

00381

34



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DEL AGUA RESIDUAL EN LA MICORRIZACION
ARBUSCULAR

2001/01/01

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

(BIOLOGIA)

PRESENTA:

M. en C. María del Pilar Ortega Larrocea

MÉXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DEL AGUA RESIDUAL EN LA MICORRIZACION
ARBUSCULAR

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

PRESENTA:

M. en C. María del Pilar Ortega Larrocea

Director de Tesis: Dra. Christina Desirée Siebe Grabach

MÉXICO, D.F.

2001

**EFFECTO DEL RIEGO CON AGUAS RESIDUALES EN LA
MICORRIZACIÓN ARBUSCULAR**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)**

PRESENTA

LA M. EN C. MA. DEL PILAR ORTEGA LARROCEA

**FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
(UNAM)**

EN COTUTELA CON

UNIVERSITE PAUL SABATIER (UPS), TOULOUSE, FRANCIA

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. CHRISTINA DESIRÉE SIEBE GRABACH (UNAM, MEXICO)
DR. GUILLAUME BECARD (UPS, FRANCIA)**

NOVIEMBRE, 2001

FINANCIAMIENTOS

La presente tesis se llevó a cabo gracias a la colaboración de las siguientes Instituciones y Programas:

- ❖ Financiamiento de la beca doctoral por la DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA) durante el periodo septiembre 1996 a Julio del 2000.
- ❖ Financiamiento de dos estancias en el extranjero dentro del proyecto *Monitoreo edafocológico de México, niveles nacional, regional y local* (M96-U02) en el marco del programa ECOS-SEP-CONACyT-ANUIES y el Ministerio de Asuntos Exteriores de la República Francesa durante los periodos de abril a septiembre de 1997 y de mayo a agosto del 2001.
- ❖ Apoyo para la compra de insumos y para la asistencia a cursos internacionales del Programa PAEP-Tesis doctorales durante los ciclos 1997 y 1998 en el Programa de Posgrado de la Facultad de Ciencias y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) en el año 2000 (y 2001).

Se agradece el apoyo obtenido por:

La Unidad de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias de la UNAM por el uso de sus instalaciones (cuarto frío e Invernadero E. H. Xolocotzi).

Parte de los resultados de esta tesis han sido presentados en los siguientes congresos:

- Participación en cartel en 2nd. International Conference on Mycorrhiza (ICOM). 5-10 julio de 1998. Uppsala, Suecia.
- Participación oral en la 1era. Reunión Nacional de Ciencias de la Tierra. 21-25 de septiembre de 1998. México D. F.
- Participación oral en 10th. International Soil Conservation Organization. 23-28 mayo de 1999. Lafayette, Indiana, U.S.A.
- Cartel en la Reunión Iberoamericana y II Simposio Nacional sobre Micorriza. 27-29 de septiembre del 2000. Guanajuato, México.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. **Christina Siebe** que me sostuvo con gran disponibilidad y experiencia durante estos años de trabajo y a quien le debo mi tema de tesis. Le agradezco haber aceptado participar en su dirección y todo el apoyo que me ha brindado, su confianza y amistad, pero sobretodo, su ejemplo.

Al Dr. **Guillaume Bécard** quien amablemente enmarcó mi tesis doctoral y me recibió en su laboratorio en Francia en los nueve meses vividos en Toulouse. Le agradezco igualmente el haber aceptado participar en la dirección de mi tesis desde que se lo propuse en Granada y el haberme acogido en su familia tan calurosamente.

Al Dr. **Chris Walker** de quien tuve la suerte y el honor de que formara parte de mi comité revisor y examinador y de que me diera de su luz en el conocimiento de estos maravillosos seres microscópicos. Por su sincera amistad, gracias.

A la Dra. **Klaudia Oleschko** que me permitió ser parte del proyecto *Monitoreo Edafocológico de México* en el marco del programa ECOS-SEP-CONACyT-ANUIES y quien me ha apoyado siempre para formar parte de su grupo de trabajo.

A los doctores **Dante Morán**, **Elena Centeno** y **Luca Ferrari** por recibirme en su planta académica y por el apoyo y consejos brindados para esta nueva etapa que inicio en el Instituto.

Al Dr. **Richard Webster** por su gran competencia en el dominio de la estadística, su ayuda inapreciable en la evaluación de los datos y en enseñarme cómo hacer un artículo científico, lo que me permitió realizar mi primera publicación en el tema.

A los doctores **Natalie Sejalon Delmas** y **Christophe Roux** por su asesoría técnica y académica en la parte de Biología Molecular, por el tiempo que me dedicaron y por su apoyo y recibimiento en el laboratorio y en sus hogares en Francia. Gracias amigos

Al Dr. **Christian Plenchette** que aceptó gentilmente sin conocerme, revisar este trabajo y venir hasta el otro lado del mundo a la defensa de mi examen.

Dr. **Arturo Estrada** por haber aceptado participar en el comité evaluador de mi tesis y haber contribuido durante este tiempo a la concepción de los muestreos y la determinación de las especies.

A la Dra. **Irma Rosas** cuyas acertados comentarios en la revisión de mi trabajo, me permitieron redefinir conceptos importantes para la comprensión del manuscrito, por su amistad y apoyos brindados desde que la conocí.

Al Dr. **Ignacio Maldonado** por haber aceptado ser revisor de mi trabajo, compañero joven con una excelente trayectoria académica, que espero compartir con él en un futuro como investigadores en nuestro querido país.

A las M. en C. **Kumiko Shimada** y **Andrea Herre** gracias a quienes pude llevar a cabo adecuadamente los análisis de suelos y por su ayuda en la lectura de las muestras, por su amistad y apoyo incondicional. A Kumi por tantísimos años de amistad sincera.

A mis amigos hechos en Toulouse **Marc Bucé** y **Sonja Kosuta** por su gentileza y amistad que me sostuvieron durante mis visitas a Francia, a Michat, Giselle, Adriana, Thierry y la Familia Bila, Nicole, Carole, Me. Housson, Colette e Irène.

A mis compañeros del **Laboratorio de Edafología Ambiental** del Instituto de Geología, Antonio Acosta y Ma. del Carmen Curiel que participaron en la digestión de los tejidos, a Doña Mati y Don Pedro, Silvia Sánchez, Ana María Rocha Torrallardona y a mis compañeras Helena Cotler, Norma Fernández, Ma. Eugenia y demás amigos y amigas del Laboratorio. Gracias por las porras!

A la Dra. Ma. Antonieta Aladro por su apoyo siempre disponible del uso de su microscopio y por la toma de imágenes a A. Bieler del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias.

A todos mis colegas del Instituto de Geología, M. en C. Sergio Palacios, Ing. Rodolfo del Arenal, Lic. Ana Ma. Rodríguez, Ing. Enrique A. González Torres, Sras. Ma. de Lourdes Ramírez, Ma. del Carmen Alcalde, María Eugenia Malagón, por todo el apoyo que de ustedes recibí y que me brindaron durante estos largos años de estudiante en el Instituto.

INDICE

I.	RESUMEN GENERAL	1
II.	INTRODUCCIÓN GENERAL	5
	1. Objetivos generales y Estructura de la tesis.	11
III.	CAPITULO UNO. Abundancia y diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en suelos regados con aguas residuales.	
	a. Introducción: Efecto del riego con aguas residuales en la micorriza arbuscular: el caso del Valle del Mezquital, Hidalgo. Ortega-Larrocea M. P. y C. Siebe Grabach. En: <i>Hongos micorrizógenos en sistemas áridos y semiáridos</i> . Ed. A. Monroy et. al. En revisión, 4 abril del 2001.	18
	b. Impacto de un siglo de riego con agua residual en la abundancia de esporas de micorrhiza arbuscular en los suelos del Valle del Mezquital, México. Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. Ortega-Larrocea M. P., C. Siebe, G. Bécard, I. Méndez y R. Webster. 2001. <i>Applied Soil Ecology</i> 16(2): 149-157.	33

- c. Potencial colonizador de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de dos suelos regados durante diferente tiempo con agua residual en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. Ortega-Larrocea M. P., C. Siebe, G. Bécard. Para ser enviado a: *Biology and Fertility of Soils*. 43
- d. Conclusiones del capítulo I 65

IV. CAPITULO DOS. Transferencia metales pesados y fósforo vía hongos micorrízicos arbusculares y su efecto en la translocación.

- a. Resumen. 68
- b. Introducción. Contribución de la micorriza arbuscular a la transferencia de metales pesados a las plantas. 70
- c. Resultados.
1. Efecto del tiempo bajo riego con agua residual en el crecimiento y absorción de metales pesados en el maíz. 78
2. Transferencia vía hongos micorrízicos arbusculares, de algunos metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) provenientes del riego con agua residual y su translocación en un cultivo de maíz. Para ser enviado a *Environmental pollution*. 89

3. Efecto de la contaminación por agua residual en la adaptación de especies de hongos MA en Vertisoles regados durante 5 y más de 90 años con agua residual.

