



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“Hongos asociados a las raíces de especies vegetales
establecidas en residuos mineros conteniendo plomo y cadmio:
identificación, caracterización y potencial en remediación”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

PRESENTA

M. en E.A. Anaid Penélope Solis Hernández

COMITÉ TUTORAL

Dr. Facundo Rivera Becerril (Director)

Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar (Asesora)

Dr. Bruno Manuel Chávez Vergara (Asesor)

Ciudad de México, agosto 2024

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología del Departamento El Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco; en el Laboratorio de Micología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional; y en el Laboratorio de Biogeoquímica y Materia Orgánica del Suelo del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Facundo Rivera Becerril del Departamento El Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. La asesoría del presente trabajo estuvo a cargo de la Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar y del Dr. Bruno Manuel Chavéz Vergara.

La autora agradece al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 608983, que comprendió del periodo del 01 de febrero de 2018 al 31 de enero de 2022. El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCyT, con número de referencia 001480.

Dedicatoria

A mi querido hijo, Elías

Esta tesis es un testimonio de mi dedicación y esfuerzo, pero también de mi amor y compromiso hacia ti. Eres mi fuente de inspiración y motivación. Te dedico esta investigación a ti, con la esperanza de que siempre persigas tus sueños ... Con todo mi amor, Mamá.

A mi madre, Emma Hernández

Esta tesis es un homenaje a tu amor incondicional y tu constante apoyo. Gracias por estar siempre a mi lado, por tus consejos sabios y por tu fe inquebrantable en mí. Te dedico esta investigación a ti, con todo mi cariño y gratitud, por ser el pilar en mi vida y el mayor respaldo en cada paso de mi camino ... Con todo mi amor, Tu chica superpoderosa.

A mi hermana, Brissia Solis

Dedico esta tesis a ti con todo mi cariño y gratitud. Tu apoyo incondicional, tus palabras de aliento y tu presencia constante en la vida de Elías y mía, han sido una fuente invaluable de fortaleza a lo largo de este proceso. Gracias por creer en mí, por estar siempre a mi lado ... Con todo mi amor, tu hermanis.

A mis tías y tíos

Dedico esta tesis con todo mi cariño y agradecimiento a ustedes. Su amor, apoyo y sabios consejos han sido una parte fundamental en mi vida y me han brindado la fortaleza necesaria para alcanzar este logro ... Con todo mi amor para ustedes.

A mis amigas y amigos

Su apoyo constante, palabras de aliento y presencia incondicional han sido fundamentales para alcanzar este logro ... Con todo mi amor para ustedes.

A Guillermo Hernández (Osito)

Esta tesis está dedicada a tu memoria con todo mi amor y respeto.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, que me permitió realizar mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por la beca otorgada para mis estudios de doctorado.

Al Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud por el apoyo económico brindado para la realización de los análisis de diversidad de mi investigación.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al **Dr. Facundo Rivera Becerril**, quien ha sido un pilar fundamental en el desarrollo de mi carrera profesional. Su orientación, paciencia y valiosos consejos han sido cruciales para la culminación de mi investigación. Aprecio inmensamente su constante apoyo y estímulo a lo largo de este proceso.

A la Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar y al Dr. Bruno Manuel Chávez Vergara, les agradezco el tiempo que dedicaron a revisar mi investigación, así como su disposición para resolver mis dudas y ofrecerme valiosos consejos. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para finalizar esta tesis. Estoy profundamente agradecida por su contribución y por la oportunidad de aprender bajo su orientación.

A los miembros del **Jurado del Examen Predoctoral y Examen de Grado**; agradezco su tiempo, atención y valiosos comentarios durante mis exámenes. Su dedicación y evaluación rigurosa han sido fundamentales para el desarrollo de mi proyecto y me brindaron una perspectiva invaluable para mejorar mi investigación.

A la Mtra. Ofelia I. Beltrán Paz, al Mtro. Luis Gerardo Martínez Jardines, al Dr. Miguel Ángel Salas Luévano y a la Dra. Jazmín Santillán Manjarrez; agradezco su orientación experta, comentarios constructivos y apoyo constante, los cuales fueron esenciales para el desarrollo y perfeccionamiento de esta investigación.

Al Laboratorio de Micología (UAM-Xochimilco), al Laboratorio de Micología Médica (ENCB-IPN) y al Laboratorio de Biogeoquímica y Materia Orgánica del Suelo (Instituto de Geología-UNAM), por las facilidades otorgadas, por la oportunidad de conocer a personas excelentes durante este tiempo.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional y personal a quienes me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en

los momentos más difíciles de mi vida. Algunos están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

M. en E.A. Anaid Penelope Solis Hernández.

El día 21 de agosto de 2024.

JURADO:



Dr. Facundo Rivera Becerril

Presidente



Dr. Bruno Manuel Chávez Vergara

Secretario



Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar

Vocal 1



Dra. Agueda Elena Cenicerós Gómez

Vocal 2



Dra. Martha Adriana Leyte Lugo

Vocal 3



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Declaración de originalidad

La que suscribe **Anaid Penelope Solis Hernández**, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, y autora de la tesis titulada: **"Hongos asociados a las raíces de especies vegetales establecidas en residuos mineros conteniendo plomo y cadmio: identificación, caracterización y potencial en remediación"**,

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctora es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 08 de agosto del 2024.

Atentamente

Anaid Penélope Solis Hernández



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Pantleón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO
Catz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 08 de agosto del año 2024, quien suscribe **Anaid Penelope Solis Hernández**, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autora intelectual de la tesis titulada "**Hongos asociados a las raíces de especies vegetales establecidas en residuos mineros conteniendo plomo y cadmio: identificación, caracterización y potencial en remediación**", bajo la dirección del Comité Tutorial conformado por el **Dr. Facundo Rivera Becerril**, la **Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar** y el **Dr. Bruno Manuel Chávez Vergara**, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso de la autora o del Comité Tutorial del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico **penelope.sol.hernan@gmail.com**; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Anaid Penelope Solis Hernández
2181800735



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

doctoradocbs@correo.uam.mx

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

http://posgradocbs.uam.mx

UNIDAD XOCHIMILCO
Catz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

Índice	
Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
Capítulo 1. Introducción	6
Capítulo 2. Antecedentes	8
2.1. Pregunta de Investigación	12
2.2. Hipotesis	13
2.3. Objetivo General	13
2.3.1. Objetivos Específicos	14
Capítulo 3. Materiales y Métodos	15
3.1. Área de estudio	15
3.2. Colecta de muestras.....	16
3.3. Caracterización de los residuos mineros	17
3.3.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos mineros.....	17
3.3.2. Concentración total y coeficientes de nutrientes en residuos mineros y en biomasa vegetal.....	18
3.3.3. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en los sustratos mineros y en los tejidos vegetales, y estimación del factor de bioconcentración	18
3.3.4. Actividad microbiana en los sustratos mineros.....	19
3.4. Identificación molecular y análisis de la comunidad fúngica total en los sustratos mineros y en tejido radical de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	23
3.5. Aislamiento, purificación, caracterización e identificación molecular de hongos endófitos septados oscuros cultivables del interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	24
3.5.1. Análisis filogenético de las secuencias ITS de los aislados fúngicos de las raíces de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	26
3.6. Tolerancia a plomo y cadmio por los hongos endófitos septados oscuros aislados de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	26
3.7. Evaluación de la solubilización de fosfato por los aislados fúngicos de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i> en presencia y en ausencia de plomo y cadmio	27
3.8. Análisis estadísticos	27
Capítulo 4. Resultados	29
4.1. Caracterización de los residuos mineros	29
4.1.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos mineros.....	29
4.1.2. Concentración total y coeficiente de nutrientes en sustratos mineros y en biomasa vegetal.....	29

4.1.3. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en los sustratos mineros, tejidos vegetales y factor de bioconcentración	31
4.1.4. Actividad microbiana en los sustratos mineros.....	35
4.2. Identificación molecular y análisis de la comunidad fúngica en los sustratos mineros y en tejido radical de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	36
4.3. Aislamiento, purificación, identificación molecular y caracterización de hongos endófitos septados oscuros cultivables del interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i> y de <i>Asphodelus fistulosus</i>	42
4.3.1. Identificación molecular y análisis filogenético de las secuencias ITS de los aislados fúngicos de las raíces de <i>Reseda luteola</i> y de <i>Asphodelus fistulosus</i>	49
4.4. Tolerancia a plomo y cadmio por los hongos endófitos septados oscuros (ESO) aislados de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	52
4.5. Solubilización de fosfato de los aislados fúngicos de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i> en presencia y en ausencia de plomo y cadmio.....	55
Capítulo 5. Discusión	58
5.1. Caracterización de los residuos mineros	58
5.1.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos mineros.....	58
5.1.2. Concentración total y coeficiente de nutrientes en sustratos mineros y biomasa vegetal.....	59
5.1.3. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en los sustratos mineros, tejidos vegetales y factor de bioconcentración	59
5.1.4. Actividad microbiana en los sustratos mineros.....	62
5.2. Identificación molecular y análisis de la comunidad fúngica global en los sustratos mineros y en tejido radical de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	62
5.3. Identificación molecular y determinación de hongos endófitos septados oscuros cultivables del interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i> y de <i>Asphodelus fistulosus</i>	65
5.4. Tolerancia a plomo y cadmio por hongos endófitos septados oscuros (ESO) aislados de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i>	66
5.5. Solubilización de fosfato de los aislados fúngicos de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i> en presencia y en ausencia de plomo y cadmio.....	67
Capítulo 6. Conclusiones	69
Capítulo 7. Perspectivas	71
Referencias Bibliográficas	72
Anexos	88
Artículos derivados de la tesis.....	88

Índice de figuras

Figura 1. A: Residuos mineros desprovistos de vegetación en el Jal Viejo en Vetagrande, Zacatecas, B: sitio no vegetado, C: sitio vegetado por <i>Reseda luteola</i> , D: sitio vegetado por <i>Asphodelus fistulosus</i>	16
Figura 2. Actividad enzimática y mineralización de carbono en los residuos mineros de los tres sitios de estudio del Jal Viejo; DV: sitio desprovisto de vegetación, RL: sitio vegetado con <i>Reseda luteola</i> ; AF: sitio vegetado con <i>Asphodelus fistulosus</i> (media±ES; n=3).....	35
Figura 3. Diagramas de Venn de (a) <i>amplicon single variants</i> (ASV) fúngicos de los sustratos mineros no vegetado y adyacentes a las raíces de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i> ; (b) <i>amplicon single variants</i> (ASV) fúngicos del interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i> . DV: sustrato minero desprovisto de vegetación; RL: sustrato minero de <i>Reseda luteola</i> ; AF: sustrato minero de <i>Asphodelus fistulosus</i> ; RLi: interior de la raíz de <i>Reseda luteola</i> ; AFi: interior de la raíz de <i>Asphodelus fistulosus</i>	37
Figura 4. Identidad y abundancia relativa de los miembros de la comunidad fúngica presentes en el sustrato minero y dentro de las raíces de plantas establecidas en el Jal Viejo. DV: sitio no vegetado; RL: sitio vegetado con <i>Reseda luteola</i> ; AF: sitio vegetado con <i>Asphodelus fistulosus</i> ; RLi: interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i> ; AFi: interior de las raíces de <i>Asphodelus fistulosus</i>	39
Figura 5. Análisis de la distribución de la comunidad fúngica en los sustratos mineros y en el interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i> y <i>Asphodelus fistulosus</i> . Los valores para cada taxón se describen según la intensidad del color. La abundancia se expresó como el valor de las secuencias objetivo a las secuencias filtradas totales para cada muestra. DV: sitio no vegetado; RL: sitio vegetado con <i>Reseda luteola</i> ; AF: sitio vegetado con <i>Asphodelus fistulosus</i> ; RLi: interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i> ; AFi: interior de las raíces de <i>Asphodelus fistulosus</i>	41
Figura 6. Hongos microscópicos desarrollados en el medio rosa de bengala procedentes del interior de las raíces de <i>R. luteola</i> (A) y de <i>A. fistulosus</i> (B), incubados en oscuridad a 28°C durante 10 días.....	42
Figura 7. Macromorfología y micromorfología de algunos aislados de hongos endófitos septados oscuros procedentes del interior de las raíces de <i>Reseda luteola</i>	47
Figura 8. Macromorfología y micromorfología de algunos aislados de hongos endófitos septados oscuros procedentes del interior de las raíces de <i>Asphodelus fistulosus</i>	48
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con la región ITS del rDNA amplificada por PCR. MM: marcador molecular (100 pb); carril C+: control positivo <i>Fusarium</i> sp.; carril C-: control negativo <i>Helicobacter</i> sp.; A) carril D1:AF-02, carril D2: AF-04, carril D3: AF-05, carril D4: AF-08, carril D5: AF-13, carril D6: AF-17, carril D7: AF-28; B) carril D8: RL-02, carril D9: RL-04, carril D10: RL-06, carril D11: RL-11, carril D12: RL-14, carril D13, RL-15.....	49
Figura 10. Árbol filogenético de los hongos ESO aislados de <i>Reseda luteola</i> (números de accesoión NCBI) y <i>Asphodelus fistulosus</i> (números de accesoión NCBI), generado con el criterio de máxima verosimilitud (1,000 bootstrap) construido sobre la base de 550 pb	

de la región ITS2-5.8S- ITS1 rDNA con el modelo evolutivo K80+G, con un valor gamma de 0.1620; *Aspergillus flavus* se utilizó como grupo externo.....51

Figura 11. Halo de solubilización de fosfato formado por los cinco aislados fúngicos provenientes de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, en presencia y en ausencia de plomo y cadmio a pH 6 y pH 8.....57

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas en los tres sitios del Jal Viejo; DV: sitio desprovisto de vegetación, RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus* (media±ES; n=3).....29

Tabla 2. Concentración total y coeficientes de nutrientes en sustratos mineros y en biomasa vegetal en tres sitios del Jal Viejo. DV: sitio desprovisto de vegetación; RL: sitio de *Reseda luteola*; AF: sitio de *Asphodelus fistulosus* (media±ES; n=3).....30

Tabla 3. Concentraciones totales de elementos potencialmente tóxicos en los tres sitios de estudio del Jal Viejo; DV: sitio desprovisto de vegetación; RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus* (media±ES; n=3).....32

Tabla 4. Acumulación de elementos potencialmente tóxicos (EPT) en tejidos vegetales de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus* (n = 3), y factores de bioconcentración (FBC) y translocación (FT).....34

Tabla 5. Número de lecturas, *amplicon single variants* (ASV) e índices de diversidad de la comunidad fúngica en tres sitios del Jal Viejo; DV: sitio no vegetado; RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus*; RLi: interior de las raíces de *Reseda luteola*; AFi: interior de las raíces de *Asphodelus fistulosus*.....36

Tabla 6. Velocidad de crecimiento radial (mm) de cinco aislados fúngicos de endófitos septados oscuros aislados de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, cultivados en presencia y en ausencia de plomo y cadmio (media±ES; n=5). Para cada EPT, diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de LSD de Fisher ($P < 0,05$).....53

Tabla 7. Producción de biomasa (mg g⁻¹) de cinco aislados fúngicos de endófitos septados oscuros aislados de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, cultivados en presencia y en ausencia de plomo y cadmio (media±ES; n=5). Para cada EPT, diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de LSD de Fisher ($P < 0,05$).....54

Tabla 8. Eficiencia relativa de solubilización de fosfato (ERSF) de cinco aislados fúngicos provenientes de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, en presencia y en ausencia de plomo y cadmio a pH 6 y pH 8 (media±ES; n=5).....56

Índice de cuadros

Cuadro 1. Descripción fenotípica de los aislados fúngicos de endófitos septados oscuros purificados, cultivados en medio PDA, procedentes del interior de las raíces de *Reseda luteola* y de *Asphodelus fistulosus*.....43

Cuadro 2. Identidad de las secuencias ITS amplificadas y secuenciadas pertenecientes a 61 aislados fúngicos purificados de endófitos septados oscuros procedentes del interior de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*, especies vegetales establecidas en residuos mineros de Zacatecas. Entre paréntesis, y en negritas se aprecia el número de accesión de la secuencia en el NCBI.....50

Abreviaturas

AF	<i>Asphodelus fistulosus</i>
AFi	Interior de la raíz de <i>Asphodelus fistulosus</i>
ASV	<i>Amplicon single variants</i>
CE	Conductividad eléctrica
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DA	Densidad aparente
DES	Deshidrogenasa
DV	Desprovisto de vegetación
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
EPT	Elementos potencialmente tóxicos
ERS	Eficiencia relativa de solubilización de fosfato
ESO	Endófitos septados oscuros
FBC	Factor de bioconcentración
FME	Fosfomonoesterasa
FT	Factor de traslocación
GLU	β -glucosidasas
HMA	Hongos micorrízicos arbusculares
HMF	Hexametafosfato
LIP	Lipasas
MUB	Buffer universal modificado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
POX	Polifenoloxidasas
RL	<i>Reseda luteola</i>
RLi	Interior de la raíz de <i>Reseda luteola</i>
TTC	Trifeniltetrasodio

Resumen

En México, millones de toneladas de residuos mineros se depositan a cielo abierto cuyo contenido de elementos potencialmente tóxicos (EPT) puede representar un riesgo ambiental. En los jales mineros, se establecen comunidades vegetales pioneras en asociación con una diversidad específica de hongos, incluidos los hongos endófitos septados oscuros (ESO). Esta simbiosis planta-hongo es fundamental para la rehabilitación natural de los residuos. En la presente investigación, se evaluó el impacto del establecimiento natural de dos especies vegetales sobre la actividad microbiana y la composición de la comunidad fúngica de hongos ESO, así como en la mitigación del efecto tóxico potencial de los EPT en un jal minero. Se determinó el microbioma fúngico en los residuos mineros, tanto en el interior de algunas raíces como en el sustrato circundante a ellas (zona rizosférica). Para ello, se estudió un depósito de residuos mineros denominado Jal Viejo en Vetagrande, Zacatecas, donde se seleccionaron tres sitios con base en la cobertura vegetal: sustrato minero desprovisto de vegetación (DV), sustrato minero con cobertura de *R. luteola* (RL) y sustrato minero con cobertura de *A. fistulosus* (AF). En cada sitio se colectó una fracción de sustrato que, en el caso de las plantas fue tomado bajo la influencia de la rizosfera; se determinaron las propiedades físicas, químicas y biológicas de los sustratos: cuantificación de EPT, actividad enzimática, mineralización del carbono; concentración de carbono, nitrógeno, fósforo y EPT en tejidos vegetales; diversidad fúngica en los sustratos y en el interior de las raíces. Fue identificada la comunidad de los hongos ESO cultivables procedente del interior de las raíces de ambas plantas; en ensayos *in vitro* se evaluó la tolerancia contra el Pb y el Cd, y la capacidad solubilizadora de fosfato de algunos hongos cultivables. Los residuos mineros mostraron un alto porcentaje de partículas de tamaño arena; el sitio DV presentó la mayor conductividad eléctrica, y se sugiere que la cobertura vegetal redujo la concentración de EPT en los sustratos de las parcelas RL y AF. Las plantas favorecieron el aumento del contenido de carbono en los residuos mineros. La actividad enzimática de la β -glucosidasa, la actividad enzimática de la deshidrogenasa, y la mineralización del carbono estuvieron influidas por la identidad de la planta y fueron más altas en el sitio AF. *R. luteola* y *A. fistulosus* acumularon EPT en sus tejidos y exhibieron potencial en la fitorremediación de Pb, Cd y Cu. La diversidad de hongos fue más elevada en los dos sitios vegetados que en el sitio sin vegetar. Los hongos Ascomycota predominaron dentro y fuera de las raíces de las dos especies vegetales; los residuos y las plantas compartieron algunos taxa fúngicos, pero otros taxa fueron específicos. Se aislaron los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma*

Rhizopycnis y *Stemphylium* pertenecientes al grupo de hongos ESO. Los cinco aislados toleraron las concentraciones biodisponibles de 143 mg Pb L⁻¹ y de 6.6 mg Cd L⁻¹, aunque *Alternaria* y *Colletotrichum* destacaron por su mayor velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa. Asimismo, los aislados mostraron capacidad solubilizadora de fosfato en presencia de Pb y Cd. Por lo anterior, en contraste con las zonas sin vegetar, la cobertura vegetal y los hongos endófitos septados oscuros de la rizosfera promovieron una atenuación natural de las condiciones extremas de los residuos mineros, y esto estuvo modulado por la especie vegetal.

Palabras clave: *Asphodelus fistulosus*, elementos potencialmente tóxicos, Hongos endófitos septados oscuros, indicadores ecológicos, *Reseda luteola*, residuos mineros.

Abstract

In Mexico, millions of tons of mining wastes are deposited in open pits and their potentially toxic elements (PTE) content may represent an environmental risk. In mining tailings, pioneer plant communities are established in association with a certain diversity of fungi, including, among others, dark septate endophyte (DSE) fungi; this plant-fungus association is essential for natural rehabilitation of mining tailings. In the present research, the impact of the natural establishment of two plant species on the microbial activity and on the composition of the fungal community of DSE fungi was evaluated, as well as on the mitigation of the potential toxic effect of elements in a mining tailing; the fungal microbiome was determined in the mining waste, both inside some roots and in the substrate surrounding them (rhizospheric zone). For this, a mining waste deposit called Jal Viejo in Vetagrande, Zacatecas, was studied, where three sites were selected based on the plant cover: mining substrate devoid of vegetation (DV), mining substrate with *R. luteola* coverage (RL) and mining substrate with coverage of *A. fistulosus* (AF). At each site, a fraction of substrate was collected, which, in the case of plants, was taken under the influence of the rhizosphere; the physical, chemical and biological properties of the substrates were determined: PTE quantification, enzymatic activity, carbon mineralization; carbon concentration, nitrogen, phosphorus and PTE in plant tissues; fungal diversity in the substrates and inside the roots. The community of cultivable DSE fungi from the interior of the roots of both plants were identified; the tolerance against Pb and Cd, and the phosphate solubilizing capacity of some cultivable fungi were evaluated. The community of cultivable DSE fungi inside the roots of both plants was identified; the tolerance against Pb and Cd, and the solubilizing capacity of some cultivable fungi, were evaluated. The mining waste showed a high percentage of sand-sized particles; the WPC site presented the highest electrical conductivity, and it is suggested that the vegetation cover reduced the concentration of PTE in the substrates of the RL and AF plots. The plants favored the increase in the carbon content in mining wastes. β -glucosidase enzyme activity, dehydrogenase enzyme activity, and carbon mineralization were influenced by plant identity and were highest at the AF site. *R. luteola* and *A. fistulosus* accumulated PTE in their tissues and exhibited potential phytoremediation for Pb, Cd and Cu. Fungal diversity was higher in the two vegetated sites than in the non-vegetated site. Ascomycota fungi predominated inside and outside the roots of the two plant species; residues and plants shared some fungal taxa, but other taxa were specific. The genera *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis* and *Stemphylium* belonging to the DSE group of fungi were isolated. The five isolates tolerated the

bioavailable concentrations of 143 mg Pb L⁻¹ and 6.6 mg Cd L⁻¹, although *Alternaria* and *Colletotrichum* exhibited the greatest radial growth rate and biomass production. Likewise, the isolates showed phosphate solubilizing capacity even in the presence of Pb and Cd. Therefore, in contrast to the non-vegetated areas, the plant cover and the dark septate endophyte fungi of the rhizosphere promoted a natural attenuation of the extreme conditions of the mining waste, and this was modulated by the plant species.

Keywords: *Asphodelus fistulosus*, potentially toxic elements, Dark septate endophyte fungi, ecological indicators, *Reseda luteola*, mining wastes.

Capítulo 1. Introducción

México destaca como una potencia mundial en la producción de minerales, entre los cuales sobresalen la plata (Ag), el plomo (Pb), el zinc (Zn), el oro (Au) y el cobre (Cu), entre otros (Azamar y Téllez, 2022). La minería es fundamental para la economía en el país. Los residuos mineros generados en grandes cantidades por esta actividad, conocidos como jales, consisten en lodos residuales derivados del proceso de beneficio del mineral económicamente aprovechable. Los cuales contienen elementos potencialmente tóxicos (EPT) y que se pueden liberar al ambiente (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008; Hernández-Acosta et al., 2009). Los EPT pueden volverse biodisponibles y de esta manera afectar a los organismos, el funcionamiento de los ecosistemas y poner en riesgo la salud humana (Salas-Luévano et al., 2017). Los depósitos de jales son más comunes en zonas áridas y semiáridas como se evidencia en el estado de Zacatecas, donde se encuentran montañas de jales mineros en áreas urbanas y rurales, así como en terrenos agrícolas (Salas-Luévano et al., 2017).

La restauración natural de ambientes contaminados por EPT, presenta desafíos que incluyen la toxicidad de los elementos, la escasez de nutrientes, una estructura física deficiente del sustrato y comunidades microbianas degradadas (Rajkumar et al., 2009). A pesar de representar una amenaza para la vida en los ecosistemas, algunas especies vegetales han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir y prosperar en estos ambientes con altos niveles de EPT (Borymski et al., 2018). La presencia de estas plantas favorece la proliferación de microorganismos en la rizosfera, la capa de suelo que rodea las raíces, mediante la exudación de una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos que enriquecen el suelo con nutrientes, atrayendo y estimulando a las comunidades microbianas (García-Villaraco Velasco et al., 2009, Borymski et al., 2018)

Entre los microorganismos presentes en la rizosfera en sitios con alta concentración de EPT, se ha observado que los hongos, incluidos los endófitos septados oscuros (ESO), aumentan la disponibilidad de nutrientes (C, N, P), modifican el funcionamiento biogeoquímico de la raíz-planta-sustrato y mejoran la tolerancia vegetal a las concentraciones altas de EPT al secuestrarlos en su pared celular ((Ban et al., 2012; Knapp 2012; Likar y Regvar, 2013; Wang et al., 2017). Por ejemplo, la inoculación del hongo *Exophiala pisciphila* en *Zea mays* aumentó la tolerancia al Cd (100 mg kg^{-1}) mediante la activación de sistemas antioxidantes y la alteración de las formas químicas del Cd para distribuirlos a través de la pared celular (Wang et al., 2016).

Diferentes especies vegetales tienen la capacidad de excluir y acumular EPT en los jales (Baker, 1981). Regvar et al. (2010) observaron que la interacción entre hongos ESO y *Salix caprea* mejoró la tolerancia al Pb y Cd. Ban et al. (2012) mencionan que la interacción con los hongos ESO permite que la planta *Astragalus adsurgens* tolere el Pb y el Zn. En suelos contaminados, se estudió el potencial de *Rosmarinus officinalis* como planta estabilizadora; la comunidad fúngica endófito, integrada por hongos micorrízicos arbusculares y septados oscuros, incremento la tolerancia vegetal contra arsénico (As), Pb, antimonio (Sb) y Zn (Affholder et al., 2014) Yamaji et al. (2016) reportaron la tolerancia de la planta *Clethra barbinervis* en un sitio altamente contaminado con Cu, Zn y Pb, metales que acumuló en sus raíces; asimismo, los hongos endófitos *Phialocephala fortinii*, *Rhizoderma veluwensis* y *Rhizoscyphus* fueron abundantes en sus raíces y confirieron mayor tolerancia contra los EPT.

Capítulo 2. Antecedentes

Desde tiempos prehispánicos, la minería ha sido una industria de relevancia central en términos económicos en México; esta actividad impulsa en forma destacada el desarrollo nacional (Hernández-Acosta et al., 2009). Los estados con mayor producción de minerales metálicos son Chihuahua, Zacatecas, Durango, Sonora, Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Sinaloa, Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán (Carrillo-González, 2005). Los metales y minerales que mayoritariamente se explotan son oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu), plomo (Pb), zinc (Zn), molibdeno (Mo), hierro (Fe), manganeso (Mn), fluorita, fosforita, caolín y wollastonita (CAMIMEX, 2023; INEGI, 2023). Sin embargo, la industria minera en su conjunto ha producido altos volúmenes de residuos en forma de lodos, ricos en elementos potencialmente tóxicos (EPT). Los EPT los podemos encontrar de forma natural en los suelos y constituyen el 1% de la corteza terrestre; sin embargo, las concentraciones de cada EPT (Pb, Cd, Zn, Cu, As y níquel (Ni)) en el suelo no rebasan los 1000 mg kg^{-1} (Szczepanska y Twardowska, 2004; Perea, 2014). El papel de los EPT en los sistemas biológicos se puede dividir en dos partes: los esenciales (Cu, Ni, Fe, Zn) que son necesarios para las funciones fisiológicas y bioquímicas de los organismos, sin embargo, en concentraciones altas pueden ser tóxicos; y los no esenciales (Pb, mercurio (Hg), Cd, As, cromo (Cr), Sb) que no son necesarios para las funciones fisiológicas y bioquímicas de los organismos (Tchounwou et al., 2012; Peco et al., 2021).

Los residuos mineros generados por la actividad minera son una fuente de EPT; habitualmente se acumulan en la superficie cercana a las minas a cielo abierto durante el beneficio del mineral (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008; Hernández-Acosta et al., 2009; Salas-Luevano et al., 2011, Perea, 2014). Estos residuos son a menudo inestables; están integrados por materiales inadecuados para el establecimiento vegetal y el desarrollo de las actividades biológicas. Algunos factores que evitan este establecimiento son pH ácido, alta salinidad, baja capacidad de retención de agua, altas concentraciones de EPT y deficiencias en la materia orgánica y la fertilidad de estos sitios (Prieto-Méndez, 2007; González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008; Hernández-Acosta et al., 2009). Estos materiales al ser dispersados contaminan el suelo y las aguas, además son una amenaza para los organismos de los sitios circundantes (Szczepanska and Twardowska, 2004; Carrillo González y Gonzales-Chávez, 2006; Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach, 2006; Salas-Luevano et al., 2017). Las áreas cercanas como zonas urbanas, carreteras y zonas agrícolas son de gran preocupación porque los EPT pueden convertirse en un riesgo para la seguridad alimentaria debido a los efectos tóxicos que generan en la salud humana.

Drahota et al. (2017) estudiaron los residuos mineros en la región de la Bohemia en República Checa y observaron que los suelos urbanos y carreteras cercanas al sitio contenían una alta concentración de As ($2,900 \text{ mg kg}^{-1}$), seguidos por Ag, Cu, Pb. En otro estudio donde se evaluaron las concentraciones de As, Cd, Pb, y Zn en suelos y hortalizas de sitios cercanos a jales mineros abandonados, se observó que las concentraciones biodisponibles en las hortalizas ($0.5 \text{ mg As kg}^{-1}$; $0.05\text{-}0.1 \text{ mg Cd kg}^{-1}$; $0.1 \text{ mg Pb kg}^{-1}$; $10\text{-}25 \text{ mg Zn kg}^{-1}$) fueron mayores que las encontradas en el suelo (Vejvodová et al., 2022). En contraste, en un estudio realizado en un vertedero de residuos industriales en la provincia de Punjab-Pakistán se evaluaron las concentraciones de Cr, Mn, Cu, As, Cd, Pb, bario (Ba), Hg en muestras de suelo y agua cercanas al sitio. Las concentraciones de todos los EPT fueron menores del límite estándar establecido por agencias reguladoras como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ahmad et al., 2021). Liu et al. (2020) determinaron los niveles de Cd, Pb, Cr, Zn Cu y As en maíz, suelo y agua de riego en el norte de Ningxia, China y observaron que las concentraciones de los EPT no excedieron los estándares nacionales; sin embargo, en los granos de maíz el Pb (0.41 mg kg^{-1}) y el Cr (2.36 mg kg^{-1}) superaron los estándares alimentarios.

Las concentraciones de EPT en los suelos varían y dependen mucho de la naturaleza del sitio o de los usos pasados de la tierra. Sin embargo, en los sitios mineros, aunque las condiciones pueden ser extremas, incluyendo la contaminación por EPT, se han logrado establecer diferentes especies vegetales que han conseguido adaptarse a través de los procesos microevolutivos (Baker, 1981; Baker et al., 2010). Estos procesos, están regidos por mecanismos celulares específicos como la restricción y/o exclusión de la absorción radical de los EPT, la inmovilización de los EPT en el ambiente externo a través de los exudados radicales, el secuestro de los iones en la epidermis, vacuola y tricomas, y la traslocación de los EPT hacia los brotes a través del xilema (Rascio y Navari-Izzo, 2011; Emanverdian et al., 2015; Singh et al., 2016). Las especies de plantas resistentes al estrés abiótico, que desarrollan islas de condiciones microclimáticas más favorables y que facilitan el crecimiento bajo su dosel de plantas menos tolerantes a estrés, son conocidas como plantas nodrizas (Navarro-Cano et al., 2018).

Las plantas que de manera natural han logrado desarrollarse en los residuos mineros crean un paisaje natural que con frecuencia están altamente contaminados; aunque la diversidad biológica (bacterias, hongos, protozoos, nemátodos, colémbolos, lombrices) en estos sitios

es baja, logran brindar cierta protección contra los efectos de la erosión (Conesa et al., 2006). Las plantas establecen un microambiente de interacción altamente dinámico con el sustrato, conocido como rizosfera. Particularmente, mediante la exudación de compuestos orgánicos en la rizosfera se generan microambientes donde se intensifica el crecimiento y la actividad de la comunidad microbiana o hotspots, lo cual se refleja en la actividad enzimática extracelular responsable del reciclaje y disponibilidad de nutrientes incluidos N, P, S (Méndez y Maier, 2008; German et al., 2011; Philippot et al. 2013; Prashar et al. 2014; Elizondo et al., 2016; Feng et al., 2017). Las enzimas extracelulares presentes en el suelo se clasifican como: a) hidrolíticas: asociadas con la despolimerización y mineralización de compuestos lábiles y b) oxidorreductasas: involucradas directamente con la despolimerización de compuestos recalcitrantes. El estudio de las actividades enzimáticas es una herramienta útil para determinar la diversidad funcional de las comunidades microbianas del suelo o la rotación de masa orgánica del suelo. La evaluación de las actividades enzimáticas en el suelo tiene una larga tradición en relación con la evaluación de la fertilidad del suelo y los procesos de cuantificación en ecosistemas naturales y seminaturales con una alta rotación de compuestos orgánicos (Baldrian, 2009).

En la rizosfera la planta libera compuestos orgánicos para los microorganismos, y estos influyen positivamente en las plantas al ayudar en la tolerancia y/o eliminación de los EPT (Kenedy y de Luna, 2005). Por lo tanto, las comunidades microbianas son fundamentales para el desarrollo vegetal en sitios contaminados por EPT (Epelde et al., 2010). Las plantas y los microorganismos establecidos en forma natural, en consecuencia, son fundamentales en la atenuación natural, es decir, en conducir procesos que degradan o disipan contaminantes orgánicos o inorgánicos en suelos, en agua, e incluso en sustratos mineros (González-Chávez et al., 2009). Los microorganismos, como bacterias y hongos, secretan algunos polisacáridos que se unen fácilmente a las partículas de estos residuos mineros, mejoran la estabilidad estructural de los mismos, y a su vez tienen un papel importante en la eliminación de EPT (Wang et al., 2017).

La simbiosis planta-hongos posee mecanismos fisiológicos para adquirir nutrimentos del suelo con una estructura variada. Entre los mecanismos desarrollados para contender contra los EPT: 1) un secuestro en el exterior celular por quelación y retención en la pared celular, y 2) una acumulación a través de la adherencia a proteínas u otras moléculas (Colanguelo y Guerinot, 2006; Anahid et al., 2011). Concentraciones elevadas de EPT pueden ser adquiridas gracias a que entran en juego distintos procesos independientes de

la ruta metabólica asociada, utilizando biomasa, y diferentes productos celulares, por ejemplo, polisacáridos, para remover los EPT (Colanguelo y Guerinot, 2006; Andrade et al., 2010).

La fitorremediación como biotecnología emplea justamente las plantas que son resistentes a EPT, así como los microorganismos, hongos y bacterias, que interaccionan con ellas a nivel de rizosfera para la remediación de sitios contaminados ya sea mediante remoción, degradación y/o estabilización de los elementos. Entre las estrategias de remediación para jales mineros están la fitoestabilización, la fitoextracción y la fitovolatilización (Peco et al., 2021). En la fitoestabilización se utilizan ciertos genotipos vegetales para secuestrar contaminantes de los suelos mediante su absorción y acumulación en las raíces, o gracias a la quelación atribuida a exudados liberados al sistema edáfico. Como consecuencia se produce una estabilización física en los suelos que disminuye la movilidad, toxicidad y biodisponibilidad de las moléculas problema. En la fitoextracción se lleva a cabo la acumulación y traslocación de EPT depositados en los suelos y sustratos, desde las raíces y hacia los distintos tejidos vegetales (tejidos aéreos), acción que limpia en forma permanente el suelo. Las plantas denominadas hiperacumuladoras acumulan concentraciones de EPT comprendidas entre 10 y 500 veces más que otras especies no acumuladoras. La fitovolatilización involucra la acumulación de contaminantes volátiles (por ejemplo, Se y Hg) en los tejidos vegetales y su consecuente volatilización o liberación a la atmósfera en la misma forma molecular inicial o en una molécula transformada. Si bien es una técnica que se aplica para la biorremediación de sitios contaminados por EPT, se requiere generar sistemas que concentren las emisiones (Singh et al., 2003; Prasad y Freitas 2003; Robinson et al., 2006; Jing et al., 2007). La fitorremediación tiene dos objetivos principales, por un lado, mejorar el suelo y por el otro facilitar el crecimiento de las plantas, por lo que bacterias, hongos y microalgas juegan un papel fundamental para la fitorremediación. Los microorganismos intervienen en la estructura de agregados, el desgaste del suelo por el viento y agua, la eliminación de EPT y la degradación de compuestos orgánicos tóxicos, produciendo polisacáridos y glomalina, captando EPT a través de hifas, además quelando compuestos orgánicos tóxicos; también intervienen en la solubilización de minerales, el aporte de nutrientes, la reducción de los niveles de etileno en las plantas y además aumentan la tolerancia de las plantas al pH ácido y a los EPT (Cao y Liu, 2015; Wang et al., 2017).

Los hongos han participado en los procesos de fitorremediación entre ellos están los hongos micorrízico arbusculares (HMA), quienes aumentan la eficiencia de captación de nutrimentos necesarios para las plantas, particularmente fósforo (P) y nitrógeno (N), gracias a que incrementan el área de exploración del suelo por medio de las hifas, lo que hace que las plantas tengan intercambio bidireccional de nutrimentos. Los HMA también amortiguan el efecto negativo debido a las condiciones de estrés del suelo, como la baja disponibilidad de agua, los niveles altos de EPT y los microorganismos patógenos de las raíces (Parodi y Pezzani, 2011).

Otro grupo de hongos son los ESO quienes desempeñan un rol fundamental en la protección vegetal contra los EPT. Ejemplo de ello es la interacción entre hongos ESO y *Salix caprea* que mejoró la tolerancia hacia el Pb y Cd (Regvar et al., 2010). Ban et al. (2012) reportaron que la planta *Astragalus adsurgens* sometida a regímenes de estrés por Pb y Zn, mostró tolerancia con ayuda de hongos ESO. Los ESO *Exophiala* sp. y *Phialophora* sp. ejercieron un rol funcional en el crecimiento vegetal y fortalecieron la tolerancia de algunas plantas en suelos contaminados con Cd, Zn y Pb (Vrålstad et al., 2002; Li et al., 2011). En suelos con presencia de Pb, Cd y Zn los hongos ESO prevalecieron entre la comunidad fúngica radical de *Erica herbacea* (Cevnik et al., 2000).

Cabe destacar que una característica de los hongos ESO, es la melanina que se encuentra en la pared celular y que es capaz de unirse a diferentes iones por lo que ayuda a la disminución de la toxicidad de EPT en las hifas (Ban et al., 2012). Algunos síntomas de la toxicidad de los EPT en los hongos refieren la inhibición en el crecimiento, un engrosamiento heterogéneo de la pared celular (Venkateswarlu et al., 1989) y aberraciones morfológicas, incluyendo hifas muy gruesas ramificadas (Cortés-Penagos et al., 1994).

2.1. Pregunta de Investigación

En los últimos años, cada vez más suelos en el mundo se encuentran contaminados debido a las actividades mineras (Mench et al., 2010; Li et al., 2012). En todo el territorio mexicano se encuentran millones de toneladas de depósitos de residuos mineros; alrededor de 200,000 ton están presentes en el distrito minero de Zacatecas. Dentro de este distrito se ubica el municipio de Vetagrande, donde por más de cuatro siglos se han depositado a cielo abierto jales ricos en Pb y Cd (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). Los EPT contenidos en los residuos mineros son perjudiciales para los ecosistemas y también representan una grave amenaza para el bienestar humano (Becerril et al., 2007; Cerbasi y Yetis, 2001; Mench et al., 2010).

En suelos contaminados por EPT las plantas son claves en el control de la erosión por acción del viento y la lluvia; asimismo, favorecen el establecimiento de vegetación secundaria, gracias también a los microorganismos con los que se asocian (Beesley et al., 2011). Además, se conoce muy poco acerca del papel de los ESO en procesos de fitoextracción de EPT, particularmente con respecto al Pb y Cd, elementos muy tóxicos presentes en residuos mineros en Zacatecas. Por otro lado, la fitorremediación en México con el uso de plantas y microorganismos puede ser aplicada en sitios con altas concentraciones de EPT (suelos mineros o depósitos de residuos mineros), o en sitios expuestos a la actividad minera (zonas agrícolas o zonas pobladas). Por lo tanto, se han planteado las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Cuál es la diversidad taxonómica de hongos endófitos septados oscuros en el interior de las raíces de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, plantas establecidas en residuos mineros?
2. ¿Cuál es el papel potencial que juega la cobertura vegetal con sus hongos, asociada en residuos mineros contaminados con elementos potencialmente tóxicos?
3. ¿La respuesta fisiológica de los hongos endófitos septados oscuros se modifica en un gradiente de concentración de plomo y cadmio?

2.2. Hipótesis

Las comunidades de hongos endófitos septados oscuros en las raíces de las plantas exóticas invasoras *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus* creciendo en residuos mineros mostrarán una riqueza y diversidad específicas a la planta hospedera.

Las plantas y sus hongos asociados amortiguan condiciones extremas como son la deficiencia de materia orgánica y las altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos de los residuos mineros contaminados con elementos potencialmente tóxicos.

La exposición *in vitro* de hongos endófitos septados oscuros al plomo y al cadmio, modificará su morfología y fisiología.

2.3. Objetivo General

Evaluar el potencial de remediación de los hongos endófitos septados oscuros asociados a especies vegetales establecidas en residuos mineros conteniendo plomo y cadmio.

2.3.1. Objetivos Específicos

Determinar la riqueza y diversidad de hongos endófitos septados oscuros en las raíces de plantas exóticas invasoras *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus* establecidas en residuos mineros con plomo y cadmio.

Caracterizar las respuestas morfológicas y fisiológicas en presencia de plomo y cadmio *in vitro* de diferentes hongos endófitos septados oscuros procedentes de las raíces de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. Área de estudio

El sitio de residuos mineros en estudio se encuentra ubicado en Vetagrande, Zacatecas, recibe el nombre de Jal Viejo (22°50'27" N, 102°33'14" W) y no ha tenido un aporte de material minero desde hace cien años. Este depósito de jales tiene un área aproximada de 13.5 Ha y las concentraciones disponibles de Pb (142.88 mg Pb kg⁻¹) y de Cd (6.6 mg Cd kg⁻¹) superan los niveles críticos ecotoxicológicos (Flores-Torres et al., 2021). El clima de la zona es semiárido (BS1kw(w)(e)g), con una precipitación anual media de 510 mm y una temperatura media anual de 16°C (García, 2004; SMG, 2018). El Jal Viejo se encuentra parcialmente vegetado (Figura 1) por las especies *Simsia* (Asteraceae), *Cordia congestiflora* (Caryophyllaceae), *Tagetes lunulata* (Asteraceae), *Reseda luteola* (Resedaceae) y *Asphodelus fistulosus* (Xanthorrhoeaceae). Particularmente, para el presente estudio se eligieron parcelas vegetadas con dos especies exóticas naturalizadas a las que se les da esta categoría por dominar las condiciones bióticas y abióticas para su supervivencia y lograr reproducirse de manera natural como si estuviera en un hábitat óptimo (CONABIO, 2023): la primera de ellas es *Reseda luteola*, herbácea perenne de la familia Resedaceae de origen europeo, que crece en bosques de pino-encino y en ambientes ruderales. La segunda es la especie exótica invasora *Asphodelus fistulosus*, una herbácea perenne de la familia Xanthorrhoeaceae introducida del Viejo Mundo, que crece en matorral xerófilo, selva baja, bosques de pino-encino seco y en ambientes ruderales. Asimismo, en el Jal Viejo fue elegido un sitio desprovisto completamente de vegetación.



Figura 1. A: Residuos mineros desprovistos de vegetación en el Jal Viejo en Vetagrande, Zacatecas, B: sitio no vegetado, C: sitio vegetado por *Reseda luteola*, D: sitio vegetado por *Asphodelus fistulosus*.

3.2. Colecta de muestras

Los tres sitios seleccionados, vegetados y no vegetado, representan las condiciones más comunes en el Jal Viejo, y fueron denominados sustrato minero desprovisto de vegetación (DV), sustrato minero con cobertura de *R. luteola* (RL) y sustrato minero con cobertura de *A. fistulosus* (AF). En cada condición se trazó un transecto de 60 m de longitud y cada 20 m se estableció un punto de muestreo; ello resultó en tres puntos de muestreo por condición. En cada uno de estos tres puntos se colectó una muestra de sustrato con un cilindro metálico de 100 cm³ para la determinación de densidad aparente; las muestras se colectaron en bolsas con cierre hermético a temperatura ambiente. Asimismo, en cada punto de muestreo con cobertura vegetal (RL y AF) se colectaron dos individuos vegetales completos (biomasa aérea y radical), de tal forma que se obtuvieron seis individuos por especie. En cada condición se colectaron con una pala tres muestras del sustrato minero del ambiente rizosférico a una profundidad de 30 cm, fueron depositadas en bolsas de cierre hermético y se guardaron en bolsas de plástico de color negro a 4°C para evaluar la actividad enzimática. Finalmente, para la extracción del DNA total se tomó una fracción de las raíces de cada individuo vegetal, del sustrato minero aledaño a las raíces y del sustrato minero desnudo, y se guardaron en bolsas de cierre hermético a 4°C; las raíces fueron desinfectadas en el laboratorio. Las raíces y sustrato colectado se almacenaron a -20 °C.

