un cambio del mutualismo al parasitismo y viceversa en función del estado ontogenético, fisiológico y genotípico del hospedero, así como de la disponibilidad de materia orgánica, nutrimentos orgánicos y condiciones ambientales/experimentales (Fesel y Zuccaro 2016). Cuando son mutualistas, los ESO actúan de manera similar a los hongos micorrízicos; los hongos se benefician al obtener carbohidratos de los hospedadores y éstos, a su vez, se benefician con un crecimiento mejorado y una adquisición de nutrimentos más eficiente, pero las estructuras fúngicas formadas por los ESO son diferentes a las observadas en las micorrizas típicas (Jumpponen 2001).

Este fenómeno de variabilidad en la estrategia empleada por los hongos ESO se conoce como el continuo mutualismo-parasitismo (Johnson et al. 1997), y podría tener un papel importante como estrategia de fitorremediación en entornos perturbados o contaminados.

2. Planteamiento del problema

La actividad minera en México ha llevado consigo la liberación de metales pesados en el entorno, generando una preocupante contaminación que afecta ríos, lagos, cultivos agrícolas, suelos, aire y diversos ecosistemas. Esta problemática ambiental ha sido objeto de estudios, y se ha identificado la presencia de metales pesados en diferentes matrices ambientales (Covarrubias y Peña 2016). La persistencia de esta contaminación requiere enfoques innovadores para su mitigación, y es en este contexto que surge la posibilidad de explorar el papel potencial de los hongos endófitos septados oscuros (ESO) como agentes de estabilización o movilización de metales pesados.

Se tiene conocimiento de que algunas interacciones hongo/planta aumentan la capacidad del sistema radical para incorporar metales pesados a las raíces de las plantas (fitoacumulación) o a los brotes y frutos (fitoextracción) (Covarrubias y Peña 2016). Por tanto, la presente investigación busca abordar esta brecha de conocimiento al evaluar el potencial de algunos hongos ESO como agentes que benefician el desarrollo de plantas en suelos contaminados con metales pesados en condiciones de laboratorio. Este enfoque no solo contribuirá con la comprensión de las interacciones entre los hongos ESO y los sistemas radicales, sino que también explorará su posible aplicación en estrategias de fitorremediación en entornos afectados por la contaminación derivada de la actividad minera en México.

3. Antecedentes

3.1 Suelo

El término *suelo* deriva del latín *solum*, y significa piso. Desde el punto de vista de la geología, puede definirse como la capa más superficial y no consolidada de la litósfera. El suelo se forma debido a la acción conjunta de procesos de meteorización química y física sobre la roca madre, de origen metamórfico, ígneo o sedimentario, y suele contener materia orgánica en proceso de descomposición en pequeñas cantidades (Navarro y Navarro 2003).

En el suelo se desarrollan constantemente, total o parcialmente, los ciclos biogeoquímicos del agua, carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo y muchos oligoelementos (Doménech 2000). Desde un punto de vista ecológico, el suelo es un ecosistema dinámico en el que se presentan una gran cantidad de nichos; esto permite el establecimiento de comunidades de muchos *taxa* con demandas metabólicas muy diferentes. La comunidad microbiana participa fuertemente en los procesos de mineralización de la materia orgánica, modifica la textura del suelo y la disponibilidad de nutrimentos para las plantas. Esto significa que la red trófica en los suelos está constituida en gran medida por microorganismos (Haferburg y Kothe 2007).

Los suelos contienen la totalidad de metales y metaloides de la tabla periódica en mayor o menor cantidad; las concentraciones de dichos metales pueden ser divididas en, a) la fracción total (que es la totalidad de las formas químicas de un elemento presente), y b) la fracción disponible (que se encuentra en alguna forma molecular que las plantas pueden utilizar) (Alloway 2013). Los metales y metaloides suelen agruparse en tres grupos:

- Metales esenciales (Na, Ca, K, Mn, Mg, V, Fe, Cu, Co, Mo, Ni, Zn y W): tienen un papel biológico reconocido, sus iones se vuelven tóxicos si la concentración aumenta.
- Metales tóxicos (Ag, Sn, Cd, Au, Ti, Hg, Pb, Al, y los metaloides Ge, Sb, As y Se): no tienen ningún rol biológico y pueden interferir en procesos celulares, pues se unen con mayor afinidad a los grupos tiol y sitios de unión de oxígeno de los metales esenciales, así la toxicidad resulta de alteraciones en la estructura de los ácidos nucleicos y proteínas, y por la interferencia con la fosforilación oxidativa y el balance osmótico.
- No esenciales (Rb, Sr, Cs y T): no tienen ningún rol biológico definido y no son tóxicos (Lima et al. 2018).

Entre los metales tóxicos, el cadmio está presente en tecnosoles como resultado de la extracción minera, lo que representa un riesgo potencial para la salud de los ecosistemas. Asimismo, frecuentemente los fertilizantes fosfatados contienen ciertas cantidades de Cd que tienden a contribuir con la contaminación del sistema edáfico.

El cadmio (Cd) es un metal no esencial presente en todos los suelos, la forma biodisponible es el catión divalente Cd^{2+} que encuentra en un intervalo normal de 01.-1.0 mg/kg. El Cd puede afectar las funciones del ecosistema a niveles traza debido a su alta toxicidad persistente, es decir, su tiempo de residencia excede las décadas y la biodisponibilidad no se reduce a largo plazo. La captación de Cd en las plantas no está regulada por límites fisiológicos, por lo que un aumento en su concentración en el suelo provocará un aumento casi proporcional en la absorción de Cd en tejidos vegetales. No obstante, con idénticas concentraciones totales de Cd, la acumulación en distintas especies de plantas puede variar ampliamente, por lo que las concentraciones totales de Cd en suelo son un indicador pobre de los posibles riesgos de toxicidad (Smolders y Mertens 2013).

La química del suelo, así como la fisiología vegetal repercuten directamente en la biodisponibilidad del Cd. El paradigma general de la absorción de metales del suelo es que las raíces absorben los elementos a través de los poros, por lo que la concentración de elementos disueltos afecta la tasa de absorción. Esto sugiere que la biodisponibilidad de Cd aumenta a medida que K_d (constante de disociación) decrece, por ejemplo, cuando el pH baja. De esto resulta que el gradiente de concentración de Cd en la rizosfera sea dependiente del balance entre la absorción de iones y el reabastecimiento por la absorción de agua (Kobayashi et al. 2015).