Para ser enviado a *Mycorrhiza*.

99

V. **CAPITULO TRES. Variabilidad genética en distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares sometidos a distintos periodos de riego con aguas residuales.**

a. Introducción. Técnicas moleculares en el estudio de la variabilidad de los hongos micorrízicos arbusculares. 110

b.

c. Análisis de la variabilidad de la región M13 de diferentes cultivos de *Glomus mosseae* (MA) de suelos regados con aguas residuales. 117

VI. **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.** 129

VII. **ANEXOS.**

A1. LOCALIZACIÓN DE LOS TERRENOS DE ESTUDIO. 133

A2. GRÁFICAS Y FIGURAS COMPLEMENTARIAS. 137

A3. ICONOGRAFÍA DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS DEL VALLE DEL MEZQUITAL, HIDALGO MÉXICO. Pensado para posible publicación en el Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología, UNAM. 144

I. RESUMEN GENERAL

Se analizó el impacto que ha producido el riego con agua residual no tratada durante un tiempo prolongado en las simbiosis micorrízicas arbusculares (MA) en el Distrito de Riego 03 del Valle del Mezquital, Hidalgo, México. Se investigó este impacto en tres aspectos distintos: a) estudios de campo que consistieron en cuantificar la abundancia y diversidad de especies de hongos MA y su potencial colonizador en dos tipos de suelos (Vertisoles y Leptosoles) regados con agua residual durante distintos periodos (5, 35, 65 y más de 90 años). b) Estudios de invernadero en los que se cuantificó la participación en la transferencia y por ende en la translocación en las plantas, de fósforo y algunos metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn). Los análisis se realizaron en plantas de maíz micorrizadas con distintos inóculos de hongos MA provenientes de Vertisoles regados con agua residual durante 5 (M05) y más de 90 años (M90) y procedentes de la vegetación natural (mezquital de *Prosopis laevigata*) nunca antes expuestos al riego ni al cultivo (MT). c) Estudios en laboratorio en los que se aplicó una herramienta molecular (análisis de regiones hipervariables del genoma minisatélite) para poder determinar si ha habido cambios genéticos en una de las especies más representativas de estos cultivos (*Glomus mosseae*) que han estado sometidos al riego con aguas residuales por periodos cortos y prolongados.

Los resultados obtenidos en cada parte muestran que el riego con agua residual no tratada ha tenido algunas repercusiones en la dinámica de las simbiosis MA. Se observó que el tipo de suelo determina el establecimiento de estos hongos, independientemente del tiempo de riego, siendo más favorables los Leptosoles por sus propiedades edáficas. Se encontró una menor abundancia *in situ* conforme incrementa el tiempo de riego en los Vertisoles, mientras que en los Leptosoles esta disminución se presenta únicamente en

los que son regados por mayor tiempo. Ambos decrementos están directamente correlacionados con las concentraciones de fósforo disponible y de metales pesados totales en los suelos. El potencial micorrízico o capacidad de los propágulos de los suelos de restablecer las simbiosis, no se ha visto aparentemente disminuido. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de colonización de las raíces en los distintos periodos bajo riego en los dos tipos de suelos analizados. Sin embargo, estos porcentajes son mayores en las plantas que crecieron en los Leptosoles que las que crecieron en los Vertisoles. Se observó una disminución en la abundancia de esporas conforme se incrementa el tiempo bajo riego y es posible que se deba a que la esporulación está relacionada con el metabolismo de carbohidratos de las raíces que a su vez depende de las concentraciones de fósforo. Estas son mayores en las plantas que crecen en los suelos regados por mayor tiempo y en los que éste elemento más se acumula. Por otro lado, la diversidad morfológica de especies de hongos MA también es aparentemente menor en los suelos regados durante el mayor tiempo y en todos los casos las especies que predominan son *Glomus mosseae*, *Glomus aggregatum* y *Sclerocystis sinuosa*.

La transferencia y translocación de fósforo y metales pesados fueron cuantificadas en Vertisoles regados únicamente durante aproximadamente 5 (V05) y más de 90 años (V90). Se observó que ambos procesos se incrementan en los V90 y que no se modifican significativamente por la aplicación de agua residual en el transcurso de un cultivo. Las plantas que crecieron en los V90 tuvieron concentraciones mayores en más de tres órdenes de magnitud de estos elementos en raíces, tallos y hojas. La contribución de las simbiosis MA en la transferencia de estos elementos se cuantificó solamente en los suelos V05 y se encontró que la translocación de fósforo, cobre y zinc en los tres tejidos fue mayor en las plantas micorrizadas debido probablemente a su bioacumulación en las raíces. Las plantas no micorrizadas presentaron una mayor absorción y translocación de cadmio y en el caso del plomo, no se encontró ninguna diferencia relacionada con la

micorrización. Las plantas inoculadas con los hongos M90 tuvieron siempre los mayores niveles de Cu y Zn en los tejidos (translocación), principalmente en la raíz. Sin embargo, estas concentraciones no estuvieron relacionadas con los niveles de colonización de las raíces ni tampoco con la esporulación de los hongos. Por otro lado, el tipo de especies que se encontraron en este cultivo después de la cosecha fueron similares en abundancia y diversidad a las de los otros aislados M05 y MT. Es por esto que se discute la posibilidad de que los hongos M90 tengan una mayor capacidad de absorber metales pesados en los suelos menos contaminados y con ello de que las plantas los transloquen en mayor cantidad. Sin embargo, las concentraciones de estos elementos están en rangos adecuados para ser considerados como micronutrientes. También se observó una mayor esporulación, y con ello una mayor abundancia de los hongos M90 cuando fueron propagados en estos suelos V05, que fue relacionada nuevamente con la disponibilidad de fósforo en los suelos y en las plantas.

G. mosseae fue el morfotipo que se encontró en todos los muestreos de campo, *in situ* después de la cosecha del maíz y en todas las ocasiones en las que se llevó a cabo la propagación de los hongos MA en cultivos de invernadero. Esta especie puede estar en vías de adaptación y presentar actualmente mecanismos de resistencia o tolerancia a las concentraciones de fósforo de estos edafosistemas como resultado de procesos fisiológicos y/o genéticos. Por esto que se consideró analizar el grado de similitud genética entre los cultivos de hongos que han estado sometidos al estrés en los suelos regados por el menor y mayor tiempo. Se seleccionó el análisis de la región minisatélite que permite detectar pequeños cambios en las secuencias altamente repetidas de este genoma, mediante su amplificación por PCR con el "primer" M13. Las amplificaciones monospóricas se llevaron a cabo en dos poblaciones de *G. mosseae* (de los cultivos M05 y M90 propagadas en los experimentos de invernadero) que estuvieron sometidas al riego con agua residual durante su propagación. El dendograma y las pruebas de similitud en los distintos perfiles de bandas analizados muestran que los individuos M05 forman más

grupos diversos que los M90. Es posible agrupar a los individuos de M05 y M90 en categorías distintas a pesar de que algunos de los individuos de ambos grupos, compartieron los mismos perfiles. Los individuos M90 mostraron un mayor cantidad de bandas pero una menor heterogeneidad en sus perfiles. Estas diferencias no implican una adaptación de los hongos al riego sino únicamente el grado de similitud entre dos poblaciones. Se discute la posibilidad de que estas diferencias sean debidas a las condiciones de manejo de los suelos atribuibles a los ciclos de cultivo que se intensifican con el riego a lo largo del tiempo en comparación con los suelos regados durante menor tiempo y anteriormente destinados a la agricultura de temporal.

Se concluye que el impacto que ha tenido el riego con agua residual durante más de cien años en las poblaciones nativas de hongos micorrízicos arbusculares no ha disminuido la micorrización sino ha producido cambios en las estrategias de propagación de estos hongos. Es posible, sin embargo, que el impacto no pueda ser apreciado mediante diferencias estructurales de estas simbiosis como los parámetros que aquí se midieron y estas poblaciones difieran fisiológica y genéticamente. Parte de esto se apreció en los distintos cultivos en su capacidad de absorber metales pesados con la consecuente translocación de los mismos por las plantas de maíz. Los grados de variabilidad encontrados entre las poblaciones de los suelos regados por cortos y largos periodos de tiempo con aguas negras deberán probarse posteriormente en su respuesta al riego para poder conocer si los hongos MA están en proceso de adaptación a estas condiciones. Sin embargo, se demuestra en este trabajo que ha habido cambios atribuibles al riego con aguas no tratadas en la dinámica de esta simbiosis la cual es fundamental para los edafocistemas agrícolas. Este trabajo es un estudio completo acerca de los factores que se deben considerar para seleccionar bioindicadores adecuados del grado de deterioro de estos edafocistemas que sirvan para llevar a cabo las prácticas de restauración y para lograr un manejo sustentable de los mismos.