3.3. Caracterización de los residuos mineros

3.3.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos mineros

La determinación de humedad permite conocer el contenido de agua en el sustrato. Se pesaron 20 g de residuos en húmedo y se colocaron en una charola limpia, pesada y rotulada con el número de la muestra correspondiente. Las muestras se secaron en un horno a una temperatura de 105 °C por 72 h.

La densidad de la fase sólida del suelo está definida como la masa total de los sólidos dividida por el volumen total de los mismos. Se determinó la densidad aparente (DA) por el método del cilindro (Fernández y Luis, 1994), el cual consistió en introducir un cilindro de volumen conocido en los residuos mineros de cada sitio bajo estudio, nivelando los sustratos con los bordes del cilindro. Posteriormente la muestra se secó en un horno a 105 °C, hasta peso constante y se obtuvo su valor de la siguiente manera: $DA \text{ (g cm}^3\text{)} = \text{peso desechos mineros seco (g) / volumen del cilindro cm}^3$.

La textura de los residuos mineros se determinó por el método de la pipeta (Gee y Bauder, 1979) en el cual se cuantifican las partículas minerales del suelo en forma gravimétrica. Se pesaron 20 g de residuos mineros con humedad de campo en un recipiente de plástico y se agregaron 50 mL de la solución dispersante hexametafosfato (HMF: 40 g en 400 mL de agua destilada) para mejorar la dispersión de las partículas. La suspensión anterior se agitó durante 24 h, posteriormente se pasó a través de un tamiz con malla de 53 μm de abertura (No. 270) para la separación de las partículas de arena que fueron lavadas sobre el tamiz con agua destilada. Las partículas de arenas se dejaron secar en un horno a 105 °C durante 24 h y posteriormente se pesaron. Las partículas de arcillas y limos se transfirieron a una probeta de 1,000 mL, se agregaron 10 mL de solución dispersante HMF y se aforó la probeta con agua destilada. Con una varilla se agitó por 10 min y se cubrió la pipeta con un vidrio. La suspensión se dejó reposar por 3 h 51 min 47 s; después de este tiempo se introdujo una pipeta aforada lentamente hasta los 5 cm y se tomó una alícuota de 25 mL, se enjuagó la pipeta con agua destilada agregando dicho lavado en el crisol. El contenido de la pipeta se colocó en un crisol. Se introdujo el crisol con la muestra al horno a 105 °C durante 24 h, y se pesaron las partículas de arcilla. Se llevó a cabo el ajuste en el peso de las partículas de arcilla por la solución de HMF que se agregó a la suspensión. El peso de las partículas de limo se estimó haciendo primero la suma del peso de las partículas de arena y el peso de partículas de arcilla ajustado, menos el peso de muestra inicial. Para

calcular las fracciones de partículas de arena, arcilla y limo, el peso de cada una de las partículas fue multiplicado por 100 y dividido entre el peso de la muestra inicial.

En los suelos, el pH indica la relación de iones hidrógeno presentes en determinadas sustancias. El pH es de las propiedades esenciales del suelo por que influye en la disponibilidad de los nutrimentos, las actividades químicas y biológicas que hay en él, además interviene indirectamente en el desarrollo de las plantas (Mireles, 2009). La conductividad eléctrica (CE) permite estimar la cantidad de sales que contiene el suelo. La CE y el pH activo de los residuos mineros se cuantificaron en una mezcla 1:5 de sustrato:agua desionizada (peso/volumen); se agitó durante 30 min a 120 rpm. Pasado este tiempo se llevó a cabo la medición en un equipo Thermo Scientific Orion™ Versa Star Pro™ adaptado con los electrodos correspondientes.

3.3.2. Concentración total y coeficientes de nutrientes en residuos mineros y en biomasa vegetal

Para determinar la concentración de nutrientes totales (C, N y P), las muestras de residuos mineros se secaron previamente en un horno a una temperatura de 105 °C por 72 h. Se molieron en un molino de esferas Retsch MM400 durante 60 s y se almacenaron en bolsas de plástico. El carbono total (CT) se determinó mediante combustión a 950 °C en un horno de combustión, bajo flujo de O₂ lo que produce que las formas de C presentes en la muestra se transformen en CO₂ y así, se detecta por coulometría. Para la determinación de la concentración de nitrógeno total (NT) y de fósforo total (PT), se llevó a cabo una digestión ácida a 360 °C; el NT se cuantificó por el método de macro Kjeldahl (Bremmer, 1996) y el PT por colorimetría a 660 nm según el método de Murphy y Riley (1962).

3.3.3. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en los sustratos mineros y en los tejidos vegetales, y estimación del factor de bioconcentración

Los sustratos mineros se molieron en un molino de esferas Retsch MM400 durante 30 s, posteriormente se pesaron 20 g por cada muestra y se almacenaron en bolsas de plástico. Las muestras se analizaron por fluorescencia de rayos X (FRX) con un equipo portátil Thermo Scientific NitonXL3TUIYRA; el patrón de referencia utilizado fue Montana 2710a. La técnica aplicada permitió evaluar la presencia de los siguientes elementos químicos en el sustrato minero: Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe y magnesio (Mg).

Las raíces y los tejidos vegetales de *R. luteola* y de *A. fistulosus* fueron lavados con agua corriente de la llave para quitar el exceso de residuos mineros. En una solución de extrán

al 10% en agua deionizada, los tejidos vegetales fueron sumergidos durante 20 min y se realizaron tres enjuagues en agua deionizada para eliminar cualquier resto de extrán o de residuos mineros. Los tejidos fueron secados con toallas absorbentes y se separaron los tallos y hojas de las raíces para su análisis por separado, se guardaron en bolsas de papel y se secaron en un horno a 70°C hasta alcanzar un peso constante. Una vez secas las muestras se molieron en un molino de esferas Retsch MM400 durante 60 s, se pesaron 20 g por cada muestra y se depositaron en bolsas de plástico. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM, UNAM) para determinar la concentración total de Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe y Mn mediante espectrometría óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Se calculó el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de translocación (FT) en la fracción aérea de *R. luteola* y de *A. fistulosus* para determinar si las especies vegetales acumulan o estabilizan los EPT: FBC <1, la especie vegetal es elemento excluyente; FBC >1, la especie vegetal es acumuladora. Por otro lado, si el FT <1, la especie vegetal no tiene una translocación eficiente de los EPT hacia los tejidos aéreos; FT >1, la especie vegetal tiene una translocación eficiente de los EPT hacia los tejidos aéreos (Baker, 1981).

3.3.4. Actividad microbiana en los sustratos mineros

Las enzimas β -glucosidasas (GLU) proporcionan fuentes lábiles de C y de energía para sustentar la vida microbiana en suelos; catalizan la hidrólisis de los oligosacáridos y liberan monosacáridos (Dick, 2011). La GLU es una enzima muy estudiada y conocida en la historia de las enzimas del suelo. Ocupa una posición central en el ciclo del C a escala global porque cataliza el paso final en la descomposición de la celulosa, que media la posterior liberación de glucosa monomérica a los microorganismos. Para determinar la actividad de la GLU; se pesaron 2 g de sustrato minero en tubos Falcon de 50 mL, se adicionaron 30 mL de MUB 1X (buffer universal modificado) ajustado a un pH de 6 para todas las muestras provenientes de la zona rizosférica de *R. luteola*, de la zona desprovista de vegetación y de la zona rizosférica de *A. fistulosus*. Se agitó horizontalmente por 30 min a 120 rpm. Posteriormente se tomaron 670 μ L del homogeneizado (muestra con MUB 1X) y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 670 μ L de pNP-glucopiranósido. Por cada muestra se prepararon tres controles muestra, se tomaron 670 μ L del homogeneizado, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a cada uno se le agregaron 670 μ L del MUB 1X al pH correspondiente; de igual manera, fueron preparados tres controles por ensayo, se agregaron 670 μ L de pNP-glucopiranósido en a los tubos Eppendorf de 1.5 mL y, se

adicionaron 670 μ L de MUB 1X. Los tubos Eppendorf se incubaron en forma vertical con agitación a 250 rpm por 4 h a una temperatura de 25°C. Finalizada la incubación los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 2 min. Para llevar a cabo la lectura de la actividad enzimática se tomaron 750 μ L del centrifugado y se colocaron en tubos Falcon de 15 mL, se adicionaron 3 mL de agua Milli Q (MQ) y 75 μ L de NaOH 1N para detener la reacción. Los tubos se agitaron en un vórtex, posteriormente se procedió a la lectura de las muestras, los controles muestra y los controles sustrato en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Las fosfatasas se estudian en gran medida y se aplican como indicadores del potencial de mineralización de P orgánico y la disponibilidad de P en suelos; esta actividad está relacionada con las condiciones del suelo y la contaminación ambiental antropogénica (Luo et al., 2017). Debido a la deficiencia de P en muchos ecosistemas, las fosfatasas juegan un papel crucial en la hidrólisis de fosfomonoésteres y en algunos casos de fosfodiésteres, y en la liberación de P inorgánico asimilable para microorganismos y plantas (Hou et al., 2015; Huang et al., 2011). Para determinar la actividad de la fosfomonoesterasa (FME), se pesaron 2 g de sustrato minero en tubos Falcon de 50 mL, se adicionaron 30 mL de MUB 1X ajustado a un pH de 6 para todas las muestras provenientes de la zona rizosférica de *R. luteola*, de la zona desprovista de vegetación y de la zona rizosférica de *A. fistulosus*. Las muestras se agitaron horizontalmente por 30 min a 120 rpm. Posteriormente se tomaron 670 μ L del homogeneizado (muestra con MUB 1X), se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 670 μ L de pNP-fosfato. Por cada muestra se prepararon tres controles muestra, se tomaron 670 μ L del homogeneizado y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a cada uno se agregaron 670 μ L del MUB 1X al pH correspondiente. De igual manera fueron preparados tres controles por ensayo, se agregaron 670 μ L de pNP-fosfato en los tubos Eppendorf de 1.5 mL y, se adicionaron 670 μ L de MUB 1X. Los tubos Eppendorf se incubaron en forma vertical con agitación a 250 rpm por 4 h a una temperatura de 25°C. Finalizada la incubación los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 2 min. Para llevar a cabo la lectura de la actividad enzimática se tomaron 750 μ L del centrifugado y se colocaron en tubos Falcon de 15 mL, se adicionaron 3 mL de agua MQ y 75 μ L de NaOH 1N para detener la reacción, los tubos se agitaron en un vórtex. Posteriormente se procedió a la lectura de las muestras, de los controles muestra y de los controles sustrato en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Las lipasas (LIP) son esterasas que participan en el catabolismo de grasas y aceites, ya que rompen y modifican los enlaces éster de lípidos y sus derivados. Realizan la hidrólisis del triacilglicerol a diacilglicerol y a monoacilglicerol, ácidos grasos y glicerol. Así mismo participan en reacciones de síntesis y transesterificación de acilglicéridos y fosfoglicéridos. Estas enzimas pueden tener actividad intracelular o extracelular (Sánchez-Ferrer, 1998).

Para determinar la actividad de la LIP, se pesaron 2 g de residuo minero en tubos Falcon de 50 mL, se adicionaron 30 mL de MUB 1X ajustado a un pH 6 para todas las muestras provenientes de la zona rizosférica de *R. luteola*, de la zona desprovista de vegetación y de la zona rizosférica de *A. fistulosus*. Las muestras se agitaron horizontalmente por 30 min a 120 rpm. Posteriormente se tomaron 670 μ L del homogeneizado (muestra con MUB 1X), se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 670 μ L de pNP-nitrofenil butirato. Por cada muestra se prepararon tres controles muestra, se tomaron 670 μ L del homogeneizado, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a cada uno se agregaron 670 μ L del MUB 1X al pH correspondiente. De igual manera fueron preparados tres controles por ensayo y se agregaron 670 μ L de pNP-nitrofenil butirato en los tubos Eppendorf de 1.5 mL; se adicionaron 670 μ L de MUB 1X. Los tubos Eppendorf se incubaron en forma vertical con agitación a 250 rpm por 4 h a una temperatura de 25°C. Finalizada la incubación los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 2 min.

Para llevar a cabo la lectura de la actividad enzimática se tomaron 750 μ L del centrifugado y se colocaron en tubos Falcon de 15 mL, se adicionaron 3 mL de agua MQ y 75 μ L de NaOH 1N para detener la reacción. Los tubos se agitaron en un vórtex y posteriormente se procedió a la lectura de las muestras, de los controles muestra y de los controles sustrato en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Las polifenoloxidasas (POX) son enzimas que tienen una especificidad de sustrato muy baja y catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, usando oxígeno como el aceptor final de electrones, considerados recalcitrantes en sustratos más fácilmente disponibles para su mineralización. En general, las bacterias y los hongos despliegan POX para degradar y desintoxicar contaminantes aromáticos y así obtener C y energía; por lo tanto, son sensibles a la contaminación y pueden utilizarse como bioindicadores de la calidad de los suelos y la salud del ecosistema (Sinsabaugh, 2010; Luo et al., 2017). Para determinar la actividad POX se pesaron 2 g de sustrato minero en tubos Falcon de 50 mL, se adicionaron 30 mL de MUB 1X ajustado a un pH 6 para todas las muestras provenientes de la zona rizosférica de *R. luteola*, la zona desprovista de vegetación y la zona rizosférica de

A. fistulosus. Las muestras se agitaron horizontalmente por 30 min a 120 rpm. Posteriormente se tomaron 670 μ L del homogeneizado (muestra con MUB 1X), se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 670 μ L de ABTS (2',2'-Anzino-bis ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico). Por cada muestra se prepararon tres controles muestra, se tomaron 670 μ L del homogeneizado y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a cada uno se agregaron 670 μ L del MUB 1X al pH correspondiente. De igual manera fueron preparados tres controles por ensayo y se agregaron 670 μ L de ABTS en los tubos Eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 670 μ L de MUB 1X. Los tubos Eppendorf se incubaron en forma vertical con agitación a 250 rpm por 4 h a una temperatura de 25°C. Finalizada la incubación los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 3 min, posteriormente se procedió a la lectura de las muestras, de los controles muestra y de los controles sustrato en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 460 nm.

La actividad deshidrogenasa (DES), evaluada por el método de Trevors et al. (1982) modificado por García et al. (1993), es un indicador del sistema redox microbiano; suele considerarse como un buen exponente de las actividades oxidativas del suelo y un indicador general de la actividad microbiana. Existe una alta correlación entre esta actividad y la respiración del suelo. Para determinar la actividad de la DES se pesó 1 g de residuo minero en tubos cónicos de 15 mL forrados con papel aluminio, se adicionó a cada muestra 1 mL de la solución trifeniltetrasodio, se preparó un control muestra por cada muestra y se agregó 1 mL de amortiguador Tris-HCl. También se prepararon tres controles sustrato por ensayo, a cada uno se le adicionó 1 mL de la solución trifeniltetrasodio. Todos los tubos cónicos fueron incubados en agitación a 180 rpm por 24 h de manera vertical. Después de la incubación a cada tubo se le adicionaron 8 mL de acetona y se agitó horizontalmente a 200 rpm durante 2 h. Finalizada la agitación los tubos fueron centrifugados a 3,000 rpm por 2 min; posteriormente se procedió a la lectura de las muestras, de los controles muestra y de los controles sustrato en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 546 nm.

La microbiota heterótrofa necesita una fuente constante de energía, la cual proviene de la transformación de la materia orgánica como celulosa, proteínas, nucleótidos y compuestos humificados. Las reacciones que se encargan del aporte de energía en la célula son reacciones redox; un ejemplo de estas reacciones es la respiración, que es la oxidación de la materia orgánica por microorganismos aerobios de donde derivan en productos finales el CO₂ y el agua. Por lo tanto, las actividades metabólicas de los microorganismos heterótrofos del suelo se pueden cuantificar midiendo la producción de CO₂ o el consumo de O₂ (Vance

et al., 1987). Para determinar la mineralización de carbono se pesaron 10 g de residuo minero dentro de tubos de PVC, los sustratos fueron humedecidos a capacidad de campo; dentro de un frasco de conserva se colocó el tubo de PVC y un vial (trampa) con 10 mL de NaOH 0.5 N, la tapa del vial también se colocó dentro del frasco. Los frascos fueron tapados y se incubaron a 25°C durante 8 días. Transcurrido el tiempo de incubación los frascos se sacaron de la incubadora y se destaparon, con unas pinzas se sacaron los viales y se taparon. Posteriormente se agregaron 5 mL de BaCl₂ 1N, 3 gotas de fenolftaleína a cada vial; finalmente se tituló el NaOH residual con HCl 1N, para de esta forma ser cuantificada por diferencia el CO₂ capturado por el NaOH.

3.4. Identificación molecular y análisis de la comunidad fúngica total en los sustratos mineros y en tejido radical de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

Para el análisis molecular se partió de muestras compuestas de raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus* para la extracción de DNA total por especie; previamente las raíces fueron desinfectadas superficialmente (Ban et al., 2012). El DNA total tanto de las raíces como de los residuos mineros se extrajo con base en el método del CTAB (Allers y Litchen, 2000 modificado por Rodríguez-Tovar et al., 2005) y fue almacenado a -20 °C. En el laboratorio RTL *Genomics* (Ludobok, Texas) fue amplificado el ITS (~300 bp) con los iniciadores ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2r (5'- GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3'), de acuerdo con los protocolos descritos por el *EarthMicrobiome Project* (EMP, www.earthmicrobiome.org) (White et al., 1990). Las secuencias fueron obtenidas por la plataforma Illumina MiSeq, se analizaron a través de la plataforma QIIME2 versión 2019.7, fueron filtradas (q2-demux plugin) y "denoisadas" (eliminación del ruido) con DADA2 (Callahan et al., 2016). Las secuencias que no superaron el filtro de calidad fueron descartadas y las que sí lo superaron fueron organizadas en *amplicon single variants* (ASV), un equivalente de "especie o taxón". Los ASV fueron ubicados en sus grupos taxonómicos correspondientes (reino, filo, clase, orden, familia, género y especie) según la base de datos UNITE (versión 8.0) (Nilson et al., 2018). El análisis de diversidad alfa, abundancia relativa y riqueza fue generado considerando el número de ASV en las muestras y bajo un ambiente de Rstudio (versión 1.0.143) (McMurdie y Holmes, 2013).

3.5. Aislamiento, purificación, caracterización e identificación molecular de hongos endófitos septados oscuros cultivables del interior de las raíces de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

Las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus* se lavaron con agua corriente hasta eliminar restos de residuos mineros. Las raíces se desinfectaron superficialmente con etanol (99%) por 1 min, peróxido de hidrógeno (35%) por 5 min, etanol (99%) por 30 s, y finalmente se enjuagaron en tres ocasiones con agua desionizada estéril (Ban et al., 2012). Posteriormente, se cortaron las raíces en unidades de 1.5 cm de largo; se hicieron incisiones longitudinales y transversales en cada segmento antes de ser depositados en Rosa de Bengala (Difco) más el antibiótico ampicilina (250 mg L^{-1}) para inhibir el crecimiento bacteriano. Se cultivó un total de 300 fragmentos de raíces por cada especie vegetal; en cada caja de cultivo fueron depositados cinco fragmentos. La incubación se hizo en oscuridad a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 días hasta apreciar crecimiento fúngico.

Los hongos aislados de campo poseen información genética heterogénea, y esto puede conducir a variabilidad celular y cambios en sus características físicas, fisiológicas y bioquímicas (Cortez-Madrigal et al., 2003). Debido a ello, los hongos ESO aislados de las raíces fueron purificados usando cultivos monohifales, mediante el método punta de hifa, para tener aislados genéticamente homogéneos, con estabilidad en sus características (Ayala-Zermeño et al., 2012). Los aislados fúngicos fueron sembrados en medio PDA natural, a 28°C durante cinco días. Con un estereomicroscopio bajo condiciones de esterilidad, fueron observados los bordes de la colonia para seleccionar los extremos de las hifas; con un alfiler desinfectado se tomó el segmento conteniendo la punta de una sola hifa y se transfirió en otra caja con PDA. Los aislados se incubaron a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$; a las 72 h se hicieron observaciones a 40X para corroborar que el crecimiento fuera originado por una única hifa, sin contaminación. Una vez que se obtuvieron los cultivos puros, los hongos se sembraron para ensayos posteriores. Finalmente, los hongos fueron almacenados en PDA natural y en agua, a una temperatura de 4°C y a temperatura ambiente, respectivamente.

Los aislados se sembraron en medio PDA ($20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días) para describir las siguientes características macromorfológicas de las colonias: presencia de pigmento en el anverso y reverso; aspecto de la superficie (algodonoso, aterciopelado, pulverulento, granuloso, velloso, etc.); superficie (plana, acuminada, umbilicada, crateriforme, etc.) y liberación de exudados (Mier et al., 2013).

De igual manera, se realizó una caracterización micromorfológica de los diferentes aislados fúngicos para lo cual se elaboraron microcultivos. Fue preparado PDA en cajas de cultivo con un espesor de 2 mm; solidificado el medio, se cortaron con un bisturí cuadrados de 1 cm², y fueron depositados sobre un portaobjetos estéril. Posteriormente, se inocularon con un asa estéril pequeñas fracciones del hongo en los costados del cuadrado de medio y se cubrió el microcultivo con un cubreobjetos. Los microcultivos fueron depositados sobre una varilla de vidrio doblada dentro de una caja Petri estéril con glicerol al 10% y fueron incubados a 28 °C durante 7 días. A continuación, los microcultivos fueron observados al microscopio cerca de un mechero; se tomó el cubreobjetos con una pinza flameada de alcohol al 70% y se colocó sobre una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos. La micromorfología de cada uno de los hongos incluyendo las estructuras reproductoras se observó a 40X (Mier et al., 2013). Se utilizaron claves dicotómicas para lograr identificar las características de los hongos ESO: pigmentos de color oscuro, estructura hifal apretada y sinuosa, hifas hialinas y delgadas con cuerpos lipídicos en su interior, así como conidios pigmentados oscuros (Jumpponen y Trappe, 1998; Barrow y Aaltonen, 2001; Barrow, 2003).

Para la identificación molecular, se produjo micelio fresco de cada aislado fúngico previamente purificado y caracterizado a partir de cultivos en PDA, incubados por 10 días a 25°C en la oscuridad. El DNA de los ESO se extrajo según el método CTAB (Allers y Litchen, 2000; modificado por Rodríguez-Tovar et al., 2005) y fue amplificada la región ITS1-5.8S-ITS2 DNAr con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La reacción de PCR se hizo en un termociclador Maxy Gene Gradient (EEUU); la mezcla de reacción tuvo un volumen final de 50 µL, con 23 µL de agua destilada estéril, 1 µL de DNA fúngico (50-100 ng), 1 µL de cada iniciador a 1 µg mL⁻¹, 25 µL del 2X PCR Super Mix (GeneDirex). El programa de amplificación comprendió una desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min, una extensión inicial a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min. El producto de la PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa (1%), teñido con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen); los amplicones se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV. Los productos de la PCR fueron enviados a Macrogen In (Geumcheon-gu, Seúl) para la purificación y secuenciación bidireccional por el método de Sanger.

3.5.1. Análisis filogenético de las secuencias ITS de los aislados fúngicos de las raíces de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

Las secuencias del ITS de cada colonia fúngica fueron editadas con el programa Sieview 4.1 y el programa BioEdit Sequence versión 7.0.5.2. Se llevó a cabo la búsqueda de los homólogos de las secuencias en la plataforma Nucleotide BLAST. Se siguieron los siguientes parámetros: la base de datos Nucleotide collection (nr/nt); se eligió el taxid: 4890 (Ascomycota) excluyendo las secuencias de muestras no cultivadas; el programa de selección fue Megablast; los parámetros de algoritmo fueron los determinados por el programa Megablast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Unipro UGENE v1.32.0 (<http://ugene.net/>). La determinación del modelo evolutivo se realizó con el programa jModel Test 2.1.10 v20160303. A continuación, se determinó el criterio de Máxima Parsimonia, utilizando el programa PhyML_3.0. Para la elaboración del árbol filogenético se consideraron los siguientes parámetros: 1,000 bootstrap y como grupo externo *Aspergillus flavus* (Galtier et al., 1996, Rigo et al., 2002; Posada y Crandall, 1998).

3.6. Tolerancia a plomo y cadmio por los hongos endófitos septados oscuros aislados de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

Se evaluó la tolerancia contra el Pb y el Cd de los aislados fúngicos AF04 (*Colletotrichum* sp.), AF06 (*Setophoma* sp.), AF27 (*Acrocalymma-Rhizopycnis* sp.), AF28 (*Stemphylium* sp.) y RL19 (*Alternaria* sp.), representantes de los hongos ESO procedentes de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*. Se utilizó el medio de cultivo mínimo Mellin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969; Ban et al., 2012) y se ajustó a pH 7. Se utilizaron tres concentraciones para cada EPT; en cuanto al Pb fueron 71.5 mg Pb L⁻¹, 143 mg Pb L⁻¹ y 214.5 mg Pb L⁻¹, y para el caso del Cd fueron 3.3 mg Cd L⁻¹, 6.6 mg Cd L⁻¹ y 9.9 mg Cd L⁻¹; además, los hongos también fueron cultivados en ausencia de metales (SM). Las concentraciones de cada EPT se eligieron con base en las concentraciones determinadas en el sustrato minero de los dos sitios de establecimiento de *R. luteola* y *A. fistulosus*. El Pb se adicionó como PbCl₂ y el Cd como CdCl₂. Los discos de micelio se obtuvieron a partir de aislados fúngicos sembrados en PDA a 20°C por 14 días. Obtenida una colonia fúngica homogénea se llevaron a cabo 30 cortes circulares en los bordes de la colonia fúngica, por aislado. Para el experimento de tolerancia a Pb y Cd, cada caja con medio MMN fue inoculada con un disco de micelio e incubada a 20±1 °C durante 14 días. Se evaluaron las siguientes variables para cada aislado fúngico:

- a) Velocidad de crecimiento radial (Mier et al., 2013): a partir del tercer día fue registrado el crecimiento radial ocurrido en 14 días en la intersección de los ejes perpendiculares del diámetro 1 (D1) y del diámetro 2 (D2) de cada crecimiento colonial.
- b) Producción de biomasa fúngica (Mier et al., 2013): La colonia crecida después de 14 días se colocó en una charola de plástico con peso conocido y se deseco a 90°C por 5 días al obtener un peso constante. El peso seco se calculó por la diferencia del peso inicial y el peso final.

3.7. Evaluación de la solubilización de fosfato por los aislados fúngicos de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus* en presencia y en ausencia de plomo y cadmio

Se evaluó la solubilización de fosfato de los aislados fúngicos AF04 (*Colletotrichum* sp.), AF06 (*Setophoma* sp.), AF27 (*Acrocalymma-Rhizopycnis* sp.), AF28 (*Stemphylium* sp.) y RL19 (*Alternaria* sp.), en presencia de Pb y Cd. En el ensayo las concentraciones de Pb y Cd utilizadas fueron 143 mg Pb L⁻¹ y 6.6 mg Cd L⁻¹, respectivamente. Se utilizó el medio de cultivo Pikovskaya-agar modificado (Nopparat et al., 2009; Hernández-Leal et al., 2011) que está compuesto por una solución base integrada por (NH₄)₂SO₄ (0.5 g), KCl (0.2 g), MgSO₄·7H₂O (0.1 g), MnSO₄·H₂O (0.004 g), NaCl (0.2 g), D-Glucosa (10 g), FeSO₄·7H₂O (0.002 g), extracto de levadura (0.5 g), cloranfenicol (0.1 g, Pfizer), agar(18 g) y agua destilada (900 mL), así como por una solución de fosfato conformada por goma arábica (0.5 g), fosfato de calcio (β-fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) 0.5 g) y agua destilada (100 mL). El medio de cultivo se ajustó a niveles de pH determinados en cada uno de los dos sitios de estudio, los cuales oscilaron entre pH 6 y pH 8; se agregó un tratamiento testigo sin Pb y sin Cd. Cada solución fue esterilizada por separado en autoclave durante 15 min a 22 psi y 121 °C, y posteriormente fueron mezcladas en cajas Petri. Cada caja fue inoculada con un disco de micelio de cada aislado fúngico correspondiente; se incubó en oscuridad a 20 °C por 12 días. El diámetro de la colonia se midió a los días 4, 6 y 12 días de incubación. Para cada aislado fúngico se evaluó el índice de eficiencia relativa de solubilización de fosfato (ERS), con la siguiente fórmula: (Diámetro del halo / Diámetro de la colonia) * 100. Este índice permite conocer el radio de acción del hongo sobre el sustrato, expresado en porcentaje, en relación con el tamaño de la colonia.

3.8. Análisis estadísticos

Se utilizaron análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para comparar las medias entre los tres sitios y entre los tratamientos de los aislados fúngicos. Cuando se notaron

diferencias significativas se realizó una prueba de Fisher LSD ($p < 0.05$). Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SigmaPlot versión 12.0.

Capítulo 4. Resultados

4.1. Caracterización de los residuos mineros

4.1.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos mineros

Las características físicas de los sustratos difirieron entre los tres sitios, excepto en la densidad aparente (Tabla 1). La humedad de los sustratos fue 40% menor en AF con respecto a los otros sitios (Tabla 1). La distribución en el tamaño de partículas mineras difirió entre los tres sitios, donde particularmente bajo AF se observó el mayor porcentaje de arenas y el menor porcentaje de partículas tamaño arcilla (Tabla 1); la clase textural para AF fue franco arenosa, para RL fue arcillosa y en el sitio DV fue franco arcillo arenosa. La conductividad eléctrica en el sitio sin vegetación fue significativamente más elevada ($p < 0.001$) que en los dos sitios vegetados. El sitio RL presentó un pH neutro, en tanto que en los sitios DV y AF fue moderadamente alcalino (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas en los tres sitios del Jal Viejo; DV: sitio desprovisto de vegetación, RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus* (media \pm ES; $n=3$).

Propiedades	DV	RL	AF	F (p)
Humedad (%)	8.27 \pm 0.30a	8.06 \pm 1.00a	4.75 \pm 0.10b	13.6 (0.01)
Densidad aparente (g cm ⁻³)	1.26 \pm 0.09a	1.30 \pm 0.07a	1.27 \pm 0.09a	0.57 (0.95)
Arenas (%)	46.0 \pm 2.12b	43.7 \pm 3.96b	63.2 \pm 2.44a	13.1 (0.01)
Arcillas (%)	31.6 \pm 1.67b	43.6 \pm 3.94a	17.3 \pm 1.83c	24.1 (0.001)
Conductividad eléctrica (μ S cm ⁻¹)	1485 \pm 107a	128 \pm 1.41b	498 \pm 217b	25.1 (0.001)
pH (H ₂ O)	8.13 \pm 0.11a	7.00 \pm 0.58a	8.15 \pm 0.17a	3.44 (0.10)

Para cada propiedad, diferentes letras indican diferencias significativas entre sitios según la prueba de LSD de Fisher ($p < 0.05$); F: Diferencia de cuadrados medios.

4.1.2. Concentración total y coeficiente de nutrientes en sustratos mineros y en biomasa vegetal

La concentración de C total en el sitio vegetado RL fue significativamente la más elevada (8.74 mg g⁻¹) y en el sitio DV la más baja (1.94 mg g⁻¹). El N y el P totales no mostraron diferencias entre los tres sitios (Tabla 2). Los cocientes C/N y C/P en el sitio vegetado RL fueron significativamente mayores con respecto a los sitios DV y AF. Asimismo, el sitio RL exhibió el contenido más alto de C en el sustrato minero (511 g C m⁻²), mientras que el sitio DV sólo alcanzó 110 g C m⁻². El N y el P almacenados en el sustrato no presentaron diferencias entre sitios (Tabla 2). Las concentraciones de C y N en los tejidos vegetales

fueron iguales entre las plantas *R. luteola* y *A. fistulosus* (Tabla 2); sin embargo, el P fue significativamente más alto en *R. luteola* que en *A. fistulosus*. El cociente C/P fue significativamente mayor en la biomasa de *A. fistulosus* que en *R. luteola* (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración total y coeficientes de nutrientes en sustratos mineros y en biomasa vegetal en tres sitios del Jal Viejo. DV: sitio desprovisto de vegetación; RL: sitio de *Reseda luteola*; AF: sitio de *Asphodelus fistulosus* (media±ES; n=3).

Nutrientes	DV	RL	AF	F (p)
Concentración total de nutrientes en el sustrato minero				
C (mg g ⁻¹)	1.94 ±0.27b	8.74 ±3.66a	4.13 ±1.67ab	6.45 (0.03)
N (mg g ⁻¹)	0.43 ±0.31a	0.16 ±0.08a	0.36 ±0.18a	1.30 (0.34)
P (mg g ⁻¹)	0.22 ±0.05a	0.31 ±0.04a	0.27 ±0.06a	2.36 (0.18)
Relación estequiométrica de nutrientes en el sustrato minero				
C/N	13.7 ±6.43b	56.0 ±2.35a	12.4 ±1.52b	12.5 (0.01)
C/P	8.58 ±0.69b	27.8 ±2.89a	14.9 ±0.96b	9.83 (0.01)
N/P	2.25 ±0.59a	0.51 ±0.07a	1.32 ±0.17a	2.00 (0.22)
Contenido de nutrientes en el sustrato minero				
C (g C m ²)	110 ±46.5b	511 ±71.4a	237 ±31.8ab	6.65 (0.03)
N (g N m ²)	24.6 ±5.93a	9.50 ±1.56a	20.8 ±3.41a	1.25 (0.35)
P (g P m ²)	12.4 ±0.99a	17.9 ±0.80a	15.4 ±1.05a	2.84 (0.13)
Concentración total de nutrientes en biomasa vegetal				
C (mg g ⁻¹)	-	408 ±5.19a	418 ±0.06a	1.27 (0.32)
N (mg g ⁻¹)	-	12.0 ±0.04a	8.95 ±0.68a	6.94 (0.06)
P (mg g ⁻¹)	-	1.75 ±0.08b	0.81 ±0.03a	42.3 (0.01)
Relación estequiométrica de nutrientes en biomasa vegetal				
C/N (mg g ⁻¹)	-	33.8 ±0.52a	48.1 ±3.23a	6.39 (0.06)
C/P (mg g ⁻¹)	-	237 ±13.8b	517 ±17.1a	54.1 (0.01)
N/P (mg g ⁻¹)	-	6.99 ±0.32a	11.2 ±1.13a	4.25 (0.11)

C: Carbono; N: Nitrógeno; P: Fósforo.

En cada fila, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Fisher LSD ($p < 0.05$); F: Diferencia de cuadrados medios.

4.1.3. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en los sustratos mineros, tejidos vegetales y factor de bioconcentración

Los niveles más altos de todos los elementos analizados (Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe y Mn) se observaron en el sitio sin cobertura vegetal; estos niveles fueron significativamente diferentes comparados con los sitios vegetados, excepto en el caso del Fe (Tabla 3). En los sustratos vegetados por *R. luteola* y por *A. fistulosus* hubo un decremento del 48-85% y del 2-46%, respectivamente, en la concentración de EPT respecto al sustrato no vegetado (Tabla 3).

El contenido de Pb fue significativamente diferente entre los sustratos de los tres sitios, con niveles máximos en DV (3,984 mg kg⁻¹), intermedios en AF (2,656 mg kg⁻¹) y bajos en RL (853 mg kg⁻¹). El Cd también alcanzó niveles diferentes entre sitios con 62.9 mg kg⁻¹ en DV, 41.7 mg kg⁻¹ en AF y 15.5 mg kg⁻¹ en RL. El sitio DV presentó los niveles más altos de Zn con 9,738 mg kg⁻¹, pero estos niveles fueron 43% y 81% inferiores en AF y RL, respectivamente. En As, las concentraciones fueron mayores en DV y AF (295-302 mg kg⁻¹), que en RL (63.2 mg kg⁻¹). El Cu fue significativamente superior en DV (283 mg kg⁻¹), con respecto a AF y RL (148-175 mg kg⁻¹). Las concentraciones de Fe fluctuaron entre 42,049 y 49,398 mg kg⁻¹, sin diferencias entre sitios. Finalmente, el Mn fue más alto en DV y AF (1,599-1,759 mg kg⁻¹) en comparación con RL (953 mg kg⁻¹).

Tabla 3. Concentraciones totales de elementos potencialmente tóxicos en los tres sitios de estudio del Jal Viejo; DV: sitio desprovisto de vegetación, RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus* (media±ES; n=3).

EPT (mg kg ⁻¹)	DV	RL	AF	F (p)
Pb	3,984 ±306a (100 %)	853 ±250b (66 %)	2,656 ±151c (34 %)	8.91 (0.02)
Cd	62.9 ±4.37a (100 %)	15.5 ±2.81b (75 %)	41.7 ±1.71c (34 %)	14.4 (<0.01)
Zn	9,738 ±741a (100 %)	1,887 ±565b (81 %)	5,551 ±326b (43 %)	10.6 (0.01)
As	302 ±49.9a (100 %)	63.2 ±14.8b (79 %)	295 ±33.9a (2 %)	11.4 (<0.01)
Cu	283 ±27.3a (100 %)	148 ±25.5b (48 %)	175 ±10.3b (38 %)	10.2 (0.01)
Fe	49,398 ±2,415a (100 %)	42,049 ±743a (54 %)	46,720 ±1,629a (46 %)	4.59 (0.06)
Mn	1,759 ±48.6a (100 %)	953 ±281b (85 %)	1,599 ±56.2a (15 %)	6.47 (0.03)

Para cada EPT, diferentes letras indican diferencias significativas entre sitios según la prueba de LSD de Fisher ($p < 0.05$); F: Diferencia de cuadrados medios. Las cifras en negritas, entre paréntesis, indican la disminución de la concentración en porcentaje de cada PTE en los sitios RL y AF en relación con el sitio DV.

Las concentraciones totales de Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe y Mn acumulados en los tejidos de *R. luteola* y de *A. fistulosus* se observan en la tabla 4. *A. fistulosus* acumuló en raíces y en tejidos aéreos cantidades más elevadas de los dos EPT no esenciales en los sistemas vivos, Pb y Cd, en comparación con *R. luteola*. La concentración de Pb en los tejidos aéreos de *R. luteola* fue 1.5 veces mayor que en las raíces; en contraste, en las raíces de *A. fistulosus* el Pb total fue 2.6 veces más elevado que en los tejidos aéreos. En *R. luteola* hubo menor acumulación de Cd en las raíces (1.44 mg kg^{-1}) que en los tejidos aéreos (4.92 mg kg^{-1}); por su parte, las raíces de *A. fistulosus* mostraron una menor acumulación de Cd (17.8 mg kg^{-1}) que los tejidos aéreos (35.1 mg kg^{-1}). La acumulación de Zn total fue mayor en los tejidos aéreos (59-79%) que en las raíces (21-41%) de las dos plantas. El As en *R. luteola* estuvo por debajo del límite de detección (0.52 mg kg^{-1}); en *A. fistulosus* se detectaron concentraciones de As muy cercanas al comparar raíces y tejidos aéreos (2.03 - 2.13 mg kg^{-1}). *R. luteola* acumuló un total de 31.4 mg kg^{-1} de Cu en sus tejidos, mientras que *A. fistulosus* alcanzó 86.6 mg kg^{-1} ; ambas plantas acumularon más Cu en tejidos aéreos que en raíces. El Fe y Mn también se acumularon más en tejidos aéreos que en raíces de las dos plantas; ambos elementos alcanzaron niveles muy cercanos en ambas especies: 633 - 693 mg kg^{-1} de Fe y 107 - 158 mg kg^{-1} de Mn.

Con relación al factor de bioconcentración, *R. luteola*, tuvo valores menores a 1 en Pb, Cd, Zn, Cu, Fe y Mn (Tabla 4); sin embargo, el factor de translocación mostró niveles mayores a 1 en Pb (1.49), Cd (3.41), Zn (3.78), Cu (3.46), Fe (2.18) y Mn (7.19). En *A. fistulosus*, el factor de bioconcentración más alto fue en Cd (0.43); asimismo, el factor de translocación fue mayor a 1 en Cd (1.97), Zn (1.45), Cu (1.19), Fe (1.42) y Mn (2.75).

Tabla 4. Acumulación de elementos potencialmente tóxicos (EPT) en tejidos vegetales de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus* ($n = 3$), y factores de bioconcentración (FBC) y translocación (FT).

EPT (mg kg ⁻¹)	<i>Reseda luteola</i>						<i>Asphodelus fistulosus</i>					
	Sustrato	Raíz	Brotes	Raíz+Brotes	FBC	FT	Sustrato	Raíz	Brotes	Raíz+Brotes	FBC	FT
Pb	853	9.56	14.2	23.8	0.01	1.49	2,656	94.5	36.1	131	0.04	0.38
Cd	15.5	1.44	4.92	6.37	0.09	3.41	41.7	17.8	35.1	52.9	0.43	1.97
Zn	1,887	45.4	172	217	0.02	3.78	5,551	240	347	587	0.04	1.45
As	63.2	-	-	-	ND	ND	295	2.03	2.13	4.16	0.01	ND
Cu	148	7.03	24.3	31.4	0.05	3.46	175	14.3	71.7	86.6	0.08	1.19
Fe	42,049	199	434	633	<0.01	2.18	46,720	287	406	693	0.01	1.42
Mn	953	19.3	139	158	0.02	7.19	1,599	28.6	78.6	107	0.02	2.75

- Concentración inferior al límite de detección de 0.52 mg kg⁻¹. **FBC:** Relación entre la concentración de EPT en las raíces de las plantas y la concentración de EPT en los residuos mineros. **FT:** Relación entre la concentración de PTE en tejidos aéreos (brotes) y la concentración de PTE en las raíces.

4.1.4. Actividad microbiana en los sustratos mineros

La actividad β -GLU fue significativamente superior en el sitio vegetado AF ($0.39 \mu\text{mol pNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$), en relación con RL y DV (0.04 - $0.06 \mu\text{mol pNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Las actividades enzimáticas de LIP, POX y FME no mostraron diferencias significativas entre los sitios estudiados; en los dos sitios vegetados, sin embargo, se apreció una clara tendencia al decremento de LIP y al incremento de FME al compararse con el sitio no vegetado (Figura 2). En el mismo sentido, la actividad DES fue considerablemente más elevada ($P < 0.001$) en el sitio vegetado AF ($13.1 \mu\text{mol TPF g}^{-1} \text{h}^{-1}$), en comparación con los sitios DV ($5.10 \mu\text{mol TPF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) y RL ($2.41 \mu\text{mol TPF g}^{-1} \text{h}^{-1}$). La mineralización de carbono fue más elevada en el sitio AF ($15.1 \mu\text{g C g}^{-1} \text{d}^{-1}$), respecto a los sitios DV ($11.3 \mu\text{g C g}^{-1} \text{d}^{-1}$) y RL ($10.6 \mu\text{g C g}^{-1} \text{d}^{-1}$) (Figura 2).

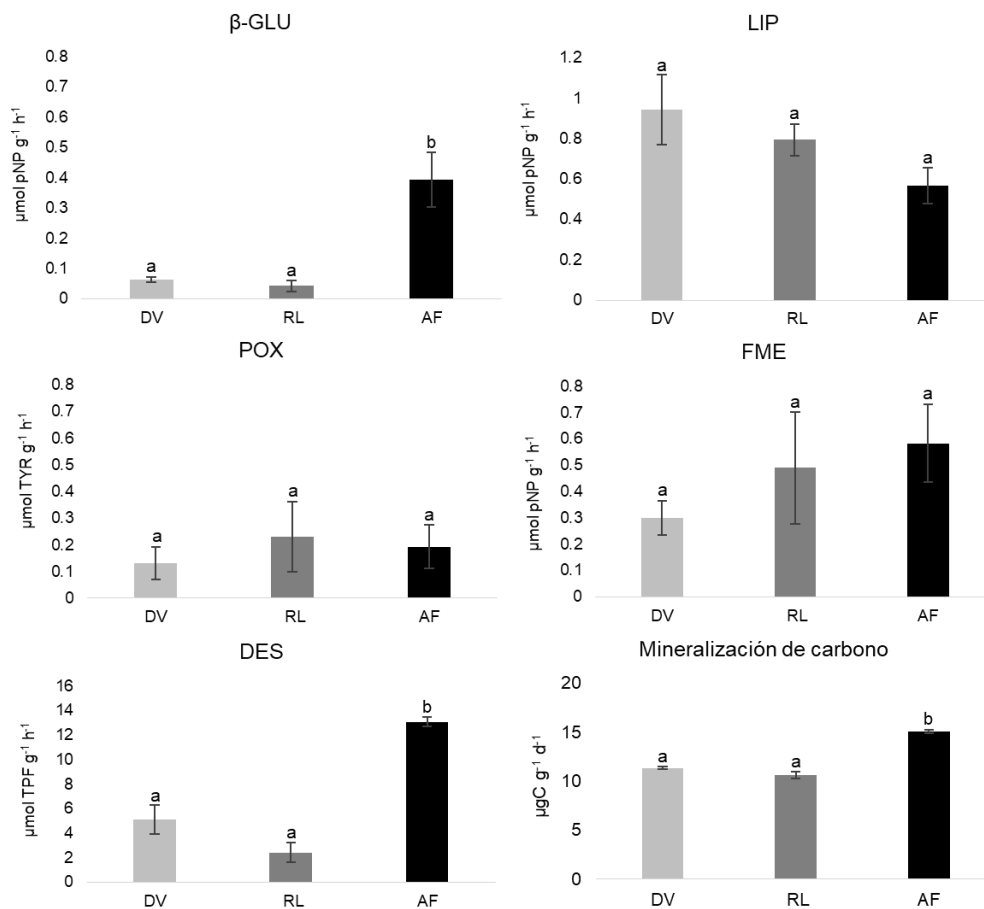


Figura 2. Actividad enzimática y mineralización de carbono en los residuos mineros de los tres sitios de estudio del Jal Viejo; DV: sitio desprovisto de vegetación, RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus* (media \pm ES; $n=3$).