En un sentido ecológico, las concentraciones de Cd presentes en el suelo y su microbiota pueden entrar en la red trófica a través de los productores primarios y secundarios, y dispersarse gracias a los depredadores. Esto tiene un efecto importante en la salud de los grandes vertebrados, principalmente aves y mamíferos, debido a que la larga vida media del Cd dentro de la biomasa animal conduce a un incremento gradual de dicho elemento, denominado magnificación. Esto provoca alteraciones a nivel enzimático, renal, respiratorio y digestivo que conducen al desarrollo de patologías o la muerte, aunque la dinámica se encuentra poco estudiada debido a la complejidad metodológica que plantea (Smolders y Mertens 2013).

3.2 Interacciones multitróficas en la rizosfera

La rizosfera es la región del suelo que se encuentra bajo influencia directa y en contacto con las raíces de las plantas. Esta área puede extenderse desde algunos cuantos centímetros hasta metros de profundidad y, en sitios con vegetación abundante y diversa, como los bosques, puede tener kilómetros de extensión. La diversidad de microorganismos en esta zona es muy grande; 1 g de suelo puede contener entre 5,000 y 10,000 especies, de las cuales 1,200 corresponden a hongos cultivables; el largo total de las hifas varía considerablemente debido al tipo de suelo y se ha estimado que puede ser tan extenso como 66,900 m en 1 g de suelo seco. Debido al alto número de especies y la cantidad de biomasa microbiana en volúmenes tan pequeños de suelo, son frecuentes las interacciones multitróficas entre bacterias, hongos, la microfauna y las plantas (Sieber y Grúnig 2006). Las plantas producen y exudan a través de las raíces una gran variedad de compuestos químicos incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, enzimas, reguladores del crecimiento vegetal y metabolitos secundarios, además de agua. Estos exudados, junto con la materia muerta vegetal, proveen una importante fuente de carbono para la biota heterotrófica del suelo. La actividad microbiana en la rizosfera determina el patrón de crecimiento radical y la disponibilidad de recursos de las plantas, lo que modifica a su vez la cantidad y calidad de los exudados radicales (López-Ráez y Pozo 2013).

3.3 Hongos endófitos septados oscuros

En 1991, Stoyke y Currah implementaron el *form taxon* endófito septado oscuro (ESO) para hongos que se encuentran total o parcialmente melanizados y que forman estructuras dentro del tejido saludable de las raíces. El taxón ESO sirve primariamente para diferenciar esos hongos de los endófitos con hifas hialinas septadas y de hongos con hifas hialinas escasamente septadas; ambas formas son propias de los hongos micorrízico arbusculares (Sieber y Grúnig 2006). La mayoría de las especies de ESO son Ascomycetes y el orden más común corresponde a los Pleosporales. Las relaciones simbióticas que mantienen con sus hospederos van desde el parasitismo hasta el mutualismo. En este último caso tienen una gran importancia para el desarrollo de las plantas, pues de manera similar a los hongos micorrízicos, pueden promover la adquisición de nutrimentos por parte de las plantas y estimular su crecimiento. Además, los ESO pueden inducir la inmovilización de metales pesados en la superficie de tejidos vivos a través de grupos de enlaces químicos en la pared celular, o por la formación de complejos entre los metales pesados y compuestos orgánicos de bajo peso molecular exudados en la rizosfera (Khan et al. 2017).

A pesar de que las interacciones multitróficas en la rizosfera se han estudiado ampliamente, existen escasos trabajos sobre el efecto que una única especie o un complejo de ESO, en ausencia de otros microorganismos, tiene sobre el desarrollo de una planta en presencia de Cd. A continuación, se hace una breve revisión sobre los géneros fúngicos de interés en este trabajo de investigación, y su actividad en presencia de metales pesados.

3.3.1 *Alternaria* spp.

Género cosmopolita que comprende más de 100 especies, muchas de las cuales pueden infectar diversos tejidos vegetales y actuar como patógenos. Por ejemplo, *Alternaria* sp. ejerció un efecto negativo sobre la germinación de semillas de *Brassica napus*, debido a la producción de micotoxinas específicas y a que el hongo infectó principalmente el revestimiento de la semilla y esporuló en el hilio, lo que disminuyó la germinación exitosa y permitió que la infección afectara también las plantas jóvenes (Tufail et al. 2020).

Al margen del comportamiento parasitario, otras especies de *Alternaria* son saprófitas o mutualistas. Se ha reportado tolerancia de algunas especies hacia altas concentraciones de metales pesados; *Alternaria* sp. CBSF68 tolera de 50-1,400 mg/kg de Cu^{+2} , Pb^{+2} , Ag^{+2} y Hg^{+2} (Verma et al. 2016), y puede producir ácido indol-3-acético y sideróforos (Yanan et al. 2017) que son moléculas estimuladoras del crecimiento vegetal. Se ha estudiado, por tanto, el potencial uso de algunos miembros del género en procesos de bio y fitorremediación en agua y suelos contaminados por metales pesados (Tatah et al. 2016).

3.3.2 *Colletotrichum* spp.

La taxonomía de este género es complicada ya que existe variación en el nombre de acuerdo con su estado sexual: *Colletotrichum* se refiere al estado asexual (anamorfo) de *Glomerella* (teleomorfo), que pertenece al Phylum Ascomycota, clase Hypocreomycetidae (Réblová et al. 2011). En 2012 los miembros de la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Colletotrichum* (ISTC) apoyaron el uso del término *Colletotrichum* sobre el de *Glomerella* debido a su amplio uso dentro de la literatura especializada (Damm et al. 2010; Zhang et al. 2013).