II. INTRODUCCION GENERAL

La utilización de distintos materiales de desecho como aguas, lodos, desperdicios animales y otros en la agricultura mundial, ha sido una consecuencia de la explosión demográfica e industrial. A su vez, ha contribuido al aumento de la productividad de las tierras cultivables en algunos casos, pero en otros ha provocado la contaminación de las mismas y ha repercutido en una transferencia de sustancias tóxicas a la cadena trófica (Naranjo y Biswas, 1997). La aplicación de aguas y lodos residuales en la irrigación y fertilización de campos de cultivo se ha practicado a nivel mundial a diferente escala. Esto tiene a su vez, distintas implicaciones ambientales como la salinización, eutrofización, liberación de amoníaco y/o óxidos nitrosos al aire (N_2O), percolación de nitratos a los mantos freáticos, degradación de los suelos, disminución de la calidad de los productos agrícolas, transferencia de elementos tóxicos para la salud humana y el ecosistema, así como distintas parasitosis (BGS, 1998). El uso agrícola de las aguas residuales, por otro lado, previene la contaminación directa de los cuerpos acuáticos naturales y permite la explotación de tierras áridas (Bond, 1998). México es un país en el que más de la mitad de las tierras agrícolas son de temporal: de los 270 mil km^2 , 58 mil son irrigados y sólo 1565 (que corresponden a una superficie cercana a las 160 000 ha) son regados con aguas residuales. En el caso de países desarrollados o industrializados, los tratamientos secundarios de estos desechos son prácticas comunes (Smith et al., 1996). Del mismo modo lo es la normatividad en cuanto a la aplicación y el monitoreo de su uso (US-EPA, 1992; Campbell, 2000). En contraste, en los países en vías de desarrollo, son pocas las ocasiones en que, tanto el tratamiento de residuos como el monitoreo y normatividad para su aplicación, sean una práctica común.

La mayor parte de los estudios acerca de los efectos causados por el uso de desechos en la productividad alimentaria, han sido dirigidos a evaluar la presencia, persistencia y transferencia de contaminantes (Bond, 1998). A esto se añade que en los últimos diez años, las

concentraciones de éstos en las aguas residuales se incrementó en un 150 % (Naranjo y Biswas, 1997). El enfoque actual es optimizar las prácticas agrícolas para que el manejo de los residuos cause el menor deterioro ambiental posible y resulte sustentable su utilización. Dentro de éstas, el manejo es el factor más importante a considerar, dado que es la clave para un uso prolongado y racional del suelo (Bond, 1998). Es evidente que las propiedades de los suelos afectan directamente el crecimiento de las plantas y de los microorganismos (Johnson y Pflieger, 1992). A su vez, los microorganismos están directamente involucrados en los procesos de fertilidad de los suelos y son uno de los fundamentos dentro de esta sustentabilidad (Herre, 1998; Friedel et al., 2000). Sin embargo, son pocos los estudios realizados que analizan el impacto en la actividad microbiana en suelos regados con aguas residuales. Dado que la gran cantidad de materia orgánica adicionada con el agua residual es transformada por las poblaciones microbianas, si éstas se ven reducidas en su abundancia y /o actividad, también se verá afectada la fertilidad de los suelos (Berthet et al., 1984; Tiller, 1989). Dentro de estas poblaciones están los hongos formadores de micorrizas, que son asociaciones simbióticas que se establecen de manera natural en las raíces de los cultivos y están representadas por las del tipo arbuscular. Este término hace referencia a la estructura que caracteriza a esta micorriza en particular y que es el *arbusculo*, formado dentro de las células de las raíces de las plantas y que es la principal zona de intercambio iónico en estas simbiosis. Los hongos micorrízicos arbusculares (MA) tienen una participación destacada en la transferencia o absorción de nutrimentos del suelo a la planta y por ende influyen indirectamente en la translocación vegetal que es el movimiento de los iones dentro de los tejidos y que se ve favorecida por una bioacumulación de los nutrimentos gracias a la formación de las simbiosis. Por otro lado, también desempeñan un papel protector en contra de los patógenos del suelo siendo por todo lo anterior que pueden ser considerarlos como organismos clave para evaluar la fertilidad de un suelo. Así mismo, estos hongos son importantes en los procesos de restauración de terrenos sobre-explotados, sobre-fertilizados o contaminados (Bethlenfalvay y Linderman, 1992; Robson et al., 1994; Batchugin et al., 1996).

Es por esto que es necesario tener un conocimiento previo acerca de los efectos causados por distintos impactos ambientales como el uso agrícola del agua residual en los hongos MA. Con base a esto, se evalúa la posibilidad de involucrar el manejo de estos organismos en cualquier estrategia de restablecimiento o restauración (Batchugjin et al, 1996). Sin embargo, pocos son los estudios que analizan el impacto del riego prolongado con aguas residuales en estas simbiosis. Esto se debe a que es prioritario evaluar el efecto que causan fuentes de contaminación más poderosas e inmediatas, como los desechos industriales o los lodos residuales (Domsch, 1984; Giller et. al., 1998; Campbell, 2000). Además, la biofertilidad del suelo, considerada como cualquier proceso biológico que favorezca la mineralización de los nutrientes, es atribuida mayoritariamente a otros microorganismos y simbiosis, como los nódulos fijadores de nitrógeno (Giller et al. 1998; Hoflich et al., 1999; Friedel et al., 2000). Por otro lado está el hecho de que la mayor parte de la información generada sobre hongos MA procede de suelos con severos problemas de disponibilidad de fósforo y se cuenta con muy pocos estudios acerca del impacto en las poblaciones que están sometidas a elevadas concentraciones de este elemento disponible (Khaliq y Sanders, 2000). Las prácticas agrícolas de cualquier tipo (rotación de cultivos, roza, tumba y quema, tecnificación, etc.) influyen y determinan el establecimiento de las simbiosis MA en los cultivos (Johnson y Pflieger, 1992; Gavito y Miller, 1998; Hoflich et al., 1999). Los estudios en campo han intentado cuantificar de qué manera se desarrolla su dinámica y si ésta se ve afectada. Esto se ha tratado de determinar a través de medidas de abundancia de los hongos (esporulación y/o producción de biomasa) y de la diversidad de sus especies, de la dinámica de colonización radical (infectividad, potencial colonizador), de los efectos en las plantas (altura, biomasa vegetal radical y/o aérea, etc.) y de la producción de los cultivos (efectividad de las simbiosis). Aún cuando el estudio de estos parámetros están siendo rápidamente complementados con nuevas metodologías basadas en técnicas moleculares (Clapp et al., 1995; Jacquot et al., 2000) la información obtenida con base a ellos sirve como punto de partida para establecer indicadores en estudios de monitoreo edafocológico y de impacto ambiental (Giller et al., 1998).

Por otro lado, los estudios ecotoxicológicos consideran prioritario el establecer cómo las sustancias que son producto de la actividad humana y son vertidas en los ecosistemas, pueden llegar a producir efectos que alteren su estructura y funcionamiento. Estas sustancias tienen muy diversos orígenes químicos y por tanto, grados de ecotoxicidad (Parr, 1983). Dentro de los componentes de las aguas residuales, existen muchos desechos peligrosos que no son eliminados, neutralizados o retenidos después de los tratamientos primarios de sedimentación. Entre éstos están los iones metálicos que quedan inactivados al formar complejos con la materia orgánica. Algunos de estos metales no forman parte del metabolismo natural de los organismos, por lo que los afectan al competir con elementos que sí son esenciales en las reacciones bioquímicas. Ejemplos de éstos son el mercurio, el cadmio, el plomo y el aluminio. Otros como el cobre y el zinc son micronutrientes que pueden llegar a ser tóxicos en concentraciones aún pequeñas (mayores a 1 000 mg por kilogramo de peso del organismo), causando distintos grados de estrés fisiológico y hasta la muerte. Por otro lado, son muchos y muy complejos los mecanismos de absorción, acumulación, toxicidad, almacenamiento-desintoxicación y con esto la inducción de tolerancia, etc., que los distintos organismos presentan ante elevadas concentraciones de metales. Concerniente al papel en estos procesos de las simbiosis MA, la principal preocupación consiste en establecer cómo estas pueden participar en la transferencia (bioacumulación) y con ello en la translocación vegetal de estos elementos de los suelos a las plantas. Cuando las concentraciones de metales esenciales (Mg, Cu, Zn, Fe) están dentro de intervalos adecuados de los micronutrientes, los hongos MA favorecen la absorción y con ello la translocación de los mismos (Manjunath and Habte, 1988; Haselwandter et al., 1994; Smith and Read, 1997). Sin embargo, cuando las concentraciones en los suelos son elevadas, no es claro aún si la formación de estas simbiosis contribuyen a una mayor transferencia y si tienen un efecto protector reteniendo a los metales en los tejidos radicales (bioacumulación). Esto se debe a que no son comparables las condiciones experimentales y de campo en las que se han realizado los estudios. A la luz de dichas investigaciones se puede únicamente concluir que los efectos antes mencionados dependen de la especie de hongo y de planta, del tipo de metal y de sustrato y del ambiente fisicoquímico (Languerau-Leman, 1999).