4.2. Identificación molecular y análisis de la comunidad fúngica en los sustratos mineros y en tejido radical de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

El análisis de la diversidad fúngica en los sustratos aledaños a las raíces, así como en el interior de las raíces de las dos plantas, produjo un total de 225,352 lecturas en bruto y 139,119 lecturas filtradas no quiméricas (Tabla 5). En los sustratos mineros, fuera de la raíz, el sitio vegetado RL presentó el mayor número de ASV (82), el sitio no vegetado DV tuvo casi la mitad del número de ASV (40) que el sitio RL; el número más bajo de ASV (19) lo presentó el sitio vegetado AF. La comunidad fúngica en el interior de la raíz de *A. fistulosus* (AFi) fue taxonómicamente más rica (47 ASV), que en el interior de las raíces de *R. luteola* (RLi) con 36 ASV. El índice de diversidad de Shannon-Wiener fue más elevado en los dos sitios vegetados que en el sitio desprovisto de vegetación. El sitio vegetado RL tuvo la diversidad fúngica más elevada (2.62) y un índice de Simpson de 0.15, mientras que el sitio vegetado AF presentó una diversidad fúngica de 2.51 y un índice de Simpson de 0.11. El sustrato sin vegetación tuvo la menor diversidad fúngica (1.47) y un índice de Simpson de 0.34. En lo que concierne al interior de las raíces, AFi fue más diverso (2.96) con respecto a RLi (2.57); el interior de ambas raíces, AFi y RLi, presentó un índice de Simpson de 0.08 y 0.11 respectivamente.

Tabla 5. Número de lecturas, ASV e índices de diversidad de la comunidad fúngica en tres sitios del Jal Viejo; DV: sitio no vegetado; RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus*; RLi: interior de las raíces de *Reseda luteola*; AFi: interior de las raíces de *Asphodelus fistulosus*.

Sitio	Lecturas en bruto	Lecturas Filtradas/No-quiméricas	Número de ASV	Índice Shannon-Wiener	Índice Simpson
DV	62785	54518	40	1.47	0.34
RL	55445	41062	82	2.62	0.15
AF	9133	5676	19	2.51	0.11
RLi	39271	20900	36	2.57	0.11
AFi	58717	16963	47	2.96	0.08

En los diagramas de Venn de la figura 3 se muestran los ASV fúngicos exclusivos y compartidos entre los sustratos de los tres sitios (vegetados y no vegetado), así como los ASV exclusivos y compartidos entre el interior de las raíces de las dos plantas. Únicamente un ASV fue común a los tres sustratos. El sitio no vegetado DV tuvo 28 ASV exclusivos; compartió 10 ASV con el sitio RL y sólo uno con el sitio AF. El sitio RL presentó 68 ASV exclusivos y compartió 3 ASV con el sitio AF, en tanto que el sitio AF tuvo 14 ASV exclusivos (Figura 3a). El interior de las raíces de *R. luteola* y de *A. fistulosus* tuvo 20 y 31 ASV

exclusivos, respectivamente; ambos sistemas radicales compartieron 16 ASV (Figura 3b). Considerando la comunidad fúngica global de los sustratos mineros de los tres sitios, el sitio vegetado RL presentó una abundancia relativa del 45%, el sitio desprovisto de vegetación del 39% y al sitio vegetado AF solamente del 17%.

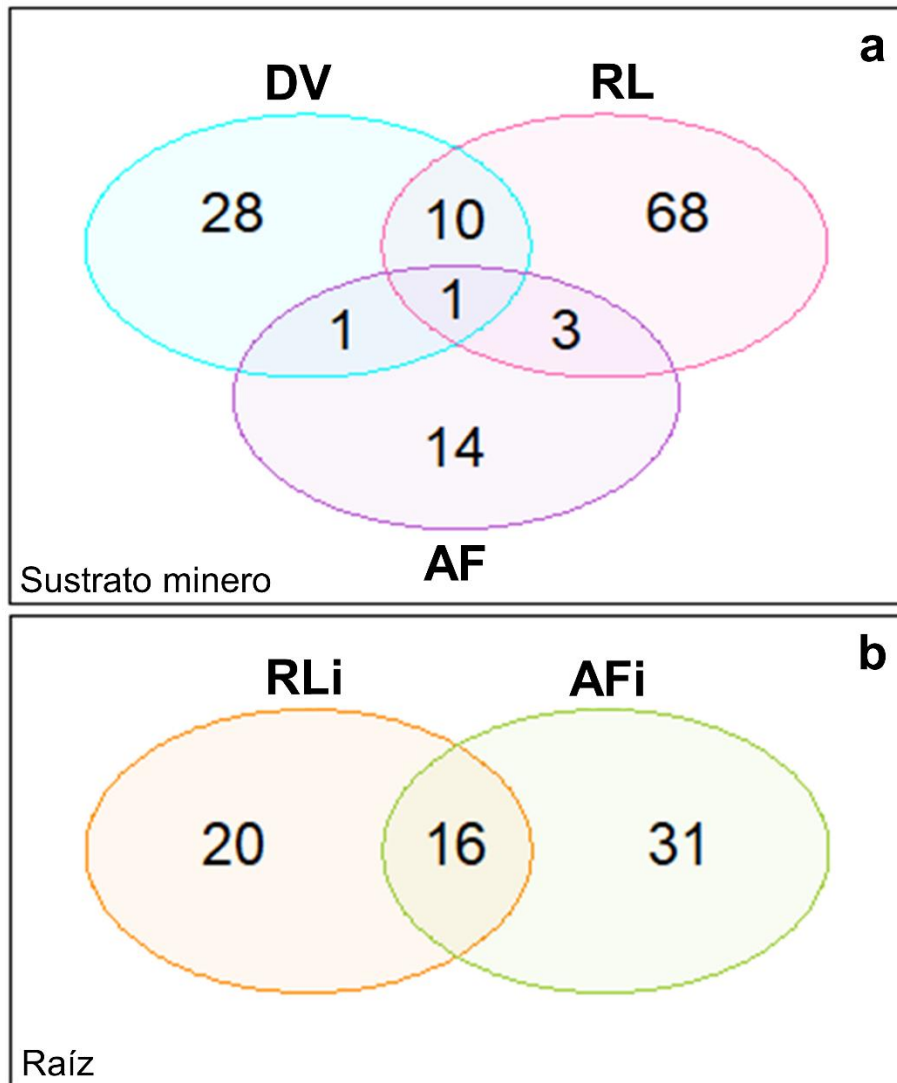


Figura 3. Diagramas de Venn de (a) ASV fúngicos de los sustratos mineros no vegetado y adyacentes a las raíces de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*; (b) ASV fúngicos del interior de las raíces de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*. DV: sustrato minero desprovisto de vegetación; RL: sustrato minero de *Reseda luteola*; AF: sustrato minero de *Asphodelus fistulosus*; RLi: interior de la raíz de *Reseda luteola*; AFi: interior de la raíz de *Asphodelus fistulosus*.

La identidad y abundancia relativa de los taxa fúngicos en los sustratos y en el interior de las raíces se muestra en la figura 4. En el sitio desprovisto de vegetación, los filo más abundantes fueron Ascomycota (99%) y Mortierellomycota (1%); Sordariomycetes fue la clase más abundante (96%), seguida por Eurotiomycetes, Dothideomycetes, Mortierellomycetes y Leotiomyces con un 4%; el orden predominante fue Hypocreales (96%), mientras que Nectriaceae (69%) e Incertae sedis (26%) fueron las familias más abundantes. En el sustrato del sitio RL los filo predominantes fueron Ascomycota (97%), Basidiomycota (2%) y Mortierellomycota (1%); Sordariomycetes (66%), Eurotiomycetes (19%), Leotiomyces (9%) y Dothideomycetes (4%) fueron las clases más abundantes; los órdenes con mayor presencia fueron Hypocreales (64%), Eurotiales (19%) y Helotiales (9%), mientras que las familias más abundantes en el sitio RL fueron Aspergillaceae (28%), Nectriaceae (21%), Incertae sedis (19%) y Helotiaceae (14%). En el sitio AF, el único filo presente fue Ascomycota; las clases más abundantes fueron Sordariomycetes (63%), Eurotiomycetes (19%) y Dothideomycetes (7%); los órdenes con mayor presencia fueron Hypocreales (62%), Chaetothyriales (14%) y Pleosporales (7%). Las familias más abundantes en el sitio AF fueron Nectriaceae (53%), Herpotrichiellaceae (16%) e Incertae sedis (11%). En el interior de las raíces de *R. luteola* el filo con mayor presencia fue Ascomycota (99%), y sólo el 1% correspondió a Basidiomycota y Mortierellomycota; las clases más abundantes fueron Hypocreales (46%), Pleosporales (30%) y Xylariales (11%); las familias con mayor presencia fueron Incertae sedis (34%), Clavicipitaceae (15%), Diatrypaceae (14%) y Pleosporaceae (13%). En el interior de las raíces de *A. fistulosus*, Ascomycota fue el filo más abundante (99%), seguido por Basidiomycota (1%); las clases con mayor presencia fueron Sordariomycetes (49%), Dothideomycetes (29%) y Leotiomyces (17%); los órdenes más abundantes fueron Hypocreales (45%), Pleosporales (27%) y Helotiales (18%); las familias con mayor presencia fueron Nectriaceae (35%), Helotiaceae (18%), Pleosporaceae (17%) y Phaeosphaeriaceae (10%). Finalmente, no se logró determinar el nivel taxonómico del 25% de la comunidad fúngica considerando los tres sitios y las raíces de las dos plantas.

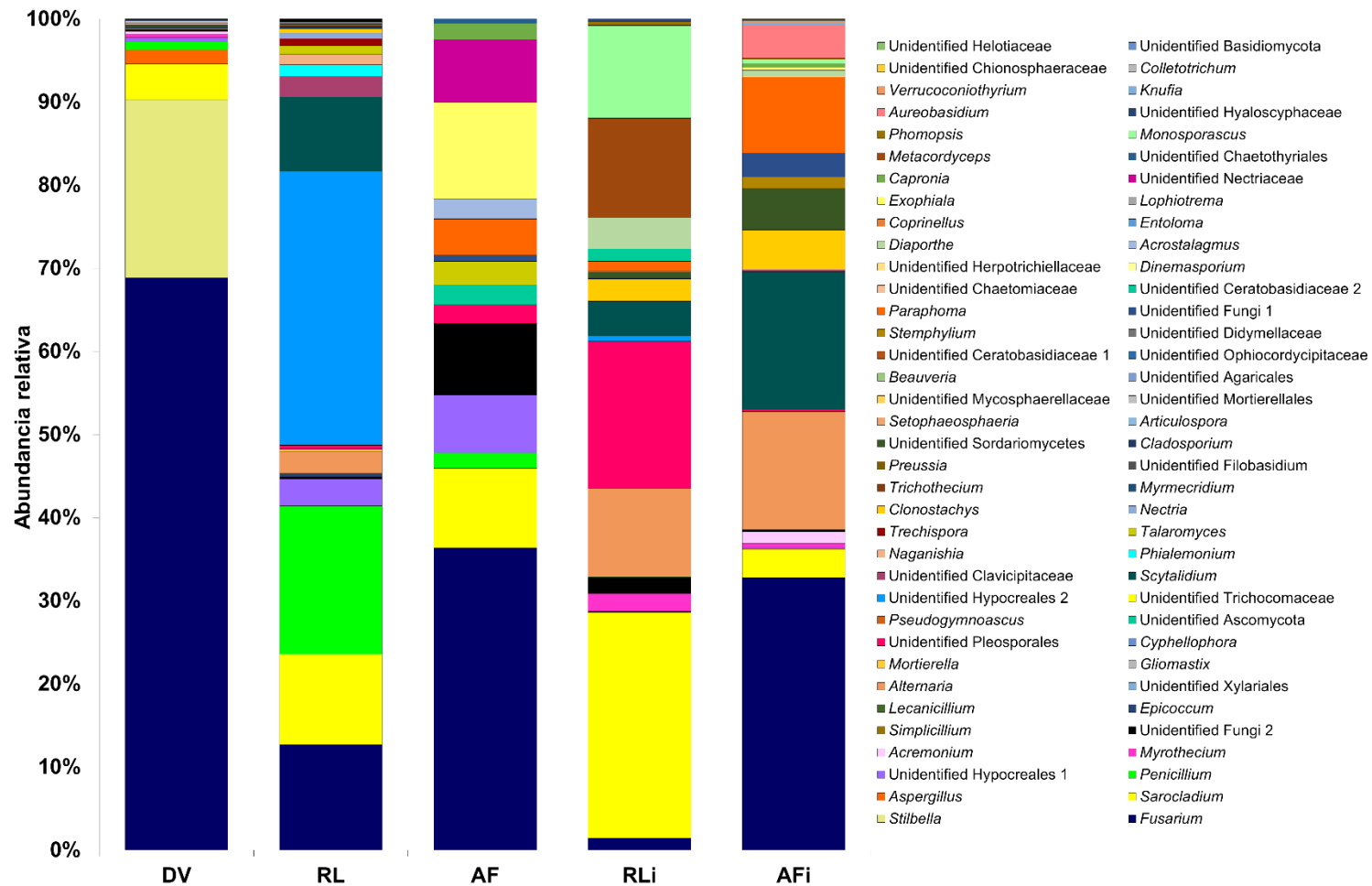


Figura 4. Identidad y abundancia relativa de los miembros de la comunidad fúngica presentes en el sustrato minero y dentro de las raíces de plantas establecidas en el Jal Viejo. DV: sitio no vegetado; RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus*; RLi: interior de las raíces de *Reseda luteola*; AFi: interior de las raíces de *Asphodelus fistulosus*.

La comunidad fúngica de los sustratos mineros de los tres sitios, así como del interior de las raíces de *R. luteola* y de *A. fistulosus* conformó dos grupos (Figura 5). El primer grupo estuvo constituido por el sitio desprovisto de vegetación, mientras que en el segundo se agruparon las comunidades de los sustratos mineros de los sitios RL y AF, así como del interior de las raíces de las dos plantas. La comunidad fúngica del sitio RL fue más parecida al sitio desprovisto de vegetación. La comunidad fúngica del interior de las raíces de *R. luteola* fue más parecida a la de los sitios DV y RL, mientras que la comunidad del interior de las raíces de *A. fistulosus* fue más semejante a los sitios RL y AF. Los géneros más abundantes en los sitios DV, RL y AF fueron *Fusarium*, *Sarocladium* y *Penicillium*; los sitios DV y RL compartieron *Alternaria* y *Mortierella*. El género *Stilbella* sólo fue observado en el sitio DV, mientras que *Scytalidium*, *Naganishia*, *Trechispora* y *Filobasidium* estuvieron presentes en el sitio RL, y *Exophiala* en el sitio AF. *R. luteola* y *A. fistulosus* compartieron en el interior de sus raíces *Alternaria*, *Scytalidium*, *Sarocladium* y *Fusarium*. *Metacordyceps* fue observado sólo en el interior de las raíces de *R. luteola*; *Exophiala* y *Naganishia* fueron detectados en el interior de las raíces de *A. fistulosus*. Es de destacar que *Penicillium* estuvo presente en los sustratos, pero ausente en el interior de las raíces de las dos plantas; *Fusarium* y *Sarocladium* se detectaron tanto fuera como dentro de las raíces de ambas plantas.



Figura 5. Análisis de la distribución de la comunidad fúngica en los sustratos mineros y en el interior de las raíces de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*. Los valores para cada taxón se describen según la intensidad del color. La abundancia se expresó como el valor de las secuencias objetivo a las secuencias filtradas totales para cada muestra. DV: sitio no vegetado; RL: sitio vegetado con *Reseda luteola*; AF: sitio vegetado con *Asphodelus fistulosus*; RLi: interior de las raíces de *Reseda luteola*; AFi: interior de las raíces de *Asphodelus fistulosus*.

4.3. Aislamiento, purificación, identificación molecular y caracterización de hongos endófitos septados oscuros cultivables del interior de las raíces de *Reseda luteola* y de *Asphodelus fistulosus*

A partir de las raíces desinfectadas de ambas especies vegetales se observaron hongos endófitos creciendo en el medio de cultivo (Figura 6). De un total de 300 fragmentos de raíces de *R. luteola*, sólo en el 3.6% se presentó colonización por hongos microscópicos cultivables. Por su parte, de los 300 fragmentos de raíz de *A. fistulosus*, el 75.67% presentó colonización fúngica. Estos aislados mixtos fueron purificados.

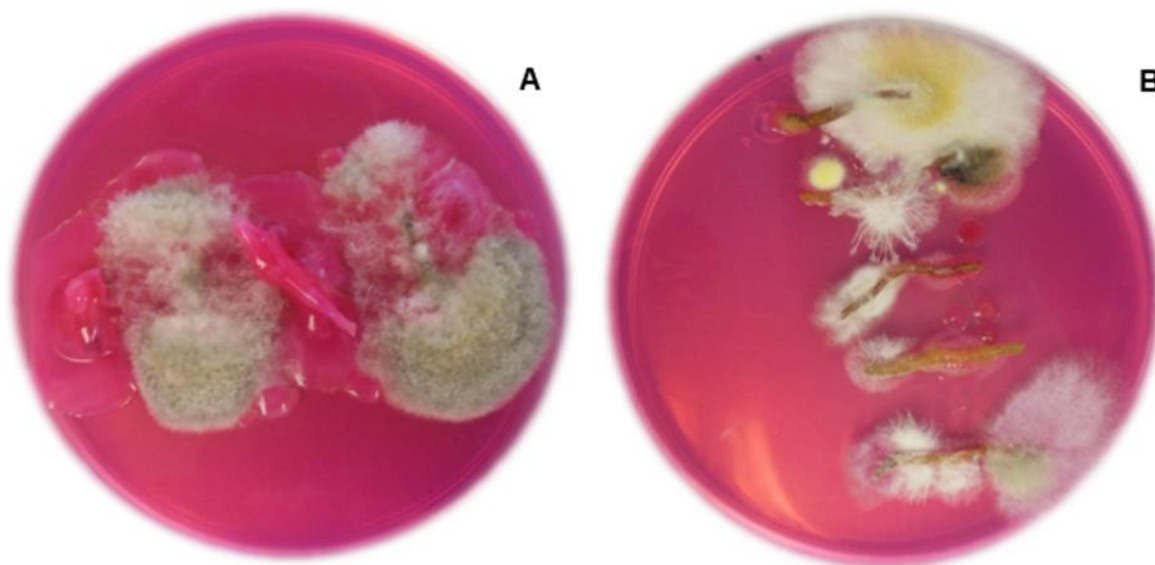


Figura 6. Hongos microscópicos desarrollados en el medio rosa de bengala procedentes del interior de las raíces de *R. luteola* (A) y de *A. fistulosus* (B), incubados en oscuridad a 28°C durante 10 días.

De los aislados mixtos se lograron purificar y caracterizar macro y micromorfológicamente 61 hongos ESO procedentes de ambas plantas (Cuadro 1). De las raíces de *R. luteola* se aislaron 33 hongos con características de ESO (Figura 7), y de las raíces de *A. fistulosus* se aislaron 28 hongos con características de ESO (Figura 8). Los hongos ESO son septados y generalmente tienen hifas melanizadas; además, pueden formar microesclerocios que son estructuras densamente septadas. Cabe señalar que la mayoría de los aislados de hongos ESO presentaron una pérdida de esporulación (sectorización) y manifestaron un crecimiento de micelio esponjoso en las colonias.

Cuadro 1. Descripción fenotípica de los aislados fúngicos de endófitos septados oscuros purificados, cultivados en medio PDA, procedentes del interior de las raíces de *Reseda luteola* y de *Asphodelus fistulosus*.

Aislados	<i>Reseda luteola</i>
RL-02	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro con borde blanco y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso en el centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y algunas hialinas.
RL-02a	Color de la colonia en el anverso y reverso, café oscuro y café claro, respectivamente; aspecto veloso ligeramente lanoso al centro; consistencia media; superficie de la colonia, plana. Hifas septadas hialinas.
RL-02b	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-03a	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-04	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-05	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto pulverulento ligeramente lanosa al centro; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas hialinas.
RL-06	Color de la colonia en el anverso y reverso, café oscuro; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-08a	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas hialinas.
RL-08b	Color de la colonia en el anverso y reverso, al principio café, al centro se oscurece y negro, respectivamente; aspecto veloso ligeramente flocoso al centro; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-08c	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas hialinas.
RL-08d	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas hialinas.
RL-08e	Color de la colonia en el anverso y reverso, al principio café, al centro se oscurece y negro, respectivamente; aspecto veloso ligeramente flocoso al centro; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-09	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso en toda la superficie; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas. Presencia de ralo veloso.
RL-11	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris oscuro con borde negro y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado lanoso en el centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
RL-11b	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro con borde blanco y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado, ligeramente flocosa; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-14	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro con borde negro y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.

RL-15	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
RL-16	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente flocoso al centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras. Presencia de ralo transparente ligeramente veloso.
RL-16b	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente flocoso al centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
RL-19	Color de la colonia en el anverso y reverso, café ligeramente grisáceo y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-20	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris verdoso y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
RL-21	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro grisáceo y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento ligeramente lanoso en el centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
RL-22	Color de la colonia en el anverso y reverso, café grisáceo y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-23	Color de la colonia en el anverso y reverso, café grisáceo y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente flocoso en el centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-24	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento ligeramente flocoso en el centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
RL-25	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo verdoso y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y presencia de exudados transparentes al borde de la colonia.
RL-26	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro grisáceo y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y presencia de exudados de color amarillo en el centro de la colonia.
RL-27	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris verdoso y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
RL-28	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro, respectivamente; aspecto aterciopelado pulverulento; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-29	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
RL-30	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro y grisáceo oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente flocoso en el centro; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras. Se visualizan anillos en la superficie de la colonia.
RL-31	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente flocoso en el centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras. Se visualizan anillos en la superficie de la colonia.
RL-38b	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento en el centro; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras. Hifas septadas oscuras y hialinas.
Aislados	<i>Asphodelus fistulosus</i>

AF-02	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro y negro, respectivamente; aspecto lanoso; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y conidios.
AF-04	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro con borde blanco y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras, micelio macrosifonado, macroconidios ligeramente redondos pardos con septos transversales y verticales.
AF-05	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro con el borde ligeramente verdoso y grisácea, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras, micelio macrosifonado, conidios ligeramente redondos pardos con septos transversales y verticales.
AF-06	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris oscuro con algunos bordes blancos y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto pulverulento y zonado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras, micelio macrosifonado.
AF-07	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro y negro con un tono verdoso al centro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso al centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras, micelio macrosifonado.
AF-08	Color de la colonia en el anverso y reverso, oscuro y cafégrisáceo, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso al centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Presencia de pigmentación de color amarillenta. Hifas septadas oscuras y hialina, micelio macrosifonado, macroconidios ovoides tabicados.
AF-09	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro con borde blanco y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras, micelio macrosifonado, conidios ligeramente redondos oscuros con septos transversales y verticales.
AF-10	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso al centro; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada; presencia de ralo veloso. Hifas septadas oscuras.
AF-11	Color de la colonia en el anverso y reverso, grisáceo oscuro con el borde blanco y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-12	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris verdoso con el borde blanco y gris oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
AF-13	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris oscuro con algunos bordes blancos y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto pulverulento y zonado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras, micelio macrosifonado.
AF-14	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro con el borde ligeramente verdoso y grisáceo, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras, micelio macrosifonado, conidios ligeramente redondos oscuros con septos transversales y verticales.
AF-15	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón ligeramente grisáceo y marrón, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia dura; superficie de la colonia, plana. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-15b	Color de la colonia en el anverso y reverso, marrón ligeramente grisáceo y marrón, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia dura; superficie de la colonia, plana. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-17	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro con presencia de ralo y grisáceo, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento y en el centro lanoso; consistencia dura; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
AF-18	Color de la colonia en el anverso y reverso, café grisáceo y grisáceo el centro ligeramente claro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento y en el centro lanoso; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas hialinas.
AF-19a	Color de la colonia en el anverso y reverso, café grisáceo y café oscuro, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente pulverulento; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
AF-22	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro con el borde blanco y negro, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia dura; superficie de la colonia,

	acuminada. Presencia de exudados en el centro, transparentes. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-24	Color de la colonia en el anverso y reverso, negro ligeramente marrón y marrón grisáceo, respectivamente; aspecto pulverulento; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-26	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris ligeramente verdoso y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-27	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris ligeramente verdoso y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Presencia de exudados en el centro, transparentes. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-28	Color de la colonia en el anverso y reverso, café grisáceo ligeramente amarillo hacia el borde y café oscuro con el borde amarillento, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso al centro; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Presencia de pigmentación amarillenta. Hifas septadas oscuras y hialina, micelio macrosifonado, macroconidos ovoides tabicados.
AF-29	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris ligeramente verdoso y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-30	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris claro y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia media; superficie de la colonia, convexa. Hifas septadas oscuras.
AF-31	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris claro y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras.
AF-31b	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris claro y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-31c	Color de la colonia en el anverso y reverso, gris claro y negro con el borde blanco, respectivamente; aspecto aterciopelado; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Hifas septadas oscuras y hialinas.
AF-105b	Color de la colonia en el anverso y reverso, café grisáceo ligeramente amarillo hacia el borde y café oscuro con el borde amarillento, respectivamente; aspecto aterciopelado ligeramente lanoso al centro; consistencia media; superficie de la colonia, acuminada. Presencia de pigmentación de color amarillenta. Hifas septadas oscuras y hialinas, micelio macrosifonado, macroconidos ovoides tabicados.

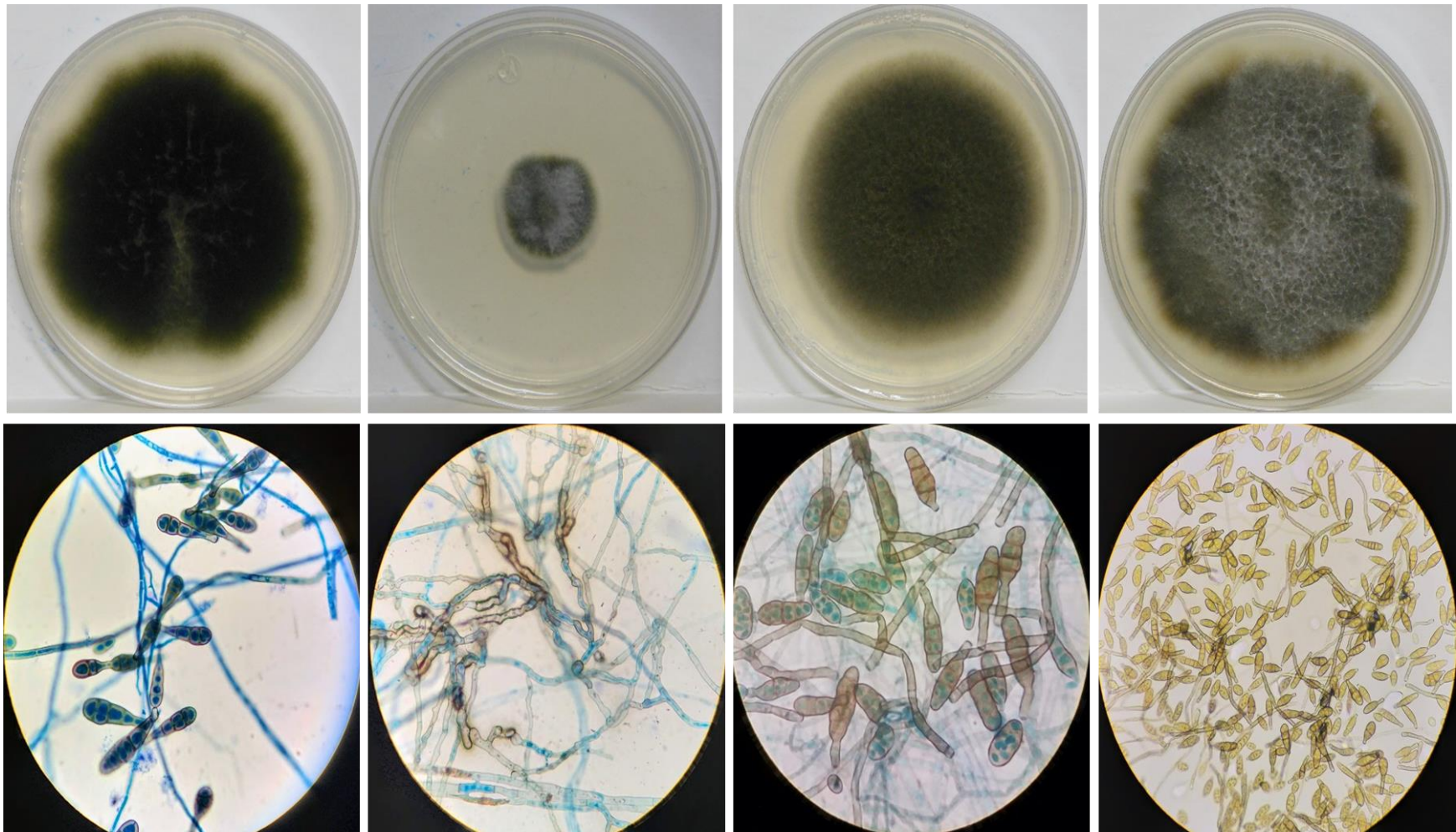


Figura 7. Macromorfología y micromorfología de algunos aislados de hongos endófitos septados oscuros procedentes del interior de las raíces de *Reseda luteola*.

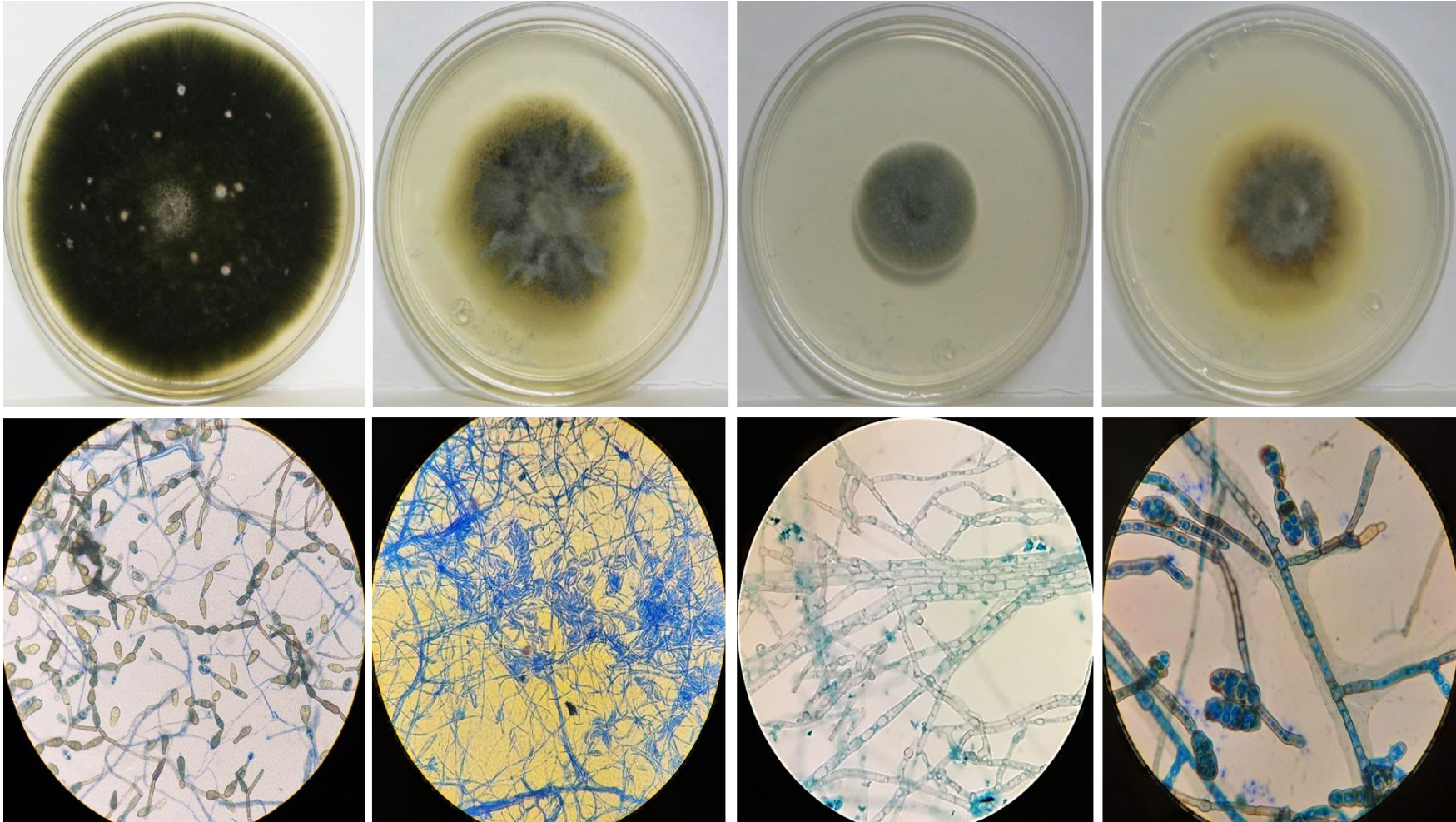


Figura 8. Macromorfología y micromorfología de algunos aislados de hongos endófitos septados oscuros procedentes del interior de las raíces de *Asphodelus fistulosus*.

4.3.1. Identificación molecular y análisis filogenético de las secuencias ITS de los aislados fúngicos de las raíces de *Reseda luteola* y de *Asphodelus fistulosus*

Se amplificó exitosamente la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2 rDNA) de cada uno de los hongos purificados. En la figura 9 se muestran dos gels representativos con el segmento amplificado de algunos de los aislados fúngicos. En cada caso se obtuvo un amplicón de entre 500 y 600 pares de bases (pb) que corresponde a la talla esperada.

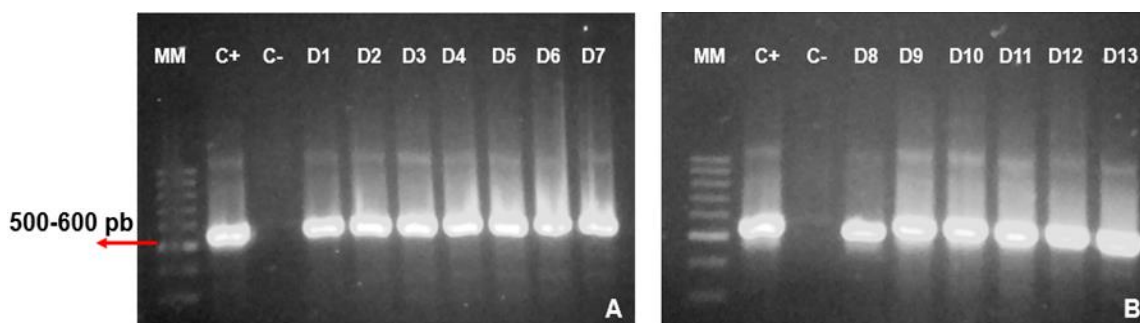


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con la región ITS del rDNA amplificada por PCR. MM: marcador molecular (100 pb); carril C+: control positivo *Fusarium* sp.; carril C-: control negativo *Helicobacter* sp.; A) carril D1:AF-02, carril D2: AF-04, carril D3: AF-05, carril D4: AF-08, carril D5: AF-13, carril D6: AF-17, carril D7: AF-28; B) carril D8: RL-02, carril D9: RL-04, carril D10: RL-06, carril D11: RL-11, carril D12: RL-14, carril D13: RL-15.

En total, 61 secuencias fúngicas cumplieron con el carácter para considerarse en el análisis de homología en el GenBank del NCBI. Las secuencias analizadas se agruparon en el Phylum Ascomycota, y a los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis* y *Stemphylium* (Cuadro 2). Un análisis filogenético permitió apreciar que las 33 secuencias de los hongos ESO aislados del interior de las raíces de *R. luteola* se agruparon en dos géneros, *Alternaria* y *Acrocalymma-Rhizopycnis*. Las 28 secuencias de los hongos ESO aislados del interior de las raíces de *A. fistulosus* se organizaron en cinco taxa, pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis* y *Stemphylium* (Figura 10). Estas 61 secuencias fueron depositadas en la biblioteca del NCBI y quedaron registradas con los números de accesoión OP630490-OP630551.

Cuadro 2. Identidad de los segmentos ITS amplificados y secuenciados pertenecientes a 61 aislados fúngicos purificados de endófitos septados oscuros procedentes del interior de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*, especies vegetales establecidas en residuos mineros de Zacatecas. Entre paréntesis, y en negritas se aprecia el número de accesión de la secuencia al ser registrada en el NCBI.

Especie vegetal	Aislado	Identidad	Taxón
Reseda luteola	RL-02 (OP630490 -578 pb), RL-02a (OP630491 -577 pb), RL-03a (OP630493 -576 pb), RL-04 (OP630494 -572 pb), RL-05 (OP630495 -548 pb), RL-06 (OP630496 -563 pb), RL-08a (OP630497 -562 pb), RL-08b (OP630498 -562 pb), RL-08c (OP630499 -579 pb), RL-08d (OP630500 -555 pb), RL-08e (OP630501 -551 pb), RL-09 (OP630502 -561 pb), RL-11b (OP630504 -563 pb), RL-14 (OP630505 -578 pb), RL-15 (OP630506 -576 pb), RL-16 (OP630507 -575 pb), RL-16b (OP630508 -576 pb), RL-19 (OP630509 -560 pb), RL-20 (OP630510 -552 pb), RL-29 (OP630519 -578 pb), RL-30 (OP630520 -567 pb)	99%	<i>Alternaria mali</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria brassicae</i> <i>Alternaria tenuissima</i>
	RL-11 (OP630503 -549 pb), RL-21 (OP630511 -548 pb), RL-22 (OP630512 -548 pb), RL-23 (OP630513 -546 pb) RL-24 (OP630514 -557 pb), RL-25 (OP630515 -546 pb), RL-26 (OP630516 -549 pb), RL-27 (OP630517 -563 pb), RL-28 (OP630518 -532 pb), RL-31 (OP630521 -569 pb), RL-38b (OP630522 - 549 pb)	99%	<i>Rhizopycnis vagum</i> <i>Acrocalymma vagum</i>
<i>Asphodelus fistulosus</i>	AF-02 (OP630523 -487 pb)	99%	<i>Alternaria solani</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tenuissima</i>
	AF-04 (OP630524 -570 pb), AF-05 (OP630525 -571 pb), AF-09 (OP630529 -497 pb), AF-14 (OP630534 -559 pb)	99%	<i>Colletotrichum liriopes</i> <i>Colletotrichum dematium</i> <i>Colletotrichum spaethianum</i>
	AF-06 (OP630526 -497 pb), AF-13 (OP630533 -551 pb)	99%	Ascomycota <i>Setophoma terrestres</i>
	AF-07 (OP630527 -510 pb), AF-08 (OP630528 -547 pb), AF-10 (OP630530 -523 pb), AF-11 (OP630531 -545 pb), AF-12 (OP630532 -520 pb), AF-15 (OP630535 -516 pb), AF-15b (OP630536 -559 pb), AF-17 (OP630537 -554 pb), AF-18 (OP630538 -555 pb), AF-19a (OP630540 -551 pb), AF-22 (OP630541 -581 pb), AF-24 (OP630542 -549 pb), AF-26 (OP630543 -551 pb), AF-27 (OP630544 -557 pb), AF-29 (OP630546 -551 pb), AF-30 (OP630547 -548 pb), AF-31 (OP630548 -548pb), AF-31b (OP630549 -520 pb), AF-31c (OP630550 -535 pb), AF-105b (OP630551 -571 pb)	100% y 99%	<i>Rhizopycnis vagum</i> <i>Acrocalymma vagum</i>
	AF-28 (OP630545 - 586 pb)	99%	<i>Stemphylium vesicarium</i> <i>Stemphylium eturmiunum</i>

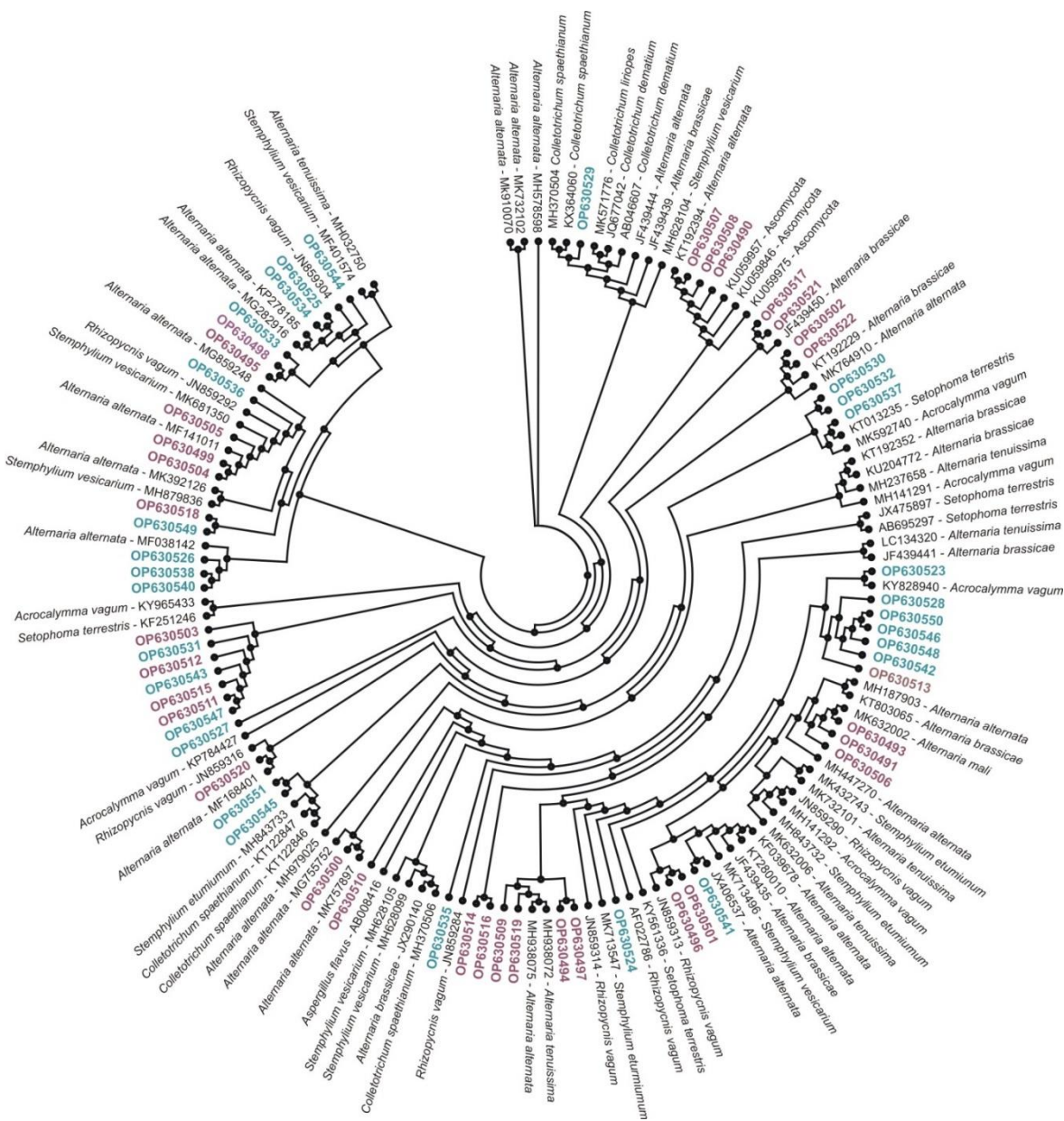


Figura 10. Árbol filogenético de los hongos ESO aislados de *Reseda luteola* (números de accesoión NCBI en rosado) y *Asphodelus fistulosus* (números de accesoión NCBI en azul), generado con el criterio de máxima verosimilitud (1,000 bootstrap) construido sobre la base de 550 pb de la región ITS2-5.8S- ITS1 rDNA con el modelo evolutivo K80+G, con un valor gamma de 0.1620; *Aspergillus flavus* se utilizó como grupo externo.

4.4. Tolerancia a plomo y cadmio por los hongos endófitos septados oscuros (ESO) aislados de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

En la tabla 6 se muestra la velocidad de crecimiento radial de los cinco aislados fúngicos de ESO en presencia de tres concentraciones de Pb (71.5, 143 y 214.5 mg Pb L⁻¹) y de Cd (3.3, 6.6 y 9.9 mg Cd L⁻¹). El aislado AF-04 no presentó diferencias entre los tratamientos con Pb y sin Pb; sin embargo, creció significativamente más ($p < 0.01$) en ausencia de Cd (68.4 mm) con respecto a los tres tratamientos con Cd. El aislado AF-06 presentó una velocidad de crecimiento radial significativamente más alta a las concentraciones de 143 y 214.5 mg Pb L⁻¹, que en los tratamientos sin Pb y con 71.5 mg Pb L⁻¹; para el caso del Cd, la velocidad de crecimiento radial en el tratamiento a la concentración de 9.9 mg Cd L⁻¹ fue significativamente más alta ($p < 0.01$) con respecto al resto de los tratamientos. En el aislado AF-27 en presencia de Pb, la velocidad de crecimiento radial en los tratamientos sin Pb y a las concentraciones de 143 y 214.5 mg Pb L⁻¹ fue significativamente más elevada ($p < 0.01$) que a una concentración de 71.5 mg Pb L⁻¹ (47.2 mm); en Cd, no hubo diferencias significativas entre el tratamiento sin Cd y el tratamiento que tiene la mayor concentración de Cd (9.9 mg Cd L⁻¹), sin embargo si presentó diferencias significativas ($p < 0.01$) con los tratamientos a las concentraciones de 3.3 y de 6.6 mg Cd L⁻¹, así mismo hubo diferencias significativas entre las concentraciones de 9.9 mg Cd L⁻¹ y 3.3 mg Cd L⁻¹. En los tratamientos con Pb, el crecimiento del aislado AF-28 fue significativamente menor a la concentración de 71.5 mg Pb L⁻¹ con respecto al resto de tratamientos; en Cd, el tratamiento sin Cd fue significativamente diferente ($p < 0.01$) a los demás tratamientos al presentar la velocidad de crecimiento radial más alta. La velocidad de crecimiento radial en el aislado RL-19 no presentó diferencias significativas entre los tratamientos sin metal y con metal.

Cabe resaltar que prácticamente los cinco aislados, cultivados en presencia de las tres concentraciones de Pb, la velocidad de crecimiento radial fue más elevada que en presencia de las tres concentraciones de Cd (Tabla 6). Es decir, los hongos se vieron más afectados por el Cd que por el Pb.

Tabla 6. Velocidad de crecimiento radial (mm) de cinco aislados fúngicos de endófitos septados oscuros aislados de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, cultivados en presencia y en ausencia de plomo y cadmio (media±ES; n=5).