Este género se caracteriza por tener más de 100 especies fitopatógenas, entre las que destacan *C. gloeosporioides*, *C. magna*, *C. truncatum*, *C. graminicola*, y *C. boninense*, todas causantes de enfermedades como cáncer, pudrición y antracnosis, enfermedad que afecta a casi todos los cultivos vegetales destinados a la producción de alimentos, fibras y forrajes. Las pérdidas en la producción por antracnosis pueden llegar al 100% (Landro-Valenzuela et al. 2016)

A pesar de que *Colletotrichum* está reconocido como género fundamentalmente patógeno, recientemente se ha demostrado el potencial de algunas especies en la biorremediación de metales pesados y en el control de enfermedades causadas por hongos. Entre dichas especies se encuentra una mutante no patogénica de *Colletotrichum magna*, que ha sido usada para combatir la antracnosis causada por su variedad silvestre (Redman et al. 1999). Una especie con potencial para biorremediación de metales pesados es *C. gloeosporioides*, que aparte de ser la especie más reportada según el número de hospedadores en México (Rojo-Báez et al. 2017), presenta una importante tolerancia a la presencia de Cd y una alta tasa de bioacumulación (12.83 mg/g) del metal en presencia de 400 mg/kg (Deka et al. 2021).

3.4 Preguntas de investigación

De lo anterior presentado se derivan las siguientes preguntas de investigación a responder en este proyecto: a) ¿Qué efecto tiene la contaminación por metales pesados en la relación hongo/planta?, b) ¿Cómo contribuyen los hongos endófitos septados oscuros con el desarrollo vegetal?, y c) ¿Tienen los hongos endófitos septados oscuros potencial en la fitorremediación de metales pesados?

4. Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto del cadmio en la interacción entre hongos endófitos septados oscuros procedentes de residuos mineros contaminados con metales pesados, y *Nicotiana tabacum*

4.1 Objetivos específicos

1. Examinar la interacción entre miembros de los géneros fúngicos *Alternaria* y *Colletotrichum*, y la raíz de *Nicotiana tabacum*, mediante un análisis micromorfológico, y determinar el nivel de colonización
2. Describir el efecto de la colonización de los hongos en el desarrollo de la raíz y tejidos aéreos de *Nicotiana tabacum*
3. Identificar algunos efectos fisiológicos en las plantas derivados de la interacción con los hongos

5. Metodología

5.1 Origen de los aislados fúngicos y planta modelo

Los aislados fúngicos de ESO empleados en este estudio proceden del Cepario del Laboratorio de Micología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, recolectados durante un trabajo previo (Solís-Hernández et al. 2024, en preparación) en residuos mineros depositados a cielo abierto, en el sitio denominado Jal Viejo, en Vetagrande, Zacatecas (22°50'27" N, 102°33'14" W). Los hongos fueron aislados del interior de las raíces de las plantas *Asphodelus fistulosus* y *Reseda luteola*, establecidas naturalmente en los residuos. Por su ciclo de vida corto y por su facilidad de manipulación se utilizó un genotipo silvestre de tabaco (*Nicotiana tabacum*) como planta modelo en las interacciones planta-hongo en estudios *in vitro*.

5.2 Resiembra y selección de fenotipos

Los aislados fúngicos de *Alternaria alternata* y *Colletotrichum* resguardados en el cepario fueron evaluados bajo microscopio para constatar las características micromorfológicas. Se realizaron resiembras en medio papa-dextrosa-agar (PDA) hasta obtener características macro morfológicas que representaran de manera homogénea la morfología colonial. Esto se logró después de la sexta generación de resiembras.

5.3 Cadmio y medio de cultivo

Durante la preparación estándar del medio Murashige & Skoog (MS), específico para plantas, la concentración de Cd biodisponible reportada por Flores-Torres et al. (2021), 6.6 mg/kg Cd, se adicionó al medio de cultivo en forma de cloruro de cadmio. Al considerar el peso

molecular del cloruro de cadmio y la densidad del sustrato, se agregaron 13.41 mg de CdCl₂ en un litro del medio MS para conseguir la concentración de 6.6 mg/kg de Cd.

5.4 Desinfección de semillas

Previo al lanzamiento final del experimento se realizó un ensayo de desinfección. Para ello se empleó la metodología propuesta por Cortázar-Murillo et al. (2023). La siembra se realizó inicialmente en agar-agua para permitir la germinación, posteriormente se trasplantaron las plántulas en placas petri con medio MS y se inocularon con los hongos ESO. Las cajas se sometieron a un fotoperiodo natural durante 15 días, a temperatura ambiente. Del ensayo se concluyó que la desinfección de las semillas no fue óptima ya que numerosas cajas presentaron contaminación fúngica y bacteriana. Incluso, en algunos testigos con semillas sembradas sin desinfectar, la presencia de contaminantes fue menor que en las sometidas a desinfección. El porcentaje de germinación de las semillas fue bajo y después del trasplante a medio MS algunas plántulas detuvieron su crecimiento que puede ser atribuido a daño mecánico sobre la radícula durante el trasplante. De lo anterior se desprendió descartar el trasplante de agar-agua a medio MS en el experimento final.

Dado el resultado, se efectuó un segundo ensayo de desinfección y germinación de semillas siguiendo otro protocolo. Debido a su efectividad, esta segunda metodología se adoptó durante el experimento final y se detalla a continuación.

Se esterilizaron viales de vidrio de 30 ml vacíos y viales con agua destilada. Las semillas de tabaco se depositaron en un vial con agua destilada estéril durante 10 min para hidratarlas; con una jeringa se retiró el agua y se agregó etanol absoluto; el vial se mantuvo en agitación durante 1 min, posteriormente se retiró el etanol y se enjuagó con agua destilada estéril dos veces más. Finalmente, se agregó hipoclorito de sodio al 13% y se agitó vigorosamente durante 7 min; al término, se realizó un último doble enjuague con agua destilada estéril.