Aunado a esto está el hecho de que el fósforo es el principal elemento que regula el establecimiento de estas simbiosis. Elevadas concentraciones de fósforo ejercen un efecto antagónico, completamente comprobado, en su desarrollo (Menge et al., 1978; Cooper, 1984; Valentine et al., 2001). En el caso de este elemento, estudios en condiciones muy diversas tanto de especies de hongos como de plantas, han permitido generalizar que las concentraciones de fósforo disponible regulan diversos aspectos de las simbiosis (germinación de las esporas, inicio de la colonización y abundancia en las raíces, esporulación, etc) y con ello de todo el ciclo de vida de los hongos MA. Cuando las concentraciones de fósforo inhiben la formación de las simbiosis MA, se ha visto que esto puede tener repercusiones en el metabolismo del fósforo en la nutrición vegetal. Adicionalmente, estos efectos pueden ser vistos desde un punto de vista ecológico, como la alteración del balance costo-beneficio que involucra sostener el metabolismo "extra" del hongo mediante los fotosintatos (Marschner y Dell, 1994) cuando la planta no requiere del hongo para la absorción de este elemento. Desde el punto de vista fisiológico, el balance interno de carbohidratos en las plantas se modifica cuando los requerimientos de fósforo son los adecuados y esto involucra cambios en la translocación de los fotosintatos a las raíces, en la permeabilidad de las membranas y la receptividad celular (Graham et al., 1981). Desde el punto de vista bioquímico, existen cambios a nivel de transcripción y traducción de proteínas específicas en las plantas, así como cambios en las afinidades de las enzimas por los complejos (Km). Tal es el caso de la concentración de los iones polifosfato ($P0_4$) que también repercuten en la activación o desactivación de genes involucrados en las simbiosis (Maldonado-Mendoza et al., en prensa). Sin embargo, existen poblaciones de hongos MA que son tolerantes o resistentes a los metales pesados y a las concentraciones de fósforo elevadas (Cooper, 1978; Gildon y Tinker, 1981). Si bien es cierto que, en muchas ocasiones, éstas se consideran como resistentes por el sólo hecho de que se encuentran presentes en dichas condiciones, sin que se tenga información acerca de los mecanismos por los que están siendo resistentes (pueden ser fisiológicos y/o genéticos). En este sentido, la resistencia o tolerancia implica en el primer caso, mecanismos de defensa en contra de la absorción de elementos tóxicos y en el segundo, mecanismos únicamente de desintoxicación de los mismos. Ambos procesos pueden existir en cualquier

organismo, pero en los hongos MA estos procesos pueden ser adquiridos a través del exhabitant u hospederos (como la compartimentalización en las paredes celulares, la formación de fitoquelatinas, etc.) protegiendo a los mismos de posibles efectos tóxicos al no ser incorporados en su metabolismo. O bien sean los hongos los que confieran esta resistencia a las plantas al incorporarlos en sus paredes celulares y citoplasma e impidiendo su transferencia directa hacia las plantas (Dueck et al., 1986; Tomsett et Thurman, 1988). En cualquiera de estos casos, son varios los niveles en los que se pueden estudiar los mecanismos específicos de estos procesos. Los primeros estudios clásicos consideraron que la abundancia, diversidad y porcentajes de colonización eran buenos indicadores de resistencia. Otras investigaciones han abarcado la adaptación fisiológica, probando el efecto de concentraciones elevadas de metales y fósforo en la germinación de las esporas, inicio de la colonización, en la absorción de dichos elementos y en la esporulación (Weissenhorn y Leyval, 1996; Joner y Leyval, 1997). Recientemente, los estudios se dirigen a analizar las características genéticas que puedan evidenciar los mecanismos mediante los cuales los hongos MA están en camino de la adaptación a este tipo de estrés. Sin embargo, en el estudio de la adaptación de los hongos, no se pueden considerar diferencias en donde la apariencia de las distintas estructuras no refleja su fisiología. Otros estudios argumentan que la tolerancia de los hongos MA observada en algunos cultivos es facultativa y puede activarse o desactivarse de un cultivo a otro cuando no son mantenidas las condiciones de estrés (Weissenhorn y Leyval, 1996; Joner y Leyval, 1997). Del mismo modo, estudios genéticos que no demuestren el aislamiento de genes responsables de dicha tolerancia, tampoco demuestran que las diferencias entre aislados involucren por sí mismas, los mecanismos de la tolerancia. Lo que hace falta entonces es llevar a cabo un estudio completo que aportara información acerca de cada uno de estos aspectos y que permitiera que se comprendiera mejor el complejo proceso de la posible adaptación de las especies a los cada vez más cambiantes ecosistemas, producto del desarrollo humano.

En este contexto se enmarca esta tesis doctoral. El estudio se lleva a cabo en el Distrito de Riego 03, Hidalgo, México, que es el más grande y antiguo del país (Siebe y Cifuentes, 1995) y del mundo (Siebe y Cifuentes, 1995; Siebe y Fischer, 1996; BGS, 1998; Naranjo y Biswas,

1997). En este Distrito encontramos diferentes unidades de suelo que han sido regadas durante distintos lapsos de tiempo con aguas residuales no tratadas. Esto permite estudiar el impacto producido en el tipo de suelo tanto como por el tiempo bajo riego. El propósito de la tesis fue estudiar los efectos producidos por un siglo de contaminación de estos edafosistemas en la dinámica de las simbiosis micorrízicas arbusculares. Fueron tres los objetivos generales que dieron lugar a la estructura del trabajo:

Objetivos generales

- 1) Se evaluó si las poblaciones autóctonas de hongos micorrízicos arbusculares de los suelos agrícolas del Valle del Mezquital, han sido afectadas por la aplicación a los suelos de agua residual, en especial por el aporte de fósforo y la acumulación de metales pesados totales.

- 2) Se determinó si las micorrizas arbusculares contribuyen a la transferencia y con ello a la translocación de fósforo y algunos metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) en uno de los tipos de suelo más susceptibles de este edafosistema.

- 3) Se analizó a través de distintos parámetros micorrízicos y moleculares, si las poblaciones de hongos MA del Distrito Riego 03 desarrollan características que pueden implicar posibles cambios para su adaptación al riego con agua residual.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Los objetivos planteados anteriormente condujeron a estructurar la tesis en tres capítulos, cada uno de ellos se basó en los resultados del capítulo precedente. Se describen los objetivos específicos de cada uno.

Capítulo I. Estudios de campo.

- 1) De manera exploratoria, se cuantificó el impacto debido al tiempo de riego con aguas residuales en un corto y largo plazo (5 y más de 90 años) en la abundancia de esporas de hongos micorrizicos arbusculares en dos unidades de suelo (Vertisoles y Leptosoles) del Distrito de Riego.
- 2) Se analizó el efecto que producen distintos periodos de riego con agua residual (5, 35, 65 y más de 90 años) en el potencial colonizador del suelo (abundancia de esporas y porcentaje de colonización) y en la diversidad de especies de hongos micorrizicos arbusculares en Vertisoles y Leptosoles del Distrito de Riego.

Capítulo II. Estudios de invernadero.

- 1) Se determinó la participación de los hongos micorrizicos arbusculares en absorción de fósforo y algunos metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) y en su translocación en un cultivo de maíz, en Vertisoles regados durante 5 y 95 años.

- 2) Se estudió si las diferencias en la abundancia y diversidad de esporas de hongos MA al ser sometidos a condiciones de mayor, menor o igual contaminación con el riego con agua residual no tratada implicaban grados de tolerancia a estas condiciones.

Capítulo III. Estudios de laboratorio.

- 1) Se aplicó una prueba molecular sensible a la detección de variabilidad intraespecífica (regiones minisatélite) para saber si los distintos cultivos de una especie de hongo MA representativa de los suelos del Distrito de riego (*Glomus mosseae*) pueden ser diferenciados genotípicamente a través de este análisis.