Aislado fúngico	Plomo				F (p)
	Testigo	71.5 mg L ⁻¹	143 mg L ⁻¹	214.5 mg L ⁻¹	
AF-04 <i>Colletotrichum</i>	68.4 ±0.67a	68.8 ±1.74a	69.2 ±0.73a	69.2 ±0.51a	0.25 (0.86)
AF-06 <i>Setophoma</i>	61.6 ±0.51b	62.2 ±0.58b	64.2 ±0.58a	64.0 ±0.44a	5.89 (<0.01)
AF-27 <i>Acrocalymma-Rhizopycnis</i>	49.2 ±0.37a	47.2 ±0.58b	49.2 ±0.20a	49.8 ±0.37a	7.81 (<0.01)
AF-28 <i>Stemphylium</i>	56.8 ±0.58a	54.4 ±0.40b	57.6 ±0.24a	56.8 ±1.02a	4.80 (0.01)
RL-19 <i>Alternaria</i>	62.2 ±0.49a	62.8 ±1.35a	64.8 ±0.58a	63.6 ±0.24a	2.03 (0.14)
Aislado fúngico	Cadmio				F (p)
	Testigo	3.3 mg L ⁻¹	6.6 mg L ⁻¹	9.9 mg L ⁻¹	
AF-04 <i>Colletotrichum</i>	68.4 ±0.67a	63.8 ±0.91b	62.6 ±0.67b	63.2 ±0.58b	13.3 (<0.01)
AF-06 <i>Setophoma</i>	61.6 ±0.51b	61.8 ±0.37b	62.8 ±0.37b	64.8 ±0.49a	10.9 (<0.01)
AF-27 <i>Acrocalymma-Rhizopycnis</i>	49.2 ±0.83a	46.8 ±0.37b	47.6 ±0.40bc	48.4±1.31ac	6.09 (<0.01)
AF-28 <i>Stemphylium</i>	56.8 ±0.58a	46.0 ±0.70b	44.2 ±1.90b	48.0 ±1.30c	20.2 (<0.01)
RL-19 <i>Alternaria</i>	62.2 ±0.49a	61.4 ±0.92a	60.4 ±0.98a	61.4 ±0.74a	0.83 (0.49)

Para cada EPT, diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Los cinco aislados fúngicos produjeron biomasa en presencia y en ausencia de Pb y Cd (Tabla7). El aislado AF-04 no presentó diferencias significativas entre tratamientos; en ausencia de Pb la producción de biomasa fue la más elevada, pero conforme se adicionó el Pb la biomasa fue disminuyendo; se observó la mayor producción de biomasa en el tratamiento sin Cd, disminuyó a una concentración de 3.3 y de 6.6 mg Cd L⁻¹ pero volvió a incrementarse a una concentración de 9.9 mg Cd L⁻¹. El aislado AF-06 no tuvo diferencias significativas entre tratamientos con y sin metal; la mayor producción de biomasa en Pb se apreció a 143 mg Pb L⁻¹, mientras que en Cd fue a una concentración de 9.9 mg Cd L⁻¹. En el aislado AF-27 no hubo diferencias significativas entre tratamientos con Pb y Cd; la mayor producción de biomasa se apreció a una concentración de 214.5 mg Pb L⁻¹ y en ausencia de Cd. El aislado AF-28 no presentó diferencias significativas entre tratamientos, la mayor

producción de biomasa fue en ausencia de los metales. El aislado RL-19 no tuvo diferencias significativas en los tratamientos en presencia y ausencia de Pb y Cd; la mayor producción de biomasa en Pb fue a la concentración de 143 mg Pb L⁻¹, y en ausencia de Cd.

Tabla 7. Producción de biomasa (mg g⁻¹) de cinco aislados fúngicos de endófitos septados oscuros aislados de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, cultivados en presencia y en ausencia de plomo y cadmio (media±ES; n=5).

Aislado fúngico	Plomo				F (p)
	SM	71.5 mg L ⁻¹	143 mg L ⁻¹	214.5mg L ⁻¹	
AF-04 <i>Colletotrichum</i>	280 ±21.6a	240 ±24.3a	210 ±9.00a	161 ±18.2a	0.21 (0.89)
AF-06 <i>Setophoma</i>	90.0 ±6.00a	60.0 ±27.0a	100 ±7.00a	70.0 ±20.6a	1.38 (0.31)
AF-27 <i>Acrocalymma- Rhizopycnis</i>	110 ±12.0a	90.0 ±39.7a	100 ±5.00a	120 ±4.00a	0.40 (0.76)
AF-28 <i>Stemphylium</i>	119 ±13.2a	65.0 ±16.8a	79.0 ±31.0a	59.0 ±5.00a	1.98 (0.19)
RL-19 <i>Alternaria</i>	270 ±13.3a	300 ±43.3a	320 ±49.1a	310 ±3.00a	1.62 (0.26)

Aislado fúngico	Cadmio				F (p)
	SM	3.3 mg L ⁻¹	6.6 mg L ⁻¹	9.9 mg L ⁻¹	
AF-04 <i>Colletotrichum</i>	280 ±21.6a	240 ±19.7a	180 ±37.4a	220 ±50.1a	0.16 (0.92)
AF-06 <i>Setophoma</i>	90.0 ±6.00a	50.0 ±30.1a	100 ±8.00a	130 ±28.8a	2.45 (0.14)
AF-27 <i>Acrocalymma- Rhizopycnis</i>	119 ±5.00a	100 ±33.1a	68 ±23.6a	81 ±62.3a	0.81 (0.49)
AF-28 <i>Stemphylium</i>	120 ±13.2a	100 ±12.5a	70.0 ±3.00a	80.0 ±43.3a	0.88 (0.49)
RL-19 <i>Alternaria</i>	300 ±75.5a	230 ±18.2a	220 ±26.0a	280 ±35.1a	0.76 (0.55)

Para cada EPT, diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de LSD de Fisher ($p < 0.05$).

4.5. Solubilización de fosfato de los aislados fúngicos de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus* en presencia y en ausencia de plomo y cadmio

Tanto en ausencia como en presencia de Pb (143 mg Pb L^{-1}) y de Cd (6.6 mg Cd L^{-1}), y a un pH de 6 y de 8, los cinco aislados fúngicos mostraron actividad solubilizadora de fosfato según los halos formados alrededor de las colonias (Tabla 8). El aislado AF-04, a pH 6 en presencia de Pb (134 %) tuvo la mayor eficiencia, mientras que el menor nivel se apreció en Cd (111 %); la eficiencia fue similar a pH 8 en el tratamiento sin metal (119 %) y con Pb (120 %). Cabe señalar que los halos de solubilización de fosfato en Pb fueron más tenues que en los tratamientos sin metal y con Cd (Figura 12). El aislado AF-06 presentó a pH 6 la mayor eficiencia de solubilización con Pb (155 %), y la colonia fúngica tuvo un tamaño de 11.2 mm; a pH 8 no se observó halo alguno en presencia de Pb y la colonia fúngica (19.4 mm) presentó un color café oscuro; en los tratamientos sin metal y con Cd se observó la misma eficiencia (133 %), la macromorfología de las colonias fue diferente entre las cajas a pH 6 y a pH 8 (Figura 12). En el aislado AF-27, a pH 6 se observó la mayor eficiencia de solubilización de fosfato en el tratamiento con Cd (173 %), seguido por el tratamiento sin metal (149 %) y por último en presencia de Pb (114 %) con un halo de solubilización tenue. A pH 8 la mayor eficiencia fue en el tratamiento con Cd (157 %), seguido por el tratamiento sin metal (119 %), pero en presencia de Pb no se observó halo alguno; cabe señalar que las colonias fúngicas fueron ligeramente más grandes a pH 8 que a pH 6 (Figura 12). En el aislado AF-28 a pH 6, los tratamientos con Pb (115 %) y Cd (109 %) presentaron la mayor solubilización de fosfato con respecto al tratamiento sin metal donde no se observó halo de solubilización; a pH 8 sólo se presentó un halo en presencia de Cd (112 %); sí hubo diferencias en la macromorfología entre los tratamientos a este pH (Figura 12). El aislado RL-19 a pH 6 exhibió la mayor solubilización en el tratamiento sin metal (121 %) y la menor solubilización en el tratamiento con Pb (107 %); a pH 8 la mayor solubilización se observó en presencia de Pb (132 %), sin embargo, en los tratamientos sin metal (115 %) y con Cd (116 %) la solubilización fue muy similar. Cabe señalar que el halo fue tenue en presencia de Pb, mientras que en ausencia de metal los halos fueron más definidos (Figura 12).

Tabla 8. Eficiencia relativa de solubilización de fosfato (ERSF) de cinco aislados fúngicos provenientes de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, en presencia y en ausencia de plomo y cadmio a pH 6 y pH 8 (media±ES; n=5).

Aislado fúngico	pH6									pH8								
	SM			Pb			Cd			SM			Pb			Cd		
	DS (mm)	DC (mm)	ERSF (%)	DS (mm)	DC (mm)	ERSF (%)	DS (mm)	DC (mm)	ERSF (%)	DS (mm)	DC (mm)	ERSF (%)	DS (mm)	DC (mm)	ERSF (%)	DS (mm)	DC (mm)	ERSF (%)
AF-04	61.2 ±0.97	54.0 ±1.67	113	62.8 ±0.83	46.8 ±1.65	134	52.8 ±0.80	47.4 ±0.92	111	64.6 ±1.28	54.2 ±1.93	119	56.4 ±1.43	47.0 ±2.28	120	54.6 ±0.50	47.2 ±1.42	116
AF-06	25.0 ±1.09	19.8 ±0.73	126	17.4 ±0.51	11.2 ±0.49	155	22.8 ±0.49	17.8 ±0.37	128	25.8 ±0.73	19.4 ±1.50	133	ND	19.4 ±0.24	ND	25.6 ±0.92	19.2 ±0.58	133
AF-27	47.6 ±0.67	32.0 ±1.48	149	40.0 ±0.54	35.0 ±1.00	114	39.8 ±0.49	23.0 ±0.44	173	53.0 ±0.89	44.4 ±1.43	119	ND	31.6 ±0.60	ND	44.4 ±1.03	28.2 ±2.22	157
AF-28	ND	38.2 ±0.20	ND	25.2 ±1.65	22.0 ±1.51	115	36.0 ±0.54	33.0 ±0.44	109	ND	35.0 ±1.37	ND	ND	96.0 ±0.81	ND	36.4 ±0.92	32.6 ±0.74	112
RL-19	57.2 ±0.97	47.2 ±0.58	121	45.2 ±0.49	42.2 ±0.37	107	51.8 ±0.37	43.6 ±0.87	119	58.6 ±0.74	50.8 ±0.97	115	65.2 ±1.46	49.4 ±1.24	132	56.6 ±0.98	48.6 ±1.72	116

SM: Sin metal; Pb: Plomo; Cd: Cadmio

DS: Diámetro de solubilización de fosfato; DC: Diámetro de la colonia; ND: No determinado.

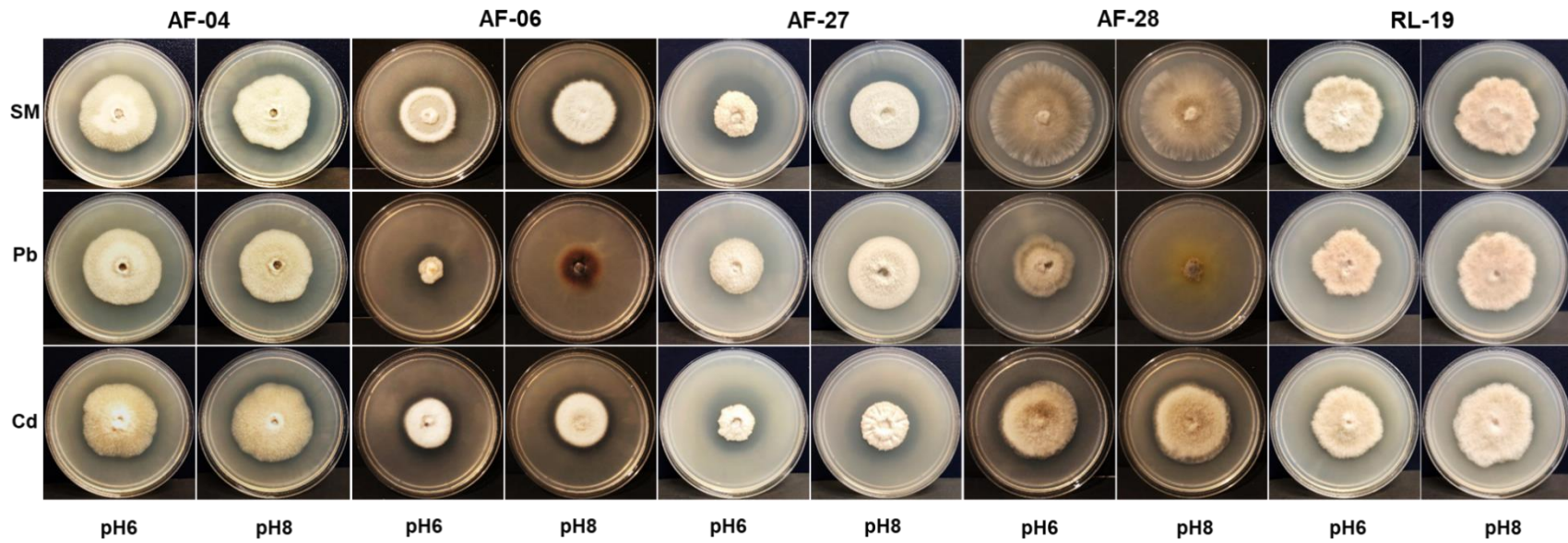


Figura 11. Halo de solubilización de fosfato formado por los cinco aislados fúngicos provenientes de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*, en presencia y en ausencia de plomo y cadmio a pH 6 y pH 8.

Capítulo 5. Discusión

El depósito a cielo abierto de residuos mineros es un reto ambiental global contemporáneo; México se enfrenta a esta problemática en forma acentuada debido a su tradición minera. En el Jal Viejo, los materiales depositados en un área de por lo menos 13 Ha contienen niveles tóxicos de Pb, Cd y As; estos residuos se encuentran próximos a comunidades humanas, mantos freáticos y zonas de cultivo. Los potenciales riesgos toxicológicos son evidentes. El Jal Viejo constituye un caso de residuos mineros abandonados a la intemperie que permite monitorear el comportamiento natural de los materiales.

5.1. Caracterización de los residuos mineros

5.1.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos mineros

El presente trabajo pone en evidencia las condiciones de un depósito de residuos mineros a cielo abierto, abandonado desde hace decenas de años en una región semiárida. Diferentes especies vegetales se han establecido en áreas específicas del Jal Viejo. El contraste entre una zona no vegetada y dos zonas vegetadas con especies diferentes, *R. luteola* y *A. fistulosus*, permitió identificar la influencia positiva de la cobertura vegetal y del efecto particular de la rizosfera en la mitigación natural de las condiciones adversas de los residuos mineros. Las plantas estudiadas en el Jal Viejo, *R. luteola* y *A. fistulosus*, tienen un intervalo amplio de distribución; al ser consideradas especies invasoras naturalizadas (CONABIO, 2021), se ha observado que sobreviven en jales con altos contenidos de EPT (Carrillo González y González-Chávez, 2006; Salas-Luevano et al., 2017).

Los jales, en general, poseen una estructura física inestable, concentraciones altas de EPT y bajo contenido en nutrientes, por lo que no son propicios o implican condiciones de estrés muy particulares para el desarrollo vegetal (Ye et al., 2002; Asensio et al. 2013, Wang, 2017). Los tres sitios del Jal Viejo presentaron una dominancia en arenas, característica que influye en el establecimiento vegetal (Hernández Acosta et al., 2009). Destacó el sitio vegetado AF con el contenido de arenas más alto (63.2%), lo que estuvo ligado a la capacidad de retención de agua más baja, 4.75% (Conesa et al., 2006). De forma contraintuitiva, los sustratos de los sitios vegetados RL y AF presentaron una conductividad eléctrica más reducida que el sitio no vegetado; los valores más altos ($1,485 \mu\text{S cm}^{-1}$) en el sitio sin vegetación pueden atribuirse a la presencia de sales solubles residuales que son fuente primaria de los EPT como el Pb, Cd, Zn, As, Cu y Fe (Gutiérrez-Ruiz et al., 2007; Pérez-Martínez y Romero, 2015). El pH en los tres sitios de estudio fue de neutro (RL) a moderadamente alcalino (DV y AF), lo que señala que los jales mineros no generan drenaje

ácido (Pérez-Martínez y Romero, 2015). Las especies vegetales en los sitios RL y AF podrían estar modificando las condiciones del jal para favorecer su crecimiento, por lo cual los pH van de neutros a alcalinos (Conesa et al., 2006). Tahar y Keltoum (2011) reportaron que un intervalo de pH de 6.5 a 8.76 favoreció la disponibilidad de nutrimentos para las plantas y la toxicidad de los EPT disminuyó, además de que estimuló una mayor actividad metabólica de los microorganismos aledaños a su rizosfera.

5.1.2. Concentración total y coeficiente de nutrientes en sustratos mineros y biomasa vegetal

El C, el N y el P son elementos clave en los procesos ecosistémicos del suelo; al mantener los ciclos biogeoquímicos mismos que transfieren energía, promueven la producción de biomasa y la descomposición de la materia orgánica. En los residuos mineros, las concentraciones de C, N, y P fueron más bajas en comparación con las de los suelos (Zheng et al., 2021), lo que destaca las deficiencias de nutrientes en el jal. Las concentraciones más altas de C en los sitios con vegetación en comparación con el sitio sin vegetación del Jal Viejo demostraron un papel positivo de la cubierta vegetal que proporciona un ambiente edáfico con este nutriente. Las proporciones más altas de C:N y C:P en los sustratos vegetados con *R. luteola* están vinculadas a tasas de descomposición lentas como consecuencia de contenidos reducidos de N y P. El contenido de C, N y P en los tejidos vegetales alcanzó los niveles medios encontrados en plantas de diferentes biomas (Tang et al., 2018), reforzando nuevamente el papel de los parches de vegetación en la mejora de las condiciones de los jales. *R. luteola* y *A. fistulosus* se pueden considerar plantas “nodrizas” al tener la capacidad de establecerse en sitios con estrés abiótico, transformar el microclima debajo de ellas y mejorar la fertilidad de estos sitios al suministrar materia orgánica a los microorganismos asociados (Navarro-Cano et al., 2018).

5.1.3. Concentración de elementos potencialmente tóxicos en los sustratos mineros, tejidos vegetales y factor de bioconcentración

Los jales, al ser dispersados por acción hídrica y eólica, implican amenazas ambientales debido a la cantidad elevada de EPT que persisten en los ecosistemas como contaminantes, y pueden afectar y ser acumulados por los seres vivos (Gutiérrez-Ruiz et al., 2007; Liu et al., 2019). Este estudio considera como críticas las concentraciones totales de Pb (400 mg kg^{-1}), Cd (20 mg kg^{-1}), As (22 mg kg^{-1}) y Cu (100 mg kg^{-1}) en suelos, acorde con la NOM-141-semarnat-2003, Carrillo González y González-Chávez (2006) y con Kabata-Pendias (2011). El Jal Viejo representa un problema ambiental por contener altos

niveles de Pb, Cd y As. Romero et al. (2008) reportaron en un jal niveles menores de Pb ($2,034 \text{ mg kg}^{-1}$), pero el As (851 mg kg^{-1}) y el Cu ($12,735 \text{ mg kg}^{-1}$) fueron superiores a los del sitio desprovisto de vegetación. En un jal reforestado, un sitio vegetado con *A. fistulosus* presentó contenidos de Pb (512 mg kg^{-1}) y Cd (13 mg kg^{-1}) inferiores a los del Jal Viejo (Salas-Luevano et al., 2017); sin embargo, el As ($4,387 \text{ mg kg}^{-1}$) fue más alto que en el sitio AF. Al apreciar las concentraciones de EPT en los tres sitios del Jal Viejo, el hecho más sobresaliente fue que en los sustratos vegetados el contenido de EPT fue notoriamente inferior que en el sitio desprovisto de vegetación: en presencia de *R. luteola*, el nivel de EPT se redujo entre 48% y 85%, y en presencia de *A. fistulosus*, la disminución estuvo entre 2% y 46%. En este sentido, ambas especies vegetales fitoestabilizaron y/o fitoacumularon una fracción relevante de los EPT, lo que explica por qué los sustratos de los sitios vegetados tuvieron menor concentración de EPT (Borymski et al., 2018).

La estabilización y/o acumulación de los EPT están determinadas por el genotipo vegetal, las asociaciones microbianas en la rizosfera, las condiciones ambientales (Borymski et al., 2018; Sing et al., 2016) y por el mismo EPT; ello explica las variaciones entre ambas especies vegetales en relación a su impacto en el contenido de EPT, en los sustratos. En el sitio RL el contenido alto de arcillas en el sustrato favoreció el secuestro y la reducción de la disponibilidad de EPT (Prieto Méndez et al., 2009). El sustrato del sitio AF, constituido en su mayoría por arenas, pudo contribuir con la baja biodisponibilidad de los EPT (Baker et al., 2010). Las concentraciones de EPT en el sitio AF fueron más altas con respecto al sitio RL. *A. fistulosus* es una especie perenne y podría estar aportando continuamente materia orgánica a los sustratos formando un microcosmos que favorece no sólo la tolerancia a EPT, sino también el aumento de los procesos ecológicos de mineralización y reciclado de nutrimentos en los jales abandonados (Epelde et al., 2010; Elizondo et al., 2016; Wang, 2017).

Las concentraciones de EPT en tejidos de *R. luteola* y de *A. fistulosus* fueron más bajas que en el sustrato correspondiente de ambas especies. Esto puede atribuirse a que existió un porcentaje bajo de EPT solubles, relacionado con el ambiente alcalino del sustrato minero (Ye et al., 2015). Las especies vegetales absorben y acumulan EPT en las raíces (fitoestabilización) o los trasladan de las raíces a los tejidos aéreos (fitoextracción) (Bhatti et al., 2018; Yan et al., 2020). Las concentraciones observadas en las raíces y en los tejidos aéreos de *R. luteola* y *A. fistulosus*, demuestran que los elementos esenciales son captados en mayor cantidad que los no esenciales (Bhatti et al., 2018). El Pb, Cd y As al no ser

esenciales, presentaron las concentraciones más bajas (Nagajyoti et al., 2010). Las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus* acumularon concentraciones menores de EPT que los tejidos aéreos. Yan et al. (2020) mencionan que las raíces son una barrera que evita la entrada de los EPT en los tejidos aéreos; sin embargo, en este estudio las raíces permitieron la traslocación de los iones metálicos hacia las partes aéreas. En conjunto, las raíces y los tejidos aéreos de *A. fistulosus* superaron los niveles máximos de acumulación en plantas de Pb (100 mg kg⁻¹), Cd (30 mg kg⁻¹) y Cu (20 mg kg⁻¹) propuestos por Kabata-Pendias (2011). En *R. luteola* sólo el Cu (31.4 mg kg⁻¹) superó el nivel máximo. En un jal reforestado (Salas-Luevano et al., 2017), *A. fistulosus* acumuló en sus tejidos aéreos concentraciones de Pb (31 mg kg⁻¹) y Cd (6.0 mg kg⁻¹) menores que en este estudio, sin embargo, el As (921 mg kg⁻¹) fue más elevado. Por otro lado, Carrillo González y González-Chávez (2006) reportaron concentraciones más elevadas de Cd (12 mg kg⁻¹) y Pb (32 mg kg⁻¹), menores niveles de Cu (10 mg kg⁻¹) en los tejidos aéreos de *R. luteola*, pero el Cd (6 mg kg⁻¹), Pb (104 mg kg⁻¹) y Cu (8 mg kg⁻¹) en los tejidos aéreos de *A. fistulosus* fueron inferiores a lo reportado aquí. Estas divergencias pueden deberse al ecotipo vegetal, al elemento en cuestión y a su concentración, entre otros factores (Baker et al 2010).

La acumulación de EPT en sus tejidos aéreos fue menor a 1,000 mg kg⁻¹; *R. luteola* y *A. fistulosus* no son especies hiperacumuladoras (Baker and Brooks, 1989). No obstante, ambas plantas toleran y acumulan EPT en sus diferentes tejidos y es a través del empleo de los factores de bioconcentración (FBC) y traslocación (FT) que se puede evaluar el potencial de cada una de ellas para ser utilizadas en fitorremediación (Yoon et al., 2006; Bhatti et al., 2018). Los valores de FBC para Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe y Mn en *R. luteola* y *A. fistulosus* fueron < 1, aun cuando *A. fistulosus* acumuló en sus raíces niveles más altos de Pb (94.5 mg kg⁻¹), Cd (17.8 mg kg⁻¹), As (2.03 mg kg⁻¹) y Cu (14.3 mg kg⁻¹) que *R. luteola*. Sin embargo, hubo cierta eficiencia para absorber Cu (FBC = 0.43) por parte de *A. fistulosus*. Carrillo González y González-Chávez (2006) mostraron que el FBC en *A. fistulosus*, fue superior a 1 para Pb (2.0) y Cd (1.2). La concentración total de EPT en los tejidos aéreos es el parámetro más importante para evaluar el potencial de fitoextracción de una planta; el FT es un indicador de la movilidad de los EPT en los tejidos vegetales (Zaier et al., 2010; Amin et al., 2018). En el presente estudio, *R. luteola* fue más eficiente en la traslocación de Mn (FT=7.19), seguido por Zn (FT=3.78), Cu (FT=3.46), Cd (FT=3.41) y finalmente Fe (FT=2.18) y Pb (FT=1.49), donde los nutrientes esenciales tuvieron mayor eficiencia de traslocación. En *A. fistulosus* la traslocación más eficiente fue de Mn (FT=2.75), seguida por Cd (FT=1.97), Zn (FT=1.45), Fe (FT=1.42) y Cu (FT=1.19). Una

mayor absorción de Cd que de Zn en los tejidos aéreos de *A. fistulosus* sugiere una competencia entre ambos elementos (Amin et al., 2018). Por otro lado, *A. fistulosus* no fue eficiente para la traslocación de Pb (FT=0.38). La captación elevada de Pb afecta la morfología, el crecimiento y los procesos fotosintéticos de las plantas (Nagajyoi et al. 2010); *A. fistulosus* evita traslocar el Pb de sus raíces hacia los tejidos aéreos para disminuir su toxicidad. La tolerancia de las especies vegetales a la toxicidad por EPT, así como su adaptabilidad a las condiciones ambientales locales, son claves en la eficiencia de la fitoextracción (Salas-Luevano et al., 2017). En este estudio se observó que *R. luteola* y *A. fistulosus* tienen un potencial para fitoextraer Pb, Cd y Cu en jales contaminados.

5.1.4. Actividad microbiana en los sustratos mineros

La elevada concentración de EPT en los residuos mineros puede inhibir la actividad enzimática en forma directa mediante la inmovilización de las enzimas, o indirecta, como consecuencia de la toxicidad sobre los microorganismos (Tunç y Demir, 2019). Sin embargo, el establecimiento de vegetación puede modificar diferencialmente este efecto, como se observó en los tres sitios, particularmente sobre el incremento en la actividad β -glucosidasa y deshidrogenasa en *A. fistulosus*, y en la tendencia al incremento en la actividad polifenoloxidasas y fosfomonoesterasa en el sustrato asociado a ambas especies, en contraste con el sustrato sin vegetación. Lo anterior fue consistente con la tasa de mineralización de carbono más alta ($15.1 \mu\text{g C g}^{-1} \text{d}^{-1}$) en el sitio vegetado AF, cuyos valores reflejan un elevado aporte de materia orgánica vegetal, lo que favorece la actividad microbiana y el suministro de nutrientes en los sustratos mineros (Borymski et al., 2018). *A. fistulosus* tiene un crecimiento profuso, con una elevada producción de biomasa que es depositada en el piso; en contraste, *R. luteola* es una planta con una producción de biomasa menor. Además de los EPT, la actividad enzimática en los sitios de estudio también está determinada por otros factores físicos, químicos y biológicos que perjudican la interacción metal-enzima (Karaca et al., 2010).

5.2. Identificación molecular y análisis de la comunidad fúngica global en los sustratos mineros y en tejido radical de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

Los EPT presentes en los jales afectan de manera negativa las plantas, así como la densidad, actividad y diversidad de los microorganismos (Epelde et al., 2010). Sin embargo, los microorganismos de la rizosfera pueden incrementar la tolerancia vegetal contra los EPT (Yamaji et al., 2016). Los hongos tienen la aptitud de tolerar y adaptarse al estrés metálico y pueden promover la evolución de ecotipos tolerantes a EPT (Gadd, 1993; Anahid et al.,

2011; Likar y Regvar, 2013). Mediante secuenciación masiva se llevó a cabo un análisis de la comunidad global fúngica en el interior y en el exterior de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*; por comparación, se analizó la comunidad del sustrato no vegetado; en todos los casos prevalecieron los hongos formadores de micelio. Cao y Liu (2015) mencionan que los hongos filamentosos reducen la biodisponibilidad y toxicidad de EPT. Es de resaltar que los sustratos mineros aledaños a las raíces de *R. luteola* (2.62) y *A. fistulosus* (2.51) mostraron mayor diversidad fúngica que el sitio desprovisto de vegetación (1.47); en este último, las concentraciones más altas de EPT pudieron afectar la diversidad (Kavamura y Esposito, 2010). La diversidad fúngica más alta en los sitios vegetados fue favorecida por *R. luteola* y *A. fistulosus* al proporcionar una amplia gama de nutrientes a la comunidad microbiana; en el sitio sin vegetación el aporte de materia orgánica es más limitado (Borymski et al. 2018). Asimismo, en algunos casos las comunidades microbianas pueden ser muy específicas y de baja diversidad (Epelde et al., 2010), como se aprecia en el sitio desprovisto de vegetación donde la comunidad fue menos diversa y más dominante (0.66). Por otra parte, dentro de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*, las comunidades fúngicas podrían estar actuando como una segunda capa de defensa de las plantas para enfrentar las concentraciones altas de EPT en los sustratos mineros (Dini-Andreote, 2020). Los sitios RL (68 ASV) y AF (14 ASV) tuvieron una comunidad fúngica específica que pudiera ser clave para el establecimiento y mantenimiento vegetal en estos sitios contaminados por EPT (Borymski et al., 2018; Rodríguez et al., 2019).

El phylum más grande y diverso de hongos, Ascomycota, fue el más abundante en los tres sitios de estudio. Los miembros de este phylum, que comprende saprobios, parásitos y simbiontes, tienen una importancia ecológica relevante al colonizar diversos hábitats, donde intervienen en el funcionamiento de los ecosistemas (Ávalos-Lázaro et al., 2018). Los phyla Basidiomycota y Mortierellomycota también estuvieron presentes en los sitios de estudio; los Ascomycota y Basidiomycota son comúnmente reportados en suelos contaminados por EPT (Mishra et al., 2017). Ye et al. (2020), en un suelo contaminado por minería, reportaron los Ascomycota y Basidiomycota como los más abundantes; cabe destacar que otros taxa también estuvieron presentes (Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Agaricomycetes, Nectriaceae, Mortierellaceae, Incertae sedis, Trichocomaceae, y *Fusarium*), y coinciden con lo reportado aquí. En el presente estudio se observó que los hongos pueden adaptarse a las diferentes concentraciones de EPT al modificar la abundancia y composición de su comunidad (Zhao et al., 2019). Los taxa más abundantes en los tres sitios de estudio, tanto en los sustratos como en el interior de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*, fueron

Fusarium y *Sarocladium*; en los sustratos el taxón más abundante fue *Penicillium*. Los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* se han reportado como especies muy competitivas para sobrevivir en diferentes condiciones de estrés (Lin et al., 2020). Algunas especies del género *Sarocladium* son consideradas endófitos mutualistas (Yeh y Kirschner 2014). Especies del género *Fusarium* han sido reportadas como tolerantes a Pb y Cd (Muñoz-Silva et al., 2019). Los géneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium* se han detectado en plantas establecidas en sitios mineros contaminados con Pb, Cd, y Zn (Ortega-Larrocea et al., 2012; Deng et al., 2014).

En los sustratos vegetados de RL y AF los taxa más abundantes fueron Hypocreales, Clavicipitaceae, *Phialemonium*, *Naganishia*, *Exophiala*, Nectriaceae, *Acrostalagmus* y *Capronia*. Zhang et al. (2013) reportaron que los hongos *Exophiala*, *Phialophora* y *Leptodontidium* colonizaron las raíces de plantas en sitios contaminados con Pb y Zn. *Exophiala* puede conferir una evidente tolerancia al Cd a su planta huésped y además juega un papel funcional como hongo benéfico (Wang et al. 2016). A diferencia de los sustratos vegetados, en el sustrato no vegetado abundaron *Stibella* y *Aspergillus*. Los taxa más abundantes en el interior de las raíces de *R. luteola* fueron Pleosporales, *Metacorcycpes*, *Monosporascus*, *Diaporthe*, *Myrothecium*, Ceratobiasidae; los taxa compartidos entre el exterior e interior de sus raíces fueron *Alternaria* y *Scytalidium*; solamente *Clonostachys* y *Paraphoma* se observaron en el interior de ambas plantas. Li et al. (2012) reportaron que los géneros *Alternaria* y *Phoma* mostraron una adaptación a Pb, taxa que fueron observados en *A. fistulosus*.

Las divergencias en las comunidades fúngicas entre sustratos vegetados y no vegetado, así como entre el interior de las raíces de las dos plantas, determinan la actividad degradadora de la materia orgánica, el comportamiento vegetal frente a los EPT y su estabilización o acumulación en los tejidos. En las zonas vegetadas del Jal Viejo está ocurriendo una atenuación natural de las condiciones extremas de los sustratos, proceso que está impulsado por microorganismos y plantas establecidos en forma natural y que participan en la estabilización o acumulación de contaminantes (González-Chávez et al., 2009; Kang et al., 2020). Las comunidades fúngicas de *R. luteola* y *A. fistulosus* podrían estar participando en el establecimiento de ambas especies vegetales en el sustrato minero. A su vez, *R. luteola* y *A. fistulosus* estarían ofreciendo un lugar rico en recursos que beneficia la abundancia y diversidad de las comunidades fúngicas.

5.3. Identificación molecular y determinación de hongos endófitos septados oscuros cultivables del interior de las raíces de *Reseda luteola* y de *Asphodelus fistulosus*

El aislamiento de hongos cultivables permitió constituir una colección de aislados procedentes del Jal Viejo, adaptados a las condiciones de los residuos mineros, así como explorar algunos aspectos fisiológicos para comprender mejor su comportamiento. Las condiciones de los residuos mineros son extremas como fue descrito previamente (Solís-Hernández et al. 2022), con una estructura física inestable, bajos niveles en nutrientes, así como un elevado contenido disponible en Pb, Cd y As. Este sistema antrópico también está sometido a altas temperaturas y regímenes de radiación, en particular en las áreas poco vegetadas y sin vegetación. A simple vista se aprecia la escasa diversidad y cobertura vegetal en el Jal Viejo; sin embargo, una cierta diversidad de hongos cultivables evidenciada en este trabajo demuestra que estos microorganismos también están presentes y toleran esas condiciones extremas. Por tanto, los hongos endófitos junto con su huésped vegetal toleran y mitigan las condiciones inhóspitas de los residuos mineros, y rehabilitan en forma natural y paulatina esas condiciones del ambiente edáfico. Los hongos ESO se encuentran ampliamente distribuidos en todas las altitudes y latitudes del planeta (Jumpponen y Trappe 1998), particularmente en ambientes de estrés como los residuos mineros con presencia de EPT (Zhang et al. 2013; Liu et al., 2017; Flores-Torres et al. 2021).

En este trabajo, de un total de 300 fragmentos de raíces sembradas de cada planta, en el 3.6% de las raíces de *R. luteola*, y en el 75.7% de las raíces de *A. fistulosus* emergieron colonias fúngicas. Lo anterior coincide con un análisis microscópico previo de las raíces teñidas de ambas plantas, donde *R. luteola* y *A. fistulosus* alcanzaron una intensidad de colonización radical por hongos ESO del 11% y 51%, respectivamente, según la presencia de hifas septadas hialinas y oscuras, y de microesclerocios (Flores-Torres et al. 2021). Se lograron aislar 61 hongos ESO cultivables del interior de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*. Es la primera vez que se aísla la comunidad fúngica del interior de las raíces de estas dos plantas exóticas con elevada relevancia como invasoras en México. *A. fistulosus* se ha registrado como ruderal en ambientes urbanos (Martínez et al. 2021) y en residuos mineros (Salas-Luévano et al. 2021); por su parte, *R. luteola* se ha reportado como ruderal y arvense (conabio.gob.mx) y colonizadora de residuos mineros (Flores-Torres et al. 2021). Hay que resaltar que ambas especies vegetales se han adaptado perfectamente a las condiciones de los residuos mineros del Jal Viejo, donde forman parches y enriquecen el ambiente edáfico con el aporte de materia orgánica.

Según las secuencias obtenidas de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2 rDNA) y las características morfológicas, los 61 aislados de hongos ESO provenientes de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus* pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis* y *Stemphylium*. Se han registrado diferentes hongos ESO en residuos mineros conteniendo EPT, ya sea como aislados cultivables (Ban et al., 2012, Xu et al., 2015; Wang 2016; Liu et al., 2017; Hou et al., 2020; Flores-Torres et al. 2021) o detectado molecularmente por secuenciación masiva (Solís-Hernández et al. 2022). Los hongos cultivables del Jal Viejo al crecer en medios sintéticos demuestran su capacidad saprobia; degradan materia orgánica y liberan los productos de esta degradación, por lo que enriquecen el limitado contenido nutrimental del ambiente edáfico de los residuos.

Ambas plantas, *R. luteola* y *A. fistulosus*, compartieron los géneros *Alternaria* y *Acrocalymma-Rhizopycnis* en el interior del sistema radical y a su vez fueron los géneros más frecuentes en este trabajo; ambos géneros tienden a promover el crecimiento de las plantas huésped y confieren tolerancia contra EPT (Li et al., 2012; Jin et al., 2018). El sistema radical de *A. fistulosus* estuvo también asociado con miembros de los géneros *Colletotrichum*, *Setophoma* y *Stemphylium*, siendo este el primer registro de esos géneros en jales mineros. Previamente, en residuos mineros *Alternaria* fue el único género aislado del interior de raíces de *Tagetes lunulata* (Flores-Torres et al. 2021), y a su vez *Alternaria* predominó en tallos y hojas de *Arabis hirsuta*, *Acacia decurrens*, *Symplocos paniculata*, *Rabbosiae riocalyx*, *Arenaria serpyllifolia* y *Rosa longicuspis* (Li et al. 2012). Considerando que *Alternaria* predominó en *R. luteola* y *Acrocalymma-Rhizopycnis* en *A. fistulosus*, las diferencias en la riqueza de hongos ESO en cada planta podría estar vinculada con una especificidad planta-hongo. La interacción fisiológica planta-hongo puede ponerse en evidencia a través de diferentes mecanismos; por ejemplo, *Acrocalymma vagum* disminuyó el contenido de EPT en hojas de tabaco (Jin et al., 2018).

5.4. Tolerancia a plomo y cadmio por hongos endófitos septados oscuros (ESO) aislados de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus*

La exposición al Cd y Pb in vitro permite introducirse en la fisiología de los hongos. Como era de esperarse, los cinco aislados toleraron las concentraciones biodisponibles de 143 mg Pb L⁻¹ y de 6.6 mg Cd L⁻¹ registradas en los residuos mineros (Flores-Torres et al. 2021), así como niveles superiores (214.5 mg Pb L⁻¹ y 9.9 mg Cd L⁻¹). Sin embargo, los hongos más tolerantes al estrés metálico fueron consistentemente *Colletotrichum* y *Alternaria* debido a que alcanzaron el máximo crecimiento colonial y la más alta producción de

biomasa a los 14 días. *Alternaria* es un género sobresaliente en sitios contaminados por agroquímicos y EPT; este género tiende a generar metabolitos que promueven el establecimiento de la planta en los sitios contaminados (Spagnottiy et al., 2020). Cada hongo ESO puede tener estrategias específicas para tolerar los EPT, entre ellas se encuentra la producción de melanina en su pared celular, de polisacáridos extracelulares, de metabolitos y de enzimas (Zhang et al., 2008). Por ejemplo, estudios a nivel transcripcional en *Exophiala pisciphila* en presencia de Cd (Zhan et al. 2015) y bioquímicos en *Gaeumannomyces cylindrosporus* sometido a Pb (Ban et al. 2012), revelaron una serie de aspectos fisiológicos ligados a sistemas antioxidantes y reparación de DNA, entre otros, para contrarrestar la toxicidad metálica. Los endófitos fúngicos afectan de manera positiva la vegetación al participar en forma indirecta en la formación de suelo, que es particularmente importante en ambientes degradados, y directamente ajustando la adaptación de la planta a la toxicidad de EPT y mejorando el rendimiento de la biomasa vegetal (Domka et al., 2019). Por lo anterior, los hongos ESO han sido señalados como herramientas relevantes en la fitorremediación (Domka et al., 2019; Nandy et al. 2020).

5.5. Solubilización de fosfato de los aislados fúngicos de *Reseda luteola* y *Asphodelus fistulosus* en presencia y en ausencia de plomo y cadmio

Los hongos ESO pueden crecer como biótrofos y saprófitos; esta heterogeneidad les permite tener diferentes efectos sobre su huésped vegetal, incluyendo una gama de relaciones simbióticas (Mandyman y Jumpponen, 2012; Barresi et al., 2022); poco se conoce sobre la capacidad que tienen para solubilizar los fosfatos del suelo. En los residuos mineros del Jal Viejo, el fósforo disponible mostró niveles casi ausentes (Flores-Torres et al. 2021) y una concentración total de apenas 0.22 a 0.31 mg g⁻¹ (Solis-Hernández et al. 2022). Los cinco aislados fúngicos analizados aquí demostraron que tienen capacidad solubilizadora de fosfatos aún bajo estrés por Pb y Cd; la solubilización a veces fue incluso superior en presencia de metales, por lo cual los mecanismos fisiológicos respectivos no fueron afectados por el Pb y el Cd. Esto destaca el papel ecológico de la comunidad de hongos ESO en el ambiente edáfico: aún en presencia de Pb y Cd, ocurre el aporte de fosfato soluble y se eleva la calidad nutrimental de los residuos mineros. En el mismo sentido, otros hongos ESO han destacado por su capacidad para solubilizar fosfato incluyendo *Curvularia*, *Phialocephala*, *Drechslera*, *Ophiosphaerella*, *Acrocalymma* y *Paraboeremia* (Priyadharsini y Muthukumar 2017; Spagnoletti et al. 2017; Surono y Narisawa, 2017; He et al., 2019; Barresi et al., 2022). Algunos de estos autores han propuesto estos hongos ESO para elaborar biofertilizantes. Los hongos ESO presentes en

los residuos mineros podrían estar facilitando la absorción de P y de esta manera promover el establecimiento de poblaciones vegetales en estos sitios extremadamente contaminados por EPT.

Capítulo 6. Conclusiones

- El Jal Viejo se estudió como un modelo para determinar las condiciones de residuos mineros abandonados y contaminados con EPT, así como para evaluar el impacto de la actividad biológica de plantas y de hongos.
- Fueron identificados indicadores químicos, bioquímicos y biológicos que ilustran el proceso de remediación natural en un jal abandonado contaminado con Pb, Cd y As. La cobertura vegetal con las plantas *R. luteola* y *A. fistulosus* favoreció la disminución de la conductividad eléctrica y redujo la concentración total de EPT en los residuos mineros. Las concentraciones más altas de C se observaron en los sitios con vegetación en comparación con el sitio sin vegetación demostrando un papel positivo de la cubierta vegetal al proporcionar este nutrimento al ambiente edáfico. La especie vegetal *A. fistulosus*, al aportar mayor cantidad de materia orgánica, favoreció la actividad enzimática de β -glucosidasa y deshidrogenasa, así como la mineralización de carbono. Las actividades enzimáticas de polifenoloxidasas y fosfomonoesterasa tendieron a incrementarse en los sitios vegetados en comparación con el sitio no vegetado. Tanto *R. luteola* como *A. fistulosus*, redujeron considerablemente el contenido de EPT en los sustratos, lo que sugiere su relevancia en procesos de fitoestabilización y de fitoextracción de los elementos.
- El microbioma fúngico presente en los residuos mineros con cubierta y sin cubierta vegetal, así como dentro de las raíces de las dos plantas, fue puesto en evidencia mediante estrategias moleculares y microbiológicas. Predominaron los hongos Ascomycota e ilustra la relevancia de estos en el ambiente extremo. Los residuos mineros sin vegetación tuvieron una comunidad fúngica menos diversa en contraste con los sitios vegetados. Se aislaron e identificaron hongos ESO del interior de las raíces de *R. luteola* y *A. fistulosus*; los géneros presentes fueron *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis* y *Stemphylium*. Se observó que, en las especies vegetales, tanto en el interior como en el exterior de sus raíces, la comunidad fúngica fue específica.
- Fue abordada la fisiología de algunos de los hongos ESO. *Alternaria* y *Colletotrichum* fueron los géneros que lograron mayor capacidad para crecer y producir biomasa en menos tiempo, por lo que se consideran los más tolerantes de

los aislados evaluados y podría constituirse como herramientas relevantes en estrategias de remediación de sustratos/suelos contaminados.

- El Pb y Cd no inhibieron la capacidad solubilizadora de fosfatos en los cinco aislados de hongos ESO; por el contrario, propiciaron que los hongos ESO tuvieran una mayor capacidad de solubilizar fosfatos. Esta evidencia ilustra que existe un aporte de fosfato al ambiente en los residuos mineros aun cuando las concentraciones de ambos metales son altas.
- Cada especie vegetal cumplió con un papel modulador en el efecto de la rizosfera sobre los residuos mineros. Los resultados ponen en evidencia el papel de la planta y de la rizosfera en la mitigación natural de las condiciones extremas de los residuos mineros. Asimismo, destaca la relevancia de vegetar los jales mineros a cielo abierto con el fin de disminuir el impacto negativo que se genera sobre el medio ambiente y en los organismos que se encuentran en su entorno. Además, los géneros *Colletotrichum* y *Alternaria* podrían ser candidatos para aplicarse, junto con un huésped vegetal previamente seleccionado, en procesos de remediación en jales contaminados.