5.5 Siembra e inoculación

La siembra de semillas se realizó por duplicado en cada caja con medio MS, bajo los siguientes tratamientos:

1. *Nicotiana tabacum* + *Alternaria alternata* + Cd (Nt+Aa+Cd)
2. *Nicotiana tabacum* + *Alternaria alternata* (Nt+Aa)
3. *Nicotiana tabacum* + *Colletotrichum* sp. + Cd (Nt+Co+Cd)
4. *Nicotiana tabacum* + *Colletotrichum* sp. (Nt+Co)
5. Testigo: *Nicotiana tabacum* + Cd (Nt+Cd)
6. Testigo: *Nicotiana tabacum* (Nt)

Cada hongo fue inoculado por separado en dos puntos de inoculación por caja, a medio centímetro de las semillas, el mismo día que éstas fueron depositadas. Cada tratamiento tuvo ocho réplicas, A-H. Después de la siembra e inoculación fúngica, todas las cajas se sometieron a fotoperiodo natural a temperatura ambiente (22-26°C) durante 30 días. La disposición de las cajas entre sí, y con respecto a la fuente de luz natural se muestra en la figura 1.

| Tratamiento | Fuente de luz | Réplicas | | | | | | | |
|-------------|---------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|
| Nt+Cd | | A | B | C | D | E | F | G | H |
| Nt+Co | | A | B | C | D | E | F | G | H |
| Nt+Aa | | A | B | C | D | E | F | G | H |
| Nt | | A | B | C | D | E | F | G | H |
| Nt+Aa+Cd | | A | B | C | D | E | F | G | H |
| Nt+Co+Cd | | A | B | C | D | E | F | G | H |

Figura 1. Disposición espacial de los tratamientos y de sus réplicas respecto a la fuente natural de luz.

5.6 Análisis del desarrollo de las plantas

Cada semana se hicieron observaciones y se realizó el registro del avance de las semillas a través de las siguientes etapas de desarrollo:

1. Semilla
2. Germinación
3. Presencia de cotiledones
4. Aparición de hojas verdaderas
5. Muerte

Las observaciones se registraron en una matriz similar a la figura 1. Con el paquete estadístico SPSS se realizó un gráfico de líneas múltiples que muestra el tránsito de los tratamientos entre las distintas etapas de desarrollo a lo largo del tiempo. También se realizó una tabla de frecuencias con los resultados de la última revisión.

5.6.1 Colonización radical y crecimiento vegetal

Los parámetros de crecimiento vegetal evaluados fueron:

- Porcentaje de germinación
- Longitud de hipocótilo en μm
- Longitud de raíz principal en μm
- Número de pelos radicales
- Peso total de la planta en μg

Para las longitudes se tomaron fotografías de las raíces vistas bajo el microscopio estereoscópico junto a una reglilla graduada en milímetros. Posteriormente, se empleó el software libre imageJ versión 1.54d para estimar la longitud de las raíces y del hipocótilo, así como el número de pelos radicales.

Se analizaron al microscopio estereoscópico y al microscopio compuesto las raíces de las plantas después de 30 días de crecimiento para evaluar la colonización por hongos ESO. Debido a la fragilidad de las raíces y su minúsculo tamaño, estas fueron inicialmente observadas al microscopio estereoscópico, posteriormente fueron clareadas con KOH al 10% por 5 min a 120°C. Se tiñeron con azul de tripano a temperatura ambiente durante 4 días. Se colocaron segmentos de raíz o raíces enteras en un portaobjetos con glicerol para la

observación e identificación de las estructuras fúngicas: hifas septadas, y eventualmente microesclerocios y conidios.

5.7 Tratamiento estadístico

Para la recopilación, limpieza, análisis descriptivo y visualización de los datos se empleó el software SPSS.

6. Actividades realizadas

Durante el desarrollo del proyecto se realizaron las siguientes actividades:

- Revisión bibliográfica, selección de marco teórico y metodológico
- Redacción, revisión y corrección del protocolo de investigación
- Visita y reconocimiento del sitio con residuos mineros en el estado de Zacatecas
- Revisión morfológica macro y microscópica de los cultivos madre de hongos ESO
- Resiembra y selección de cultivos
- Preparación de cultivos fúngicos para ensayos y experimento
- Limpieza y desinfección de semillas, método 1
- Ensayo de germinación de tabaco en Medio Murashige y agar agua
- Ensayo de inoculación de hongos ESO en Medio Murashige con semillas de tabaco
- Limpieza y desinfección de semillas, método 2
- Siembra de semillas de tabaco en medio MS
- Inoculación de las cajas con semillas de tabaco con hongos ESO
- Desarrollo del experimento
- Gráficas, tablas y análisis de estas
- Elaboración del informe final

7. Metas alcanzadas

- Se examinó la interacción entre hongos ESO y un modelo vegetal
- Se estandarizó una metodología de desinfección y siembra de semillas
- Se estandarizó una metodología de inoculación fúngica
- Se detectaron estilos de vida necrotróficos y mutualistas de los aislados fúngicos

8. Resultados

8.1 Desarrollo de las plántulas

El desarrollo global de las semillas (Figura 2) muestra que el tratamiento Nt+Co+Cd fue el que presentó los mejores resultados debido a que, con excepción de una, todas las unidades experimentales formaron hojas verdaderas (Tabla 1), seguido por el tratamiento Nt+Cd, con 4 unidades experimentales con hojas verdaderas y 4 con cotiledones. En tercer lugar, en el tratamiento Nt+Co, 4 plantas presentaron hojas verdaderas, pero solamente se presentó una planta con cotiledones, mientras que 3 no germinaron (Tabla 1). En el testigo Nt solamente tres semillas germinaron, de las cuales 2 desarrollaron hojas verdaderas y una se mantuvo en etapa de cotiledones (Tabla 1). Finalmente, aunque algunas semillas germinaron en presencia de *A. alternata*, el crecimiento vegetal no continuó en ninguno de los dos tratamientos inoculados con el hongo.

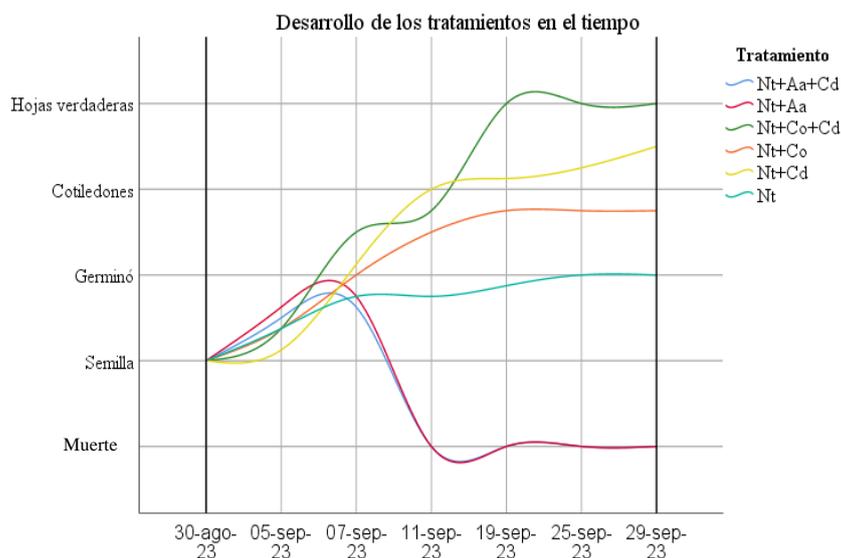


Figura 2. Desarrollo de las plantas de tabaco sometidas a los diferentes tratamientos a través del tiempo.