Literatura Citada

- Batchugin E., J. Albrechtova, M. Gryndler, M. Vosatka, J. Dodd. 1996. Isolation of arbuscular mycorrhizal fungi from polluted soils for rehabilitation of degraded ecosystems. In: S. Gianinazzi, H. Schuepp, eds. COST Action 8.21. *Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil-Plant Systems*. P. 73. UROP, Luxembourg.
- Berthet B., C. Amiard-Triquet, C. Metayer, J. C. Amiard. 1984 Étude des voies de transfert du plomb de l'environnement aux végétaux cultivés; application à l'utilisation agricole des boues de station d'épuration. *Water, Air and Soil Pollution* 21: 447-460.
- Bethlenfalvay G. J., R. G. Linderman. 1992. *Mycorrhiza in sustainable agriculture*. American Society of Agronomy, Inc. Special Number 54. 124 p.
- Bond W. J. 1998. Effluent irrigation – an environmental challenge for soil science. *Aust. J. Soil Res.* 36: 543-555.
- BGS (British Geological Survey). 1998. Protecting groundwater beneath wastewater recharge sites. <http://www.hrwallingford.co.uk/projects/DFID-KAR/projects/files/R6231.html>.

- Campbell H. W. 2000. Sludge management – future issues and trends. *Water Science and Technology* 41 (8): 1-8.
- Clapp J. P., Young J. P. W., Merryweather J. W., Fitter A. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* 130: 259-265.
- Cooper K. M. 1978. Adaptation of VA mycorrhizal fungi to phosphate fertilizers. In: A. R. Ferguson, R. L. Bielecki, I. B. Ferguson. 107. New Zealand Department of Scientific & Industrial Res. Wellington, USA.
- Cooper K. M. 1984. *Physiology of VA mycorrhizal associations.* In: C. L. Powell, D. Joseph, eds. VA mycorrhizal. 115-186. CRC Press, Florida, USA.
- Domsch K. H. 1984. Effects of pesticides and heavy metals on biological process in soil. *Plant and Soil* 76: 367-378.
- Dueck T. A., P. Visser, W. H. O. Ernst, H. Schat. 1989. Vesicular-arbuscular mycorrhizae decrease zinc-toxicity to grasses growing in zinc-polluted soil. *Soil Biol. Biochem.*, 18: 331-333.
- Friedel J., T Langer, C. Siebe, K. Stahr. 2000. Effects of long-term wastewater irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and activities in Central Mexico. *Biology and Fertility of Soils* 31:414-421. 2000
- Gavito M., Miller M. H. 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant and Soil*: 177-186.
- Gildon A., P. B. Tinker. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. I. The effect of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 95: 247-261.
- Giller K. E., Witter E., McGrath S. T. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* (10-11): 1389-1414.
- Graham J. H., R. T. Leonard, J. A. Menge. 1981 Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorous inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. *Plant Physiol.* 68: 548.
- Haselwandter K., C. Leyval, F. S. Sanders. 1994 Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on plant uptake of heavy metals and radionucleotides from soil. In: Gianinazzi S., H. Schuepp. (Eds.), *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems.* Pp. 179-189. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.

- Herre A. 1998. Auswirkungen einer veränderten Qualität des Bewässerungswassers auf die C-Mineralisierung und Schwermetallmobilisierung in langjährig mit ungeklärten Abwässern bewässerten Böden Mexiko's. Diplomarbeit im Studiengang Agrarbiologie. Universität Hohenheim.
- Hoflich G., Tauschke M., Kuhn G., Werner K., Frielinghaus M., Hohn, W. 1999. Influence of long-term conservation tillage on soil and rhizosphere microorganisms. *Biol. Fert. Soils* 29 (1): 81-86.
- Jacquot E., Van Tuinen D., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 2000. Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in plant and in soil by nested PCR: applications to the study of the impact of sewage sludge. *Plant and Soil* 226 (2): 179-188.
- Johnson N. C., F. L. Pflieger. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stress. In: Bethlenfalvay and R. G. Linderman (Eds.). *Mycorrhiza in sustainable agriculture*. Pp. 71-99. American Society of Agronomy, Inc. Special Number 54.
- Joner E. J., C. Leyval. Uptake of ¹⁰⁹Cd by roots and hyphae of *Glomus mosseae/Trifolium subterraneum* mycorrhizal formation from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytol.* 135: 353-360.
- Khaliq A., Sanders F. E. 2000. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation on the yield and phosphorous uptake of field-grown barley. *Soil Biol. and Biochem.* 32: 1691-1696.
- Languereau-Leman F. 1999. La tolérance aux métaux lourds d'*Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. Ex J. & C. Presl. Tesis doctoral, Université de Lille 2. 165 p.
- Maldonado-Mendoza I. E., G. R. Dewbre, M. J. Harrison. S. F. A phosphate transporter gene (*GtPT*) from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, is regulated in response to phosphate in the environment. En prensa.
- Manjunath A., M. Habte. 1988. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and the uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*. *Plant and Soil* 106: 97-103.
- Marschner H., and B. Deil. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159: 89-102.
- Menge J. A., D. Steirle, D. J. Bagyaraj, E. L. V Johnson, R. T Leonard. 1978. Phosphorous concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytol.*, 80: 575.

- Naranjo P. L. M. F., A. K. Biswas. 1997. Water, wastewater, and environmental security problems: a case study of Mexico City and the Mezquital Valley. *International Water Resources Association* 22 (3).
- Parr J. M., Marsh P. B., Kla J. M. 1983. *Land treatment of hazardous wastes*. Noyes Data Corp. New Jersey.
- Robson A. D., L. K. Abbott, N. Malajczuk. 1994. *Management of mycorrhizas in Agriculture, horticulture and Forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 238 p.
- Siebe C., W. R. Fischer. 1995. Effect of long-term irrigation with untreated sewage effluents on soil properties and heavy metals adsorption of Leptosols and Vertisols in Central Mexico. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 159: 357-364.
- Siebe C., E. Cifuentes. 1995. Environmental impact of wastewater irrigation in Central Mexico: an overview. *International Journal of Environmental Health Research* 5: 161-173.
- Smith S. E. and D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2o. Ed. Academic Press, London, U. K.
- Smith C. J., P. Hopmans, F. J. Cook. 1996. Accumulation of Cr, Pb, Cu, Ni, Zn, and Cd in soil following irrigation with treated urban effluent in Australia. *Environm. Poll.* 94 (3): 317-323.
- Miller K. G. 1989. Heavy metals in soils and their environmental significance. *Advances in Soil Science* 9: 113-142.
- Tomsett A. D., D. A. Thurman. 1988. Molecular biology of metal tolerance of plants. *Plant, Cell and Environm.* 11: 383-394.
- USEPA (U. S. Environmental Protection Agency). 1992. Environmental Regulations and Technology Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. USEPA, Ohio 152 p.
- Valentine A. J., B. A. Osborne, D. T. Mitchell. 2001. Interactions between phosphorous supply and total nutrient availability on mycorrhizal colonization, growth and photosynthesis of cucumber. *Scientie Horticulturae* 88 (3): 177-189.
- Weissenhorn I., C. Leyval. 1996. Spore germination of arbuscular-mycorrhizal fungi in soils differing in heavy metal contents and other parameters. *Eur. Journal of Soil Biol.* 32: 165-172.

CAPITULO UNO. ESTUDIOS DE CAMPO.

Abundancia y diversidad de los hongos micorrízicos arbusculares en suelos regados con aguas residuales.

- a. Efecto del riego con aguas residuales en la micorriza arbuscular: el caso del Valle del Mezquital, Hidalgo. Ortega-Larrocea M. P. Y C. Siebe Grabach. En: *Hongos micorrizógenos en Sistemás áridos y semiáridos*. Ed. A. Monroy et al. En revisión, 4 abril del 2001. 18
- b. Impacto de un siglo de riego con agua residual en la abundancia de esporas de mycorrhiza arbuscular en los suelos del Valle del Mezquital, México. Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. Ortega-Larrocea M. P., C. Siebe, G. Bécard, I. Méndez y R. Webster. 2001. *Applied Soil Ecology* 16(2): 149-157. 33
- c. Potencial colonizador de hongos micorrízicos arbusculares de dos suelos regados durante diferente tiempo con agua residual en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. Ortega-Larrocea M. P., C. Siebe, G. Bécard. 43

Efecto del riego con agua residual en la micorriza arbuscular: el caso del Valle del Mezquital, Hidalgo.

Impact of wastewater irrigation on arbuscular mycorrhizal fungi: The case of Mezquital Valley.

a. del Pilar Ortega Larrocea, Cristina Desirée Siebe Grabach.

Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Apartado Postal 70-296, 04510 México D. F. Tel. 56 22 48 34, Fax: 56 22 48 28, E-mail: mpol@hp.fciencias.unam.mx.