Capítulo 7. Perspectivas

1. Identificar la comunidad fúngica tanto interna como externa de *A. fistulosus* y *R. luteola*, ilustra la relevancia de conocer la comunidad fúngica de otras especies vegetales que se establecen en depósitos de residuos mineros.
2. El aislamiento de los hongos ESO cultivables es un precedente que permitió integrar un cepario compuesto por cinco géneros (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis* y *Stemphylium*), para continuar estudios fisiológicos: por ejemplo, la producción y el papel de la melanina y de los metalóforos, y la tolerancia y la capacidad de acumulación de otros EPT de relevancia ambiental, entre otros aspectos.
3. Evaluar el sistema planta-raíz-residuos mineros *in vitro* en cuanto a la tolerancia a EPT con inoculación fúngica de los hongos aislados y especies vegetales nativas de los jales mineros.
4. Este trabajo ofrece herramientas fúngicas para potencialmente ser utilizadas en vegetación de jales mineros que contribuyan en mitigar el impacto ambiental en zonas semiáridas de México.

Referencias Bibliográficas

Affholder, M.C., Pricop, A.D., Laffont-Schwob, I., Coulomb, B., Rabier, J., Borla, A., Demelas, C., Prudent, P., 2014. As, Pb, Sb, and Zn transfer from soil to root of wild rosemary: do native symbionts matter? *Plant Soil*. 382, 219-236.

Ahmad, W., Alharthy, R.D., Zubair, M., Ahmed, M., Hameed, A., Rafique, S., 2021. Toxic and heavy metals contamination assessment in soil and water to evaluate human health risk. *Scientific reports*. 11, 17006.

Allers, T., Litchen, M., 2000. A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holliday junctions. *Nucleic Acids Research*. 28, 26-36.

Amin, H., Arain, B.A., Jahangir, T.M., Abbasi, M.S., Amin, F., 2018. Accumulation and distribution of lead (Pb) in plant tissues of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.): profitable phytoremediation with biofuel crops. *Geology, Ecology, and Landscapes*. 2(1), 51-60.

Anahid, S., Yaghmaei, S., Ghobadinejad, Z., 2011. Research note: heavy metal tolerance of fungi. *Chemical Engineering Transactions*. 18, 502-508.

Andrade, S., Gratão, P., Azevedo, R., Silveira, A., Schiavinato, M., Mazzafera, P., 2010. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany*. 68, 198-207.

Asensio, V., Vega, F.A., Singh, B.R., Covelo, E.F., 2013. Effects of tree vegetation and waste amendments on the fractionation of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in polluted mine soils. *Science of the Total Environment*. 443, 446e453.

Ávalos Lázaro, A.A., Rosique Gil, J.E., Capello García, S., Villarruel Ordaz, J.L., 2018. Ascomycetes (Fungi: Ascomycota) del parque estatal agua Blanca, Macuspana, Tabasco, México. *Acta Botánica Mexicana*. 122, 141-154.

Ayala-Zermeño, M.A., Montesinos-Matías, R., Berlanga-Padilla, A., 2012. Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-27, 4 p.

- Azamar, A., Téllez I., 2022. Minería en México: Panorama social, ambiental y económico. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. México. 183 p.
- Baker, A., 1981. Accumulators and excluders strategies in response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*. 3, 643-654.
- Baker, A., Brooks, R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements, a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1, 81-126.
- Baker, A.J.M., Ernst, W.H.O., Van der Ent, A., Malaisse, F., Ginocchio, R., 2010. Metalophytes: the unique biology resource, its ecology and conservation status in Europe, Central Africa and Latin America. In: Batty, L.C., Hallberg, K.B. (Eds.), *Ecology of Industrial Pollution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 7-40.
- Baldrian, P., 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environment*. 55(9): 370-378.
- Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H., Yang, Y., 2012. The response of dark septate endophytes (ESO) to heavy metals in pure culture. *PLoS ONE*. 7(10), 1-11.
- Barresi, O., Lavado R.A., Chiochio V.M., 2022. Can dark septate endophytic fungi (DSE) mobilize selectively inorganic soil phosphorus thereby promoting sorghum growth? A preliminary study. *Revista Argentina de Microbiología*. 54, 220-223.
- Barrow J.R., Aaltonen, R.E., 2001. A method evaluating internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and how they are influenced by physiological activity. *Mycorrhiza*. 11, 199-205.
- Barrow, J.R., 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*. 13, 239-247.
- Beesley, L., Moreno, E., Gómez, J.L., Harris, E., Robinson, B., Sizmur, T., 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Journal Environmental Pollution*. 159, 3269-3282.
- Becerril, J.M., Barrutia, O., García, J.L., Hernández, A., Olano, J.M., Garbisu, C., 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas*. 16(2), 50-55.

Bhatti, S.S., Kumara, V., Sambyal, V., Singh, J., Nagpala, A.K., 2018. Comparative analysis of tissue compartmentalized heavy metal uptake by common forage crop: a field experiment. *Catena*. 160, 185-193.

Borymski, S., Cycon, M., Beckmann, M., Mur, L.A.J., Piotrowska-Seget, Z., 2018. Plant species and heavy metals affect biodiversity of microbial communities associated with metal-tolerant plants in metalliferous soils. *Frontiers in Microbiology*. 9, 1425.

Bremner, J., 1996. Nitrogen-total. In: Sparks, D., Page, A., Summer, M., Tabatabaia, M., Helmke, P. (Eds.), *Methods of soil analyses part 3: Chemical analyses*. Soil Science Society of American, Madison, p. 1085-1121.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nature Methods*. 13(7), 581-583.

Cámara Minera de México (CAMIMEX), 2019. Informe anual. <https://camimex.org.mx/index.php/publicaciones/informe-anual>. (Acceso 15 septiembre 2023).

Cao, X.F., Liu, L.P., 2015. Using microorganisms to facilitate phytoremediation in mine tailings with multi heavy metals. *Advanced Materials Research*, 437-440.

Carrillo González, R.C., 2005. Niveles de contaminación de los suelos y las plantas. En: González-Chávez, M.C., Pérez-Moreno, J., Carrillo González, R.C. (eds.). *El sistema planta-microorganismo-suelo en áreas contaminadas con residuos de minas*. Colegio de Postgraduados, Montecillo Estado de México, 161 p.

Carrillo González, R.C., González-Chávez, M.C., 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environmental Pollution*. 144(1), 84-92.

Cerbasi, I.H., Yetis, U., 2001. Biosorption of Ni (ii) and Pb (ii) by *Phanerochaete chrysosporium* from binary metal system -Kinetics. *Water Research*. 27, 15-20.

Cevnik, M., Jurc, M., Vodnik, D., 2000. Filamentous fungi associated with the fine roots of *Erica herbacea* L. from the area influenced by the Zerjav lead smelter (Slovenia). *Phyton: annales rei botanicae*. 40, 61-64.

Colanguelo, E., Guerinot, M., 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Plant Biology*. 9, 322-330.

Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2021. Ficha informativa.

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asphodelaceae/asphodelus-fistulosus/fichas/ficha.htm>

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/resedaceae/reseda-luteola/fichas/ficha.htm>

(acceso 23 septiembre 2023).

Conesa. H.M., Faz, A., Arnaldos, R., 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena–La Unión mining district (SE Spain). *Science of the Total Environment*. 366, 1-11.

Cortez-Madrugal, H., Alatorre-Rosas, R., Mora-Aguilera, G., Bravo-Mojica, H., Ortiz-García, C.F., Aceves-Navarro, L.A., 2003. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxopteraaurantii* in cocoa. *BioControl*. 48, 321-334.

Cortés-Penagos, C., Gradueñas-Piña, C., Caracheo-Aguilar, S., Obregón-Herrera, A., Ramírez-Salgado, P., Amézquita-López, F., Hernández-Hernández, M., Cano-Canchola, C., Sosa-Luna, L., Gutiérrez-Corona, F., 1994. Tolerancia a metales en hongos: mecanismos y aplicaciones. En: *la Importancia Biológica de los Iones Inorgánicos*. Cervantes, C., Saavedra-Molina, A., Farias Rodríguez, R., (eds). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, p. 118-32.

Deng, Z., Zhang, R., Shi, Y., Hu, L., Tan, H., Cao, L., 2014. Characterization of Cd-, Pb-, Zn resistant endophytic lasiodiplodia sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 2346-2357.

Dick, R.P., 2011. *Methods of soil enzymology*. Soil Science Society of America, Inc.

Dini-Adreote, F., 2020. Endophytes: the second layer of plant defense. *Trends in Plant Science*. 25(4), 319-322.

Domka, A.M., Rzpadek, P., Turnau, K., 2019. Are fungal endophytes merely mycorrhizal copycats? The role of fungal endophytes in the adaptation of plants to metal toxicity. *Frontiers in Microbiology*. 10, 371.

- Drahota, P., Raus, K., Rychlíková, E., Rohovec, J., 2017. Bioaccessibility of As, Cu, Pb, and Zn in mine waste, urban soil, and road dust in the historical mining village of Kaňk, Czech Environmental Geochemistry and Health. 40(4), 1495-1512.
- Elizondo, C., Márquez-Linares, M.A., Marín-García, M.L., Gutiérrez-Yurrita, P.J., 2016. Flora que crece naturalmente en presas de jale minero abandonadas susceptibles de ser utilizadas en reclamación, Zimapán, Hidalgo, México. Interciencia. 41(47), 492-1298.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorran, F., Xie, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. The Scientific World Journal. 756120, 1-18.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Barrutia, O., González-Oreja, J.A., Garbisu, C., 2010. Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. Environmental Pollution. 158, 1576-1583.
- Feng, N.X., Yu, J., Zhao, H.M., Cheng, Y.T., Mo, C.H., Cai, Q.Y., Li, Y.W., Li, H., Wong, M.H., 2017. Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant endophyte partnerships. Science of the Total Environment. 583, 352-368.
- Fernández, L., Luis, J., 1994. Barrena de extracción de muestras de suelo para la determinación del peso volumétrico. Patente certificado número 22 316, Oficina Nacional de Invenciones. Información Técnica y Marcas, Cuba.
- Flores-Torres, G., Solís-Hernández, A.P., Vela-Correa, G., Rodríguez-Tovar, A.V., Cano-Flores, O., Castellanos-Moguel, J., Pérez, N.O., Chimal-Hernández, A., Moreno-Espíndola, I.P., Salas-Luévano, M.A., Chávez-Vergara, B.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.
- Gadd, G.M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist. 124, 25-60.
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C., 1996. Seaview and Phylo_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Computer Applications in the Biosciences. (6), 543-8.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G., 1993. The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system

regeneration. En: Gallardo-Lancho, J. (Ed), Proceedings of the XI International Symposium of Environmental Biochemistry, CSIC, Salamanca, España, p. 89-100.

García, E., 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, Serie 6, Instituto de Geografía, UNAM, México.

García-Villaraco Velasco, A., Probanza, A., Gutierrez Mañero, F.J., Ramos, B., Lucas García, J.A., 2009. Functional diversity of rhizosphere microorganisms from different genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Community Ecology*. 10, 111-119.

Gee, G.W., Bauder, J.W., 1979. Particle size analysis by hydrometer: a simplified method for routine textural analysis and a sensitivity test of measurement parameters. *Soil Science Society of America Journal*. 43(5), 1004-1007.

German, D.P., Weintraub, M.N., Grandy, A.S., Lauber, C.L., Rinkes, Z.L., Allison, S.D., 2011. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biology and Biochemistry*. 43(7), 1387-1397.

González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Gutiérrez-Castorena, M.C., 2009. Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: the role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Hazardous Materials*. 161, 1288-1298.

González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 82, 53-61.

Gutiérrez-Ruiz, M., Romero, F.M., González-Hernández, G., 2007. Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de Jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 24(2), 170-184.

He, C., Wang, W., Hou, J., 2019. Plant growth and soil microbial impacts of enhancing licorice with inoculating dark septate endophytes under drought stress. *Frontiers in Microbiology*. 10, 2277.

Hernández-Acosta, E., Mondragón-Romero, E., Cristóbal-Acevedo, D., Rubiños-Panta, J.E., Robledo-Santoyo, E., 2009. Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un Jal de Pachuca Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 15, 109-114.

- Hernández-Leal, T.I., Carrión, G., Heredia, G., 2011. Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*. 45(8), 881-892.
- Hou, E., Chen, C., Wen, D., Liu, X., 2015. Phosphatase activity in relation to key litter and soil properties in mature subtropical forests in China. *Science of the Total Environment*. 515, 83-91.
- Hou, L., Yu, J., Zhao, L., He, X., 2020. Dark septate endophytes improve the growth and the tolerance of *Medicago sativa* and *Ammopiptanthus mongolicus* under cadmium stress. *Frontiers in Microbiology*. 10, 3061.
- Huang, W., Liu, J., Zhou, G., Zhang, D., Deng, Q., 2011. Effects of precipitation on soil acid phosphatase activity in three successional forests in southern China. *Biogeosciences*. 8, 1901-1910.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2019. <https://www.inegi.org.mx/temas/imai/#Tabulados>. (Acceso 10 septiembre 2023).
- Jing, Y., He, Z., Yang, X., 2007. Role rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Journal of Zhejiang University Science B*. 8,192-207.
- Jin, H-Q., Liu, H-B., Xie, Y-Y., Zhang, Y-G., Xu, Q-Q., Mao, L-J., Li, X-J., Chen, J., Lin, F-C., Zhang, C.L., 2018. Effect of the dark septate endophytic fungus *Acrocalymma vagum* on heavy metal content in tobacco leaves. *Symbiosis*. 74, 89-95.
- Jumpponen, A., Trappe, J.M., 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi. *New Phytologist*. 140, 295-310.
- Kabata-Pendias, A., 2011. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kang, X., Cui, Y., Shen, T., Yan, M., Tu, W., Shoaib, M., Xiang, Q., Zhao, K., Gu, Y., Chen, Q., Li, S., Liang, Y., Ma, M., Zou, L., Yu, X., 2020. Changes of root microbial populations of natively grown plants during natural attenuation of V-ti magnetite tailings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 201, 110816.
- Karaca, A., Cetin, S.C., Turgay, O.C., Kizilkaya, R., 2010. Effects of heavy metals on soil enzyme activities. In: Sherameti, I., Varma, A. (Eds.), Soil heavy metals, Soil Biology. Springer Vol. 19. Berlin, Heidelberg, p. 237-262.

- Kavamura, V.N., Esposito, E., 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*. 28, 61-69.
- Kennedy, A.C., de Luna, L.Z., 2005. Rhizosphere. In: Hillel, D. (Ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, p. 399-406.
- Knapp, D.G., Pintye, A., Kovacs, G.M., 2012. The dark side is not fastidious-dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS ONE*. 7, e32570.
- Li, H.Y., Li, D.W., He, C.M., Zhou, Z.P., Mei, T., Xu, H.M., 2012. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*. 5, 309-315.
- Likar, M., Regvar, M., 2013. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant Soil*. 370, 593-604.
- Lin, Y., Xiao, W., Ye, Y., Wu, C., Hu, Y., Shi, H., 2020. Adaptation of soil fungi to heavy metal contamination in paddy fields-a case study in eastern China. *Environmental Science and Pollution Research*. 27, 27819-27830.
- Liu, P., Zhang, Y., Feng, N., Zhu, M., Tian, J., 2020. Potentially toxic element (PTE) levels in maize, soil, and irrigation water and health risks through maize consumption in northern Ningxia, China. *BMC Public Health*. 20, 1729.
- Liu, H., Li, T., Ding, Y., Yang, Y., Zhao, Z., 2017. Dark septate endophytes colonizing the roots of 'non-mycorrhizal' plants in a mine tailing pond and in a relatively undisturbed environment, Southwest China. *Journal of Plant Interactions*. 12, 264-271.
- Liu, X., Bal, Z., Shi, H., Zhou, W., Liu, X., 2019. Heavy metal pollution of soils from coal mines in China. *Natural Hazards*. 99, 1163-1177.
- Luo, L., Meng, H., Gu, J.D., 2017. Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems. *Journal of Environmental Management*. 197, 539-549.
- Mandyam, K., Jumpponen, A., 2005. Seeking the elusive function of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*. 53, 173-189.
- Martínez, D.N., López-Toledo, L., Espinosa-García, F., Camacho-Cervantes, M. de la Barrera, E., 2021. Ephemeral visitors or permanent residents? – Decadal change in the

ruderal vegetation from a periurban university campus. *Urban Forestry and Urban Greening*. 65, 127372.

Marx, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. 59, 153-163.

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*. 8.

Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.P., Gawronski, S.W., Schöder, P., Vangronsveld, J., 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST action 859. *Journal of Soils and Sediments*. 10, 1039-1070.

Mendez, O.M., Maier, R.M., 2008. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 7, 47-59.

Mier, T., Rivera-Becerril, F., Ayala-Zermeño, M.A., Toriello, C., Aguilar, S., Ulloa, M., 2013. Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. 103 p.

Mireles, P., 2009. Manual de prácticas de laboratorio de edafología y evaluación de tierras. Facultad de Planeación Urbana y Regional. Universidad Autónoma del Estado de México. México.

Mishra, J., Singh, R., Arora, N.K., 2017. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1706.

Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., Santillán-Torres, M., Tamariz-Angeles, C., 2019. Heavy metals tolerant microorganisms from mine tailing wastelands Santa Rosa, jangas (Peru). *Revista Peruana de Biología*. 26(1), 109-118.

Murphy, J., Riley, J., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27, 31-36.

Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 8, 199-216.

- Nandy, S., Das, T., Tudu, C.K., Pandey, D.K., Dey, A., Ray, P., 2020. Fungal endophytes: futuristic tool in recent research area of phytoremediation. *South African Journal of Botany*. 134, 285-295.
- Navarro-Cano, J.A., Verdú, M., Goberna, M., 2018. Trait-based selection of nurse plants to restore ecosystem functions in mine tailings. *Journal of Applied Ecology*. 55, 1195-1206.
- Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2018. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*. 47, D259-D264.
- Nopparat, C., Jatupornpipat, M., Rittiboon, A., 2009. Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 43, 172-181.
- Ortega-Larrocea, M.P., Xoconostle-Cázares, B., Maldonado-Mendoza, I.E., Carrillo-González, R., Hernández-Hernández, J., Díaz Garduño, M., López-Meyer, M., Gómez-Flores, L., González-Chávez, M.C., 2012. Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Environmental Pollution*. 158, 1922-1931.
- Parodi, G., Pezzani, F., 2011. Micorrizas arbusculares en dos gramíneas nativas de Uruguay en áreas con y sin pastoreo. *Agrociencia Uruguay*. 15(2), 1-10.
- Peco, J.D., Higuera, P., Campos, J.A., Esbrí, J.M., Moreno, M.M., Battaglia-Brunet, F., Sandalio, L.M., 2021. Abandoned Mine Lands Reclamation by Plant Remediation Technologies. *Sustainability*. 13, 6555.
- Perea, V.Y.S., 2014. Estabilización química de elementos potencialmente tóxicos con enmiendas. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 5(9), 44-54.
- Pérez-Martínez, I., Romero, M., 2015. Uso de parámetros indirectos para la evaluación de la contaminación de suelos por metales pesados en una zona minera de San Luis Potosí, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 67(1), 1-12.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11, 789-799.

Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14, 817-818.

Prasad, M.N., Freitas, H.M., 2003. Metal hyperaccumulation in plants biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6(3), 285-321.

Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S., 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 13, 63-77.

Prieto-Méndez, J., González-Ramírez, C.A., Román-Gutiérrez, A.D., Prieto-García, F., 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10(1), 29-44.

Priyadharsini, P., Muthukumar, T., 2017. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. *Fungal Ecology*. 27, 69-77.

Rajkumar, M., Ae, N., Freitas H. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. 77(2), 153-160.

Ramos-Arroyo, Y.R., Siebe-Grabach, C.D., 2006. Estrategia Para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de Caso en el distrito de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 23(1), 54-74.

Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*. 180, 169-181.

Regvar, M., Likar, M., Piltaver, A., Kugonic, N., Smith, J.E., 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil*. 330, 345-356.

Rigo, K., Varga, J., Tóth, B., Téren, J., Mesterházy, A., Kazakiewicz, Z., 2002. Evolutionary relationships within *Aspergillus section Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 48, 9-16.

Robinson, R., Schulin, R., Nowack, B., Roulier, S., Menon, M., Clothier, B., Green, S., Mills, T., 2006. Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated site. *Forest Snow and Landscape Research*. 80, 221-234.

Rodríguez, P.A., Rothballer, M., Chowdhury, S.P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., Falter-Braun, P., 2019. Systems biology of plant-microbiome interactions. *Molecular Plant*. 12, 804-821.

Rodríguez-Tovar, A., Xoconostle-Cásarez, B., Valdés, M., 2004. Molecular ecology of ectomycorrhizal fungi. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27(3), 267-278.

Romero, F.M., Armienta, M.A., Gutiérrez, M.E., Villaseñor, G., 2008. Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 242, 43-54.

Salas-Luevano, M.A., Manzanares-Acuña, E., Letechipia-de Leon, C., Hernández-Dávila, V.M., Vega-Carrillo, H., 2011. Lead concentration in soil from an old mining town. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 289, 35-39.

Salas-Luevano, M.A., Mauricio-Catillo, J.A., González-Rivera, M.L., Vega-Carrillo, H.R., Salas-Muñoz, S., 2017. Accumulation and phytostabilization of as, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences*. 76, 806.

Salas-Luevano, M.A., Puente-Cuevas, R., Vega-Carrillo, H.R., 2021. Concentrations of heavy metals and measurement of 40K in mine tailings in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences*. 80, 186.

Sánchez-Ferrer, A., 1998. Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis de doctorado. Escola Tecnica Superior d'Enginyeria. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2003. **NOM-141-SEMARNAT-2003**: Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales. Ciudad de México.

Servicio Geológico Mexicano (SGM), 2018. Panorama minero del estado de Zacatecas. Coordinación general de Minería. <http://www.sgm.gob.mx> (acceso 23 septiembre 2023).

- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*. 6, 1143.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K., 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61, 405-412.
- Sinsabaugh, R.L., 2010. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology. Biochemistry*. 42, 391-404.
- Solis-Hernández, A.P., Chávez-Vergara, B.M., Rodríguez-Tovar, A.V., Beltrán-Paz, O.I., Santillán, J., Rivera-Becerril, F., 2022. Effect of the natural establishment of two plant species on microbial activity, on the composition of the fungal community, and on the mitigation of potentially toxic elements in an abandoned mine tailing. *Science of the Total Environment*. 802, 149788.
- Spagnoletti, F.N., Tobar, N.E., Fernández, Di Pardo. A., Chiocchio, V.M., Lavado, R.S., 2017. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminium phosphates. *Applied Soil Ecology*. 111, 25-32.
- Surono, Narisawa, K., 2017. The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of asparagus officinalis growth. *Fungal Ecology*. 28, 1-10.
- Szczepanska, J., Twardowska, I., 2004. Waste management. In: Twardowska, I., Allen, H.E., Kettrup, A.A.F., Lacy, W.J. (Eds.), *Solid waste: Assessment, monitoring and remediation*. Vol. 4. Elsevier, Amsterdam, p. 319-385.
- Tahar, K., Keltoum, B., 2011. Effects of heavy metals pollution in soil and plant in the industrial area, West Algeria. *Journal of the Korean Chemical Society*. 55 (6), 1018-1023.
- Tang, Z., Xu, W., Zhou, G., Bai, Y., Li, J., Tang, X., Chen, D., Liu, Q., Ma, W., Xiong, G., He, H., He, N., Guo, Y., Guo, Q., Zhu, J., Han, W., Hu, H., Fang, J., Xie, Z., 2018. Patterns of plant carbon, nitrogen, and phosphorus concentration in relation to productivity in China's terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115, 4033-4038.
- Trevors, J.T., Mayfield C.I., Innis, W.E., 1982. Measurement of electron transport system (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology*. 8, 163-168.

Tunc, E., Demir, M., 2019. Enzymes and heavy metals in soil. 1st International Congress on Sustainable Agriculture and Technology, 1-3 April 2019. Gaziantep University, Gaziantep, Turkey.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 101, 133-164.

Vance, E., Brookes, P., Jenkinson, D., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*. 19(6), 703-770.

Vejvodová, K., Ash, C., Dajčl, J., Tejnecký, V., Johanis, H., Spasić, M., Polák, F., Praus, L., Borůvka, L., Drábek, O., 2022. Assessment of potential exposure to As, Cd, Pb and Zn in vegetable garden soils and vegetables in a mining region. *Scientific reports*. 12, 13495.

Venkateswarlu, B., Maheswari, M., Saharan, N., 1989. Effects of water deficit on N₂ (C₂H₂) fixation in cowpea and groundnut. *Plant Soil*. 114, 69-74.

Vrålstad, T., Myhre, E., Schumacher, T., 2002. Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytologist*. 155, 131-148.

Wang, J.L., Li, T., Liu, G.Y., Smith, J.M., Zhao, Z.W., 2016. Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Scientific Reports*. 6, 22028.

Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., Sun, W., 2017. A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*. 184, 594-600.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, p. 315-322.

Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*. 50, 775e780.

Xu, R., Li, T., Cui, H., Wang, J., Yu, X., Ding, Y., Wang, C., Yang, Z., Zhao, Z., 2015. Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Applied Soil Ecology*. 93, 11-18.

- Yamaji, K., Watanabe, Y., Massuya, H., Shigeto, A., Yui, H., Haruma, T., 2016. Root fungal endophytes enhance heavy-metal stress tolerance of *Clethra barbinervis* growing naturally at mining sites via growth enhancement, promotion of nutrient uptake and decrease of heavy-metal concentration. PLoS ONE. 11(12), 1-15.
- Yan, W., Artz, R. R. E., Johnson, D., 2008. Species-specific effects of plants colonising cutover peatlands on patterns of carbon source utilisation by soil microorganisms. Soil Biology and Biochemistry. 40, 544-549.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S.N., Yusof, M.L.M., Ghosh, S., Chen, Z., 2020. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. Frontiers in Plant Science. 11, 359.
- Ye, Z.H., Shu, W.S., Zhang, Z.Q., Lan, C.Y., Wong, M.H., 2002. Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailings using bioassay techniques. Chemosphere. 47, 1103-1111.
- Ye, X., Xiao, W., Zhang, Y., Zhao, S., Wang, G., Zhang, Q., Wang, Q., 2015. Assessment of heavy metal pollution in vegetables and relationships with soil heavy metal distribution in Zhejiang province, China Environmental Monitoring and Assessment. 187, 378.
- Ye, F., Gong, D., Pang, C., Luo, J., Zeng, X., Shang, C., 2020. Analysis of fungal composition in mine-contaminated soils in Hechi City. Current Microbiology. 77, 2685-2693.
- Yeh, Y.H., Kirschner, R., 2014. *Sarocladium spinificis*, a new endophytic species from the coastal grass *Spinifex littoreus* in Taiwan. Botanische Studien. 55, 25.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. Science of the Total Environment. 368, 456-464.
- Zaier, H., Ghnaya, T., Lakhdar, A., Baioui, R., Ghabriche, R., Mnasri, M., Sghair, S., Lutts, S., Abdelly, C., 2010. Comparative study of pb-phytoextraction potential in *Sesuvium portulacastrum* and *Brassica juncea*: tolerance and accumulation. Journal of Hazardous Materials. 183(1-3), 609-615.
- Zhan, F., He, Y., Li, Y., Li, T., Yang, Y-Y., Toor, G.S., Zhao, Z., 2015. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. Environmental Science and Pollution Research. 22, 17897-17905.

- Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, M., Shi, X., Zhao, Z., 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals In Vitro. *Journal of Microbiology*. 46, 624-634.
- Zhang, W. H., Huang, Z., He, L. Y., Sheng, X. F., 2012. Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead-zinc mine tailings. *Chemosphere*. 87, 1171-1178.
- Zhang, Y., Li, T., Zhao, Z.W., 2013. Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in Southwest China. *Soil and Sediment Contamination*. 22(5), 532-545.
- Zhao, D., Li, T., Shen, M., Wang, J., Zhao, Z., 2015. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: evidence from RNA-seq data. *Microbiological Research*, 170:27-35.
- Zhao, X., Huang, J., Lu, J., Sun, Y., 2019. Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 170, 218-226.
- Zheng, S., Xia, Y., Hu, Y., Chen, X., Rui, Y., Gunina, A., He, X., Ge, T., Wu, J., Su, Y., Kuzyakov, Y., 2021. Stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus in soil: effects of agricultural land use and climate at a continental scale. *Soil and Tillage Research*. 209, 104903.

Anexos

Artículos derivados de la tesis

- Solis-Hernández AP, Chávez-Vergara BM, Rodríguez-Tovar AV, Beltrán-Paz OI, Santillán J, Rivera-Becerril F. 2022. Effect of the natural establishment of two plant species on microbial activity, on the composition of the fungal community, and on the mitigation of potentially toxic elements in an abandoned mine tailing. *Science of the Total Environment* 802:149788. **Factor de impacto 2023: 9.8**
- Solis-Hernández AP, Rodríguez-Tovar AV, Carballar-Hernández S, Chávez-Vergara BM, Rivera-Becerril F. 2024. Fungal microbiome involved in the natural attenuation and rehabilitation of the extreme conditions prevailing in an abandoned Pb-, Cd-, As-polluted mine-tailing deposit. *Water, Air, & Soil Pollution, en evaluación*. **Factor de impacto 2023: 2.9**



Effect of the natural establishment of two plant species on microbial activity, on the composition of the fungal community, and on the mitigation of potentially toxic elements in an abandoned mine tailing

Ana­id Penelope Solis-Hernández^a, Bruno M. Ch­avez-Vergara^{b,c}, A­ida V. Rodr­iguez-Tovar^d, Ofelia I. Beltr­an-Paz^{b,c}, Jazm­in Santill­an^e, Facundo Rivera-Becerril^{f,*}

^a Doctorado en Ciencias Biol­gicas y de la Salud, Universidad Aut­onoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

^b Instituto de Geologia, Universidad Nacional Aut­onoma de M­exico, Mexico City, Mexico

^c Laboratorio Nacional de Geoqu­mica y Mineralog­ia, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico

^d Departamento de Microbiolog­ia, Escuela Nacional de Ciencias Biol­gicas, Instituto Polit­ecnico Nacional, Mexico City, Mexico

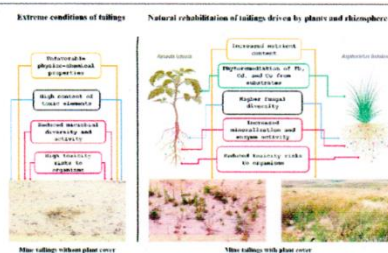
^e Posgrado en Ciencias de la Tierra, Universidad Nacional Aut­onoma de M­exico, Mexico City, Mexico

^f Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Aut­onoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico

HIGHLIGHTS

- *Asphodelus fistulosus* and *Reseda luteola* plants mitigated extreme conditions of tailings.
- Both plants reduced the concentration of potentially toxic elements in tailings.
- Rhizosphere favored a higher fungal diversity.
- Microbial activity was promoted in rhizosphere.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2021

Received in revised form 4 August 2021

Accepted 16 August 2021

Available online 20 August 2021

Editor: Filip M.G. Tack

Keywords:

Asphodelus fistulosus
Dehydrogenase activity
Ecological indicators
Mine wastes
Natural attenuation
Reseda luteola

ABSTRACT

In Mexico, millions of tons of mining wastes are deposited in the open pit. Their content in potentially toxic elements (PTE) represents an environmental risk. In the tailings, pioneer plant communities are established, associated with a determined diversity of fungi; plants, and fungi are fundamental in the natural rehabilitation of mining wastes. The objective was to evaluate the impact of the natural establishment of two plant species on the microbial activity, on the composition of the fungal community, and on the mitigation of the effect of PTE in a contaminated mine tailing. In a tailing, we selected three sites: one non-vegetated; one vegetated by *Reseda luteola*, and one vegetated by *Asphodelus fistulosus*. In the substrates, we conducted a physical and chemical characterization; we evaluated the enzymatic activity, the mineralization of the carbon, and the concentration of PTE. We also determined the fungal diversity in the substrates and in the interior of the roots, and estimated the accumulation of carbon, nitrogen, phosphorus and PTE in plant tissues. The tailings had a high percentage of sand; the non-vegetated site presented the highest electric conductivity, and the plant cover reduced the concentration of PTE in the substrates. Plants increased the carbon content in tailings. The enzymatic activities of β -glucosidase and dehydrogenase, and the mineralization of carbon were highest at the site vegetated with *A. fistulosus*. Both plant species accumulated PTE in their tissues and exhibited potential in the phytoremediation of lead (Pb), cadmium (Cd), and copper (Cu). Fungal diversity was more elevated at the vegetated sites than in the bare substrate.

* Corresponding author at: Departamento El Hombre y su Ambiente, UAM-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960 Mexico City, Mexico. E-mail address: frivera@correo.xoc.uam.mx (F. Rivera-Becerril).

Ascomycota prevailed in the substrates; the substrates and the plants shared some fungal taxa, but other taxa were specific. The plant coverage and the rhizosphere promoted the natural attenuation and a rehabilitation of the extreme conditions of the mining wastes, modulated by the plant species.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The extraction of metallic minerals commonly generates residues in the form of waste muds that are rich in potentially toxic elements (PTE), such as Pb, Cd, zinc (Zn), Cu, arsenic (As), and nickel (Ni) (Szczepanska and Twardowska, 2004). The muds are poured into open-pit dams where, once evaporated in water, they are denominated tailings (Ramos-Arroyo and Siebe-Grabach, 2006; Romero and Gutiérrez-Ruiz, 2010). These tailings present limiting conditions for the establishment of plants, with these latter conditions including a massive structure, an elevated bulk density, high porosity, low water retention, low capacity of cationic exchange, a very low concentration of nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K), the absence of organic matter, as well as an excess of salts and PTE (Becerril et al., 2007; González-Mendoza and Zapata-Pérez, 2008; Hernández-Acosta et al., 2009). In Mexico, there are millions of tons of tailings deposited in the open pit, representing a risk. These materials, on being dispersed, contaminate the water and the soil and are a threat to organisms in the surrounding sites, including humans (Szczepanska and Twardowska, 2004; Carrillo González and González-Chávez, 2006; Ramos-Arroyo and Siebe-Grabach, 2006; Salas-Luevano et al., 2017; Servicio Geológico Mexicano (SGM), 2018).

However, although tailings are highly contaminated with PTE, different plant species have achieved their adaptation through microevolution processes (Baker, 1981; Memon and Schröder, 2009; Baker et al., 2010). These processes are ruled by specific cellular mechanisms, and the processes include the restriction and/or exclusion of the radical absorption of PTE, immobilization of the PTE in the external environment through the radical exudates, the sequestration of the ions in the epidermis, vacuoles, and trichomes, and the translocation of the PTE to the shoots through the xylem (Rascío and Navari-Izzo, 2011; Emamverdian et al., 2015; Singh et al., 2016).

Plants that have achieved the development of these strategies generally are colonizers that are ruderal in character and that, on establishing themselves, act as physical stabilizers of the material. The plants establish an environment of highly dynamic interaction with the substrate, the rhizosphere. In particular, by means of the exudation of the organic compounds in the rhizosphere, different microenvironments are generated, where growth and activity intensify of the microbial community, which is reflected in the extracellular enzymatic activity responsible for nutrient availability and recycling (Mendez and Maier, 2008; Philippot et al., 2013; Prashar et al., 2014; Elizondo et al., 2016; Feng et al., 2017). For example, in a mine tailing, it was observed that in the rhizosphere, phosphatase activity was increased by around 50% in comparison with a non-vegetated zone (Flores-Torres et al., 2021), which positively retributes the availability of P.

In the rhizosphere, the plant releases organic compounds for the microorganisms, and these exert a positive influence on the plant on aiding in the tolerance and/or elimination of the PTE (Kennedy and de Luna, 2005); thus, microbial communities are essential for plant development at PTE-contaminated sites (Epelde et al., 2010). Consequently, naturally established plants and microorganisms are fundamental in natural attenuation, that is, in leading to processes that degrade or dissipate organic or inorganic contaminants in soils, in water, and even in mining substrates (González-Chávez et al., 2009).

Among the microorganisms that are developed within the rhizosphere at sites with a high concentration of PTE, it has been observed that fungi, including endophytes, increase the availability of nutrients (carbon (C), N, and P), modify the biogeochemical functioning at the

plant-substrate interface, and improve plant tolerance to high concentrations of PTE through their sequestration in the cell wall (Ban et al., 2012; Knapp et al., 2012; Likar and Regvar, 2013; Wang et al., 2017). For example, plants of *Zea mays* inoculated with the fungus *Exophiala pisciphila*, increased tolerance to Cd (100 mg kg^{-1}) on activating antioxidant systems and altering the chemical forms of inactive Cd in order to distribute these through the cellular wall (Wang et al., 2016).

Different plant populations possess the capacity to exclude and accumulate PTE in tailings (Baker, 1981). In contaminated soils, the potential was studied of *Rosmarinus officinalis* as a stabilizer plant; the endophytic fungal community, composed of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi, increased plant tolerance against As, Pb, antimony (Sb), and Zn (Alfholder et al., 2014). Yamaji et al. (2016) reported the tolerance of the plant *Clethra barbinervis* at a site highly contaminated with Cu, Zn, and Pb, metals that accumulated in its roots; likewise, the endophytic fungi *Phialocephala fortinii*, *Rhizoderma velutensis*, and *Rhizocypus* were abundant in its roots and conferred greater tolerance against PTE. However, it has been observed that the microbial community can differ in terms of the associated plant species and the chemical characteristics of the substrates (Gagnon et al., 2020; Jia et al., 2020).

In Mexico, mining comprises one of the main economic activities, contributing 41% of the gross internal product of the industrial sector and representing 2.4% of the national gross domestic product (Hernández-Acosta et al., 2009; Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2019). This activity is principally concentrated in the Mexican states of Sonora, Chihuahua, Zacatecas, Durango, and Guerrero, with primordial interest in the extraction of gold (Au), silver (Ag), Cu, Pb, Zn, and iron (Fe) (Salas-Luevano et al., 2017; Cámara Minera de México (CAMIMEX), 2019). It was found that 326,915 tons were obtained of metallic minerals only in the State of Zacatecas in 2017; the volume of the residues generated is unknown (Servicio Geológico Mexicano (SGM), 2018). These residues have accumulated through the years and represent an environmental risk. Therefore, it is necessary to understand the mechanisms that facilitate the establishment of plant species in the tailings, as well as the association of the rhizosphere with the microbial communities. The objective of the present investigation was to evaluate the impact of the natural establishment of two plant species on microbial activity, on the composition of the fungal community, as well as on the mitigation of the effect of PTE in a contaminated tailing. To comply with this objective, we selected an abandoned tailing with the presence of Pb, Cd, As, and Cu, where a non-vegetated site was identified, in addition to two sites with a coverage of the naturally established plant species, *Asphodelus fistulosus* L. and *Reseda luteola* L. We analyzed the accumulation of PTE by means of the plant tissues, the fungal richness and diversity, and some aspects of the microbial activity. The hypothesis was that the rhizosphere positively influences the richness, diversity, and microbial activity, but that it is modulated by the identity of the plant species.

2. Material and methods

2.1. Area of study

The tailing-under-study, localized in Vetagrande, Zacatecas State, Mexico, is denominated Jal Viejo ($22^{\circ}50'27'' \text{ N}$, $102^{\circ}33'14'' \text{ W}$); Jal Viejo has not made a contribution in terms of new mining material in the last 100 years. This tailing has an approximate area of 13.5 ha; the

concentrations of available Pb ($142.88 \text{ mg kg}^{-1}$) and of available Cd (6.6 mg kg^{-1}) exceed critical ecotoxicological levels, but Cu only reached 17 mg kg^{-1} (Flores-Torres et al., 2021). There are no data on As content. The climate of this zone is semi-arid (BS1kw (w)(e)g), with a mean annual precipitation of 510 mm and a mean annual temperature of 16°C (García, 2004; Servicio Geológico Mexicano (SGM), 2018). Jal Viejo is found partially vegetated with patches (Fig. 1) of *Simsia* (Asteraceae), *Tagetes lumulata* (Asteraceae), *Reseda luteola* (Resedaceae), and *Asphodelus fistulosus* (Xanthorrhoeaceae). In particular for the present study, we selected two vegetated plots with two naturalized exotic species, *R. luteola* and *A. fistulosus*.

2.2. Sample collection

We selected three sites that represent the most common conditions found in Jal Viejo, which were denominated based on their plant cover as follows: non-vegetated mining substrate (NV); mining substrate with *R. luteola* cover (RL), and mining substrate with *A. fistulosus* (AF) coverage. Under each condition, we traced a 60-m transect in which a sampling point was established at every 20 m. At each point, we collected a substrate sample with a 100 cm^3 metallic cylinder for determination of the bulk density; the samples were stored in hermetically sealed bags at room temperature. Similarly, at each sampling point with plant cover (RL and AF), we collected two complete, individual plants (aerial and radical biomass), in such a way that we obtained six individuals per site. Under each site, we collected three mining-substrate samples of the rhizospheric environment at a depth of 30 cm with a shovel; these samples were deposited in hermetically sealed bags and were kept in black plastic bags at 4°C to determine enzymatic activity. Finally, for the extraction of total DNA, we took a fraction of the roots of each individual plant, of the mining substrate in the vicinity of the roots, and of the bare mining substrate, keeping these in hermetically sealed bags at 4°C . The roots were disinfected in the laboratory. These samples of roots and substrates were stored at -20°C .

2.3. Physical and chemical properties of the mining substrates, and nutrient content in plant tissues

The humidity of the mining substrates was determined by gravimetry. We placed 20 g of fresh substrate on an aluminum tray; this was dried in an oven (Ecoshel 9023A) at 105°C during 72 h. The dry weight was registered and the loss of humidity was calculated as a percentage. The bulk density was determined by the known-volume cylinder method; the samples of the substrate collected in the 100-cm^3 cylinder were dried to a constant weight at 105°C (Fernández and Luis, 1994). Texture was determined by the pipette method (Gee and Bauder, 1979) from 10 g of fresh mining substrate, to which we added 50 mL of $\text{Na}(\text{PO}_3)_6$ at 10%; this was agitated at 120 rpm during 24 h. Subsequently, the sands were separated through a $53\text{-}\mu\text{m}$ sieve, washed with distilled water, and dried at 105°C during 24 h. The clay and silt particles were transferred into a 1000 mL sedimentation cylinder with 10 mL of $\text{Na}(\text{PO}_3)_6$ at 10%; this was filled with distilled water and shaken for 10 min. The suspension was allowed to rest for 4 h and the clays were collected with a 25-mL pipette, the content was transferred into a melting crucible previously dried at 105°C during 24 h, and the weight of the clays was registered. The weight of the silt was estimated by adding together the weight of the sands and the clays, minus the weight of the initial sample. To calculate the fractions of sand, clay, and silt the weight of each of the particles was multiplied by 100 and divided by the weight of the initial sample. Finally, we obtained the textural class for each site according to The United States Department of Agriculture (USDA) (1999). Electric conductivity (EC) and the pH were quantified in a 1:5 mixture of substrate:deionized water (weight/volume); this was shaken during 30 min at 120 rpm. Later, EC and pH were measured in Thermo Scientific Orion™ Versa Star Pro™ equipment adapted with the corresponding electrons.

For quantification of total concentration of C, N and P, samples of tailings and plant tissues previously dried were ground in a Retsch MM 400 ball mixer mill during 60 s. Total C was determined by combustion at

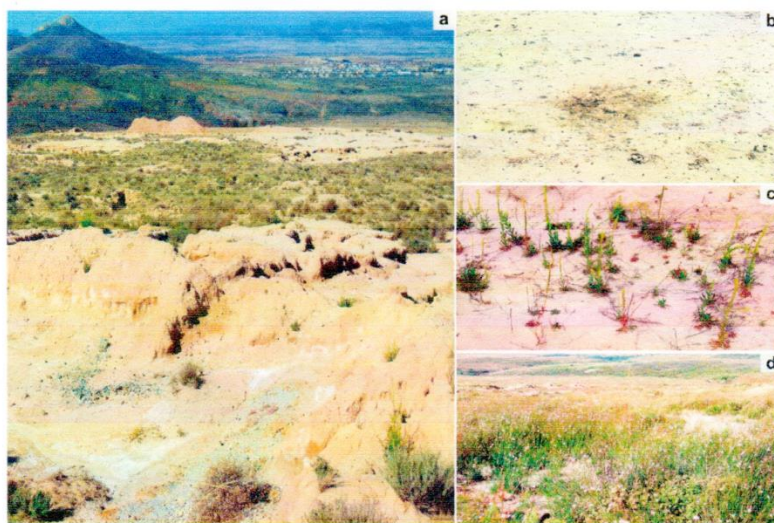


Fig. 1. Deposit of tailings-under-study: a) partial view with non-vegetated and naturally vegetated areas; b) non-vegetated site; c) site vegetated with *Reseda luteola*, and d) site vegetated with *Asphodelus fistulosus*.

950 °C under O₂ flow; the present forms of C in the sample were transformed into CO₂ and were detected by coulometry (Huffman, 1977). After an acid digestion at 360 °C, total N was quantified by the Macro-Kjeldahl method (Bremner, 1996) and total P, by colorimetry at 660 nm (Murphy and Riley, 1962). Stoichiometric relationships were calculated based on the C, N, and P concentrations. Finally, the C, N, and P contents were established in tailings; the three elements were expressed as nutrient content m⁻² at a depth of 30 cm, considering the results in terms of the bulk density of substrates.

2.4. Concentration of potentially toxic elements in the substrates, plant tissues, and the bioconcentration factor

The concentration of PTE in the substrates was determined in the previously dried and ground samples by means of X ray fluorescence (XRF) with Thermo Scientific NitonXL3TUIYRA portable equipment. The spectrometer was calibrated with the Montana 2710a pattern-of-reference to measure the total concentrations of Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe, and Mn.

The roots and shoots of *R. luteola* and *A. fistulosus* were washed with running tap water to remove the mining wastes. Then they were submerged during 20 min into a 10% Extran solution, and three rinses were performed in deionized water. The tissues were dried with absorbent towels, and the stems/leaves were separated from the roots, kept in paper bags, and dried in an oven at 70 °C until reaching a constant weight. The dried samples were ground in a Retsch MM 400 ball mixer mill during 60 s; there was a weight of 20 g per sample, and these samples were deposited in plastic bags. The samples were analyzed at the Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía (LANGEM, UNAM) to determine the total concentration of Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe, and Mn by means of inductively coupled plasma with optical spectrometry (ICP-OES).

The bioconcentration factor (BCF) and the translocation factor (TF) in the aerial fractions of *R. luteola* and *A. fistulosus* were calculated to determine whether the plant species accumulate or stabilize the PTE. If the BCF is <1, the plant species is an excluding element, while if the BCF is >1, the plant species is an accumulator plant. If the TF is <1, the plant species does not possess an efficient PTE translocation to the aerial tissues, while if the TF is >1, the plant species does indeed have an efficient PTE translocation to the aerial tissues (Baker, 1981).