Tabla 1. Estado final de las semillas de tabaco sometidas a cada uno de los tratamientos

| Tratamientos | Semilla | Germinó | Cotiledones | Hojas verdaderas | Muerte por <i>Alternaria</i> |
|--------------|---------|---------|-------------|------------------|------------------------------|
| 1. Nt+Aa+Cd | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 2. Nt+Aa | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 3. Nt+Co+Cd | 1 | 0 | 0 | 7 | 0 |
| 4. Nt+Co | 3 | 0 | 1 | 4 | 0 |
| 5. Nt+Cd | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 |
| 6. Nt | 5 | 0 | 1 | 2 | 0 |

8.2 Crecimiento vegetal

8.2.1 Germinación

Los valores de germinación se presentan en la figura 3. El testigo sin cadmio, Nt, presentó el porcentaje más bajo de germinación con un 37.5%, mientras que el tratamiento Nt+Cd destacó con un 100% de germinación. Los tratamientos restantes mantuvieron niveles del 62.5 al 87.5%.

Durante las primeras semanas de crecimiento, en los dos tratamientos inoculados con *A. alternata*, se presentó un desarrollo acelerado del micelio y las placas fueron colonizadas por completo. Aunque el micelio no logró una alta densidad, esto fue suficiente para que el crecimiento de las pocas semillas que germinaron se detuviera por completo y murieran. La muerte del 100% de estas unidades experimentales descartó este aislado de *A. alternata* como apto para posibles trabajos en fitorremediación, al menos bajo las condiciones estudiadas, e hizo imposible continuar con el análisis estadístico para estos dos tratamientos.

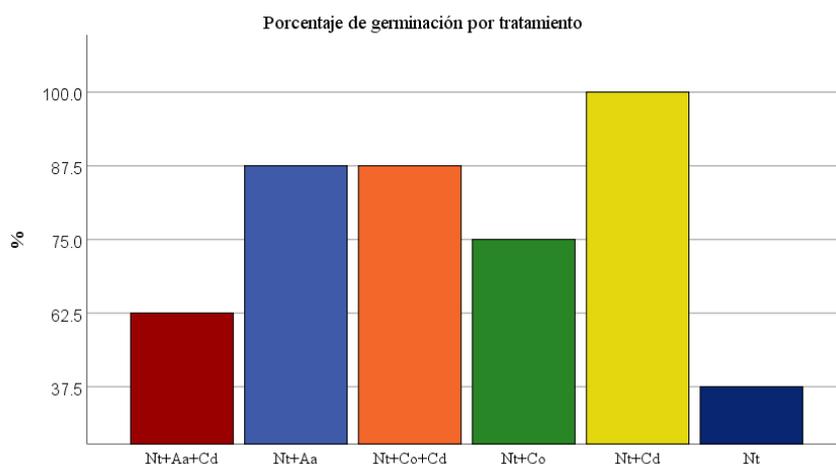


Figura 3. Porcentaje de germinación de semillas de tabaco por tratamiento

8.2.2 Raíz e hipocótilo

8.2.2.1 Valores numéricos

Las tablas 2 y 3 muestran las métricas para los parámetros vegetales. Los dos tratamientos inoculados con *Colletotrichum* destacaron sobre los dos testigos en variables distintas; en presencia del hongo y cadmio, Nt+Co+Cd, se observaron la media más alta (2,828 μm) y el valor máximo (6,215 μm) de longitud de la raíz, así como la media (2.5 mg) y el valor máximo (5 mg) de la masa fresca total vegetal. El tratamiento Nt+Co, que se desarrolló en ausencia de Cd destacó por los valores de media (6,071 μm .) y máximo (10,543 μm) de longitud del hipocótilo, y de número de pelos radicales con 124 en su valor máximo. Contrariamente, los dos grupos testigo presentaron casi todos los valores mínimos en los parámetros evaluados. En su conjunto, al comparar los dos tratamientos inoculados con el hongo con los no inoculados, estos datos demuestran que *Colletotrichum* tuvo un efecto positivo en la germinación y en el desarrollo de las plantas de tabaco según la longitud del hipocótilo y de la raíz, el número de pelos radicales y la biomasa vegetal. Por otro lado, hay que resaltar que las plantas de tabaco en presencia de Cd, mostraron un efecto protector gracias a *Colletotrichum*; esta protección se reflejó particularmente en una mayor longitud de las raíces y en una biomasa vegetal más elevada en el tratamiento Nt+Co+Cd en contraste con el tratamiento Nt+Cd.

Tabla 2. Valores de número de semillas germinadas, longitud de hipocótilo y longitud de raíces de las plantas de tabaco al final del experimento.

| Tratamientos | Germinación (#) | | Hipocótilo (μm) | | | | | Raíz (μm) | | | | |
|--------------|-----------------|----|------------------------------|--------|--------|-----------|---------|------------------------|--------|--------|-----------|---------|
| | No | Si | Media | Máximo | Mínimo | Intervalo | DE | Media | Máximo | Mínimo | Intervalo | DE |
| 3. Nt+Co+Cd | 1 | 7 | 5855.86 | 8281 | 2464 | 5817 | 2512.17 | 2827.86 | 6215 | 1042 | 5173 | 1899.73 |
| | 2 | 6 | 6071.5 | 10543 | 490 | 10053 | 3941.04 | 2657.25 | 3327 | 2399 | 928 | 447.6 |
| | 0 | 8 | 2281.63 | 4744 | 983 | 3761 | 1329.97 | 681.88 | 1707 | 196 | 1511 | 534.96 |
| | 5 | 3 | 2246.25 | 3057 | 1548 | 1509 | 619.46 | 770.33 | 1366 | 354 | 1012 | 529.3 |