Resumen

Se presentan los primeros trabajos de campo existentes en los que se estudió el efecto del riego con agua residual en las simbiosis micorrízicas arbusculares, en uno de los Distritos de Riego más grandes y antiguos del mundo. Se analizaron las concentraciones de fósforo disponible y metales pesados totales como los principales factores que pudieran ejercer un impacto negativo en las poblaciones nativas de hongos. Se encontró que el tipo de suelo (Leptosol vs. Vertisol), es el factor determinante en la regulación del impacto por el riego. Esto se observó en la abundancia de esporas en campo y después de ciclo de propagación en invernadero, en el potencial colonizador de los suelos y en la diversidad de especies. El tiempo de irrigación tiene efectos negativos en la abundancia de esporas, inclusive en la formación de vesículas y esporas intraradicales, lo cual se evidenció claramente a los 95 años bajo riego en los Vertisoles. Por el contrario, la colonización de las raíces no se ve alterada por el tiempo de irrigación sino por el tipo de suelo, por lo que el potencial colonizador de los suelos no se ha visto afectado. Del mismo modo, se observó un decremento en la diversidad de esporotipos en los suelos regados durante el mayor tiempo.

Palabras clave: micorriza arbuscular, agua residual, fósforo, metales pesados, contaminación

Abstract

For first time, the impact of wastewater irrigation on arbuscular mycorrhizal fungi in the Mezquital Valley, one of the biggest croplands in the world, is documented. Two factors that may affect the indigenous mycorrhizal soil populations, available phosphorous and total heavy metal concentrations, were analyzed. Soil type was the main factor affecting the irrigation impact. This was determined by the abundance of arbuscular mycorrhizal fungal spores in field and culture propagation samples, and in the colonization potential and morphotype (roughly equated to AMF species) diversity. Length of time under irrigation negatively affected the abundance of AMF spores, including intraradical spores and vesicles. This effect was evident in the 95 years irrigated Vertisols. Colonization potential of neither soil was affected by the irrigation period but it was influenced by soil type (or some factor or factors therein).

Key words: arbuscular mycorrhiza, wastewater, phosphorous, heavy metals, soil contamination.

Introducción.

El uso de aguas y lodos residuales en la irrigación de terrenos agrícolas, se practica mundialmente a diferente escala y con distinto grado de impacto ambiental (British Geological Survey, 1998). Reutilizar el agua residual en el riego es menos costoso que tratarla y con ello se evita contaminar a los cuerpos acuáticos superficiales quienes son los receptores de los desechos en caso de que no se pueda solventar su tratamiento. El uso de aguas residuales contribuye al reciclaje de los nutrientes, reduce la aplicación de fertilizantes costosos y aumenta considerablemente la productividad en las tierras áridas (Kelley et al., 1984; Bond, 1998). Este hecho es particularmente ventajoso en México donde más de la mitad de las tierras agrícolas son de temporal: de los 270 mil km², sólo 58 mil son regados y 1 565 son regados con agua residual (Siebe y Cifuentes, 1995). Sin embargo, se reconocen ya muchos efectos causados por el uso de lodos y aguas residuales en la producción de alimentos. Entre ellos se encuentra la eutroficación de suelos y cuerpos de agua superficiales, la liberación de amoníaco y óxidos nitrosos a la atmósfera, la percolación de nitratos a los mantos freáticos, la contaminación de los suelos con sustancias potencialmente tóxicas, la disminución de la calidad de los productos agrícolas por

absorción de elementos tóxicos para la salud humana, animal y del ecosistema y en la diseminación de parásitos y enfermedades.

La mayor parte de los estudios han sido dirigidos a evaluar la presencia, persistencia y transferencia de contaminantes. El enfoque actual está encaminando al implemento de prácticas agrícolas convenientes para que la aplicación de aguas residuales cause el menor deterioro ambiental posible y permita un uso sustentable del suelo y de los agroecosistemas (Bond, 1998).

Las propiedades de los suelos afectan directamente el crecimiento de las plantas y de los microorganismos (Johnson y Pflieger, 1992) y el papel de éstos en su fertilidad es uno de los fundamentos dentro de esta sustentabilidad (Dahlin et al., 1997). La gran cantidad de materia orgánica adicionada a los suelos con el agua residual es transformada y reciclada a través de procesos microbianos. Es por esto que si las poblaciones microbianas se ven reducidas en cantidad y/o actividad, la productividad del suelo puede verse muy disminuída (Domsch, 1984; Tiller, 1989; Giller et al., 1998). Los hongos micorrízicos del tipo arbuscular (MA) forman parte de estas poblaciones microbianas. Ellos forman simbiosis con las raíces de casi todos los cultivos agrícolas. Estos hongos incrementan la absorción y transferencia de nutrimentos a las plantas y las protegen contra patógenos del suelo. La simbiosis MA mejora el rendimiento de las plantas principalmente porque incrementan la absorción de fósforo. Del mismo modo, los hongos MA permiten que haya una mayor absorción de elementos poco móviles en el suelo por el rápido crecimiento del micelio que incrementa el gran volumen y superficie de absorción del suelo de manera más eficiente que las raíces de las plantas. Esto permite considerarlos como organismos clave en los procesos de restauración de terrenos sobreexplotados, sobrefertilizados o contaminados (Stahl et al., 1988; Bethlenfalvay y Linderman, 1992; Robson et al., 1994; Atkinson, 2000).

Se han llevado a cabo algunos intentos en la manipulación de estos hongos micorrízicos sin un entendimiento del comportamiento de las plantas y los hongos incluyendo su fisiología y ecología. Es necesario generar conocimiento acerca del modo en que las poblaciones han sido afectadas (quizás dañadas) por el uso de aguas residuales. Es importante conocer si y cómo han sido afectados los hongos y el papel que éstos desempeñan continúa siendo el mismo o han introducido uno nuevo en asociación

en un cultivo en particular. Por ejemplo, estos hongos permiten disminuir el estrés en las plantas permitiéndoles una mayor aclimatación a la contaminación? o contribuyen activamente en la tolerancia teniendo o acumulando los contaminantes?.

Los suelos agrícolas regados con agua residual reciben aportes excesivos de nutrimentos, particularmente de fósforo proveniente de los detergentes. El fósforo se considera inhibitorio para la simbiosis, junto con el efecto adicional que pudieran tener otras fuentes de contaminación como lo son los metales pesados. A pesar de que se sabe mucho acerca de los efectos del fósforo en las micorrizas arbusculares, comparativamente se ha descubierto muy poco acerca de la influencia que los metales pesados puedan tener en estas simbiosis. Se sabe que a concentraciones traza de estos elementos, los hongos MA participan positivamente en su absorción como micronutrimentos para desarrollo vegetal. Sin embargo, cuando los metales pesados se encuentran en concentraciones mayores, en ocasiones a niveles tóxicos, pueden ser transferidos y en consecuencia translocados en mayor cantidad en las plantas simbióticas que en las no simbióticas. Alternativamente, es posible que los hongos MA también desarrollen un papel protector en contra de su absorción.

La zona de estudio: el Distrito de Riego 03 en el Valle del Mezquital.

El estudio se llevó a cabo en el Distrito de Riego 03, Hidalgo, México, considerado el más grande y antiguo del país (Siebe and Cifuentes, 1995) y del mundo (Siebe y Cifuentes, 1995; Siebe y Moscher, 1996; Naranjo y Biswas, 1997; BGS, 1998; Campbell, 2000). La heterogeneidad que presentan las unidades de suelo y tiempos de irrigación, lo hace un escenario potencial para estudiar el impacto que ha tenido la aplicación de agua negra en las poblaciones nativas de hongos MA y en la dinámica de las simbiosis que ellos forman.

El Distrito 03 está situado entre 80 y 110 km al N de la Ciudad de México, a una LN entre 19° 30' - 20° 30' y una LO entre 98° 59' - 99° 38'. El clima en el Mezquital es templado seco considerado

como el más húmedo dentro de los áridos. La temperatura anual promedio oscila entre 12 y 20 °C y la precipitación es de 530 mm en una altitud de 1 900 a 2 100 msnm. *Prosopis laevigata* (Willd.) M. C. Johnston. (Leguminosae), el Mezquite, es la especie que da nombre al lugar ya que domina la fisionomía del matorral xerófilo o bosque espinoso. Actualmente, debido a que una gran parte de la superficie ha sido asignada a la producción agrícola, la vegetación natural se limita a los cerros circundantes al Valle de Naranjo y Biswas, 1997). Los suelos se han caracterizado taxonómicamente como Vertisoles eútricos, Feozems calcáreos y háplicos y Leptosoles rendzínicos y mólicos. Presentan rangos de pH desde 6.9 hasta ligeramente alcalinos entre 7.6 a 8.2. Como consecuencia de la irrigación estos valores se han incrementado cerca de diez veces ó más (Siebe y Cifuentes, 1995; Flores et al., 1997). La conductividad eléctrica varía entre 0.8 mS/cm para suelos de temporal y de 1 a 3.4 para los irrigados (Siebe y Cifuentes, 1995). Los contenidos de carbonato de calcio (CaCO₃) son muy variables y dependen de las unidades de suelo, pero pueden ser menores al 2 % en Vertisoles, entre 1 y 3 % en Feozems, y de 3 a 6 % y hasta 18 % en el horizonte superficial de Leptosoles rendzínicos (Carrillo y Cajuste, 1992; Siebe y Cifuentes, 1995). Los contenidos de materia orgánica en suelos de temporal son de 1.4 al 2 % (Siebe y Cifuentes, 1995). A mediados de los 70's, los principales cultivos sembrados fueron trigo (12-30 %), maíz (13-45 %), alfalfa (25-40 %) y jitomate (14 %). Los cultivos de temporal (25 %) eran frijol, avena, calabaza, chile verde, hortalizas como papa y frutales (Terán, 1956; Mendoza, 1981). Para 1997, el déficit en la producción de maíz en el Estado desplazó los otros cultivos, por lo que el 41 % de la superficie sembrada correspondió únicamente a la producción de este cultivo y 41 % de alfalfa, produciéndose frijol, frijol y trigo en la restante. La siembra se ha basado en un sistema de rotación cuya base es la alfalfa y se alterna con maíz, frijol y trigo (Terán, 1956).