2.5. Microbial activity in the mining substrates

To quantify the depolymerization capacity of some organic molecules by the microorganisms, we determined the activity of four extracellular enzymes in the mining substrates: β-glucosidase (β-GLU); phosphomonoesterase (PME); lipase (LIP), and polyphenol oxidase (POX). In addition, we quantified the activity of dehydrogenase (DEH) as an estimator of microbial metabolic activity (Alef and Nannipieri, 1995; German et al., 2011; Chávez-Vergara et al., 2018). In the case of the hydrolases (β-GLU, PME, and LIP), their activity was quantified through the release from the specific substrates and colorimetric quantification of *p*-nitrophenol (pNP) at 520 nm; determination of POX activity was quantified by means of the oxidation of 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) by colorimetry at 460 nm (German et al., 2011; Chávez-Vergara et al., 2018). Determination of DEH activity was quantified from 1 g of mining substrate to which we added 1 mL of a triphenyl tetrazolium chloride (TTC) solution at 1%; this was left to be agitated in the dark at 25 °C at 180 rpm for 24 h. After this, we added 8 mL of acetone; this was agitated horizontally at 2000 rpm during 2 h. At the end of the agitation, the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 2 min and absorbance was measured at a wavelength of 546 nm (Alef and Nannipieri, 1995; Chávez-Vergara et al., 2018).

The potential mineralization of the C by the heterotrophic microorganisms was determined by means of the quantification of CO₂ (Vance

et al., 1987). We weighed 10 g of mining substrate in a PVC tube; this was humidified at field capacity. The PVC tube was introduced into a jar, as well as a trap vial containing 10 mL of NaOH 0.5 N. The jars were covered and incubated at 25 °C during 8 days; once out of the incubator, they were uncovered, and 5 min later, the vials were removed with some tweezers and were covered. To each NaOH vial trap we added 5 mL of BaCl₂ 1 N and three drops of phenolphthalein, and this was titrated with HCl 1 N (g 100 mL⁻¹).

2.6. Molecular identification and analysis of the fungal community in the mineral substrate and in radical tissue

The total DNA of the mining substrate and of the radical tissue was extracted by the CTAB method (Allers and Litchen, 2000, modified by Rodríguez-Tovar et al., 2004) and the ITS fragment of ~300 bp was amplified (RTLGenomics, Lubbock, TX, USA). According to the protocols described by the Earth Microbiome Project (www.earthmicrobiome.org), the ITS segment was amplified with the primers ITS1f (5'-CTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') and ITS2r (5'-GCTCGCTTCTCATCGATGC-3') (White et al., 1990). The sequences were obtained through the Illumina MiSeq platform and were analyzed by the QIIME 2 version 2019.7 software platform; these were filtered (q2-demux plugin) and were denoised with DADA 2 software (Callahan et al., 2016). The sequences that did not pass through the quality filter were discarded and those that did pass were organized into amplicon single variants (ASVs). The ASVs were assigned to different taxonomic groups (kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species) according to the UNITE database (version 8.0) (Nilsson et al., 2018). The richness, relative abundance, and alpha diversity analysis were generated taking into account the number of ASVs in the samples with the Phyloseq program under an RStudio environment (version 1.0.143) (McMurdie and Holmes, 2013).

2.7. Statistical analyses

We performed a one-way analysis of variance (ANOVA) to compare the means of the three sites. When significant differences were observed among the sites, we applied the Fisher LSD test ($p < 0.05$). The data were analyzed employing the SigmaPlot version 12.0 statistical software package.

3. Results

3.1. Physical and chemical properties of the substrates, and nutrient content in plant tissues

The physical characteristics of the substrate differed among the sites, except in bulk density (Table 1). Distribution in mining-particle size differed among the three sites where, in particular under AF, we observed a greater percentage of sands and a lesser percentage of clay-size particles (Table 1). The textural class for AF was sandy loam, for RL it was clay, and at the NV site it was sandy clay loam. The humidity of the substrates was 40% less in AF with respect to that at the other sites (Table 1). Electrical conductivity at the NV site was significantly higher ($p < 0.001$) than that of the two vegetated sites. The RL site presented a neutral pH, while at the NV and AF sites, the pH was moderately alkaline (Table 1).

The concentration of total C at the vegetated RL site was significantly the highest (8.74 mg g⁻¹), while at the non-vegetated site, it was the lowest (1.94 mg g⁻¹). Total N and total P were similar among the three sites (Table 2). C:N and C:P ratios at the vegetated RL site were higher ($p < 0.05$) as compared to the NV and AF sites. The RL site exhibited the highest content of C in tailings (511 g C m⁻²), while the latter only attained 110 g C m⁻² at the NV site. Concentrations of N and P stocked in the substrate did not show differences between the sites. Concentrations of C and N in plant tissues were similar between *R. luteola* and *A. fistulosus* (Table 2); however, P content was higher

Table 1
Physical and chemical properties of tailings at three sites of Jal Viejo: NV: non-vegetated site; RL: site vegetated with *Reseda luteola*; AF: site vegetated with *Asphodelus fistulosus* (mean ± SE; n = 3).

Properties	NV	RL	AF	F (P)
Moisture (%)	8.27 ± 0.30a	8.06 ± 1.00a	4.75 ± 0.10b	13.6 (0.01)
Bulk density (g cm ⁻³)	1.26 ± 0.09a	1.30 ± 0.07a	1.27 ± 0.09a	0.57 (0.95)
Sand (%)	46.0 ± 2.12b	43.7 ± 3.96b	63.2 ± 2.44a	13.1 (0.01)
Clay (%)	31.6 ± 1.67b	43.6 ± 3.94a	17.3 ± 1.83c	24.1 (0.001)
Electric conductivity (µS cm ⁻¹)	1485 ± 107a	128 ± 1.41b	498 ± 217b	25.1 (0.001)
pH (H ₂ O)	8.13 ± 0.11a	7.00 ± 0.58a	8.15 ± 0.17a	3.44 (0.10)

For each property, different letters indicate significant differences among the sites according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares.

($p < 0.05$) in *R. luteola* than in *A. fistulosus*. The C:P ratio was significantly higher in plant tissues of *A. fistulosus* in comparison to *R. luteola*.

3.2. Concentration of PTE in substrate, plant material, and the bioconcentration factor

The highest levels of all of the elements analyzed (Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe, and Mn) were observed at the site without plant cover; these levels were significantly different in comparison to the vegetated sites, with the exception of the case of Fe (Table 3). The substrates vegetated by *R. luteola* and by *A. fistulosus* exhibited a decrease of 15–81% and of 2–43%, respectively, in the concentration of PTE with respect to the NV substrate (Table 3).

The content of Pb was significantly different among the substrates of the three sites, with maximal levels in NV (3984 mg kg⁻¹), intermediate levels in AF (2656 mg kg⁻¹), and low levels in RL (853 mg kg⁻¹). Cd also reached different levels among the sites, with 62.9 mg kg⁻¹ in NV, 41.7 mg kg⁻¹ in AF, and 15.5 mg kg⁻¹ in RL. The NV site presented the highest levels in Zn with 9738 mg kg⁻¹; however, these levels were 43% and 81% lower in AF and RL, respectively. The concentrations of As were higher in NV and AF (295–302 mg kg⁻¹) than in RL (63.2 mg kg⁻¹). Cu was significantly higher in NV (283 mg kg⁻¹) with regard to AF and RL (148–175 mg kg⁻¹). The concentrations of Fe ranged between 42,049 and 49,398 mg kg⁻¹, without differences among the sites. Finally, Mn was higher in NV and in AF (1599–1759 mg kg⁻¹) in comparison with RL (953 mg kg⁻¹).

The total concentrations of Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe, and Mn in the tissues of *R. luteola* and *A. fistulosus* are observed in Table 4. *A. fistulosus*

accumulated higher amounts of the two, non-essential PTE in the roots and aerial tissues in the live systems, that is, Pb and Cd, in comparison with *R. luteola*. The concentration of Pb in the shoots of *R. luteola* was 1.5-times higher than in the roots; in contrast, in the roots of *A. fistulosus*, total Pb was 2.6-times higher than in the shoots. In *R. luteola*, there was a lower accumulation of Cd in the roots (1.44 mg kg⁻¹) than in the shoots (4.92 mg kg⁻¹); for their part, the roots of *A. fistulosus* demonstrated a lower accumulation of Cd (17.8 mg kg⁻¹) than the shoots (35.1 mg kg⁻¹). The accumulation of total Zn was greater in the shoots (59–79%) than in the roots (21–41%) of the two plants. The As in *R. luteola* was under the limit of detection (0.52 mg kg⁻¹); in *A. fistulosus*, the concentrations of As were detected as similar in comparison with those of the roots and shoots (2.03–2.13 mg kg⁻¹). *R. luteola* accumulated a total of 31.4 mg kg⁻¹ of Cu in its tissues, while *A. fistulosus* reached 86.6 mg kg⁻¹; both plants accumulated more Cu in shoots than in roots. Fe and Mn also accumulated more in shoots than in roots in the two plants; both elements reached very close levels in both species: 633–693 mg kg⁻¹ of Fe, and 107–158 mg kg⁻¹ of Mn.

With relation to the BCF, *R. luteola* demonstrated values lower than 1 in Pb, Cd, Zn, Cu, Fe, and Mn (Table 4); however, the TF revealed levels higher than 1 in Pb (1.49), Cd (3.41), Zn (3.78), Cu (3.46), Fe (2.18), and Mn (7.19). In *A. fistulosus*, the highest BCF was in Cd (0.43); likewise, the TF was greater than 1 in Cd (1.97), Zn (1.45), Cu (1.19), Fe (1.42), and Mn (2.75).

3.3. Microbial activity in the mining substrate

The enzymatic activities of LIP, POX, and PME did not show significant differences among the studied sites (Table 5). The β-GLU activity was significantly superior at the AF vegetated site (0.39 µmol pNP g⁻¹ h⁻¹) with

Table 2
Total concentrations and stoichiometry of nutrients (C, carbon; N, nitrogen; P, phosphorus) in tailings and plant tissues at three sites of Jal Viejo: NV: non-vegetated site; RL: site vegetated with *Reseda luteola*; AF: site vegetated with *Asphodelus fistulosus* (mean ± SE; n = 3).

Nutrients	NV	RL	AF	F (P)
Total concentration of nutrients in tailings				
C (mg g ⁻¹)	1.94 ± 0.27b	8.74 ± 3.66a	4.13 ± 1.67ab	6.45 (0.03)
N (mg g ⁻¹)	0.43 ± 0.31a	0.16 ± 0.08a	0.36 ± 0.18a	1.30 (0.34)
P (mg g ⁻¹)	0.22 ± 0.05a	0.31 ± 0.04a	0.27 ± 0.06a	2.36 (0.18)
Stoichiometry of nutrients in tailings				
C:N	13.7 ± 6.43b	56.0 ± 2.35a	12.4 ± 1.52b	12.5 (0.01)
C:P	8.58 ± 0.69b	27.8 ± 2.89a	14.9 ± 0.96b	9.83 (0.01)
N:P	2.25 ± 0.59a	0.51 ± 0.07a	1.32 ± 0.17a	2.00 (0.22)
Nutrient content in tailings				
C (g C m ⁻²)	110 ± 46.5b	511 ± 71.4a	237 ± 31.8ab	6.65 (0.03)
N (g N m ⁻²)	24.6 ± 5.93a	9.50 ± 1.56a	20.8 ± 3.41a	1.25 (0.35)
P (g P m ⁻²)	12.4 ± 0.99a	17.9 ± 0.80a	15.4 ± 1.05a	2.84 (0.13)
Total concentration of nutrients in plant tissues				
C (mg g ⁻¹)	-	408 ± 5.19a	418 ± 0.06a	1.27 (0.32)
N (mg g ⁻¹)	-	12.0 ± 0.04a	8.95 ± 0.68a	6.94 (0.06)
P (mg g ⁻¹)	-	1.75 ± 0.08b	0.81 ± 0.03a	42.3 (0.01)
Stoichiometry of nutrients in plant tissues				
C:N	-	33.8 ± 0.52a	48.1 ± 3.23a	6.39 (0.06)
C:P	-	237 ± 13.8b	517 ± 17.1a	54.1 (0.01)
N:P	-	6.99 ± 0.32a	11.2 ± 1.13a	4.25 (0.11)

For each property, different letters indicate significant differences among the sites according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares.

Table 3
Total concentrations of potentially toxic elements in the tailings of the three sites of Jal Viejo: NV: non-vegetated site; RL: site vegetated with *Reseda luteola*; AF: site vegetated with *Asphodelus fistulosus* (mean ± SE; n = 3).

PTE (mg kg ⁻¹)	NV	RL	AF	F (P)
Pb	3984 ± 306a (100%)	853 ± 250b (79%)	2656 ± 151c (33%)	8.91 (0.02)
Cd	62.9 ± 4.37a (100%)	15.5 ± 2.81b (75%)	41.7 ± 1.71c (34%)	14.4 (<0.01)
Zn	9738 ± 741a (100%)	1887 ± 565b (81%)	5551 ± 326b (43%)	10.6 (0.01)
As	302 ± 49.9a (100%)	63.2 ± 14.8b (79%)	295 ± 33.9a (2%)	11.4 (<0.01)
Cu	283 ± 27.3a (100%)	148 ± 25.5b (48%)	175 ± 10.3b (38%)	10.2 (0.01)
Fe	49,398 ± 2415a (100%)	42,049 ± 743a (15%)	46,720 ± 1629a (5%)	4.59 (0.06)
Mn	1759 ± 48.6a (100%)	953 ± 281b (46%)	1599 ± 56.2a (9%)	6.47 (0.03)

For each PTE, different letters indicate significant differences among the sites according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares. Numbers in bold in parentheses indicate the decrease of the concentration in the percentage of each PTE at the RL and AF sites in relation to the NV site.

Table 1
Physical and chemical properties of tailings at three sites of Jal Viejo: NV: non-vegetated site; RL: site vegetated with *Reseda luteola*; AF: site vegetated with *Asphodelus fistulosus* (mean ± SE; n = 3).

Properties	NV	RL	AF	F (P)
Moisture (%)	8.27 ± 0.30a	8.06 ± 1.00a	4.75 ± 0.10b	13.6 (0.01)
Bulk density (g cm ⁻³)	1.26 ± 0.09a	1.30 ± 0.07a	1.27 ± 0.09a	0.57 (0.95)
Sand (%)	46.0 ± 2.12b	43.7 ± 3.96b	63.2 ± 2.44a	13.1 (0.01)
Clay (%)	31.6 ± 1.67b	43.6 ± 3.94a	17.3 ± 1.83c	24.1 (0.001)
Electric conductivity (µS cm ⁻¹)	1485 ± 107a	128 ± 1.41b	498 ± 217b	25.1 (0.001)
pH (H ₂ O)	8.13 ± 0.11a	7.00 ± 0.58a	8.15 ± 0.17a	3.44 (0.10)

For each property, different letters indicate significant differences among the sites according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares.

($p < 0.05$) in *R. luteola* than in *A. fistulosus*. The C:P ratio was significantly higher in plant tissues of *A. fistulosus* in comparison to *R. luteola*.

3.2. Concentration of PTE in substrate, plant material, and the bioconcentration factor

The highest levels of all of the elements analyzed (Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe, and Mn) were observed at the site without plant cover; these levels were significantly different in comparison to the vegetated sites, with the exception of the case of Fe (Table 3). The substrates vegetated by *R. luteola* and by *A. fistulosus* exhibited a decrease of 15–81% and of 2–43%, respectively, in the concentration of PTE with respect to the NV substrate (Table 3).

The content of Pb was significantly different among the substrates of the three sites, with maximal levels in NV (3984 mg kg⁻¹), intermediate levels in AF (2656 mg kg⁻¹), and low levels in RL (853 mg kg⁻¹). Cd also reached different levels among the sites, with 62.9 mg kg⁻¹ in NV, 41.7 mg kg⁻¹ in AF, and 15.5 mg kg⁻¹ in RL. The NV site presented the highest levels in Zn with 9738 mg kg⁻¹; however, these levels were 43% and 81% lower in AF and RL, respectively. The concentrations of As were higher in NV and AF (295–302 mg kg⁻¹) than in RL (63.2 mg kg⁻¹). Cu was significantly higher in NV (283 mg kg⁻¹) with regard to AF and RL (148–175 mg kg⁻¹). The concentrations of Fe ranged between 42,049 and 49,398 mg kg⁻¹, without differences among the sites. Finally, Mn was higher in NV and in AF (1599–1759 mg kg⁻¹) in comparison with RL (953 mg kg⁻¹).

The total concentrations of Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe, and Mn in the tissues of *R. luteola* and *A. fistulosus* are observed in Table 4. *A. fistulosus*

accumulated higher amounts of the two, non-essential PTE in the roots and aerial tissues in the live systems, that is, Pb and Cd, in comparison with *R. luteola*. The concentration of Pb in the shoots of *R. luteola* was 1.5-times higher than in the roots; in contrast, in the roots of *A. fistulosus*, total Pb was 2.6-times higher than in the shoots. In *R. luteola*, there was a lower accumulation of Cd in the roots (1.44 mg kg⁻¹) than in the shoots (4.92 mg kg⁻¹); for their part, the roots of *A. fistulosus* demonstrated a lower accumulation of Cd (17.8 mg kg⁻¹) than the shoots (35.1 mg kg⁻¹). The accumulation of total Zn was greater in the shoots (59–79%) than in the roots (21–41%) of the two plants. The As in *R. luteola* was under the limit of detection (0.52 mg kg⁻¹); in *A. fistulosus*, the concentrations of As were detected as similar in comparison with those of the roots and shoots (2.03–2.13 mg kg⁻¹). *R. luteola* accumulated a total of 31.4 mg kg⁻¹ of Cu in its tissues, while *A. fistulosus* reached 86.6 mg kg⁻¹; both plants accumulated more Cu in shoots than in roots. Fe and Mn also accumulated more in shoots than in roots in the two plants; both elements reached very close levels in both species: 633–693 mg kg⁻¹ of Fe, and 107–158 mg kg⁻¹ of Mn.

With relation to the BCF, *R. luteola* demonstrated values lower than 1 in Pb, Cd, Zn, Cu, Fe, and Mn (Table 4); however, the TF revealed levels higher than 1 in Pb (1.49), Cd (3.41), Zn (3.78), Cu (3.46), Fe (2.18), and Mn (7.19). In *A. fistulosus*, the highest BCF was in Cd (0.43); likewise, the TF was greater than 1 in Cd (1.97), Zn (1.45), Cu (1.19), Fe (1.42), and Mn (2.75).

3.3. Microbial activity in the mining substrate

The enzymatic activities of LIP, POX, and PME did not show significant differences among the studied sites (Table 5). The β-GLU activity was significantly superior at the AF vegetated site (0.39 µmol pNP g⁻¹ h⁻¹) with

Table 2
Total concentrations and stoichiometry of nutrients (C, carbon; N, nitrogen; P, phosphorus) in tailings and plant tissues at three sites of Jal Viejo: NV: non-vegetated site; RL: site vegetated with *Reseda luteola*; AF: site vegetated with *Asphodelus fistulosus* (mean ± SE; n = 3).

Nutrients	NV	RL	AF	F (P)
Total concentration of nutrients in tailings				
C (mg g ⁻¹)	1.94 ± 0.27b	8.74 ± 3.66a	4.13 ± 1.67ab	6.45 (0.03)
N (mg g ⁻¹)	0.43 ± 0.31a	0.16 ± 0.08a	0.36 ± 0.18a	1.30 (0.34)
P (mg g ⁻¹)	0.22 ± 0.05a	0.31 ± 0.04a	0.27 ± 0.06a	2.36 (0.18)
Stoichiometry of nutrients in tailings				
C:N	13.7 ± 6.43b	56.0 ± 2.35a	12.4 ± 1.52b	12.5 (0.01)
C:P	8.58 ± 0.69b	27.8 ± 2.89a	14.9 ± 0.96b	9.83 (0.01)
N:P	2.25 ± 0.59a	0.51 ± 0.07a	1.32 ± 0.17a	2.00 (0.22)
Nutrient content in tailings				
C (g C m ⁻²)	110 ± 46.5b	511 ± 71.4a	237 ± 31.8ab	6.65 (0.03)
N (g N m ⁻²)	24.6 ± 5.93a	9.50 ± 1.56a	20.8 ± 3.41a	1.25 (0.35)
P (g P m ⁻²)	12.4 ± 0.99a	17.9 ± 0.80a	15.4 ± 1.05a	2.84 (0.13)
Total concentration of nutrients in plant tissues				
C (mg g ⁻¹)	–	408 ± 5.19a	418 ± 0.06a	1.27 (0.32)
N (mg g ⁻¹)	–	12.0 ± 0.04a	8.95 ± 0.68a	6.94 (0.06)
P (mg g ⁻¹)	–	1.75 ± 0.08b	0.81 ± 0.03a	42.3 (0.01)
Stoichiometry of nutrients in plant tissues				
C:N	–	33.8 ± 0.52a	48.1 ± 3.23a	6.39 (0.06)
C:P	–	237 ± 13.8b	517 ± 17.1a	54.1 (0.01)
N:P	–	6.99 ± 0.32a	11.2 ± 1.13a	4.25 (0.11)

For each property, different letters indicate significant differences among the sites according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares.

Table 3
Total concentrations of potentially toxic elements in the tailings of the three sites of Jal Viejo: NV: non-vegetated site; RL: site vegetated with *Reseda luteola*; AF: site vegetated with *Asphodelus fistulosus* (mean ± SE; n = 3).

PTE (mg kg ⁻¹)	NV	RL	AF	F (P)
Pb	3984 ± 306a (100%)	853 ± 250b (79%)	2656 ± 151c (33%)	8.91 (0.02)
Cd	62.9 ± 4.37a (100%)	15.5 ± 2.81b (75%)	41.7 ± 1.71c (34%)	14.4 (<0.01)
Zn	9738 ± 741a (100%)	1887 ± 565b (81%)	5551 ± 326b (43%)	10.6 (0.01)
As	302 ± 49.9a (100%)	63.2 ± 14.8b (79%)	295 ± 33.9a (2%)	11.4 (<0.01)
Cu	283 ± 27.3a (100%)	148 ± 25.5b (48%)	175 ± 10.3b (38%)	10.2 (0.01)
Fe	49,398 ± 2415a (100%)	42,049 ± 743a (15%)	46,720 ± 1629a (5%)	4.59 (0.06)
Mn	1759 ± 48.6a (100%)	953 ± 281b (46%)	1599 ± 56.2a (9%)	6.47 (0.03)

For each PTE, different letters indicate significant differences among the sites according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares. Numbers in bold in parentheses indicate the decrease of the concentration in the percentage of each PTE at the RL and AF sites in relation to the NV site.

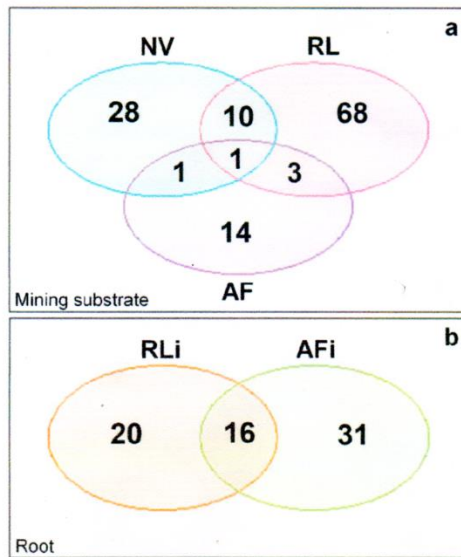


Fig. 2. Venn diagrams of (a) number of fungal amplicon sequence variants (ASVs) in the non-vegetated site (NV), and in tailings adjacent to the roots of *Reseda luteola* (RL), and *Asphodelus fistulosus* (AF); (b) number of fungal ASVs in the interior of the roots of both plants, *Reseda luteola* (RLi) and *Asphodelus fistulosus* (AFi).

sedis (19%), and Helotiaceae (14%). At the AF site, the sole phylum present was Ascomycota; the most abundant classes were Sordariomycetes (63%), Eurotiomycetes (19%), and Dothideomycetes (7%), and the orders with greatest presence were Hypocreales (62%), Chaetothyriales (14%), and Pleosporales (7%). The most abundant families at the AF site were Nectriaceae (53%), Herpotrichiellaceae (16%), and Incertae sedis (11%). At the interior of the roots of *R. luteola*, the phylum with the greatest presence was Ascomycota (99%), and only 1% corresponded to Basidiomycota and Mortierellomycota. The most abundant classes were Hypocreales (46%), Pleosporales (30%), and Xylariales (11%), while the families with the greatest presence were Incertae sedis (34%), Clavicipitaceae (15%), Diatrypaceae (14%), and Pleosporaceae (13%). In the interior of the *A. fistulosus* roots, Ascomycota was the most abundant phylum (99%), followed by Basidiomycota (1%), and the classes with the greatest presence were Sordariomycetes (49%), Dothideomycetes (29%), and Leotiomycetes (17%). The most abundant orders were Hypocreales (45%), Pleosporales (27%), and Helotiales (18%), while the families with the greatest presence were Nectriaceae (35%), Helotiaceae (18%), Pleosporaceae (17%), and Phaeosphaeriaceae (10%). Finally, determination of the taxonomic level was unable to be achieved of 25% of the fungal community considering the three sites and the roots of the two plants.

The fungal community of the mining substrates of the three sites, as well as the interior of the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus*, made up two groups (Fig. 4). The first group comprised the NV site, while in the second were grouped the communities of the mining substrates of the RL and AF sites, as well as the interior of the roots of the two plants. The fungal community of the RL site was more similar to that of the NV site. The fungal community of the roots of *R. luteola* was more similar to that of the NV and RL sites, while the community at the interior of the roots of *A. fistulosus* was more similar to the RL and AF sites. The most abundant genera at the NV, RL, and AF sites were *Fusarium*, *Sarocladium*, and *Penicillium*; the NV and RL sites shared *Alternaria* and *Mortierella*. The genus *Stilbella* was only observed at the NV site, while *Scytalidium*, *Naganishia*, *Trechispora*, and *Filobasidium* were present at the RL site, and *Exophiala* was present at the AF site. *R. luteola* and *A. fistulosus*

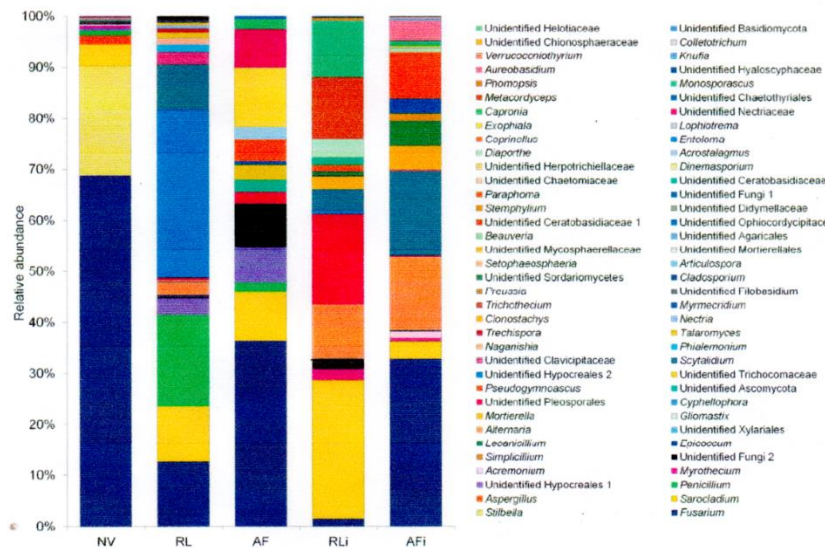


Fig. 3. Relative abundance of members of the fungal community present in tailings and in the interior of the roots of the plants established at Jal Viejo. NV, non-vegetated tailings; RL, tailings vegetated with *Reseda luteola*; AF, tailings vegetated with *Asphodelus fistulosus*; RLi, interior of the roots of *R. luteola*; AFi, interior of the roots of *A. fistulosus*.

shared *Alternaria*, *Scytalidium*, *Sarocladium*, and *Fusarium* at the interior of their roots. *Metacordyceps* was observed solely in the interior of the roots of *R. luteola*; *Exophiala* and *Naganishia* were detected in the interior of the roots of *A. fistulosus*. It is noteworthy that *Penicillium* was present in the substrates, but absent in the interior of the roots of the two plants; *Fusarium* and *Sarocladium* were detected in the interior and the exterior of the roots of both plants.

4. Discussion

4.1. Physical and chemical conditions of the mine tailings, and nutrient content in plant tissues

The present work provides evidence on a deposit of open-air mining wastes abandoned some dozens of years ago in a semi-arid region.

Different plant species have become established at specific sites of Jal Viejo. The contrast between a non-vegetated site and two vegetated sites with different species, *R. luteola* and *A. fistulosus*, allowed for the identification of the positive influence of plant coverage and of the particular effect of the rhizosphere in the natural mitigation of the adverse conditions of the mining wastes. The plants studied at Jal Viejo, that is, *R. luteola* and *A. fistulosus*, entertain a broad interval of distribution; on being considered naturalized invasive species (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2021), it has been observed that these plants survive in tailings with high contents of PTE (Carrillo González and González-Chávez, 2006; Salas-Luevano et al., 2017).

Tailings, in general, possess an unstable physical structure, high concentrations of PTE, and a low content of nutrients; thus, they are not favorable or they imply very particular stress conditions for the



Fig. 4. Heatmap analysis of the distribution of the fungal community in tailings and in the interior of the roots of *Reseda luteola* and *Asphodelus fistulosus*. The values for each taxon are described by the intensity of the color. Abundance was expressed as the value of the target sequences for each sample. NV, non-vegetated tailings; RL, tailings vegetated with *Reseda luteola*; AF, tailings vegetated with *Asphodelus fistulosus*; RLi, interior of the roots of *R. luteola*; AFi, interior of the roots of *A. fistulosus*.

development of the plants (Ye et al., 2002; Asensio et al., 2013; Wang et al., 2017). The three Jal Viejo sites presented a dominance in sands, a characteristic that exerts an influence on plant establishment (Hernández-Acosta et al., 2009). The vegetated AF site was prominent in terms of having the highest content of sands (63.2%), which was linked with the lowest capacity of water retention, 4.75% (Conesa et al., 2006). Counterintuitively, the substrates of the vegetated sites RL and AF presented lower electric conductivity than the NV site; the higher levels of electric conductivity ($1485 \mu\text{S cm}^{-1}$) at the NV site can be attributed to the presence of the residual soluble salts that are the primary sources of PTE, such as Pb, Cd, Zn, As, Cu, and Fe (Gutiérrez-Ruiz et al., 2007; Pérez-Martínez and Romero, 2015). The pH at the three study sites was neutral (RL) to moderately alkaline (NV and AF), indicating that these mine tailings do not generate acid leaching (Pérez-Martínez and Romero, 2015). The plant species at the RL and AF sites could be modifying the conditions of the tailing in order to favor their growth, thus the pH range from neutral to alkaline (Conesa et al., 2006). Tahar and Keltoum (2011) reported that a pH interval ranging from 6.5 to 8.76 favored the availability of nutrients for the plants, and the toxicity of the PTE diminished. In addition, this stimulated greater metabolic activity of the rhizosphere microorganisms.

Carbon, N, and P are fundamental elements for the maintenance of soil fertility, consequently for key ecosystem processes regulated by the soil, such as primary productivity and nutrient cycling. Here, concentrations of these three elements in tailings were lower in comparison to those of the soils (Zheng et al., 2021), highlighting nutrient deficiencies in mine wastes. Higher C concentrations in vegetated sites as compared to the Jal Viejo tailing's non-vegetated site demonstrated a positive role of plant cover that provides an edaphic environment with this nutrient. The highest C:N and C:P ratios in vegetated tailings with *R. luteola* are linked to slow decomposition rates as a consequence of reduced N and P contents. The content of C, N, and P in plant tissues achieved the reported mean levels in plants from different biomes (Tang et al., 2018), again reinforcing the role of plant patches in ameliorating the nutrient status of tailings.

4.2. PTE concentration in the substrate, plant material, and the bioaccumulation

The tailings, on being dispersed by water and wind action, imply environmental threats due to the high amount of PTE persisting in the ecosystems as contaminants; these can affect and be accumulated by humans (Gutiérrez-Ruiz et al., 2007; Liu et al., 2019). In spite of this, there are no regulations that specify the critical concentrations of the PTE present. This study takes into consideration the total critical concentrations of Pb (400 mg kg^{-1}), Cd (20 mg kg^{-1}), As (60 mg kg^{-1}), and Cu (100 mg kg^{-1}) in soils, as cited by Carrillo González and González-Chávez (2006), and by Kabata-Pendias (2011). Jal Viejo represents an environmental problem due to its containing high levels of Pb, Cd, and As. Romero et al. (2008) reported lower levels of Pb (2034 mg kg^{-1}) in a tailing, but the levels of As (851 mg kg^{-1}) and Cu ($12,735 \text{ mg kg}^{-1}$) were higher than those at the NV site. In a reforested tailing, a vegetated site with *A. fistulosus* presented contents of Pb (512 mg kg^{-1}) and of Cd (13 mg kg^{-1}), lower than those of Jal Viejo (Salas-Luevano et al., 2017); however, As (4387 mg kg^{-1}) was higher than at the AF site. On appreciating the concentrations of PTE in the substrate at the three Jal Viejo sites, the most outstanding fact was that, in the vegetated substrates, the content of PTE was notoriously lower than at the NV site: in the presence of *R. luteola*, the PTE level was reduced between 15% and 81%, and in the presence of *A. fistulosus*, the diminution was between 2% and 43%. In this regard, both plant species stabilized and/or phytoaccumulated a relevant fraction of the PTE, which is explained by that the substrates of the vegetated sites had a lower concentration of PTE (Borymski et al., 2018).

The stabilization and/or accumulation of PTE are determined by the plant genotype, the microbial associations in the rhizosphere, the

environmental conditions (Borymski et al., 2018; Singh et al., 2016), and as due to the PTE themselves, which explains the variations between both plant species in relation to their impact on the content of PTE in the substrates. At the RL site, the high content of clays in the substrate favored the sequestration of PTE and the diminution of their availability (Prieto Méndez et al., 2009). The substrate of the AF site, constituted in its majority of sands, can contribute to the low bioavailability of the PTE (Baker et al., 2010). The PTE concentrations at the AF site were higher with regard to the RL site. *A. fistulosus* is a perennial species that could be continually contributing organic material to the substrates, forming a microcosms that favors not only tolerance to PTE, but also the increase in the ecological processes of mineralization and the recycling of nutrients in the abandoned tailings (Epelde et al., 2010; Elizondo et al., 2016; Wang et al., 2017).

PTE concentrations in *R. luteola* and *A. fistulosus* tissues were lower than in the substrate corresponding to both species. This can be attributed to the existence of a low percentage of soluble PTE, the latter to with the alkaline environment of the mining substrate (Ye et al., 2015). Plant species absorb and accumulate PTE in their roots (phytostabilization) or they transfer them from the roots to the shoots (phytoextraction) (Bhatti et al., 2018; Yan et al., 2020). The concentrations observed in the roots and in the shoots of *R. luteola* and *A. fistulosus* demonstrate that the essential elements are taken up in greater amounts than the non-essential elements (Bhatti et al., 2018). Pb, Cd, and As, on not being essential, presented lower concentrations (Nagajyoti et al., 2010). *R. luteola* and *A. fistulosus* roots accumulated lower concentrations of PTE than the shoots. Yan et al. (2020) mention that roots comprise a barrier that avoids the entry of PTE into the shoots. However, in this study, the roots permitted the translocation of the metallic ions into the shoots. In conjunction, the roots and the aerial tissues of *A. fistulosus* exceeded the maximal accumulation levels in plants of Pb (100 mg kg^{-1}), Cd (30 mg kg^{-1}), and Cu (20 mg kg^{-1}) proposed by Kabata-Pendias (2011). In *R. luteola*, only Cu (31.4 mg kg^{-1}) surpassed the maximal level. In the reforested tailing (Salas-Luevano et al., 2017) *A. fistulosus* accumulated, in its shoots, Pb (31 mg kg^{-1}) and Cd (6 mg kg^{-1}), levels that were lower than those in this study; however, that of As (921 mg kg^{-1}) was higher. On the other hand, Carrillo González and González-Chávez (2006) reported higher concentrations of Cd (12 mg kg^{-1}) and Pb (32 mg kg^{-1}), and lower levels of Cu (10 mg kg^{-1}) in the shoots of *R. luteola*, but Cd (6 mg kg^{-1}), Pb (104 mg kg^{-1}), and Cu (8 mg kg^{-1}) in the shoots of *A. fistulosus* were lower than those reported herein. These divergences can be due to the plant ecotype, to the element-in-question, and to its concentration, among other factors (Baker et al., 2010).

On considering that the accumulation of PTE in their shoots was less than 1000 mg kg^{-1} , *R. luteola* and *A. fistulosus* are not hyperaccumulator species (Baker and Brooks, 1989); notwithstanding this, both plants tolerated and accumulated PTE in their different tissues. The BCF and the TF evaluate the potential of a plant for purposes of phytoremediation (Yoon et al., 2006; Bhatti et al., 2018). BCF values for Pb, Cd, Zn, As, Cu, Fe, and Mn in *R. luteola* and in *A. fistulosus* were <1 , although *A. fistulosus* accumulated in its roots higher levels of Pb (94.5 mg kg^{-1}), Cd (17.8 mg kg^{-1}), As (2.03 mg kg^{-1}), and Cu (14.3 mg kg^{-1}) than *R. luteola*. However, a certain efficiency was observed for absorbing Cu (BCF = 0.43) on the part of *A. fistulosus*. Carrillo González and González-Chávez (2006) reported that the BCF in *A. fistulosus* was more than 1 for Pb (2.0) and Cd (1.2). The total concentration of PTE in shoots comprises the most important parameter for evaluating the potential of phytoextraction in a plant, while the TF is an indicator of the mobility of the PTE in plant tissues (Zaier et al., 2010; Amin et al., 2018). In the present study, *R. luteola* was more efficient in the translocation of Mn (TF = 7.19), followed by Zn (TF = 3.78), Cu (TF = 3.46), Cd (TF = 3.41), Fe (TF = 2.18), and Pb (TF = 1.49), where the essential nutrients possessed greater efficiency of translocation. In *A. fistulosus*, the most efficient translocation was that of Mn (TF = 2.75), followed by Cd (TF = 1.97), Zn (TF = 1.45), Fe (TF =

1.42), and Cu (TF = 1.19). The greater absorption of Cd than of Zn in the shoots of *A. fistulosus* suggests competition between both elements (Amin et al., 2018). On the other hand, *A. fistulosus* was not efficient for the translocation of Pb (TF = 0.38). The high uptake of Pb affects the morphology, growth, and photosynthetic processes of plants (Nagajyoti et al., 2010); *A. fistulosus* avoids translocating the Pb of its roots to the shoots to diminish its toxicity. Tolerance of the plant species to toxicity by PTE, as well as their adaptability to the local environmental conditions, play a key role in the efficiency of the phytoextraction (Salas-Luevano et al., 2017). In this study, it was observed that *R. luteola* and *A. fistulosus* have a potential to phytoextract Pb, Cd, and Cu in contaminated tailings.

4.3. Microbial activity in the mining substrates

The elevated concentration of PTE in mining wastes can directly inhibit enzymatic activity through immobilization of the enzymes, or indirectly as a consequence of the toxicity to the microorganisms (Tunc and Demir, 2019). However, the establishment of vegetation can differentially modify this effect, as observed at the three sites, particularly on the increase of the activity of β -glucosidase and dehydrogenase in the AF vegetated site, and in the tendency on increasing the polyphenol oxidase and phosphomonoesterase activities in the substrate associated with both plant species, in contrast with the non-vegetated substrate. The latter was consistent with the highest rate of carbon mineralization ($15.1 \mu\text{g C g}^{-1} \text{d}^{-1}$) in the AF vegetated site, whose values reflect a high contribution of organic plant material, favoring microbial activity and the supply of nutrients in the mining substrates (Borymski et al., 2018). *A. fistulosus* entertains a profuse growth, with an elevated production of biomass that is deposited in the ground; in contrast, *R. luteola* is a plant with a lower biomass production. In addition to PTE, the enzymatic activity of the study sites is determined by other physical, chemical, and biological factors that affect the metal–enzyme interaction (Karaca et al., 2010).

4.4. Changes in the structure of the fungal community

The PTE present in the tailings negatively affect the plants, as well as the abundance, activity, and diversity of the microorganisms (Epelde et al., 2010). The microorganisms of the rhizosphere can increase plant tolerance against PTE (Yamaji et al., 2016). Fungi possess the capacity to resist and adapt to metal stress and can promote the evolution of PTE-tolerant ecotypes (Gadd, 1993; Anahid et al., 2011; Likar and Regvar, 2013). Here, we carried out an analysis of this fungal community at the interior and exterior of the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus*; for a comparison, the community of the NV substrate was analyzed. In all of the cases, the mycelium-forming fungi prevailed. Cao and Liu (2015) reported that filamentous fungi reduced PTE bio-availability and toxicity. It is noteworthy that the mining substrates in the vicinity of the roots of *R. luteola* (2.62) and *A. fistulosus* (2.51) demonstrated greater fungal diversity than the NV site (1.47); in the latter, the high concentrations of PTE could affect this diversity (Kavamura and Esposito, 2010). The highest fungal diversity at the vegetated sites was favored by *R. luteola* and *A. fistulosus* on providing a broad gamma of nutrients to the microbial community; at the NV site, the contribution of organic matter was more limited (Borymski et al., 2018). Similarly, in some cases, microbial communities can be very specific and possess low diversity (Epelde et al., 2010), as can be appreciated at the NV site, where the community was less diverse and more dominant (0.34). On the other hand, the fungal communities present in the interior of the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus* could be acting as a second layer of defense of the plants to confront the high concentrations of PTE in the mining substrates (Dini-Adreote, 2020). The RL (68 ASV) and AF (14 ASV) sites had a specific fungal community that could be key for the establishment and plant maintenance in these sites contaminated by PTE (Borymski et al., 2018; Rodríguez et al., 2019).

The largest and most diverse phylum, Ascomycota, was the most abundant at the three sites-under-study. The members of this phylum, including saprobes, parasites, and symbionts, entertain a relevant ecological importance on colonizing diverse habitats, where they intervene in the functioning of the ecosystems (Ávalos Lázaro et al., 2018). The phyla Basidiomycota and Mortierellomycota were also present at the study site; Ascomycota and Basidiomycota are commonly reported in soils contaminated by PTE (Mishra et al., 2017). Ye et al. (2020), in a soil contaminated by mining, reported Ascomycota and Basidiomycota as the most abundant; other taxa were also present (Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Agaricomycetes, Nectriaceae, Mortierellaceae, Incertae sedis, Trichocomaceae, and *Fusarium*), these coinciding with that reported herein. In the present study, it was observed that fungi can adapt to different PTE concentrations on modifying the abundance and composition of their community (Zhao et al., 2019). The most abundant taxa at the three sites-under-study, in the substrates as well as in the interior of the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus*, were *Fusarium* and *Sarocladium*; in the substrates, the most abundant taxon was *Penicillium*. The genera *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium* have been reported as very competitive species in terms of surviving under different stress conditions (Lin et al., 2020). Some species of the genus *Sarocladium* are considered mutualistic endophytes (Yeh and Kirschner, 2014). Species of the genus *Fusarium* have been reported as being tolerant to Pb and Cd (Muñoz-Silva et al., 2019). The genera *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* have been detected in plants established at mining sites contaminated with Pb, Cd, and Zn (Ortega-Larrocea et al., 2012; Deng et al., 2014).

In the vegetated substrates of RL and AF, the most abundant taxa were Hypocreales, Clavicipitaceae, *Phialemonium*, *Naganishia*, *Exophiala*, Nectriaceae, *Acrostalagmus*, and *Capronia*. Zhang et al. (2013) reported that the fungi *Exophiala*, *Phialophora*, and *Leptodontidium* colonized the roots of plants at sites contaminated with Pb and Zn. *Exophiala* can confer an evident tolerance to Cd on its host plant and additionally plays a functional role as a beneficial fungus (Wang et al., 2016). In contrast with the vegetated substrates, in the NV substrates there was an abundance of *Stibella* and *Aspergillus*. The most abundant taxa at the interior of the roots of *R. luteola* were *Pleosporales*, *Metacordyceps*, *Monosporascus*, *Diaporthe*, *Myrothecium*, and *Ceratobasidiaceae*; the taxa shared between the interior and the exterior of its roots were *Alternaria* and *Scytalidium*. Solely *Clonostachys* and *Paraphoma* were observed in the interior of both plants. Li et al. (2012) reported that the genera *Alternaria* and *Phoma* exhibited an adaptation to Pb, taxa which were observed in *A. fistulosus*. The divergences in the fungal communities between vegetated and non-vegetated substrates, as well as between the interior of the roots of the two plants, determine the degradation activity of the organic matter, the plant behavior toward the PTE, and the stabilization or accumulation of PTE in the tissues. In Jal Viejo vegetated zones, a natural attenuation of the extreme conditions of the substrates is taking place; this process is driven by microorganisms and naturally established plants that participate in the stabilization or accumulation of contaminants (González-Chávez et al., 2009; Kang et al., 2020). The fungal communities of *R. luteola* and *A. fistulosus* could be participating in the establishment of both plant species in the mining substrate. In turn, *R. luteola* and *A. fistulosus* offer a place rich in resources that benefit the abundance and diversity of the fungal communities.

5. Conclusions

Tailings present unfavorable conditions for plant establishment; however, some pioneer plant species achieve their development and transform the environment, with the rhizosphere playing a fundamental role in this transformation. The present study identified some indicators that illustrate the process of natural remediation in an abandoned tailing contaminated with Pb, Cd, and As. Plant coverage with *R. luteola* and *A. fistulosus* favored the diminution of electric conductivity

and of the total concentration of PTE, in the substrates. Higher C concentrations in vegetated sites as compared to the non-vegetated site demonstrated a positive role of plant cover that provides an edaphic environment with this nutrient. *Asphodelus fistulosus*, on contributing a greater amount of organic matter in the mining substrates, favored the enzymatic activity of β -glucosidase and dehydrogenase, as well as high carbon mineralization. The enzymatic activities of polyphenol oxidase and phosphomonoesterase tended to increase in the substrate vegetated with the two plant species on comparing these with the NV site. Both plants, *R. luteola* and *A. fistulosus*, considerably reduced the content of PTE in the substrates on participating in the phytostabilization and phytoextraction of the elements, and could be considered with potential in the remediation of Pb, Cd, and Cu. We identified the fungal community in non-vegetated and vegetated mining wastes with the two species of plants, as well as in the interior of their roots. The non-vegetated mining wastes had a less diverse fungal community than the vegetated sites. Among the plant species, in the interior as well as in the exterior of their roots, the fungal community was specific. The modulator role is noteworthy of each plant in the effect of the rhizosphere on the mining wastes. These results illustrate the role of the plant and of the rhizosphere in the natural mitigation of the extreme conditions of the mining wastes. In similar fashion, the relevance is highlighted of vegetating the tailings deposited in the open pit in order to reduce their negative impact on the environment and of the organisms found in the surroundings.