Tabla 3. Número de pelos radiculares y peso de las plantas al final del experimento.

| Tratamientos | Pelo radicular (número) | | | | | Masa (mg) | | | | |
|--------------|-------------------------|--------|--------|-----------|-------|-----------|--------|--------|-----------|-----|
| | Media | Máximo | Mínimo | Intervalo | DE | Media | Máximo | Mínimo | Intervalo | DE |
| 3. Nt+Co+Cd | 28.43 | 68 | 4 | 64 | 22.1 | 2.5 | 5 | 1 | 4 | 1.4 |
| o | 38.25 | 124 | 0 | 124 | 58.21 | 1.1 | 1.8 | 0.1 | 1.7 | 0.7 |
| d | 2 | 3 | 1 | 2 | 1.41 | 0.5 | 0.9 | 0.1 | 0.8 | 0.3 |
| | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0.3 | 0.5 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |

8.2.2.2 Microfotografías y fotografías al microscopio estereoscópico

Las unidades experimentales inoculadas con *A. alternata* presentaron, como se ha dicho, una mortalidad del 100%. Las imágenes de las raíces revelan un desarrollo limitado, apenas perceptible a simple vista. Al microscopio estereoscópico es notable la red de hifas que envolvieron las semillas de *N. tabacum*; no se observaron estructuras de invasión secundaria en las raíces como apresorios (Figura 4, T1a, T1b, T2a, T2b).

Los grupos inoculados con *Colletotrichum* presentaron un desarrollo radicular notablemente superior a los otros tratamientos (Figura 4, T3a y T4a). Las imágenes evidencian raíces más grandes, un hipocótilo más extenso y un mayor número de pelos radicales, aunque la forma ramificada de las raíces sugiere un desvío del desarrollo estándar de las raíces (Pasternak et al., 2017). El color de los cotiledones y hojas verdaderas en los tratamientos Nt+Co+Cd y Nt+Co refleja una mayor integridad metabólica y actividad fotosintética, posiblemente relacionada con una mayor captación de nutrientes debido al desarrollo radicular superior. Las microfotografías de estos grupos no revelaron más que en una ocasión (Fig 4, T4b) la presencia de estructuras, hifas, dentro las raíces. Lo anterior puede atribuirse a que la metodología aplicada fue un poco agresiva y destruyó el material fúngico presente dentro de las raíces. Paralelamente, las estructuras celulares vegetales conservaron su integridad.

Los grupos testigo crecieron pobremente, sin desarrollo completo de raíces, cotiledones con pocos pigmentos fotosintéticos, hojas verdaderas minúsculas y en general un aspecto desnutrido. En estos elementos no se detectó una diferencia significativa entre la presencia y ausencia de Cd.

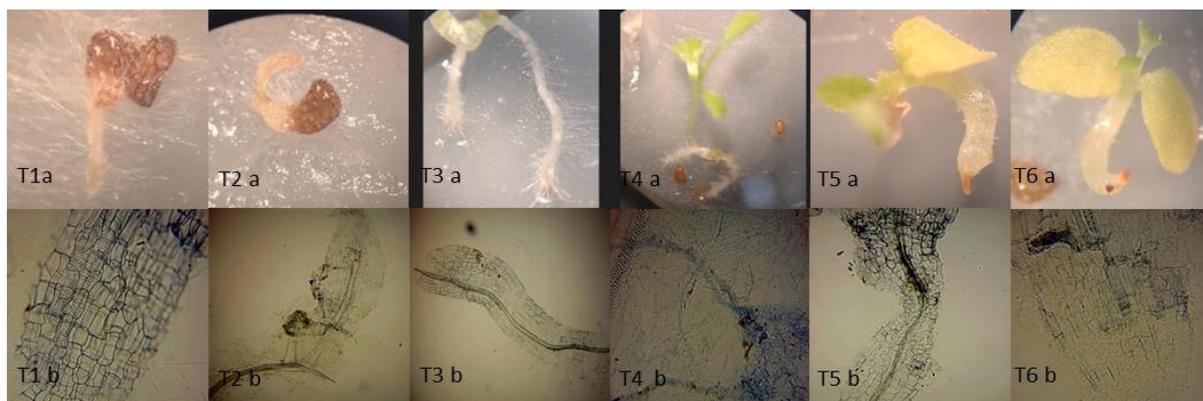


Figura 4. Microfotografías y fotografías estereoscópicas de plantas de tabaco bajo los diferentes tratamientos. Se observan semillas y plántulas (arriba) y su correspondiente raíz al microscopio compuesto (abajo). T1a (Nt+Aa+Cd), T2a (Nt+Aa+Cd): semillas con micelio de *A. alternata*; T3a (Nt+Aa), T4a (Nt+Co+Cd): inoculación con *Colletotrichum* donde se aprecian los pelos radicales y la ramificación de la raíz; T5a (Nt+Co), T6a (Nt): plántulas de los grupos testigo donde se aprecia desarrollo radicular escaso y poca actividad fotosintética.

9. Discusión

El presente trabajo permitió estandarizar una metodología *in vitro* para evaluar el impacto de dos hongos endófitos septados oscuros en plantas de tabaco como modelo experimental, sometidas a estrés por Cd. Ambos hongos, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum*, fueron previamente aislados del interior de las raíces de plantas establecidas en residuos mineros contaminados con Cd (6.6 mg/kg de Cd) por lo que, en principio, son tolerantes a esas condiciones de toxicidad.

El aislado de *A. alternata* demostró ser un patógeno de *N. tabacum*, por lo menos bajo estas condiciones experimentales, considerando que apenas permitió la formación de la radícula y enseguida tuvo un crecimiento invasivo con una profusa red micelial que impidió el desarrollo de la plántula. Diversos trabajos han reportado un carácter fitopatógeno de esta especie. Por ejemplo, Dalinova et al. (2020) mencionan que *A. alternata* se caracteriza por la producción de fitotoxinas específicas y no específicas (fitotoxinas AK, AF y ACT) durante el proceso de infección. Estas fitotoxinas no necesariamente facilitan el proceso de infección, sino que constituyen una estrategia competitiva por el sustrato contra otros micro y macroorganismos. Entre los compuestos fitotóxicos producidos por *A. alternata*, el ácido alternarico se ha relacionado con la aparición de estados necrotróficos en plantas de tabaco (Langsdorf et al. 1990). El carácter fitopatógeno mediado por la producción de fitotoxinas y enzimas hidrolíticas se ha reportado incluso en cepas que se encontraban en estados de vida endófitos sin causar síntomas (Castaldi et al. 2023; Shrestha et al. 2000). En semillas de tabaco se ha demostrado que *A. alternata* presenta un estilo de vida necrotrófico que puede repercutir de manera significativa en el cultivo de esta especie vegetal (Ishizuka et al. 2018).