La irrigación con agua residual en el Mezquital fue anterior a 1945, fecha en la que se decretó el Distrito por la entonces Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) (Mendoza, 1981). Este decreto se hizo oficial por acuerdo presidencial en el año de 1953 (Terán, 1956). Sin embargo, debido al propio crecimiento de la zona metropolitana del Valle de México, desde la época de la Colonia existió la necesidad de desalojar volúmenes cada vez mayores de las aguas usadas. Así se comenzó en 1571, la construcción del Tajo de Nochistongo que duró hasta 1789 y sirvió para encauzar el agua residual hacia el río Tula (o Dren Lagunilla) a través del río Cuauhtitlán. De este modo, la irrigación agrícola data desde 1886 (Sánchez, 1985) y es paralela a la construcción del Gran Canal de Desagüe y el

nel de Tequisquiac hasta 1904. En este año se hace la conseción del uso del agua al Distrito de Riego, e ya existía de manera no oficial y que en 1912 se tiene ya formalizada (Siebe y Cifuentes, 1995). ra los años 70's, el encauzamiento y almacenamiento del agua negra de la capital hizo posible su licación a gran escala en los suelos del Mezquital, productivamente inexplotados debido a la aridez de zona. Sin embargo, ésta no fue la única razón para la creación del Distrito ya que el déficit de oductos básicos y la necesidad de autoabastecimiento de la demanda nacional, obligaron a explotar evos territorios. En los años 1925-1938, la mayoría de los terrenos de siembra fueron asignados al go (Flores-Delgadillo et al., 1992) y para 1985, se cubrió entre el 80 y 94 % del área cultivada ánchez, 1985). Esta superficie aumenta conforme se incrementa el volúmen de agua de desecho: entre 14-1926 se regaban 14 000 Ha, duplicándose para 1950 y ya en 1955, la superficie oficial se delimitó 32 000 Ha (12 municipios). En 1965 eran irrigadas entre 42 500 y 50 100 Ha, 85 000 para 1985 y roximadamente 100 000 en 1997 (Siebe y Cifuentes, 1995; Flores et al., 1997). Estas cifras anifiestan que la planeación del Distrito no fue lo que se calculó para el año 2000, en el que el número hectáreas irrigadas sería cercano a 13 000 (Cuadra, 1981). Por otro lado, no todos los terrenos gados reciben la misma calidad de agua: en 1995 de 85 000 Ha, 10 000 eran regadas con agua negra da, 35 000 con una mezcla entre agua cruda (80%) y agua pluvial (20 %) almacenada en presas, 25 0 Ha con agua que recibió un tratamiento primario al ser almacenada en la presa Endhó. El resto que rresponde a terrenos situados a altitudes menores a 1 900 msnm, reciben el agua recuperada de los nales que riegan a suelos de mayor altitud y aguas de drenaje (Siebe y Cifuentes, 1995).

Impacto ambiental.

El aporte de nutrimentos con el riego (especialmente N y P) ha contribuido al enriquecimiento de s suelos (aunque naturalmente ricos en Ca, K y otras bases) lo que ha aumentado la productividad de zona comparada con la de temporal (Siebe y Cifuentes, 1995). Palacio et al. (1994) y Palacio y Siebe 994), muestran un enriquecimiento en el Valle en C orgánico, N, P, K y Mn debido al riego. A través la aplicación de agua cruda, se estima una adición anual de hasta 580 kg/ha de N, 250 de P y 780 de

(Siebe y Cifuentes, 1995; Siebe, 1998). Sin embargo, la calidad del agua, el tiempo y volumen de irrigación que varían dependiendo de la unidad de suelo, estación del año y tipo de cultivo, son determinantes en la acumulación de contaminantes. La calidad del agua ha cambiado con el tiempo pasando de inicialmente doméstica, a doméstica e industrial desde los 50's. En 1989, de 71 m³ anuales que se generaban en la Ciudad de México, un 55-67 % eran de origen doméstico, 11-17% industrial y 26-34 % de servicios y comercios (Naranjo y Biswas, 1997). A esto se suma el uso indiscriminado de detergentes, cuya producción comercial comienza en México a mediados del siglo pasado y en diez años reemplazó a los jabones hasta en un 80 %. Aún así, en los 70's, la calidad del agua cruda se consideraba aceptable para su utilización agrícola ya que la mayoría era de uso municipal. En 1990 se calculó un aporte de 470 kg/ha de metales pesados, 712 de B y 2 340 de detergentes (Naranjo y Biswas, 1997). Como ejemplo, en 1993 los lodos residuales se calculaban aproximadamente en 12 000 toneladas anuales (48 % industriales y 52 % domésticas) (Mazari y Mackay, 1993) que no sobrepasaron los límites de metales pesados según la Norma Oficial Mexicana (Siebe y Fischer, 1996). A pesar de esto, la acumulación de fosfatos no ha provocado todavía problemas de toxicidad (al menos a concentraciones de 70 mg/kg o mayores de P disponible) gracias a que la mayoría de los cultivos son resistentes a los componentes de los detergentes como las sustancias activas de azul de metileno y los alquil-bencil-sulfonatos (ABS). Acerca de la acumulación de MP en los suelos, Carrillo y Cajuste (1992) observan concentraciones de Cu y Zn de 8 a 20 veces mayores en suelos regados con agua cruda en comparación con un sitio regado con agua de pozo. Sin embargo y a pesar de que en algunos casos hasta el 99 % de los metales pesados puedan estar adsorbidos, fijados y/o retenidos, su disponibilidad en la solución del suelo aumenta proporcionalmente conforme aumentan los años bajo riego y la cantidad de agua aplicada (Cajuste et al., 1991; Siebe, 1995; Siebe, 1998). Siebe (1994) calculó una adición anual hasta de 0.28 mg/m² de Pb, 0.11 de Cd, 0.4 de Cu y hasta de 1.13 de Zn. Su transferencia en la cadena trófica se ha puesto en evidencia en el caso del Pb encontrado en todos los niveles y del Cd en el estiércol de bovino (O'Iri y Atthié, 1981). El constante monitoreo de los suelos ha confirmado que a pesar de que se establece un equilibrio dinámico con los contaminantes incorporados (Sánchez, 1985), éste puede superar la capacidad amortiguadora. Dado que la acumulación de metales está directamente relacionada con la textura y contenido de CaCO₃, es por lo que los suelos calcáreos permiten recibir un mayor volumen de riego. Esto implica además que a través de un adecuado manejo del suelo que permitiera conservar su estructura, se limitaría también el aumento de la salinidad (Sánchez, 1985) Otras propiedades asociadas

La acumulación de metales pesados son el contenido de materia orgánica y de arcillas que contribuyen principalmente a la retención de Cu, Cr, Pb, Mn y Zn (Cajuste et al., 1991; Flores-Delgadillo et al., 1992; Flores et al., 1997). Esto es importante porque el incremento de la materia orgánica en suelos regados por más de 80 años ha sido incrementado cerca de lo doble (6.4 %) (Siebe y Cifuentes, 1995).