CRedit authorship contribution statement

Anaid Penelope Solís-Hernández: conceptualization, field sampling, data collection, elaboration of figures and tables, data analysis, writing original draft. **Bruno M. Chávez-Vergara:** conceptualization, data collection, data analysis, resources, funding acquisition, revision and editing of the original draft. **Aida V. Rodríguez-Tovar:** conceptualization, data collection, data analysis, resources, funding acquisition, revision and editing of the original draft. **Ofelia I. Beltrán-Paz:** data collection, data analysis. **Jazmin Santillán:** data analysis, elaboration of figures. **Facundo Rivera-Becerril:** conceptualization, field sampling, data analysis, resources, funding acquisition, revision and editing of the original and final draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

A. Penelope Solís-Hernández received a scholarship from CONACyT-Mexico while studying for a Ph.D. The authors acknowledge Luis Gerardo Martínez Jardines, and Javier Tadeo León (UNAM-LANGEM), as well as Jaime Díaz Ortega (UNAM) for help in soil and plant analysis. Miguel Ángel Salas Luévano (Universidad Autónoma de Zacatecas) encouraged us to work at Jal Viejo.

References

- Allholder, M.C., Pricop, A.D., Lalfont-Schwob, I., Coulomb, B., Rabier, J., Borla, A., Demelas, C., Prudent, P., 2014. As, Pb, Sb, and Zn transfer from soil to root of wild rosemary: do native symbionts matter? *Plant Soil* 382, 219–236. <https://doi.org/10.1007/s11044-014-2135-4>.
- Alef, K., Nannipieri, P., 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic, London, England.
- Allers, T., Litchfield, M., 2000. A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holliday junctions. *Nucleic Acids Res.* 28, 26–36. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.e6>.
- Amin, H., Arain, B.A., Jahangir, T.M., Abbasi, M.S., Amin, F., 2018. Accumulation and distribution of lead (Pb) in plant tissues of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and sesame

- (*Sesamum indicum* L.): profitable phytoremediation with biofuel crops. *Geol. Eco. Landsc.* 2 (1), 51–60. <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1452464>.
- Anahid, S., Yaghmaei, S., Ghobadinejad, Z., 2011. Research note: heavy metal tolerance of fungi. *Trans. C Chem. Chem. Eng.* 18, 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.05.015>.
- Asensio, V., Vega, F.A., Singh, B.R., Covelo, E.F., 2013. Effects of tree vegetation and waste amendments on the fractionation of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in polluted mine soils. *Sci. Total Environ.* 443, 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.069>.
- Ávalos Lázaro, A.A., Rosique Gil, J.E., Capello García, S., Villarruel Ordaz, J.L., 2018. Ascomycetes (Fungi: Ascomycota) del parque estatal agua Blanca, Macuspana, Tabasco, México. *Acta Botánica Mexicana* 122, 141–154. <https://doi.org/10.21829/abm122.2018.1261>.
- Baker, A., 1981. Accumulators and excluders strategies in response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3, 643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>.
- Baker, A., Brooks, R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements, a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81–126.
- Baker, A.J.M., Ernst, W.H.O., Van der Ent, A., Malaisse, F., Ginocchio, R., 2010. Metallophytes: the unique biology resource, its ecology and conservation status in Europe, Central Africa and Latin America. In: Batty, L.C., Hallberg, K.B. (Eds.), *Ecology of Industrial Pollution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 7–40.
- Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H., Yang, Y., 2012. The response of dark septate endophytes (ESO) to heavy metals in pure culture. *PLoS ONE* 7 (10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047968>.
- Becerril, J.M., Barnutia, O., García, J.L., Hernández, A., Olano, J.M., Garbisu, C., 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas* 16 (2), 50–55. <https://doi.org/10.7818/ECOS.128>.
- Bhatti, S.S., Kumara, V., Samyialb, V., Singh, J., Nagpala, A.K., 2018. Comparative analysis of tissue compartmentalized heavy metal uptake by common forage crop: a field experiment. *Catena* 160, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.09.015>.
- Borynski, S., Cycon, M., Beckmann, M., Mur, L.A.J., Piotrowska-Seget, Z., 2018. Plant species and heavy metals affect biodiversity of microbial communities associated with metal-tolerant plants in metalliferous soils. *Front. Microbiol.* 9, 1425. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01425>.
- Bremner, J., 1996. Nitrogen-total. In: Spark, D., Page, A., Summer, M., Tabatabala, M., Helmke, P. (Eds.), *Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Analyses*. Soil Science Society of America, Madison, pp. 1085–1121.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13 (7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Cámara Minera de México (CAMIMEX), 2019. Informe anual. <https://camimex.org.mx/index.php/publicaciones/informe-anual>. (Accessed 15 July 2020).
- Cao, X.F., Liu, P., 2015. Using microorganisms to facilitate phytoremediation in mine tailings with multi heavy metals. *Adv. Mater. Res.* 437, 4440. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1094.437>.
- Carrillo González, R.C., González-Chávez, M.C., 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut.* 144 (1), 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.006>.
- Chávez-Vergara, B., Merino, A., González-Rodríguez, A., Oyama, K., García-Oliva, F., 2018. Direct and legacy effects of plant-traits control litter decomposition in a deciduous oak forest in Mexico. *PeerJ* 6, e5095. <https://doi.org/10.7717/peerj.5095>.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2021. Ficha informativa. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asphodelaceae/asphodelus-fistulosus/fichas/ficha.htm>. (Accessed 28 November 2020).
- Conesa, H.M., Faz, A., Araldos, R., 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiárid Cartagena-La Unión mining district (SE Spain). *Sci. Total Environ.* 366, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.12.008>.
- Deng, Z., Zhang, R., Shi, Y., Hu, J., Tan, H., Cao, L., 2014. Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Aspidiplodia* sp. MXXSF11 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2346–2357. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2163-2>.
- Dini-Adreote, F., 2020. Endophytes: the second layer of plant defense. *Trends Plant Sci.* 25 (4), 319–322. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.007>.
- Elizondo, C., Márquez-Linares, M.A., Marín-García, M.L., Gutiérrez-Yurrita, P.J., 2016. Flora que crece naturalmente en presas de jale minero abandonadas susceptibles de ser utilizadas en reclamación, Zimapán, Hidalgo, México. *Interciencia* 41 (47), 492–1298. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33946267009>.
- Emamveridian, A., Ding, Y., Mokhbadoran, F., Xie, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.* 756120, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Barnutia, O., González-Oreja, J.A., Garbisu, C., 2010. Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Environ. Pollut.* 158, 1576–1583. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.12.013>.
- Feng, N.X., Yu, J., Zhao, H.M., Cheng, Y.T., Mo, C.H., Gai, Q.Y., Li, Y.W., Li, H., Wong, M.H., 2017. Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant-endophyte partnerships. *Sci. Total Environ.* 583, 352–368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.075>.
- Fernández, L., Luis, J., 1994. Barrena de extracción de muestras de suelo para la determinación del peso volumétrico. Patente certificado número 22 316, Oficina Nacional de Inventiones, Información Técnica y Marcas, Cuba.
- Flores-Torres, G., Solís-Hernández, A.P., Vela-Correa, C., Rodríguez-Tovar, A.V., Cano-Flores, O., Castellanos-Moguel, J., Pérez, N.O., Chimal-Hernández, A., Moreno-Espíndola, I.P., Salas-Luévano, M.A., Chávez-Vergara, B.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. Environ. Sci. Pollut. Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14716-6> published online.
- Cadd, G.M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124, 25–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0981-7_28.
- Cagnon, V., Rodrigue-Morin, M., Tremblay, J., Wasserscheid, J., Champagne, J., Belenger, J., Greer, C., Roy, S., 2020. Life in mine tailings: microbial population structure across the bulk soil, rhizosphere, and roots of boreal species colonizing mine tailings in north-western Québec. *Ann. Microbiol.* 70, 41. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01582-9>.
- García, E., 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, serie 6. Instituto de Geografía, UNAM, Mexico.
- Gee, G.W., Bauder, J.W., 1979. Particle size analysis by hydrometer: a simplified method for routine textural analysis and a sensitivity test of measurement parameters. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43 (5), 1004–1007. <https://doi.org/10.12136/sssaj1979.0361599500430050038x>.
- German, D.P., Weintraub, M.N., Grandy, A.S., Lauber, C.L., Rinkes, Z.L., Allison, S.D., 2011. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biol. Biochem.* 43 (7), 1387–1397. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.017>.
- González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Gutiérrez-Castorena, M.C., 2009. Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: the role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Hazard. Mater.* 161, 1288–1298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.110>.
- González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 82, 53–61. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-21282008000100005&lng=es&lng=es.
- Gutiérrez-Ruiz, M., Romero, F.M., González-Hernández, G., 2007. Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de Jales inactivos de sulfatos metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 24 (2), 170–184. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1026-87742007000200005&lng=es&lng=es.
- Hernández-Acosta, E., Mondragón-Romero, E., Cristóbal-Acevedo, D., Rubiños-Panta, J.E., Robledo-Santoyo, E., 2009. Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un Jal de Pachuca Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 15, pp. 109–114. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-4018200900200004&lng=es&lng=es.
- Huffman, E., 1977. Performance of a new automatic carbon dioxide coulometer. *Microchem. J.* 22 (4), 567–573. [https://doi.org/10.1016/0026-265X\(77\)90128-X](https://doi.org/10.1016/0026-265X(77)90128-X).
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 2019. <https://www.inegi.org.mx/temas/mai/#Tabulados>. (Accessed 10 September 2020).
- Jia, T., Yao, Y., Guo, T., Wang, R., Chai, B., 2020. Effects of plant and soil characteristics on phyllosphere and rhizosphere fungal communities during plant development in a copper tailings dam. *Front. Microbiol.* 11, 556002. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556002>.
- Kabata-Pendias, A., 2011. *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kang, X., Cui, Y., Shen, T., Yan, M., Tu, W., Shouli, M., Xiang, Q., Zhao, X., Gu, Y., Chen, Q., Li, S., Liang, Y., Ma, M., Zou, L., Yu, X., 2020. Changes of root microbial populations of native grown plants during natural attenuation of V-ti magnetite tailings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 201, 110816. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110816>.
- Karaca, A., Cetin, S.C., Turgay, O.C., Kirazkaya, R., 2010. Effects of heavy metals on soil enzyme activities. In: Sheremeti, L., Varma, A. (Eds.), *Soil Heavy Metals*, Soil Biology. Springer Vol. 19. Berlin, Heidelberg, pp. 237–262.
- Kavamura, V.N., Esposito, E., 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnol. Adv.* 28, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.09.002>.
- Kennedy, A.C., de Jona, L.Z., 2005. Rhizosphere. In: Hillel, D. (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford, pp. 399–406.
- Knapp, D.G., Pintye, A., Kovacs, G.M., 2012. The dark side is not fastidious—dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS ONE* 7, e32570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032570>.
- Li, H.Y., Li, D.W., He, C.M., Zhou, Z.P., Mei, T., Xu, H.M., 2012. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecol.* 5, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.06.002>.
- Likar, M., Regvar, M., 2013. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant Soil* 370, 593–604. <https://doi.org/10.1007/s11014-013-1656-6>.
- Liu, Y., Xiao, W., Ye, Y., Wu, C., Hu, Y., Shi, H., 2020. Adaptation of soil fungi to heavy metal contamination in paddy fields—a case study in eastern China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 27819–27830. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09049-9>.
- Liu, X., Bal, Z., Shi, H., Zhou, W., Liu, X., 2019. Heavy metal pollution of soils from coal mines in China. *Nat. Hazards* 99, 1163–1177. <https://doi.org/10.1007/s11069-019-03771-5>.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Memon, A.R., Schröder, P., 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (2), 162–175. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0079-z>.
- Mendez, O.M., Maier, R.M., 2008. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 47–59. <https://doi.org/10.1007/s1157-007-9125-4>.
- Mishra, J., Singh, R., Arora, N.K., 2017. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Front. Microbiol.* 8, 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>.
- Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., Santillán-Torres, M., Tamariz-Angeles, C., 2019. Heavy metals tolerant microorganisms from mine tailing wastelands Santa Rosa, jangas (Peru). *Rev. Peru. Biol.* 26 (1), 109–118. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15912>.
- Murphy, J., Riley, J., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>.
- Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, L., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2018. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucl. Acids Res.* 47, D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/kyt1022>.
- Ortega-Larrocea, M.P., Xocostle-Cázares, B., Maldonado-Mendoza, I.F., Carrillo-González, R., Hernández-Hernández, J., Díaz Garduño, M., López-Heyer, M., Gómez-Flores, L., González-Chávez, M.C., 2012. Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapán, Hidalgo, Mexico. *Environ. Pollut.* 158, 1922–1931. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.034>.
- Pérez-Martínez, L., Romero, M., 2015. Uso de parámetros indirectos Para la evaluación de la contaminación de suelos por metales pesados en una zona minera de San Luis Potosí, México. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 67 (1), 1–12. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-33222015000100001&lng=es&lng=es.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>.
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S., 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 13, 63–77. <https://doi.org/10.1007/s1157-013-9317-z>.
- Prieto Méndez, J., González Ramírez, C.A., Román Gutiérrez, A.D., Prieto García, F., 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 10 (1), 29–44. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243003>.
- Ramos-Arroyo, Y.R., Siebe-Grabach, C.D., 2006. Estrategia Para identificar Jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de Caso en el distrito de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 23 (1), 54–74. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1026-87742006000100004&lng=es&lng=es.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>.
- Rodríguez, P.A., Rothballer, M., Chowdhury, S.P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., Falter-Braun, P., 2019. Systems biology of plant-microbiome interactions. *Mol. Plant* 12, 804–821. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.05.006>.
- Rodríguez-Tovar, A., Xocostle-Cázares, B., Valdés, M., 2004. Molecular ecology of ectomycorrhizal fungi. *Rev. Fitotec. Mex.* 27 (3), 267–278. <https://doi.org/10.3724/SPJ.1143.2009.09086>.
- Romero, F.M., Gutiérrez-Ruiz, M., 2010. Estudio comparativo de la peligrosidad de Jales en dos zonas mineras localizadas en el Sur y Centro de México. *Bol. Soc. Geol. Mex.* 64, 43–53. <https://doi.org/10.18268/BSGM2010v62n1a3>.
- Romero, F.M., Armienta, M.A., Gutiérrez, M.E., Villaseñor, G., 2008. Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 242, 43–54. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992008000200001&lng=es&lng=es.
- Salas-Luevano, M.A., Mauricio-Catillo, J.A., González-Rivera, M.L., Vega-Carrillo, H.R., Salas-Muñoz, S., 2017. Accumulation and phyto-stabilization of as, pb and cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, Mexico. *Environ. Earth Sci.* 76, 806. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-7139-y>.
- Servicio Geológico Mexicano (SGM), 2018. *Panorama minero del estado de Zacatecas. Coordinación general de Minería*. (Accessed 23 June 2018).
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.* 6, 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>.
- Szczepanska, J., Twardowska, I., 2004. Waste management. In: Twardowska, I., Allen, H.E., Ketrup, A.A.F., Lacy, W.J. (Eds.), *Solid Waste: Assessment, Monitoring and Remediation*. Vol. 4. Elsevier, Amsterdam, pp. 319–385.
- Tahar, K., Keltoum, B., 2011. Effects of heavy metals pollution in soil and plant in the industrial area, West Algeria. *J. Korean Chem. Soc.* 55 (6), 1018–1023. <https://doi.org/10.5012/jkcs.2011.55.6.1018>.
- Tang, Z., Xu, W., Zhou, G., Bai, Y., Li, J., Tang, X., Chen, D., Liu, Q., Ma, W., Xiong, G., He, H., He, N., Guo, Y., Guo, Q., Zhu, J., Han, W., Hu, H., Fang, J., Xie, Z., 2018. Patterns of plant carbon, nitrogen, and phosphorus concentration in relation to productivity in China's terrestrial ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4033–4038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700295114>.
- The United States Department of Agriculture (USDA), 1999. *Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*. Edition second. EUA.
- Tunc, E., Demir, M., 2019. Enzymes and heavy metals in soil. 1st International Congress on Sustainable Agriculture and Technology, 1–3 April 2019. Gaziantep University, Gaziantep, Turkey.
- Vance, E., Brookes, P., Jenkinson, D., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19 (6), 703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6).
- Wang, J.L., Li, T., Liu, G.Y., Smith, J.M., Zhao, Z.W., 2016. Unravelling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genetic aspects. *Sci. Rep.* 6, 22028. <https://doi.org/10.1038/srep22028>.

- Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., Sun, W., 2017. A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere* 184, 594–600. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.025>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315–322.
- Yamaji, K., Watanabe, Y., Massaya, H., Shigeto, A., Yui, H., Haruma, T., 2016. Root fungal endophytes enhance heavy-metal stress tolerance of *Clethra barbinervis* growing naturally at mining sites via growth enhancement, promotion of nutrient uptake and decrease of heavy-metal concentration. *PLoS ONE* 11 (12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169089>.
- Yan, A., Wang, Y., Fan, S.N., Yusof, M.L.M., Ghosh, S., Chen, Z., 2020. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Front. Plant Sci.* 11, 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>.
- Ye, F., Gong, D., Pang, C., Luo, J., Zeng, X., Shang, C., 2020. Analysis of fungal composition in mine-contaminated soils in Hechi City. *Curr. Microbiol.* 77, 2685–2693. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02044-w>.
- Ye, X., Xiao, W., Zhang, Y., Zhao, S., Wang, G., Zhang, Q., Wang, Q., 2015. Assessment of heavy metal pollution in vegetables and relationships with soil heavy metal distribution in Zhejiang province, China. *Environ. Monit. Assess.* 187, 378. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4604-5>.
- Ye, Z.H., Shu, W.S., Zhang, Z.Q., Lan, C.Y., Wong, M.H., 2002. Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailings using bioassay techniques. *Chemosphere* 47, 1103–1111. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00054-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00054-1).
- Yeh, Y.H., Kirschner, R., 2014. *Sarocladium spinificis*, a new endophytic species from the coastal grass *Spinifex littoreus* in Taiwan. *Bot. Stud.* 55, 25. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-25>.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2006. Accumulation of pb, cu, and zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* 368, 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>.
- Zaier, H., Ghnaya, T., Lakhdar, A., Baioui, R., Ghabriche, R., Mnasri, M., Sghair, S., Lutts, S., Abdelly, C., 2010. Comparative study of pb-phytoextraction potential in *Sesuvium portulacastrum* and *Brassica juncea*: tolerance and accumulation. *J. Hazard. Mater.* 183 (1–3), 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.068>.
- Zhang, Y., Li, T., Zhao, Z.W., 2013. Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in Southwest China. *Soil Sediment Contam.* 22 (5), 532–545. <https://doi.org/10.1080/15320383.2013.750267>.
- Zhao, X., Huang, J., Lu, J., Sun, Y., 2019. Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.136>.
- Zheng, S., Xia, Y., Hu, Y., Chen, X., Rui, Y., Ganina, A., He, X., Ge, T., Wu, J., Su, Y., Kuz'yakov, Y., 2021. Stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus in soil: effects of agricultural land use and climate at a continental scale. *Soil Tillage Res.* 209, 104903. <https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104903>.

Fungal microbiome involved in the natural attenuation and rehabilitation of the extreme conditions prevailing in an abandoned Pb-, Cd-, As-polluted mine-tailing deposit

A. Penélope Solís-Hernández^a, Aída V. Rodríguez-Tovar^b, Santos Carballar-Hernández^c, Bruno M. Chávez-Vergara^{d,e}, Facundo Rivera-Becerril^{f,*}

^aDoctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

^bDepartamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^cUniversidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Sahuayo, Mich., Mexico

^dInstituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^eLaboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico

^fDepartamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico

*Corresponding author: Facundo Rivera-Becerril, Departamento El Hombre y su Ambiente, UAM-Xochimilco, Mexico City, Mexico. E-mail: frivera@correo.xoc.uam.mx, ORCID: 0000-0002-2166-4311

Abstract

Mining releases elevated volumes of mining residues that possess extreme abiotic characteristics, in which their content in potentially toxic elements (PTE) constitutes a threat to the ecosystems and organisms. The fungi associated with the rhizosphere of the plants established in the mining residues tolerate and mitigate these inhospitable conditions, and in addition participate in the natural rehabilitation of that anthropic environment. The objective was to identify the fungal community associated with the roots of *Reseda luteola* and *Asphodelus fistulosus* in mining residues contaminated with lead (Pb), cadmium (Cd), and arsenic, and to explore the role of the fungi. We isolated and identified 60 dark septate endophyte (DSE) fungi from the interior of the roots of the two plants. The sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region were registered in the databases of the NCBI; according to a phylogenetic analysis, the DSE proceeding from both plants belonged to *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis*, and *Stemphylium*. *Colletotrichum* and *Alternaria alternata* consistently exhibited the greatest tolerance to the Pb and Cd, in vitro; five of the DSE fungi solubilized phosphate, even in the presence of Pb and Cd. We identified 10 morphotypes of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in the rhizospheric soil of *A. fistulosus*; there was a predominance of Glomerales, with the most abundant species being *Rhizophagus intraradices*. Due to their saprobe character, their abundance, their tolerance, and/or

their phosphate solubilization, the relevance is argued for and highlighted of DSE and AMF in the mitigation and the natural rehabilitation of the extreme conditions of the mining residues.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, *Asphodelus fistulosus*, Dark septate endophyte fungi, Funga, *Reseda luteola*, *Rhizophagus intraradices*

1. Introduction

The Great Acceleration, which initiated around 1950, probably marks the beginning of the most recent geological epoch in the history of Planet Earth, denominated Anthropocene. This epoch is characterized by the profound impact of human activity on the biosphere, including the dissemination of a broad spectrum of elements, molecules, and materials (Waters et al., 2016). In this respect, mining activity daily releases millions of tons of residues that are deposited the open air. Mining residues or tailings, are materials that frequently contain potentially toxic elements (PTE), such as lead (Pb), cadmium (Cd), zinc (Zn), copper (Cu), and arsenic (As) (Liu et al., 2017; Salas-Luévano et al., 2017; Flores-Torres et al., 2021). The dragging of these toxic residues by means of the action of the rain and wind magnifies their negative impact on the ecosystems, organisms, human populations, agricultural soils and bodies of water to reach great distances, thus representing a serious threat to human well-being (Becerril et al., 2007; Mench et al., 2010). Throughout the territory of Mexico, historically a mining country, multiple sites are appreciated with residues deposited in an unordered manner in the open air, very infrequently disposed in dams, as cited in the valid legislation (NORMA Oficial Mexicana NOM-141-SEMARNAT-2003). In 2021, 585 tailings dams accounted for in the country (SEMARNAT, 2023). Mining residues are materials that, because of their characteristics, represent an extreme environment for organisms, due to that they lack an adequate physical structure, they possess a low retention capacity of water, they are poor in basic nutrients, and they contain an elevated concentration of PTE (Flores-Torres et al., 2021; Solis-Hernández et al., 2022).

Certain pioneer plant species and microorganisms tolerate inhospitable conditions and establish themselves in mining residues (Xu et al., 2015; Salas-Luévano et al., 2017). In particular, the rhizosphere is an environment of microbial diversity that is adapted to the conditions of stress in the mining residues. The exudates of organic compounds in the rhizosphere generates microenvironments in which the growth and microbial activity is intensified, which is reflected in the extracellular enzymatic activity responsible for the recycling and availability of the nutrients (Mendez & Maier, 2008; Philippot et al., 2013; Prashar et al., 2014; Elizondo et al., 2016; Feng et al., 2017). The microorganisms secrete certain polysaccharides that join with the particles that integrate mining residues and improve their structural stability (Wang et al., 2017). Thanks to that the tissues and cells tend to accumulate certain PTE and hamper their dispersion, the microbial-plant covering puts a stop to the eolic and hydric transport of the residues, buffers, and detains the toxicity that they represent for the environment (Salas-Luévano et al., 2017). This biological covering slowly transforms the inhospitable conditions of the residues, favors the increase of the

diversity and the abundance of organisms, and stimulates basic edaphic functions. The plant and microbial mass is a food source for organisms such as arthropods, collembola, annelids and mollusks, with which the trophic network is strengthened.

The fungal community is fundamental for the plant development at sites contaminated by PTE (Epelde et al., 2010); the microorganisms positively influence then plants on increasing the tolerance and/or eliminate the PTE (Kenedy & de Luna, 2005). The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) belong to the Subphylum Glomeromycotina, and most of dark septate endophyte (DSE) fungi are included in the Phylum Ascomycota (Spatafora et al., 2017); both fungal groups are ubiquitous and their role can be very relevant in mining residues. The AMF elevate the efficiency of the uptake of phosphorus and nitrogen by the plants thanks to that they increase the area of exploration of the soil with the hyphal network (Smith & Read, 2008); they also protect the plants from the edaphic stress deriving from PTE. The DSE fungi have been highlighted for their favoring of the nutrient uptake and for their key role in plant protection against the PTE (Jumpponen & Trappe, 1998). In this context, the DSE *Exophiala pisciphila* improved the Cd tolerance of maize plants by modifying root morphology, by promoting Cd binding to the cell walls, and by forming an insoluble phosphate Cd (Chen et al., 2023). Inoculation of *Medicago sativa* and *Ammopiptanthus mongolicus* plants with the DSE fungi *Acrocalymma vagum* and *Scytalidium lignicola* improved the root growth and the nutrient absorption, modified the Cd concentration in soil, and enhanced plant growth and survival under Cd stress (Hou et al., 2020). Concerning AMF, in recent reviews some plant aspects were pointed out that are related to AMF mitigation of PTE in metal contaminated soils, including nutrient uptake, defense systems, and metal tolerance (Riaz et al., 2021), as well as plant performance (Marro et al., 2022). Fungi, together with their plant counterpart, in consequence, are fundamental in the natural attenuation or alleviation, that is, leading to processes that degrade or dissipate contaminants (González-Chávez et al., 2009), in this case in mining substrates.

The latter has motivated going into more depth in the knowledge of the fungal microbiome at a mining-residues site abandoned more than 50 years ago, with minimal human activity at present. Thus, our objective was to identify the fungal community (DSE and AMF) associated with the roots of *Reseda luteola* and *Asphodelus fistulosus*, invasive exotic plants established in mining residues contaminated with PTE, and to explore the role of fungi in the natural attenuation of the toxic conditions and in the rehabilitation of the residues.

2. Materials and methods

2.1. Area of study and sampling

The site-under-study of the mining residues, denominated Jal Viejo, is found in Vetagrande, in the Mexican State of Zacatecas, in the open air (22°50'27" N, 102°33'14" W); it has not had an additional contribution of mining material for more than 50 years. This deposit of tailings has an approximate area of 13.5 ha; the available concentration of Pb (143 mg kg⁻¹) and of Cd (6.6 mg kg⁻¹), and the total concentration of As (63-302 mg kg⁻¹) represent levels of ecotoxicological risk (Flores-

Torres et al., 2021; Solis-Hernández et al., 2022). The climate of the zone is semi-arid (BS1kw(w)(e)g), with a mean annual precipitation of 510 mm and a mean annual temperature of 16 °C (García, 2004; Servicio Geológico Mexicano, 2018). Jal Viejo is found partially vegetated by *Simsia* (Asteraceae), *Cordia congestiflora* (Caryophyllaceae), *Tagetes lunulata* (Asteraceae), *Reseda luteola* (Resedaceae), and *Asphodelus fistulosus* (Xanthorrhoeaceae). In the present study, land parcels covered with two invasive exotic species, herbaceous species, and perennial species of European origin were selected (Fig. 1): on the one hand *R. luteola*, which grows in pine–oak forests and in ruderal environments, and on the other hand, *A. fistulosus*, which grows in xeric scrub lands, tropical forests, dry pine–oak forests, and also in ruderal environments. At each site, covered with *R. luteola* or with *A. fistulosus*, it was traced a 60-m transect: within this transect, at each 20 m, it was established a sampling point. For isolating DSE fungi, it was sampled a fraction of the roots of an individual plant, in order to have a total of three individuals per species, and we kept the roots in hermetically sealed bags at 4°C. Extraction of AMF spores was carried out in *A. fistulosus*, considering that only this plant was colonized by these fungi, according to a previous analysis (Flores-Torres et al., 2021). Meanwhile, in the field we selected three *A. fistulosus* plants, we took a portion of the substrate adjoining the roots and stored this at room temperature.

2.2. Isolation, characterization, and identification of dark septate endophyte fungi

The roots of *R. luteola* and *A. fistulosus* were washed with running water until eliminating the remaining substrate. Following this, the roots were disinfected superficially during 1 min with ethanol 99 %, for 5 min with hydrogen peroxide at 35 %, for 30 s with ethanol at 99 %, and finally they were washed three times with sterile deionized water (Ban et al., 2012). Afterward, the roots were cut into 1.5-cm-long segments, longitudinal and transversal incisions were made in each segment prior to their being deposited in rose Bengal agar (Difco) plus ampicillin (250 mg L⁻¹) plates to inhibit bacterial growth. Five segments were deposited per plate and a total of 300 root segments per plant species; these were incubated at 28 °C during 10 days until observing fungal growth.

The initial fungal colonies proceeding from the roots were purified by means of monohyphal cultures, according to the hyphal-tip method, in order to obtain homogeneous isolates with a greater stability in their genetic properties (Ayala-Zermeño et al., 2012). For this, each isolate was cultivated in natural potato-dextrose-agar (PDA), at 28 °C during 5 días. With a stereoscopic microscope under sterile conditions, we observed the colony's borders in order to identify the hyphal tips under growth conditions; with a sterile needle it was cut the PDA segment containing the tip of a sole hypha and transferred it to a new plate. The isolates were incubated at 28 °C; after 72 h, we carried out compound microscope observations (40X) to verify the growth originating from a sole hypha, without contamination. The morphological characteristics of the purified colonies were described (Mier et al., 2013). Finally, the fungi were stored in natural PDA at 4 °C, and in water at room temperature. The micromorphological characterization of the fungal isolates was conducted through microcultures in 2-mm-thick PDA segments. The microcultures

were deposited on a glass rod doubled within a sterile Petri dish with glycerol at 10 %, incubated at 28 °C during 7 days, and observed with the light microscope in a single drop of lactophenol blue on a slide. Dichotomic keys were consulted to identify the characteristics of the DSE fungi, which present in their majority a dark pigmentation, hyphal structure tight and sinuous, hyaline, and thin hyphae with lipidic bodies in their interior, in addition to dark-colored conidia (Jumpponen & Trappe, 1998; Barrow & Aaltonen, 2001; Barrow, 2003).

For the molecular identification, we obtained fresh mycelia from the purified fungal isolates cultivated in natural PDA during 10 days at 25 °C in darkness. The DNA of the DSE was extracted based on the CTAB method (Allers & Litchen, 2000, modified by Rodríguez-Tovar et al., 2005), and the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA was amplified with the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). The PCR reaction was carried out in a MaxyGene Gradient Thermocycler (USA). The reaction mixture has a final volume of 50 µL, with 22 µL of sterile distilled water, 1 µL of fungal DNA (50-100 ng), 1 µL of each primer at 1 µg mL⁻¹ and 25 µL of 2X PCR Super Mix (GeneDirex). The amplification program was the following: initial denaturation at 95 °C/10 min, 35 denaturation cycles at 95 °C/1 min, annealing at 55 °C/1 min, an initial elongation at 72 °C/1 min, and a final elongation at 72 °C/7 min. The PCR product was analyzed by electrophoresis in a 1 % agarose gel, stained with SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen), and the amplified bands were visualized in a transilluminator under ultraviolet light. The PCR products were purified and sequenced in bidirectional form by the method of Sanger (Macrogen Inc., Geumcheon-gu, Seoul, South Korea). In order to perform a phylogenetic analysis, each sequence was edited with the Sieview version 4.1 software program and the BioEdit Sequence version 7.0.5.2 software program. A search was conducted for the homologues of the sequences in the Nucleotide BLAST platform; the following parameters were utilized: the Nucleotide collection database (nr/nt); the taxid 4890 (Ascomycota) was selected, excluding the sequences of the uncultured samples; the selection program was Megablast; the algorithm parameters were those determined by the Megablast program ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Sequence alignment was carried out with the Unipro UGENE v1.32.0 program ([//ugene.net/](http://ugene.net/)), and the determination of the evolutive model was conducted by the jModel Test 2.1.10 v20160303 program. On obtaining the evolutive model, we determined the maximal parsimony criterion with the PhyML_3.0 program; for the elaboration of the phylogenetic tree, we considered as parameters 1,000 bootstrap and as external group *Aspergillus flavus* (Galtier et al., 1996; Posada & Crandall, 1998; Rigó et al., 2002).

2.3. Tolerance to Pb and Cd by dark septate endophyte fungi

It was evaluated *in vitro* the tolerance of the DSE fungi against the Pb and Cd. For this, we selected five fungal isolates at the rate of one representative of each genus present in the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus*: *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis*, *Stemphylium*, and *Alternaria*. It was utilized the modified minimum Mellin-Norkrans (MMN) culture medium and adjusted it to pH 7. We considered as treatment three concentrations for each metal based on the levels present in the Jal Viejo site, wherefrom proceeded the plants and the fungi as

follows: for the Pb, 71.5, 143, and 214.5 mg L⁻¹, and for the Cd, 3.3, 6.6, and 9.9 mg L⁻¹. As the control treatment, the fungi were cultured in the absence of metals. The Pb was added as PbCl₂, and the Cd, as CdCl₂. Prior to the inoculation, the fungal isolates were cultivated in natural PDA at 20 °C during 14 days. Once a homogeneous colony was obtained, circular disks were taken with the mouthpiece of a Pasteur pipette from the corresponding fungal border. A disk was utilized to inoculate one plate MMN medium with and without Pb and Cd; the plates were incubated at 20±1 °C during 14 days. It was evaluated the colonial growth at 14 days, considering two perpendicular diameters (D1 and D2) of each colony. It was also determined the production of biomass, for which with a spatula, we took each complete fungal colony at 14 days of incubation, deposited it on a previously weighed aluminum tray to dry them in an oven at 90 °C, during 5 days, until constant weight. The dry weight of the biomass was calculated by means of the difference between the initial and the final weight.

2.4. Solubilization of phosphate by the dark septate endophyte fungi

It was performed a semi-quantitative evaluation of the solubilization of phosphate of five fungal isolates at the rate of one representative of each genus present in the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus*: *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis*, *Stemphylium*, and *Alternaria*, in the same available concentration of Pb (143 mg L⁻¹) and of Cd (6.6 mg L⁻¹), that in the mining residues, as well as in the absence of metals as control. It was utilized the modified Pikovskaya-agar medium (Nopparat et al., 2009; Hernández-Leal et al., 2011), comprising the base solution of (NH₄)₂SO₄ (0.5 g), KCl (0.2 g), MgSO₄·7H₂O (0.1 g), MnSO₄·H₂O (0.004 g), NaCl (0.2 g), D-Glucose (10 g), FeSO₄·7H₂O (0.002 g), yeast extract (0.5 g), chloramphenicol (0.1 g, Pfizer), agar (18 g), and distilled water (900 mL), as well as a phosphate solution containing arabic gum (0.5 g), calcium phosphate (β-tricalcium phosphate, Ca₃(PO₄)₂, 0.5 g), and distilled water (100 mL). The culture medium was adjusted to two levels of pH, 6 and 8, to cover the interval present in the Jal Viejo site (Flores-Torres et al., 2021; Solis-Hernández et al., 2022). The base solution and that of the phosphate were sterilized separately during 15 min, at 121 °C, and then these were mixed in the Petri dish. The plates were inoculated with mycelium disks of each fungal isolate, as indicated previously, and were incubated in darkness at 20 °C for 12 days. The diameter of the colony and the diameter of the colony plus the solubilization halo were measured at days 4, 6, and 12 of incubation. In each fungal isolate, it was determined the relative efficiency of solubilization (RES) of the phosphate with the following formula: (diameter of the halo+colony / diameter of the colony) * 100. This index allows to know the radius-of-action of the fungi on the substrate, expressed in a percentage, in relation to the size of the colony.

2.5. Identification of the morphotypes of spores of arbuscular mycorrhizal fungi

Recovery and counting of spores of AMF was carried out using the wet sieving and decanting method (Gerdemann & Nicolson, 1963), following a step-gradient of sucrose (20 and 60 %) centrifugation (Sieverding, 1983) and observation under a stereoscopic microscope (40X). Spores were separated based on their morpho-anatomical characteristics and mounted on glass slides in polyvinyl alcohol-lactic

acid-glycerol and Melzer (Brundrett et al., 1996). The identification of morphospecies was performed following the keys available on the websites of the International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi ([//invam.caf.wve.edu/](http://invam.caf.wve.edu/)), Janusz Blaszkowski of the Szczecin University of Agronomy (www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/) and the Glomeromycota Phylogeny (www.lrz-muenchen.de/schuessler/amphylo/). A Nomarski interference contrast optic microscope (Nikon Optiphot II, Nikon, Tokyo, Japan) was used for this purpose (400X). Names of AMF species and the names of the authorities were verified and updated according to the website of AMF Phylogeny of A. Schüßler (www.amf-phylogeny.com). The taxonomic classification of the AMF species follows Redecker et al. (2013), updated by A. Schüßler (www.amf-phylogeny.com).

2.6. Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) allowed for the comparison of the means between the treatments of the DSE fungal isolates. When significant differences were observed, the Fisher LSD test was applied ($p < 0.05$). The data were analyzed with the SigmaPlot version 12.0 statistical software package.

3. Results

3.1. Community of cultivable dark septate endophyte fungi

3.1.1. Identification and morphological characterization

The protocol for the superficial disinfection of the roots permitted the growth of the filamentous endophyte fungi in the culture medium; bacterial growth was abated thanks to the antibiotic. From a total of 300 root fragments of *R. luteola*, fungal growth only presented in 4 %; in contrast, in 76 % of the 300 roots of *A. fistulosus* was fungal development appreciated. From these initial mixed colonies, there were purified and characterized macro- and micromorphologically 60 DSE isolates: 32 of *R. luteola* and 28 of *A. fistulosus*. The isolates deriving from *R. luteola* presented a colonial coloration ranging from white, to grey, brown, and black; the hyphae were septated hyaline and/or pigmented, with the absence of conidia. The isolates deriving from *A. fistulosus* exhibited a colonial coloration ranging from white and yellowish, to grey, brown, and black; the hyphae were septated hyaline and/or pigmented, and some of the isolates presented septated conidia.

The morphological characteristics were not sufficient for the identification of the isolates of DSE fungi, above all because, in the majority of these, sterile mycelium was appreciated, that is, only septated hyphae but not conidia. The ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region was amplified by PCR. In each isolate, it was obtained an amplicon of between 500 and 600 bp, which corresponded to the expected size, and this was sequenced. The 60 fungal sequences complied with the adequate quality for being considered in a homology analysis with sequences deposited in the GenBank of the NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Likewise, these 60 sequences were registered in the NCBI databases with accession numbers OP630490, OP630491, OP630493-OP630538, and OP630540-OP630551. All of the sequences belonged to the Phylum Ascomycota (Wijayawardene et al., 2017), and to the genera *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis*, and *Stemphylium*, with a

percentage of homology of 99-100 % (Table 1). A phylogenetic analysis allowed to appreciate that the 32 sequences of the DSE fungi isolated from the interior of the *R. luteola* roots were organized into two taxa (Fig. 2), corresponding to the genera *Alternaria* (21 isolates) and *Acrocalymma-Rhizopycnis* (11 isolates). Meanwhile, the 28 sequences of the DSE fungi proceeding from the interior of *A. fistulosus* roots were organized into five taxa (Fig. 2), belonging to the genera *Alternaria* (1 isolate), *Colletotrichum* (4 isolates), *Setophoma* (2 isolates), *Acrocalymma-Rhizopycnis* (20 isolates), and *Stemphylium* (1 isolate). It may be clearly appreciated that *A. fistulosus* presented a greater richness of fungal genera of the interior of its roots than the other plant. *Alternaria* predominated in *R. luteola*, and *Acrocalymma-Rhizopycnis* in *A. fistulosus*.

3.1.2. Tolerance in vitro to Pb and Cd

Table 2 presents the diameter of the colonies of the five DSE fungal isolates exposed during 14 days to three concentrations of each metal, these latter being Pb and Cd. As expected, the isolates tolerated the available concentrations of Pb (143 mg L⁻¹) and Cd (6.6 mg L⁻¹) in the Jal Viejo mining residues. Similarly, the fungi also tolerated a lesser concentration and a greater concentration of each metal, that is, 71.5 and 214.5 mg L⁻¹ of Pb, and 3.3 and 9.9 mg L⁻¹ of Cd.

With regard to the Pb, the colonial growth of *Colletotrichum* and *Alternaria* did not exhibit differences among treatments. *Setophoma*, for its part, demonstrated greater growth of the colony ($p < 0.01$) with the two highest concentrations of Pb (143 and 214.5 mg Pb L⁻¹), on comparison with the control and with the lowest concentration (71.5 mg Pb L⁻¹). Finally, *Acrocalymma-Rhizopycnis* and *Stemphylium* were more sensitive to the lowest concentration of Pb, while in the remaining treatments, the colonies achieved a similar size. With respect to the Cd, the colonial growth of *Alternaria* did not exhibit differences among treatments. *Colletotrichum* diminished the colonial growth at a same level ($p < 0.01$) below the three concentrations of Cd, on comparison with the control. *Setophoma*, in contrast, revealed a significantly more elevated growth with the highest concentration of Cd (9.9 mg Cd L⁻¹). In *Acrocalymma-Rhizopycnis*, the colonial growth diminished to the greatest degree in the treatment with the lowest concentration of Cd (3.3 mg Cd L⁻¹). Last, *Stemphylium* was significantly affected by the Cd ($p < 0.01$) with the three concentrations. On comparing the global impact of the metals on the colonial growth of the five DSE fungi, the negative effect of the Pb was minimal; only with the concentration of 71.5 mg Pb L⁻¹ there was a diminution (4 %) in the colonial growth of *Acrocalymma-Rhizopycnis* and *Stemphylium*. In counterpart, with the exception of *Setophoma*, the Cd reduced the colonial growth of all of the fungi, where the most sensitive was *Stemphylium* with a diminution between 15.5 and 22 %, followed by *Colletotrichum*, with a reduction of 6.7-8.5 %, while *Acrocalymma-Rhizopycnis* and *Alternaria* were affected in less than 5 % by the metal. The colonial growth of *Colletotrichum*, *Setophoma*, and *Alternaria* achieved, at 14 days of incubation, diameters superior to those of 60 mm in the presence as well as in the absence of Pb and Cd, while the rest of the fungi did not surpass that level (Table 2). In sum, the fungi were observed to be more affected by the Cd than by the Pb.

In relation to biomass production in dry weight by the five DSE fungi, there were no differences among the treatments in the presence and in the absence of Pb and Cd (Table 3). With respect to the Pb, *Colletotrichum* diminished its biomass in 14 %, 25 %, and 42.5 %, as the concentration of the metal increases in comparison with the control. *Stemphylium* also reduced its biomass (33.6-50 %) in the presence of Pb. For their part, *Setophoma* and *Acrocalymma-Rhizopycnis* exhibited a greater diminution of biomass (18-33 %) with the concentration of 71.5 mg Pb L⁻¹, but they increased or diminished their biomass according to the other two concentrations of the metal. *Alternaria* consistently increased its biomass in the presence of the metal, between 11 % and 18.5 %. With regard to the Cd, in *Setophoma* the lowest concentration (3.3 mg L⁻¹) diminished the biomass by 44 %, but the other two concentrations instead increased it (11-44%). In the remaining four fungal isolates, the presence of Cd diminished the production of biomass in the three concentrations, with a more marked effect of the concentration of 6.6 mg Cd L⁻¹ on reducing it from 26.7 % to 43 %. *Setophoma* and *Alternaria* were the fungi least affected by the Pb and Cd in terms of the production of biomass. With respect to the production of biomass at 14 days, *Alternaria* was foremost with the highest levels (220-320 mg) followed by *Colletotrichum* (161-280 mg), while the rest of the fungi did not surpass 130 mg (Table 3).

3.1.3. Solubilization of phosphate

In this semi-quantitative strategy, the five fungal isolates exhibited a solubilizing activity of phosphate, according to the visualization of the halos surrounding the colonies (Fig. 3), in the absence as well as in the presence of Pb (143 mg Pb L⁻¹) and of Cd (6.6 mg Cd L⁻¹), and at a pH 6 and of 8 (Table 4). These concentrations of the metals were reported as bioavailable at the Jal Viejo site, the reason for which they were simulated *in vitro*; in a similar manner, the two pH belong to the interval registered in the mining residues.

In the presence and in the absence of metals, *Colletotrichum* exhibited a greater interval of RES at pH 6 (111-134 %), in contrast with pH 8 (116-120 %), with a maximum of 134 % in the presence of Pb at pH 6. *Setophoma* also presented a greater RES interval at pH 6 (126-155 %), different from the pH 8 (133 %) with or without metal, although this was not determined at pH 8 in the presence of Pb; the greatest RES was with Pb at pH 6 (155 %). In relation to *Acrocalymma-Rhizopycnis*, the RES at pH 6 was 114-173 %, while at pH 8, this was 119-157 %, where it was not possible to determine it in the presence of Pb; the greatest RES was observed in the presence of Cd (173 %) at pH 6. The RES of *Stemphylium* at pH 6 without metal was not determined, and at pH 8 without metal and with Pb; in the other cases, it reached 109-115 %. *Alternaria* demonstrated an interval from 107 to 121 % at pH 6, while at pH 8, this interval was 115-132 %, with the highest level at pH 8 in the presence of Pb (132 %).