Con relación a *Colletotrichum* spp., en contraste, no se apreció un crecimiento micelial externo sobre la placa de cultivo, sino que el hongo favoreció más bien el crecimiento vegetal. Esto se reflejó en una alta proporción de germinación de las semillas, en la longitud máxima del hipocótilo y de la raíz, en el mayor número de pelos radicales y en una alta producción de biomasa vegetal. Trabajos previos han reportado el efecto positivo de este hongo en el crecimiento de múltiples especies vegetales y su uso potencial en la industria agrícola (De Silva et al. 2017; Díaz-González et al. 2020; Hiruma et al. 2023; Redman et al. 2001; Rodríguez y Redman. 2008), que puede atribuirse, por ejemplo, a una mejora en la captación de fósforo (Díaz-González et al. 2020), y en la liberación de fitohormonas y de metabolitos fúngicos que estimulan el crecimiento vegetal (De Silva et al. 2017; Hiruma et al. 2016; Redman et al. 2001). Sin embargo, debido al periodo de experimentación de 30 días, es probable que más adelante haya continuado un efecto de estimulación del crecimiento vegetal, o el hongo podría haber pasado de un estado hemibiotrófico a la necrotrofia (De Silva et al. 2017).

Es notable mencionar que en los estudios donde se han realizado inoculaciones de múltiples especies vegetales en paralelo, se ha evidenciado que la misma cepa de *Colletotrichum* puede presentar distintos comportamientos que oscilan entre estilos de vida mutualistas, comensalistas y patógenos. Al respecto, la hipótesis más aceptada es que el comportamiento

del hongo depende de la genética del hospedero (Redman et al. 2001), pero se ha identificado también un metabolismo secundario fúngico responsable en la transición entre estilos de vida patógenos y mutualistas durante el crecimiento de las plantas (Hiruma et al. 2023). Es decir, aún es desconocido el mecanismo o los mecanismos que regulan la plasticidad fúngica que presentan las especies del género *Colletotrichum*.

En relación con la presencia de Cd, aunque que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, *Colletotrichum* spp. ejerció un efecto de protección en las plantas de tabaco. Esta protección se reflejó particularmente en una mayor longitud de las raíces y en una biomasa vegetal más elevada en el tratamiento Nt+Co+Cd en contraste con el tratamiento Nt+Cd. La evidencia sugiere que el efecto de *Colletotrichum* sobre las plantas pudo haberse centrado en la captación de nutrimentos y en la producción de hormonas de crecimiento.

10. Conclusiones

1. Se estandarizó una metodología de desinfección de semillas, siembra e inoculación fúngica. Este sistema es útil para el desarrollo de trabajos posteriores bajo estas condiciones
2. El aislado del hongo *Alternaria alternata* demostró ser un patógeno letal para el genotipo de *Nicotiana tabacum* evaluado y se descarta su uso en estrategias de fitorremediación
3. El hongo *Colletotrichum* spp. presentó un estilo de vida mutualista; mejoró la longitud de las raíces y del hipocótilo, el número de pelos radicales fue notablemente superior, y el color de las plantas fue más intenso. Debido a la plasticidad genética que presenta este género es necesario evaluar la relación hongo/planta en otros modelos vegetales antes de considerarlo en estrategias de fitorremediación
4. Las plantas de tabaco en presencia de Cd mostraron un efecto protector gracias a *Colletotrichum*, particularmente reflejado en una mayor longitud de las raíces y en una biomasa vegetal más elevada en el tratamiento Nt+Co+Cd, en contraste con el tratamiento Nt+Cd.

11. Recomendaciones

Los resultados de este trabajo priorizan la necesidad de ampliar y reevaluar el sistema probado, con distintas plantas nativas del sitio donde se recolectaron las muestras fúngicas y co-inoculaciones con otras especies fúngicas, con ciclos de cultivo completos y considerando distintas concentraciones de metales pesados. Todo esto antes de determinar si es viable el uso de *Colletotrichum* spp. y de aislados de otros géneros en estrategias de fitorremediación.

12. REFERENCIAS

- Alloway B (2013) Sources of heavy metals and metalloids in soils. En: Alloway B (ed) Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. Springer, U.K pp 11-12
- Cortazar-Murillo E, Méndez-Bravo A, Monribot-Villanueva J, Garay-Serrano E, Kiel-Martínez A, Ramírez-Vázquez, M, Guevara-Avenida E, Méndez-Bravo A, Guerrero-Analco J, Reverchon F (2023) Biocontrol and plant growth promoting traits of two avocado rhizobacteria are orchestrated by the emission of diffusible and volatile compounds. *Frontiers in Microbiology* 14:6-16
- Covarrubias S, Peña J (2016) Contaminación por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33:7-21
- Dalinova A, Salimova D, Berestetskiy A (2020) Fungi of the genera *Alternaria* as producers of biological active compounds and mycoherbicides. *Applied Biochemistry and Microbiology* 56:223-241
- Damm U, Baroncelli R, Cai L, Kubo Y, O'Connell R, Weir B, Yoshino, Cannon PF (2010) *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. *International Mycological Association Fungus* 1:161-165
- De Silva D, Crous P, Ades P, Hyde, K, Taylor P (2017) Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews* 31:3 155-168
- Deka D, Bora P, Nirjanta N, Chabukdhara M (2021) Biosorption of cadmium by fungi isolated from Bharalu river, Assam. *J Tropical Life Sciences Research* 11:279-284
- Díaz-González S, Marín P, Sánchez R, Arribas C, Kruse J, González-Melendi P, Brunner F, Sacristán S (2020) Mutualistic fungal endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Ct0861 colonizes and increases growth and yield of maize and tomato plants. *Agronomy* 10:10
- Doménech X (2000) Estructura y composición química del suelo. En: Doménech X (ed) *Química del suelo: el impacto de los contaminantes*. Miraguano, Madrid pp 11-27
- Fesel P, Zuccaro A (2016) Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology* 32:103-112
- Flores-Torres G, Anaid, Solis-Hernández P, Vela-Correa G, Rodríguez-Tovar V, Cano-Flores O, Castellanos-Moguel J, Néstor O, Pérez O, Chimal-Hernández A, Moreno-Espíndola P, Salas-Luévano M, Bruno V, Chávez-Vergara M, Rivera-Becerril F (2021) Pioneer plant species and fungal root endophytes in metal-polluted tailings deposited near human populations and agricultural areas in Northern Mexico. *Environmental Science and Pollution Research* 28:55072–55088
- Haferburg G y Kothe E (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* 47:453–467
- Hiruma K, Aoki S, Takino J, Higa T, Utami Y, Shiina A, Okamoto M, Nakamura M, Kawamura N, Ohmori Y, Sugita R, Tanoi K, Sato T, Oikawa H, Minami A, Iwasaki

- W, Saijo Y (2023) A fungal sesquiterpene biosynthesis gene cluster critical for mutualist-pathogen transition in *Colletotrichum tofieldiae*. *Nature Communications* 14:1
- Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, Nakano R, Hacquard S, Kracher B, Neumann U, Ramírez D, Bucher M, O'Connell R, Schulze-Lefert P (2016) Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell* 165:2 464–474
- Ishizuka M, Moraes M, Chamma M, Pulcinelli C, Menten J (2018) Effect of fungal incidence on physiological quality of tobacco seeds used in Brazil. *Arquivos Do Instituto Biológico* 85:1-6
- Johnson N, Graham J, Smith F (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575–585
- Jumpponen A (2001) Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11:207-211
- Jumpponen A, Trappe J (2008) Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140:295-310
- Khan A, Waqas M, Ullah, Ihsan, Khan, Abdul L, Khan, Muhammad Al, Lee, In-Jung, Shin, Jae-Ho (2017) Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* 135:126-135
- Kobayashi T, Liu Y, Takahashi Y, Kameya T, Yamada Y (2015) The adsorption equilibrium of Pb and Cd on several soils in various pH solutions or in the presence of dissolved humic substances. *Soil Biology* 44:105-111
- Landero-Valenzuela N, Lara-Viveros FM, Andrade-Hoyos P, Aguilar-Pérez LA, Aguado RGJ (2016) Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7:1189-1198
- Langsdorf G, Fururchi N, Doke N, Nishimura S (1990) Investigations on *Alternaria solani* infections: detection of alternaric acid and a susceptibility-inducing factor in the spore-germination fluid of *A. solani*. *Journal of Phytopathology* 128: 271–282
- Lima M, Urbieta M, Donati E (2018) Microbial communities and the interaction with heavy metals and metalloids: impact and adaptation. En: Donari E (ed) *Heavy metals in the environment: microorganisms and bioremediation*, CRC Press, Argentina, pp. 4-5
- Liu F, Wang J, Li H, Wang W, Cai L (2019) *Setophoma* spp. on *Camellia sinensis*. *Fungal Systematics and Evolution* 4:43-57
- López-Ráez J y Pozo M (2013) Chemical signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: biotechnological applications. En: Aroca R (ed) *Symbiotic endophytes*. Springer, India, pp 215-232
- Navarro S, Navarro G (2003) Formación y constituyentes del suelo: aspectos generales. En: Navarro G (ed) *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Mundi-Prensa, Madrid pp 15-31
- Ochoa M, Trujillo M, Pedraza R, Abud Y (2010) Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12:65-71

- Réblová M, Gams W, Seifert K (2011) Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology* 68:163-191
- Redman R, Dunigan D, Rodriguez R. J (2001) Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151:3 705–716
- Redman R, Freeman S, Clifton D, Morrel J, Brown G, Rodriguez R (1999) Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. *ASPB* 119:795-804 *No abreviar revista*
- Rodriguez R, Redman R (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59:5 1109–1114
- Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada R, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R (2017) Current status of *Colletotrichum* spp. in México: taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:549-570
- Shrestha SK, Mathur SB, Munk L (2000) *Alternaria brassicae* in seeds of rapeseed and mustard, its location in seeds, transmission from seeds to seedlings and control. *Seed Science and Technology* 28: 75-84
- Sieber T, Grünig C (2006) Biodiversity of fungal root-endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte *Phialocephala fortinii* s. l. En: Sieber T (ed) *Microbial root endophytes*. Springer, Germany pp 107-132
- Smolders E, Mertens J (2013) Cadmium. En: Alloway B (ed) *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. Springer, U.K, pp 284-307
- Tatah S, Ogodo A, Kaa L, Agwaranze D (2016) The potential use of *Alternaria alternata* in bioremediation of wastewater contaminated by hexavalent chromium ion. *FUW Trends in Science & Technology Journal* 1:115-118
- Tufail A, Muhammad I, Safdar A, Raza M, Zubar A (2020) Effect of *Alternaria* sp on seed germination in rapeseed and its control with seed trarment. *Journal of Cereals and Oilseeds* 11:1-6
- Verma J, Bhatt A, Kumar P (2016) In-vitro study on bioaccumulation and tolerance of heavy metals by endophytic fungi *Alternaria alternata* isolated from *Cupressus torulosa* D. Don. In-vitro study on bioaccumulation and tolerance of heavy metals by endophytic fungi *Alternaria alternata* isolated from *Cupressus torulosa* 4:146-152
- Węźowicz K, Rozpądek P, Turnau K (2017) Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. *Mycorrhiza* 27:499–511
- Yanan S, Huarong X, Lixiang C, Renduo Z, Zaicaho X, Zhuoya W, Zujun D (2017) Effects of Cd and Pb resistant endophytic fungi on growth and phytoextraction of *Brassica napus* in metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research* 24:417–426
- Zhang N, Rossman AY, Seifert K, Bennett JW, Cai G, Cai L, Hillman B, Hyde KD, Luo J, Manamgoda D, Meyer W, Molnar T, Schoch C, Tadych M, White JF (2013) Impacts of the

international code of nomenclature
for algae, fungi and plants
(Melbourne Code) on the scientific
names of plant pathogenic fungi.
APS Feature