Globally, the maximal RES for four of the five fungi was appreciated in the presence of Pb as follows: at pH 8 in *Alternaria* (132 %), and at pH 6 in *Colletotrichum* (134 %), *Setophoma* (155 %), and *Stemphylium* (115 %). Meanwhile, in *Acrocalymma-Rhizopycnis*, this was appreciated in the presence of Cd (173 %) at pH 6.

3.2. Community of arbuscular mycorrhizal fungi

In the *A. fistulosus* rhizosphere, the number of AMF spores comprised between 48 and 171 in 100 g of dry soil. Ten AMF spore morphotypes were identified; the Glomerales predominated, and also present were the Diversisporales (*Diversispora spurca*), the Archaeosporales (*Archaeospora*), and the Paraglomerales (*Paraglomus*) (Table 5). Consistently predominant in all of the three plants was *Rhizophagus intraradices* (49-79 %), followed by *Paraglomus* sp. 1 (6-17 %) and *Archaeospora* sp. 1 (1-15%). *Rhizophagus clarus* reached 32 % in one plant, but was absent in the other two. The remaining morphotypes (*Claroideoglomus claroideum*, *Claroideoglomus* sp. 1 “small”, *Funneliformis mosseae*, *Nanoglomus* sp. 1, *Diversispora spurca* and *Archaeospora* sp. 2) represented only between 1.8 % and 7 % of the AMF community.

4. Discussion

This work has permitted knowledge of the fungal community associated with the roots of two plant species established in mining residues deposited in the open air, whose extreme conditions make up an unstable physical structure dominated by sands, low levels of nutrients, and high in the content of Pb, Cd, and As, that is, non-essential and potentially toxic elements for living systems (Solís-Hernández et al., 2022). This anthropic system is also submitted to high temperatures and high regimens of solar radiation, in particular in areas with little vegetation or without vegetation. To the naked eye, scarce diversity and plant cover in at the Jal Viejo site is appreciated; however, a certain diversity and abundance of fungi suggests a fungal tolerance against the inhospitable abiotic conditions.

DSE fungi are found distributed at all altitudes and latitudes of the planet (Jumpponen & Trappe, 1998), including stressful environments such as mining residues with the presence of PTE (Zhang et al., 2013; Liu et al., 2017; Flores-Torres et al., 2021), where they probably perform significant functions. In this work, from 3.6 % and 75.7 % of the total fragments of *R. luteola* and of *A. fistulosus* roots respectively, there emerged fungal colonies. The latter coincides with a prior microscopic analysis of the stained roots of both plants, where *R. luteola* and *A. fistulosus* achieved a colonization intensity by means of the DSE fungi of 11 % and 51 %, respectively, according to the presence of dark and hyaline septate hyphae and of microsclerotia (Flores-Torres et al., 2021). Sixty pure cultivable isolates of DSE fungi were obtained from the interior of the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus*; this is the first time, to our knowledge, that fungal community has been isolated from these two exotic plants with heightened relevance as invaders in Mexico. *A. fistulosus* has been registered as ruderal in urban environments (Martínez et al., 2021) and in mining residues (Salas-Luévano et al., 2021); for its part, *R. luteola* has been reported as ruderal, arvense (field plant) (conabio.gob.mx), and colonizer in tailings (Flores-Torres et al., 2021). Both species are adapted to the conditions of the mining residues of the Jal Viejo site, in which they form plant patches, where they constitute a habitat for microorganisms particularly at the rhizosphere level, and where they enrich the edaphic environment with organic matter.

According to the morphological characteristics and the sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region, these isolated DSE fungi belong to the genera *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Setophoma*, *Acrocalymma-Rhizopycnis*, and *Stemphylium*. Different DSE fungi have been registered in mining residues containing PTE, whether as cultivable isolates (Liu et al., 2017; Flores-Torres et al., 2021) or as detected molecularly by massive sequencing (Solís-Hernández et al., 2022). The cultivable fungi of the Jal Viejo site, on growing in PDA, demonstrate their saprobe capacity; the products released from this degradation enrich the nutritional content of the mining residues.

Both plants, *R. luteola* and *A. fistulosus*, shared *Alternaria* and *Acrocalymma-Rhizopycnis* in the interior of the radical system, and in turn comprised the most frequently isolated genera. The *A. fistulosus* radical system was also associated with members of the genera *Colletotrichum*, *Setophoma*, and *Stemphylium*. Previously, *Alternaria* was the sole genus isolated from the interior of the roots of *Tagetes lunulata* in mining residues (Flores-Torres et al., 2021), and in turn, *Alternaria* predominated in the stems and leaves of *Arabis hirsuta*, *Acacia decurrens*, *Symplocos paniculata*, *Rabbosia ericalyx*, *Arenaria serpyllifolia*, and *Rosa longicuspis* (Li et al., 2012). Considering that *Alternaria* predominated in *R. luteola* and *Acrocalymma-Rhizopycnis* in *A. fistulosus*, the difference in the richness of DSE fungi between plants suggests a certain specificity that could be related with adaptation and plant survival under conditions of stress. The plant–fungus–soil interaction promotes a regeneration of the system through different mechanisms; for example, *Acrocalymma vagum* diminished the content of PTE in tobacco leaves (Jin et al., 2018). Similarly, the secondary metabolites produced by *Alternaria* have been studied, some of which are antimicrobial; others stimulate plant growth and certain others protect against oxidative stress (Lou et al., 2013).

Exposure to Cd and Pb *in vitro* permitted the exploration of the physiology of the fungi. The five isolates tolerated the bioavailable concentrations of 143 mg Pb L⁻¹ and of 6.6 mg Cd L⁻¹, registered in the mining residues-of-origin (Flores-Torres et al., 2021), as well as at superior levels (214.5 mg Pb L⁻¹ and 9.9 mg Cd L⁻¹). *Colletotrichum* and *Alternaria* consistently demonstrated the greatest tolerance to metallic stress, due to that they reached, at 14 days, maximum colonial growth and the highest production of biomass. The mechanisms to explain this tolerance can be diverse. For example, studies at the transcriptional level in *Exophiala pisciphila* in the presence of Cd (Zhao et al., 2015), and at the biochemical level in *Gaeumannomyces cylindrosporus* submitted to Pb (Ban et al., 2012), revealed aspects linked with antioxidant systems and DNA repair, among others, in order to counteract the metallic toxicity. *Colletotrichum* and *Alternaria* could be candidates for being applied, together with a previously selected plant counterpart, in the remediation processes of contaminated soils or mining residues. The fungal endophytes have been cited as relevant in phytoremediation (Nandy et al., 2020). In this regard, the DSE fungus *E. pisciphila* accumulates relevant proportions of Cd in its cell wall (Zhan et al., 2015), and this hinders the entry and damage of the element in the cytosol. The retention of PTE in the tissues of *R. luteola* and *A. fistulosus* plants, together with their associated microorganisms, contributed to diminishing the

total accumulation of Pb, Cd, and As in 33-79 %, 34-75 %, and 2-79 %, respectively, in the mining residues of the Jal Viejo site (Solis-Hernández et al., 2022). That suggests that the fungi participate in the detoxification of the tailings.

The available phosphate, a frequently limiting element in the production in the systems, revealed nearly absent levels (Flores-Torres et al., 2021) and a total concentration of scarcely 0.22-0.31 mg g⁻¹ (Solis-Hernández et al., 2022) in the Jal-Viejo mining residues. The five fungal isolates analyzed herein demonstrated possessing the solubilizing capacity of phosphate, even under stress by Pb and Cd. The solubilization was sometimes even superior in the presence of EPT; therefore, the physiological mechanisms related to this metabolic activity would not appear to be affected in the presence of PTE. This highlights the ecological role of the community of DSE fungi: even in the presence of Pb and Cd, the contribution of soluble phosphate is carried out and the nutritional quality of these mining residues is elevated. Other DSE fungi have been highlighted for their capacity to solubilize phosphate, including *Curvularia geniculata*, *Drechslera*, and *Ophiosphaerella*; thus it is that these latter have been proposed for elaborating biofertilizers (Priyadharsini & Muthukumar, 2017; Spagnoletti et al., 2017). Consistent with the latter, *Colletotrichum* has been described as a promoter of *Arabidopsis thaliana* growth under inorganic phosphate (Pi)-limiting conditions through the transfer of Pi to the plant (Paries & Gutjahr, 2023).

The AMF are associated with the majority of the higher plants (Smith & Read, 2008); they are obligate biotrophs. The present investigation constitutes, to our knowledge, the first contribution of the richness of AMF in tailings in Mexico. In a previous study on the mining residues from the Jal Viejo site, the roots of the *A. fistulosus* plant were colonized by AMF (Flores-Torres et al., 2021). Herein, the abundance and the identity of the AMF viable spores in the rhizosphere of this invasive exotic plant species are presented, which suggests an active plant-AMF physiological interaction under the extreme conditions prevailing in mining residues. Taking into account that *A. fistulosus* forms extensive patches at Jal Viejo (Fig. 1c), its relevance in terms of the contribution of mycorrhizal propagules to the edaphic environment is considerable. The morphotype of *R. intraradices* was predominant in the *A. fistulosus* plants with 49-79 %, while *R. clarus* presented solely in one plant (32 %). *R. intraradices* has widely exhibited a positive effect on plant performance under metal stress (Marro et al., 2022). The latter suggests a high level of adaptation of these two Glomerales to the abiotic conditions prevailing in the mining residues: elevated content in Cd, Pb, and As, low nutritional level, and exposure to extreme temperatures and radiation. The Glomeraceae have been described as being predominant worldwide (Öpik et al., 2010), including Mexico (Polo-Marcial et al., 2021), and that was appreciated in the mining residues of Jal Viejo. Also present in all of the plants was an *Archaeospora* morphotype (1-15 %) and one of *Paraglomus* (6-17 %). Previously, different AMF taxa (Glomerales, Paraglomerales and Diversisporales) were molecularly identified in the interior of roots of plants established in mining residues highly contaminated with Cd, Pb, and Zn (Sánchez-Castro et al., 2017).

AMF comply with relevant functions in the ecosystems. Their positive role is widely known in the phosphate and nitrogen nutrition of the plants in arbuscular mycorrhizal interaction (Smith & Read, 2008). Similarly, the increase has been reported of plant tolerance in the face of abiotic stress by PTE in AMF inoculated plants. For example, the interaction between *Pisum sativum* and *R. intraradices* mitigated or annulled the negative effect by Cd on the plants (Rivera-Becerril et al., 2002). In the Jal Viejo mining residues, the presence of the spores and networks of the AMF mycelium contribute organic matter to the edaphic environment, which improves its nutritional quality, strengthens the physical structure, and increases the retention of humidity. This increment of mycorrhizal propagules in the environment permits the interaction and favors the establishment and the development of mycotrophic plant species sensitive to the contamination produced by PTE. Thus, the extreme conditions and the metallic toxicity of the mining residues are mitigated and rehabilitated naturally, also thanks to the AMF and to the arbuscular mycorrhiza that they establish. It has been demonstrated that AMF accumulate PTE in their cells (Tiwari et al., 2022). Likewise, the protein produced in the hyphae of AMF and released into the edaphic environment, glomalin, is recognized for sequestering PTE, and thus for the stabilization of PTE (González-Chávez et al., 2004). In this manner, AMF also participate in the detoxification of mining residues. AMF have been cited as accelerators in the phytoremediation of metal-contaminated soils (Tiwari et al., 2022). The two groups of fungi, DSE and AMF, on being present in the mining residues, can establish synergistic interactions between themselves and with relation to the plant species that they colonize. For example, it has been mentioned that the AMF *Diversispora epigaea* and the DSE *Alternaria*, when co-colonized maize roots, exerted positive effects on the host plants depending on DSE density (Xie et al., 2021).

5. Conclusions

This work approached the study of the fungal microbiome in toxic mining residues. At least five genera of DSE fungi colonized the interior of the roots of *R. luteola* and *A. fistulosus*; 10 AMF taxa were present in the *A. fistulosus* rhizosphere. Likewise, the roles of some members of the community of the DSE and the AMF in environments contaminated with PTE were highlighted (Table 6). These fungi tolerate the extreme conditions in mining residues contaminated with Pb, Cd, and As through different physiological mechanisms. The fact of colonizing the interior of the roots diminishes their direct contact with the PTE in the edaphic environment and favors the persistence, production, and dispersion of fungal propagules. The fungi, together with their associated plants, remediate the mining residues through the phytostabilization; the fungi immobilize PTE in the cell wall, in the interior of the cells, and/or in the surrounding substrate due to the interaction of chelating molecules such as glomalin and organic acids. The DSE fungi *Alternaria* and *Colletotrichum*, and the AMF *Rhizophagus intraradices* and *R. clarus* exhibited the highest tolerance against PTE in the tailings. The DSE and AMF perform a central role in the bioalleviation or mitigation, as well as in the rehabilitation of the mining residues, and favor the establishment of plants, microorganisms, and animals that are more sensitive to these inhospitable conditions. The release of cellular material

by the fungi, their activity of degradation and mineralization of the organic matter, as well as the solubilization of phosphate, constitute fungal contributions that nutritionally enrich the mining residues and strengthen plant development. In sum, DSE fungi and AMF are a fundamental component in tailings with toxic levels of Pb, Cd, and As, and they participate in the mitigation and natural rehabilitation of the mining residues.

Acknowledgments

A. Penélope Solís-Hernández received a scholarship from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, Mexico, while studying for a Ph.D.

Contribution

All authors contributed to the study conception and design. Field work, material preparation, data collection, and analysis were performed by A.P. Solís-Hernández, A.V. Rodríguez-Tovar, S. Carballar-Hernández, and F. Rivera-Becerril. The first draft of the manuscript was written by F. Rivera-Becerril, and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript

Funding

Universidad Autónoma Metropolitana, Instituto Politécnico Nacional and Universidad Nacional Autónoma de México

Data Availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request

Statements and Declarations

Conflict of Interest

The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article

References

- Adeyemi, N.O., Atayese, M.O., Sakariyawo, O.S., Azeez, J.O., Olubode, A., Ridwan, M., Adebayo, R., & Adeoye, S. (2021). Growth and phosphorus uptake of soybean (*Glycine max* L.) in response to arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus intraradices* inoculation in heavy metal-contaminated soils. *Soil and Sediment Contamination*, 30, 698-713. <https://doi.org/10.1080/15320383.2021.1887809>
- Allers, T., & Lichten, M. (2000). A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holliday junctions. *Nucleic Acids Research*, 28, e6. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.e6>

- Ayala-Zermeño, M.A., Montesinos-Matías, R., & Berlanga-Padilla, A. (2012). *Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos*. CNRCB, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA, Ficha Técnica CB-27.
- Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H., & Yang, Y. (2012). The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *PLoS ONE*, *7*, 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047968>
- Barrow, J.R. (2003). Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, *13*, 239-247. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0222-0>
- Barrow, J.R., & Aaltonen, R.E. (2001). Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, *11*, 199-205. <https://doi.org/10.1007/s005720100111>
- Becerril, J.M., Barrutia, O., García Plazaola, J.I., Hernández, A., Olano, J.M., & Garbisu, C. (2007). Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas*, *16*, 50-55.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Cabral, L., Siqueira, J.O., Fonseca Sousa Soares, C.R., & Pereira Pinto, J.E.B. (2010). Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrizicos arbusculares. *Química Nova*, *33*, 25-29. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100005>
- Chen, S., Zhang, G., Liang, X., Wang, L., Li, Z., He, Y., Li, B., & Zhan, F. (2023). A dark septate endophyte improves cadmium tolerance of maize by modifying root morphology and promoting cadmium binding to the cell wall and phosphate. *Journal of Fungi*, *9*, 531. <https://doi.org/10.3390/jof9050531>
- Elizondo, C., Márquez-Linares, M.A., Marín-García, M.L., & Gutiérrez-Yurrita, P.J. (2016). Flora que crece naturalmente en presas de jale minero abandonadas susceptibles de ser utilizadas en reclamación, Zimapán, Hidalgo, México. *Interciencia*, *41*, 492-498.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Barrutia, O., González-Oreja, J.A., & Garbisu, C. (2010). Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. *Environmental Pollution*, *158*, 1576-1583. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.12.013>
- Feng, N.-X., Yu, J., Zhao, H.-M., Cheng, Y.-T., Mo, C.-H., Cai, Q.-Y., Li, Y.-W., Li, H., & Wong M.-H. (2017). Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–endophyte partnerships. *Science of the Total Environment*, *583*, 352-368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.075>

Flores-Torres, G., Solis-Hernández, A.P., Vela-Correa, G., Rodríguez-Tovar, A.V., Cano-Flores, O., Castellanos-Moguel, J., Pérez, N.O., Chimal-Hernández, A., Moreno-Espíndola, I.P., Salas-Luévano, M.Á., Chávez-Vergara, B.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. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14716-6>

Galtier, N., Gouy, M., & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*, *12*, 543-548. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.6.543>

García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Serie 6, Instituto de Geografía, UNAM.

Gerdemann, J.W., & Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, *46*, 235-244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)

González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., & Gutiérrez-Castorena, M.C. (2009). Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: the role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Hazardous Materials*, *161*, 1288-1298. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.110>

González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Wright, S.F., & Nichols, K.A. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, *130*, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>

Hernández-Leal, T.I., Carrión, G., & Heredia, G. (2011). Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, *45*, 881-892.

Hou, L., Yu, J., Zhao, L., & He, X. (2020). Dark septate endophytes improve the growth and the tolerance of *Medicago sativa* and *Ammopiptanthus mongolicus* under cadmium stress. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3061. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03061>

Jin, H.-Q., Liu, H.-B., Xie, Y.-Y., Zhang, Y.-G., Xu, Q.-Q., Mao, L.-J., Li, X.-J., Chen, J., Lin F.-C., & Zhang C.L. (2018). Effect of the dark septate endophytic fungus *Acrocalymma vagum* on heavy metal content in tobacco leaves. *Symbiosis*, *74*, 89-95. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0485-4>

Jumpponen, A., & Trappe, J.M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, *140*, 295-310. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>

Kennedy, A.C., & de Luna, L.Z. (2005). Rhizosphere. In D. Hillel (Ed.), *Encyclopedia of soils in the environment* (pp. 399–406). Elsevier.

- Li, H.-Y., Li, D.-W., He, C.-M., Zhou, Z.-P., Mei, T., & Xu, H.-M. (2012). Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb–Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*, 5, 309-315. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.06.002>
- Liu, H., Li, T., Ding, Y., Yang, Y., & Zhao, Z. (2017). Dark septate endophytes colonizing the roots of 'non-mycorrhizal' plants in a mine tailing pond and in a relatively undisturbed environment, Southwest China. *Journal of Plant Interactions*, 12, 264-271. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1333635>
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18, 5891-5935. <https://doi.org/10.3390/molecules18055891>
- Marro, N., Grilli, G., Soteras, F., Caccia, M., Longo, S., Cofré, N., Borda, V., Burni, M., Janouskova, M., & Urcelay, C. (2022). The effects of arbuscular mycorrhizal fungal species and taxonomic groups on stressed and unstressed plants: a global meta-analysis. *New Phytologist*, 235, 320-332. <https://doi.org/10.1111/nph.18102>
- Martínez, D.N., López-Toledo, L., Espinosa-García, F., Camacho-Cervantes, M., & de la Barrera, E. (2021). Ephemeral visitors or permanent residents? – Decadal change in the ruderal vegetation from a periurban university campus. *Urban Forestry & Urban Greening*, 65, 127372. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2021.127372>
- Mench, M., Lepp, N., Bert, V., Schwitzguébel, J.P., Gawronski, S.W., Schröder, P., & Vangronsveld, J. (2010). Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments*, 10, 1039-1070. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0190-x>
- Mendez, M.O., & Maier, R.M. (2008). Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7, 47-59. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9125-4>
- Mier, T., Rivera-Becerril, F., Ayala-Zermeño, M.A., Toriello, C., Aguilar Ogarrio, S., & Ulloa, M. (2013). *Métodos experimentales para el estudio de hongos microscópicos*. Instituto de Biología, UNAM, UAM-Xochimilco.
- Mukherjee, D., Pramanik, K., Mandal, S., & Mandal, N.C. (2022). Augmented growth of Cd-stressed rice seedlings with the application of phytostimulating, root-colonizing, Cd-tolerant, leaf-endophytic fungi *Colletotrichum* spp. isolated from *Eupatorium triplinerve*. *Journal of Hazardous Materials*, 438, 129508. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129508>
- Nandy, S., Das, T., Tudu, C.K., Pandey, D.K., Dey, A., & Ray, P. (2020). Fungal endophytes: futuristic tool in recent research area of phytoremediation. *South African Journal of Botany*, 134, 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.015>
- Nopparat, C., Jatupornpipat, M., & Rittiboon, A. (2009). Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 43, 172-181.

NORMA Oficial Mexicana NOM-141-SEMARNAT-2003, Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=661988&fecha=13/09/2004#gsc.tab=0 accessed: 19.01.2024.

Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J.M., Reier, Ü., & Zobel, M. (2010). The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188, 223-241. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x>

Paries, M., & Gutjahr, C. (2023). The good, the bad, and the phosphate: regulation of beneficial and detrimental plant-microbe interactions by the plant phosphate status. *New Phytologist*, 239, 29-46. <https://doi.org/10.1111/nph.18933>

Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., & van der Putten, W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

Polo-Marcial, M.H., Lara-Pérez, L.A., Tomio Goto, B., Margarito-Vista, X., & Andrade-Torres, A. (2021). Glomeromycota in Mexico: a country with very high richness. *Sydowia*, 74, 33-63. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia74-2021-0033>

Posada, D., & Crandall, K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.817>

Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13, 63-77. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>

Priyadharsini, P., & Muthukumar, T. (2017). The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. *Fungal Ecology*, 27, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.02.007>

Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S.L., Morton, J.B., & Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 23, 515-531. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0486-y>

Riaz, M., Kamran, M., Fang, Y., Wang, Q., Cao, H., Yang, G., Deng, L., Wang, Y., Zhou, Y., Anastopoulos, I., & Wang, X. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: a critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123919. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.12391>

Rigó, K., Varga, J., Tóth, B., Téren, J., Mesterházy, A., & Kozakiewicz, Z. (2002). Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of

the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Journal of General and Applied Microbiology*, 48, 9-16. <https://doi.org/10.2323/jgam.48.9>

Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J.P., Belimov, A.A., Gianinazzi, S., Strasser, R.J., & Gianinazzi-Pearson, V. (2002). Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1177-1185. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1177>

Rodríguez-Tovar, A.V., Ruiz-Medrano, R., Herrera-Martínez, A., Barrera-Figueroa, B.E., Hidalgo-Lara, M.E., Reyes-Márquez, B.E., Cabrera-Ponce, J.L., Valdés, M., & Xoconostle-Cázares, B. (2005). Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.016>

Salas-Luévano, M.A., Mauricio-Castillo, J.A., González-Rivera, M.L., Vega-Carrillo, H.R., & Salas-Muñoz, S. (2017). Accumulation and phytostabilization of As, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences*, 76, 806. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-7139-y>

Salas-Luevano, M.A., Puente-Cuevas, R., & Vega-Carrillo, H.R. (2021). Concentrations of heavy metals and measurement of ⁴⁰K in mine tailings in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences*, 80, 186. <https://doi.org/10.1007/s12665-021-09460-6>

Sánchez-Castro, I., Gianinazzi-Pearson, V., Cleyet-Marel, J.C., Baudoin, E., & van Tuinen, D. (2017). Glomeromycota communities survive extreme levels of metal toxicity in an orphan mining site. *Science of the Total Environment*, 598, 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.084>

Servicio Geológico Mexicano. (2018). Panorama minero del estado de Zacatecas. <http://www.sgm.gob.mx> accessed: 23.09.2023.

SEMARNAT. (2021). Inventario homologado preliminar de presas de jales. <https://geomaticaportal.semarnat.gob.mx/arccisp/apps/webappviewer/index.html?id=95841aa3b6534cdfbe3f53b3b5d6edfa> accessed: 21.12.2023

Sieverding, E. (1983). *Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Smith, S.E., & Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press and Elsevier.

Solis-Hernández, A.P., Chávez-Vergara, B.M., Rodríguez-Tovar, A.V., Beltrán-Paz, O.I., Santillán, J., & Rivera-Becerril, F. (2022). Effect of the natural establishment of two plant species on microbial activity, on the composition of the fungal community, and on the mitigation of potentially toxic elements in an abandoned mine tailing. *Science of the Total Environment*, 802, 149788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149788>

Spagnoletti, F.N., Tobar, N.E., Fernández Di Pardo, A., Chiocchio, V.M., & Lavado, R.S. (2017). Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminium phosphates. *Applied Soil Ecology*, 111, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.010>

Spatafora, J.W., Aime, M.C., Grigoriev, I.V., Martin, F., Stajich, J.E., & Blackwell, M. (2017). The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum*, 5, FUNK-0053-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0053-2016>

Tang, W., Gao, Y., Li, Q., Mao, W., Jiang, Y., & Li, H. (2022). Effects of endophytes on *Dysphania ambrosioides* heavy metal tolerance and accumulation under multi-heavy metal stress. *Chiang Mai Journal of Science*, 49, 312-324. <https://doi.org/10.12982/CMJS.2022.022>

Tiwari, J., Ma, Y., & Baudh, K. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi: an ecological accelerator of phytoremediation of metal contaminated soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 68, 283-296. <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1829599>

Wang, L., Ji, B., Hu, Y., Liu, R., & Sun, W. (2017). A review on in situ phytoremediation of mine tailings. *Chemosphere*, 184, 594–600. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.025>

Waters, C.N., Zalasiewicz, J., Summerhayes, C., Barnosky, A.D., Poirier, C., Galuszka, A., Cearreta, A., Edgeworth, M., Ellis, E.C., Ellis, M., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J.R., Richter, D.B., Steffen, W., Syvitski, J., Vidas, D., Wagnreich, M., Williams, M., Zhisheng, A., Grinevald, J., Odada, E., Oreskes, N., & Wnagaolfe, A.P. (2016). The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science*, 351, aad2622-1–10. <https://doi.org/10.1126/science.aad2>

Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Rajeshkumar, K.C., Hawksworth, D.L., Madrid, H. et al. (2017). Notes for genera: *Ascomycota*. *Fungal Diversity*, 86, 1-594. <https://doi.org/10.1007/s13225-017-0386-0>

Xie, L., Bi, Y., Ma, S., Shang, J., Hu, Q., & Christie, P. (2021). Combined inoculation with dark septate endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi: synergistic or competitive growth effects on maize? *BMC Plant Biology*, 21, 498. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03267-0>

Xu, R., Li, T., Cui, H., Wang, J., Yu, X., Ding, Y., Wang, C., Yang, Z., & Zhao, Z. (2015). Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Applied Soil Ecology*, 93, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.03.013>

Zhan, F., He, Y., Li, Y., Li, T., Yang, Y.-Y., Toor, G.S., & Zhao, Z. (2015). Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in a dark septate endophyte (DSE),

Exophiala pisciphila. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17897-17905. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5012-7>

Zhang, Y., Li, T., & Zhao, Z.-W. (2013). Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in Southwest China. *Soil & Sediment Contamination. Soil and Sediment Contamination*, 22, 532-545. <https://doi.org/10.1080/15320383.2013.750267>

Zhao, D., Li, T., Shen, M., Wang, J., & Zhao, Z. (2015). Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: evidence from RNA-seq data. *Microbiological Research*, 170, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.005>

Figure legends

Fig. 1 Jal Viejo tailing: a) global view, b) *Reseda luteola*, and c) *Asphodelus fistulosus* plant patches from which the fungal community was isolated.

Fig. 2 Phylogenetic tree of 60 dark septate endophyte fungi isolated from the interior of the roots of *Reseda luteola* (accession numbers in pink) and *Asphodelus fistulosus* (accession numbers in blue), established in a tailing contaminated with Pb, Cd, and As. The tree was generated with the maximal similarity criterion (1,000 bootstrap), built on 550-bp base of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region with the K80+G evolutive model, with a gamma value of 0.1620; *Aspergillus flavus* was utilized as external group.

Fig. 3 Halo of the solubilization of phosphate of the dark septate endophyte fungus *Acrocalymma-Rhizopycnis* (OP630544) isolated from the interior of the roots of *Asphodelus fistulosus*, at pH 6 (above) and at pH 8 (below), in the absence (C) and in the presence of 143 mg Pb L⁻¹ (Pb) and of 6.6 mg Cd L⁻¹ (Cd).

Figure 1

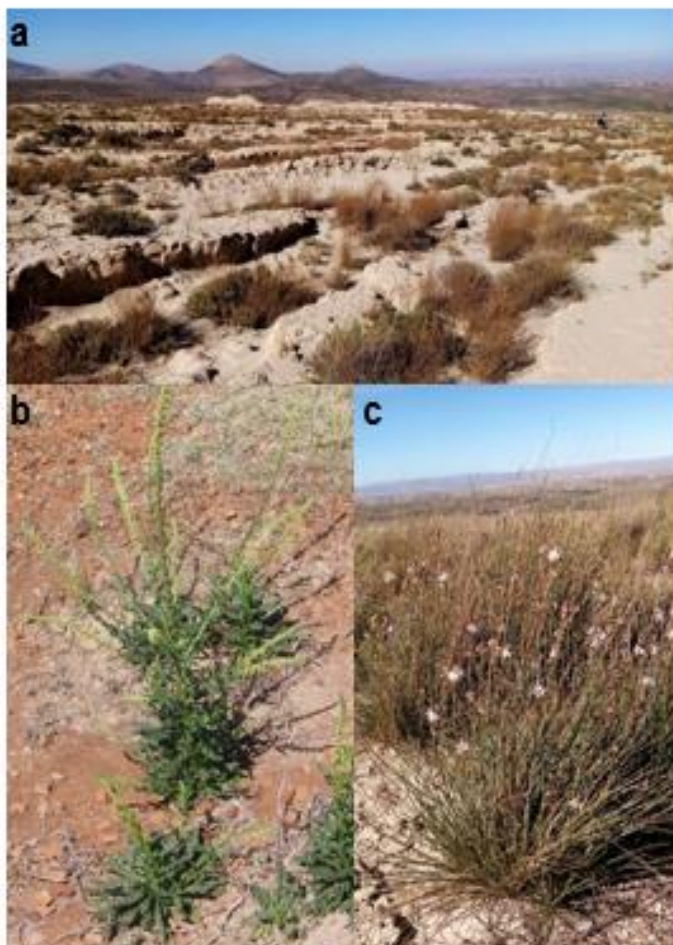


Figure 3

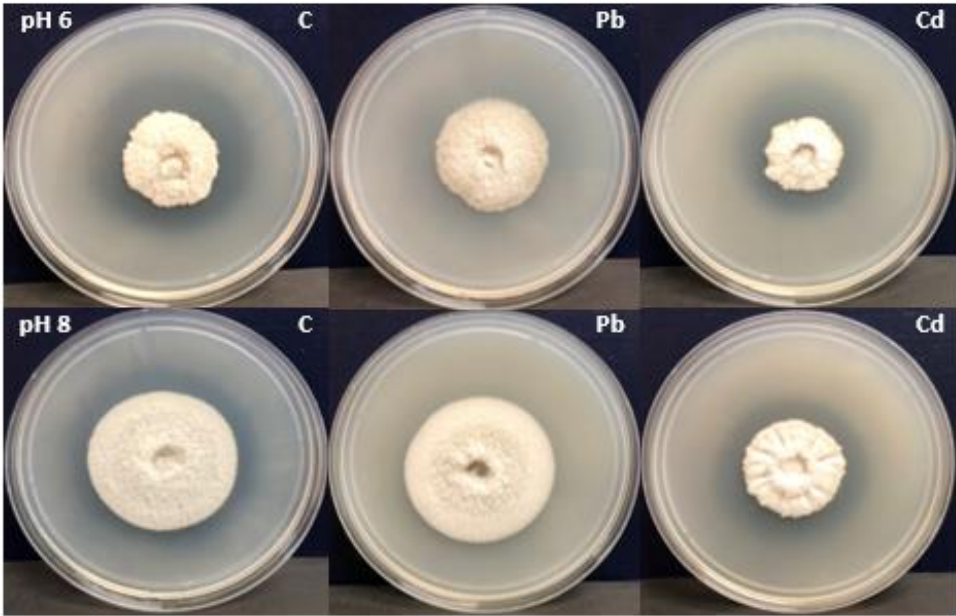


Table 1. Homology of 60 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences of cultivable dark septate endophyte fungi colonizing the interior of the roots of *Reseda luteola* (32 sequences) and of *Asphodelus fistulosus* (28 sequences) plants established in Pb-, Cd-, and As-polluted tailings.

Fungal isolate	Homology	Taxon
Accession number (bp)		
<i>Reseda luteola</i> plant		
OP630490 (578), OP630491 (577), OP630493 (576), OP630494 (572), OP630495 (548), OP630496 (563), OP630497 (562), OP630498 (562), OP630499 (579), OP630500 (555), OP630501 (551), OP630502 (561), OP630504 (563), OP630505 (578), OP630506 (576), OP630507 (575), OP630508 (576), OP630509 (560), OP630510 (552), OP630519 (578), OP630520 (567)	99 %	<i>Alternaria mali</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. tenuissima</i>
OP630503 (549), OP630511 (548), OP630512 (548), OP630513 (546), OP630514 (557), OP630515 (546), OP630516 (549), OP630517 (563), OP630518 (532), OP630521 (569), OP630522 (549)	99 %	<i>Rhizopycnis vagum</i> , <i>Acrocalymma vagum</i>
<i>Asphodelus fistulosus</i> plant		
OP630523 (487)	99 %	<i>A. solani</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i>
OP630524 (570), OP630525 (571), OP630529 (497), OP630534 (559)	99 %	<i>Colletotrichum liriopes</i> , <i>C. dematium</i> , <i>C. spaethianum</i>
OP630526 (497), OP630533 (551)	99 %	Ascomycota, <i>Setophoma terrestres</i>
OP630527 (510), OP630528 (547), OP630530 (523), OP630531 (545), OP630532 (520), OP630535 (516), OP630536 (559), OP630537 (554), OP630538 (555), OP630540 (551), OP630541 (581), OP630542 (549), OP630543 (551), OP630544 (557), OP630546 (551), OP630547 (548), OP630548 (548), OP630549 (520), OP630550 (535), OP630551 (571)	99-100 %	<i>Rhizopycnis vagum</i> , <i>Acrocalymma vagum</i>
OP630545 (586)	99 %	<i>Stemphylium vesicarium</i> <i>S. eturmiunum</i>

Table 2. Radial growth (mm) of five dark septate endophyte fungi isolated from the interior of roots of *Reseda luteola* and *Asphodelus fistulosus*, cultivated in the presence and in the absence of Pb and Cd (mean \pm SE; $n = 5$). For each PTE and fungus, different letters indicate significant differences among treatments according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares. Numbers in parentheses indicate the decrease (-) or the increase (+) in relation to the control.

Fungal isolate	Pb				F (P)
	Control	71.5 mg L ⁻¹	143 mg L ⁻¹	214.5 mg L ⁻¹	
<i>Colletotrichum</i> (OP630524)	68.4 \pm 0.67a	68.8 \pm 1.74a (+0.6 %)	69.2 \pm 0.73a (+1.2 %)	69.2 \pm 0.51a (+1.2 %)	0.25 (0.86)
<i>Setophoma</i> (OP630526)	61.6 \pm 0.51b	62.2 \pm 0.58b (+1.0 %)	64.2 \pm 0.58a (+4.2 %)	64.0 \pm 0.44a (+3.9 %)	5.89 (<0.01)
<i>Acrocalymma- Rhizopycnis</i> (OP630544)	49.2 \pm 0.37a	47.2 \pm 0.58b (-4.1 %)	49.2 \pm 0.20a (0 %)	49.8 \pm 0.37a (+1.2 %)	7.81 (<0.01)
<i>Stemphylium</i> (OP630545)	56.8 \pm 0.58a	54.4 \pm 0.40b (-4.2 %)	57.6 \pm 0.24a (+1.4 %)	56.8 \pm 1.02a (0 %)	4.80 (0.01)
<i>Alternaria</i> (OP630509)	62.2 \pm 0.49a	62.8 \pm 1.35a (+1.0 %)	64.8 \pm 0.58a (+4.2 %)	63.6 \pm 0.24a (+2.3 %)	2.03 (0.14)
Fungal isolate	Cd				F (P)
	Control	3.3 mg L ⁻¹	6.6 mg L ⁻¹	9.9 mg L ⁻¹	
<i>Colletotrichum</i> (OP630524)	68.4 \pm 0.67a	63.8 \pm 0.91b (-6.7 %)	62.6 \pm 0.67b (-8.5 %)	63.2 \pm 0.58b (-7.6 %)	13.3 (<0.01)
<i>Setophoma</i> (OP630526)	61.6 \pm 0.51b	61.8 \pm 0.37b (+0.3 %)	62.8 \pm 0.37b (+1.9 %)	64.8 \pm 0.49a (+5.2 %)	10.9 (<0.01)
<i>Acrocalymma- Rhizopycnis</i> (OP630544)	49.2 \pm 0.83a	46.8 \pm 0.37c (-4.9 %)	47.6 \pm 0.40bc (-3.3 %)	48.4 \pm 1.31ab (-1.6 %)	6.09 (<0.01)
<i>Stemphylium</i> (OP630545)	56.8 \pm 0.58a	46.0 \pm 0.70bc (-19.0 %)	44.2 \pm 1.90c (-22.2 %)	48.0 \pm 1.30bc (-15.5 %)	20.2 (<0.01)
<i>Alternaria</i> (OP630509)	62.2 \pm 0.49a	61.4 \pm 0.92a (-1.3 %)	60.4 \pm 0.98a (-2.9 %)	61.4 \pm 0.74a (-1.3 %)	0.83 (0.49)

Table 3. Total biomass (mg) of five dark septate endophyte fungi isolated from the interior of roots of *Reseda luteola* and *Asphodelus fistulosus*, cultivated in the presence and in the absence of Pb and Cd (mean \pm SE; $n = 5$). For each PTE and fungus, different letters indicate significant differences among treatments according to the Fisher LSD test ($p < 0.05$); F: difference of mean squares. Numbers in parentheses indicate the decrease (-) or the increase (+) in relation to the control.

Fungal isolate	Pb				F (P)
	Control	71.5 mg L ⁻¹	143 mg L ⁻¹	214.5 mg L ⁻¹	
<i>Colletotrichum</i> (OP630524)	280 \pm 21.6a	240 \pm 24.3a (-14.3 %)	210 \pm 9.00a (-25.0 %)	161 \pm 18.2a (-42.5 %)	0.21 (0.89)
<i>Setophoma</i> (OP630526)	90.0 \pm 6.00a	60.0 \pm 27.0a (-33.3 %)	100 \pm 7.00a (+11.1 %)	70.0 \pm 20.6a (-22.2 %)	1.38 (0.31)
<i>Acrocalymma- Rhizopycnis</i> (OP630544)	110 \pm 12.0a	90.0 \pm 39.7a (-18.2 %)	100 \pm 5.00a (-9.1 %)	120 \pm 4.00a (+9.1 %)	0.40 (0.76)
<i>Stemphylium</i> (OP630545)	119 \pm 13.2a	65.0 \pm 16.8a (-45.4 %)	79.0 \pm 31.0a (-33.6 %)	59.0 \pm 5.00a (-50.4 %)	1.98 (0.19)
<i>Alternaria</i> (OP630509)	270 \pm 13.3a	300 \pm 43.3a (+11.1 %)	320 \pm 49.1a (+18.5 %)	310 \pm 3.00a (+14.8 %)	1.62 (0.26)
Fungal isolate	Cd				F (P)
	Control	3.3 mg L ⁻¹	6.6 mg L ⁻¹	9.9 mg L ⁻¹	
<i>Colletotrichum</i> (OP630524)	280 \pm 21.6a	240 \pm 19.7a (-14.3 %)	180 \pm 37.4a (-35.7 %)	220 \pm 50.1a (-21.4 %)	0.16 (0.92)
<i>Setophoma</i> (OP630526)	90.0 \pm 6.00a	50.0 \pm 30.1a (-44.4 %)	100 \pm 8.00a (+11.1 %)	130 \pm 28.8a (+44.4 %)	2.45 (0.14)
<i>Acrocalymma- Rhizopycnis</i> (OP630544)	119 \pm 5.00a	100 \pm 33.1a (-16.0 %)	68 \pm 23.6a (-42.9 %)	81 \pm 62.3a (-31.9 %)	0.81 (0.49)
<i>Stemphylium</i> (OP630545)	120 \pm 13.2a	100 \pm 12.5a (-16.7 %)	70.0 \pm 3.00a (-41.7 %)	80.0 \pm 43.3a (-33.3 %)	0.88 (0.49)
<i>Alternaria</i> (OP630509)	300 \pm 75.5a	230 \pm 18.2a (-23.3 %)	220 \pm 26.0a (-26.7 %)	280 \pm 35.1a (-6.7 %)	0.76 (0.55)

Table 4. Relative efficiency of solubilization (RES) of the phosphate of five dark septate endophyte fungi isolated from the interior of the roots of *Reseda luteola* and *Asphodelus fistulosus*, cultivated in the presence and in the absence of Pb and of Cd at pH 6 and pH 8 (mean \pm SE; $n = 5$). DS: Diameter of the solubilization of the phosphate+colony; DC: Diameter of the colony. -, not determined.

Fungal isolate	pH 6									pH 8								
	Control			Pb			Cd			Control			Pb			Cd		
	DS (mm)	DC (mm)	RES (%)	DS (mm)	DC (mm)	RES (%)	DS (mm)	DC (mm)	RES (%)	DS (mm)	DC (mm)	RES (%)	DS (mm)	DC (mm)	RES (%)	DS (mm)	DC (mm)	RES (%)
<i>Colletotrichum</i> (OP630524)	61.2 ± 0.97	54.0 ± 1.67	113	62.8 ± 0.83	46.8 ± 1.65	134	52.8 ± 0.80	47.4 ± 0.92	111	64.6 ± 1.28	54.2 ± 1.93	119	56.4 ± 1.43	47.0 ± 2.28	120	54.6 ± 0.50	47.2 ± 1.42	116
<i>Setophoma</i> (OP630526)	25.0 ± 1.09	19.8 ± 0.73	126	17.4 ± 0.51	11.2 ± 0.49	155	22.8 ± 0.49	17.8 ± 0.37	128	25.8 ± 0.73	19.4 ± 1.50	133	-	19.4 ± 0.24	-	25.6 ± 0.92	19.2 ± 0.58	133
<i>Acrocalymma-Rhizopycnis</i> (OP630544)	47.6 ± 0.67	32.0 ± 1.48	149	40.0 ± 0.54	35.0 ± 1.00	114	39.8 ± 0.49	23.0 ± 0.44	173	53.0 ± 0.89	44.4 ± 1.43	119	-	31.6 ± 0.60	-	44.4 ± 1.03	28.2 ± 2.22	157
<i>Stemphylium</i> (OP630545)	-	38.2 ± 0.20	-	25.2 ± 1.65	22.0 ± 1.51	115	36.0 ± 0.54	33.0 ± 0.44	109	-	35.0 ± 1.37	-	-	96.0 ± 0.81	-	36.4 ± 0.92	32.6 ± 0.74	112
<i>Alternaria</i> (OP630509)	57.2 ± 0.97	47.2 ± 0.58	121	45.2 ± 0.49	42.2 ± 0.37	107	51.8 ± 0.37	43.6 ± 0.87	119	58.6 ± 0.74	50.8 ± 0.97	115	65.2 ± 1.46	49.4 ± 1.24	132	56.6 ± 0.98	48.6 ± 1.72	116

Table 5. Richness and abundance of spores of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of *Asphodelus fistulosus* at the Jal Viejo tailing.

Fungal species or genus	Number of spores/100 g (percent)		
	Plant 1	Plant 2	Plant 3
Glomerales			
Claroideoglomeraceae			
<i>Claroideoglomerum claroideum</i> C. Walker & Schuessler	0	12 (7 %)	3 (2.1 %)
<i>Claroideoglomerum</i> sp. 1 "small"	0	3 (1.8 %)	0
Glomeraceae			
<i>Funneliformis mosseae</i> C. Walker & Schuessler	2 (4.2 %)	0	0
<i>Nanoglomerum</i> sp. 1	2 (4.2 %)	0	3 (2.1 %)
<i>Rhizophagus clarus</i> C. Walker & Schuessler	0	0	46 (32.2 %)
<i>Rhizophagus intraradices</i> C. Walker & Schuessler	26 (54.2 %)	135 (78.9 %)	70 (49 %)
Diversisporales			
Diversisporaceae			
<i>Diversispora spurca</i> C. Walker & A. Schuessler	3 (6.3 %)	0	3 (2.1 %)
Archaeosporales			
Archaeosporaceae			
<i>Archaeospora</i> sp. 1	7 (14.6 %)	2 (1.2 %)	9 (6.3 %)
<i>Archaeospora</i> sp. 2	0	8 (4.7 %)	0
Paraglomerales			
Paraglomeraceae			
<i>Paraglomerum</i> sp. 1	8 (16.7 %)	11 (6.4 %)	9 (6.3%)
Total of spores/100 g	48	171	143

Table 6. Examples of the roles of DSE fungi and AMF identified in this research, in environments polluted with potentially toxic elements (PTE).

Fungus	Role in environments polluted with PTE	References
Dark septate endophyte fungi		
<i>Acrocalymma-Rhizopycnis</i>	Release/degradation of organic matter, phosphate solubilization in tailings	This work
	<i>Acrocalymma vagum</i> decreased PTE content in tobacco leaves	Jin et al. (2018)
<i>Alternaria</i>	Release/degradation of organic matter, phosphate solubilization in tailings	This work
	Interaction with <i>Tagetes lunulata</i> roots in tailings	Flores-Torres et al. (2021)
<i>Colletotrichum</i>	Release/degradation of organic matter, phosphate solubilization in tailings	This work
	Cd accumulation in mycelial cells and protection to rice plants	Mukherjee et al. (2022)
<i>Setophoma</i>	Release/degradation of organic matter, phosphate solubilization in tailings	This work
	Improved host plants growth and PTE tolerance	Tang et al. (2022)
<i>Stemphylium</i>	Release/degradation of organic matter, phosphate solubilization in tailings	This work
Arbuscular mycorrhizal fungi		
<i>Rhizophagus clarus</i>	Release of organic matter, interaction with <i>Asphodelus fistulosus</i> in tailings	This work
	Retention capacity of mycelium for Cu, Cd and Pb in solution	Cabral et al. (2010)
<i>Rhizophagus intraradices</i>	Release of organic matter, interaction with <i>Asphodelus fistulosus</i> in tailings	This work
	Enhanced plant growth and P nutrition under PTE stress in <i>Glycine max</i>	Adeyemi et al. (2021)