3. Efecto del tiempo bajo riego.

Flores-Delgadillo et al. (1992) encuentran diferencias significativas relacionadas con el tiempo de aplicación de agua residual para Cd y Cu en todos los perfiles de los suelos estudiados en el Valle. En un periodo de 15 años, el Cd, Cr, Pb y Zn se acumularon en cantidades 10 veces mayores (Carrillo et al., 1992). Siebe (1994, 1995) encuentra que todos estos metales se acumulan en los horizontes superficiales (0-10 cm) conforme aumenta el tiempo bajo riego. En suelos regados por 80 años, el Cu, Pb y Zn están hasta 10 veces más concentrados y el Cd hasta nueve. Se mostró una correspondencia positiva entre los años bajo riego y la adsorción de metales (Siebe y Fischer, 1996). Se observó que su disponibilidad aumenta conforme incrementa el carbono orgánico disuelto en suelos regados por periodos cortos así como el carbono total aumenta la adsorción en suelos regados por periodos prolongados (aunque esto no repercute en su traslocación directa a los cultivos). Aún cuando la acumulación es proporcional a los años bajo riego, ésta no es siempre una condición (Carrillo y Cajuste, 1995; Flores et al., 1997) ni ocurre en todos los casos en las capas superficiales (Carrillo et al., 1992). Esto se podría atribuir a diferencias en los sitios de alimentación de los canales, a la ubicación de los terrenos y a que la calidad del agua aplicada en un sitio no ha sido la misma lo que influye en los contenidos locales de materia orgánica.

Impacto en las simbiosis micorrízicas: estudios de campo.

Son pocos los trabajos a nivel mundial acerca de los efectos causados en las simbiosis MA por el uso agrícola del agua residual. Esto se debe a que existe una prioridad en evaluar la magnitud antes que la duración del impacto que causan fuentes de contaminación más poderosas e inmediatas como los efluentes industriales o los lodos residuales (Domsch, 1984; Giller et al., 1998; Campbell, 2000). Además de que la biofertilidad del suelo es prioritariamente atribuida a otros microorganismos y simbiosis como las bacterianas (Giller et al. 1998; Hoflich et al., 1999; Fridel, 2000). Por otro lado, está el hecho de que en el caso de la MA, la mayor parte de los estudios se dirigen a los suelos con deficiencias en fósforo y muy pocos a estudiar el impacto en las poblaciones sometidas a elevadas concentraciones de este elemento disponible (Khaliq y Sanders, 2000). Dado el hecho de que las prácticas agrícolas de cualquier tipo influyen y determinan el establecimiento de las simbiosis MA (Johnson y Pflieger, 1992; Gavito y Miller, 1998; Hoflich et al., 1999), los estudios en campo han tratado de cuantificar de qué manera éstas se ven afectadas a través de medidas de abundancia del hongo (porcentaje de esporulación y/o producción de biomasa), de la diversidad de especies, de la colonización radical, de los efectos en las plantas (volumen y/o biomasa radical, aérea) y de la producción de los cultivos. Estos parámetros están siendo complementados con nuevas metodologías con técnicas moleculares (Clapp et al., 1995; Jacquot et al., 2000), pero sirven como punto de partida para establecer indicadores de impacto y como base de posteriores estudios ecotoxicológicos (Giller et al., 1998).

En este trabajo se consideraron como indicadores para cuantificar el efecto del tiempo de irrigación con agua residual (5, 35, 65 y 95 años) a la abundancia y diversidad de esporas y al potencial colonizador de los suelos, referido como la capacidad de los propágulos en el mismo para formar de nuevo las simbiosis. Los métodos de estudio se encuentran referidos en Ortega-Larrocea et al. (2001a y

Para poder atribuir al riego cualquiera de los cambios en la dinámica de las simbiosis, fue necesario considerar los efectos producidos por el manejo de los cultivos y de los suelos que los pudieran enmascarar. Estos factores se resumen en la rotación de cultivos, el manejo de la siembra y la cosecha y la aplicación de pesticidas que fueron constantes bajo las siguientes condiciones:

a. Como se indicó, la rotación de cultivos se practica continuamente alternándose de manera permanente el maíz, frijol y alfalfa, todas especies altamente micótrofas. El maíz (*Zea mays* L.) fue seleccionado como el cultivo en el que se muestrearon después de la cosecha, las rizosferas de todos los muestreos, debido a su importancia como cultivo nacional y local y también porque es una especie comúnmente utilizada en la propagación de hongos MA. Aún cuando las prácticas agrícolas reducen la diversidad de estos hongos en el suelo (Feldmann y Boyle, 1999), la ininterrumpida rotación de cultivos permite suponer que las poblaciones se han mantenido representadas de una manera equilibrada y ésta es constante para todos los suelos estudiados. El monocultivo o el cultivo de especies no micótrofas como la col que pudieran causar una depresión en la abundancia y diversidad de la MA (Giller y McGrath, 1988; Jackobsen, 1994) no son prácticas agrícolas que se lleven a cabo en este Distrito.

b. Métodos de siembra, cosecha y manejo del suelo en los terrenos son similares debido a que todavía no existen zonas altamente tecnificadas en los terrenos colectados que pudieran contrastar con la siembra tradicional.

c. El control de plagas se lleva a cabo principalmente por la rotación y la propagación de éstas mediante el riego y tiene la misma probabilidad de ocurrir en todos los terrenos que son irrigados. Aún así, no se tiene evidencia de que en las parcelas muestreadas hubiera la aplicación previa de pesticidas por problemas de plagas.

Otros factores que permitieron disminuir aún más el efecto de variables no asociadas al riego fueron el tipo de suelo (que como se ha visto, es determinante en el poder amortiguador de la contaminación), la época de colecta y el monitoreo de los terrenos en estudios previos (Siebe, 1994). Por todo los muestreos se hicieron separadamente para cada tipo de suelo y tiempo de irrigación que fueron ambos las variables independientes. Por todo lo anterior y con lo que se conoce de la simbiosis, los efectos predecibles de la aplicación del riego en las simbiosis MA fueron:

a. La reducción, y hasta posible inhibición, en la formación de la micorriza debido a las elevadas concentraciones de fósforo disponible en los suelos y en el agua de riego (Sainz et al., 1998; Khaliq y

anders, 2000). Esto podría ser una consecuencia de la disminución de la micotrofia de las plantas por el excesivo aporte de nutrimentos.

b. El efecto tóxico de contaminantes como MP que actúan como una presión de selección sobre las poblaciones sometidas al riego, permitiendo la tolerancia y/o adaptación de ciertas especies (Del Val et al., 1999).

Bajo condiciones de riego contrastantes (5 y 95 años), se estudió únicamente a la abundancia total de esporas en los dos tipos de suelos (Leptosoles y Vertisoles) para poder determinar si ésta podía ser utilizada como un indicador para evaluar la simbiosis en muestreos de campo (Ortega-Larrocea et al., 2001a). Las abundancias fueron relacionadas con las respectivas concentraciones de fósforo disponible y metales pesados totales.

En este primer estudio se encontró que el tipo de suelo pondera la abundancia de esporas tanto como la amortiguación del impacto provocado por el riego, siendo los Leptosoles un mejor sustrato para la esporulación de los hongos MA. En los suelos regados por los mismos periodos de tiempo, las mayores densidades se encontraron en los Vertisoles, así como poblaciones numéricamente más homogéneas, lo que fue atribuible a las características intrínsecas de estos suelos como su textura arcillosa, mayor acumulación de materia orgánica y contaminantes. Por otro lado, las abundancias de los esporocarpos encontrados (*Glomus mosseae* y *Sclerocystis sinuosa*) no presentaron ninguna relación aparente con el riego, debido posiblemente a la naturaleza de resistencia de estas estructuras. Se concluyó entonces que había un efecto significativo atribuible al riego y a las concentraciones de fósforo disponible y metales pesados totales en la disminución de esporas libres en el suelo y que fue mucho más claro en los Vertisoles.

En un segundo estudio, se procedió a investigar si había un efecto gradual entre el tiempo de propagación y la abundancia, potencial colonizador y diversidad de especies de estos suelos (Ortega-Larrocea et al., 2001b). La abundancia y diversidad de esporas se cuantificaron directamente en muestreos de campo y después de un ciclo de propagación en invernadero en el que se analizó el potencial colonizador.

Nuevamente se encontraron diferencias en estos parámetros atribuibles al tipo de suelo. En el tiempo, las abundancias de esporas libre presentaron una clara disminución conforme aumentaba el tiempo bajo riego en los Vertisoles, mientras que en Leptosoles este efecto no se hace evidente hasta los 65 años. En macetas de propagación, la dinámica de la colonización está influenciada completamente por el tipo de suelo, confirmando que los Leptosoles son un mejor habitat para las simbiosis MA ya que permitieron desarrollar una elevada colonización radical (hasta un 85 %), independiente del tiempo bajo riego. El potencial micorrízico de ambos suelos no se relacionó con las abundancias de esporas en el tiempo ni tampoco con los tiempos bajo riego, por lo que se atribuyó a la influencia de otros propágulos que pueda estar determinando la colonización de las raíces en el suelo. Sin embargo, la posterior población en macetas de propagación mostró nuevamente una disminución detectable hasta los 95 años bajo riego en ambos suelos.

En relación a la diversidad, las especies dominantes fueron en todos los casos similares (antes y después de la propagación). *Glomus mosseae* en forma libre y esporocárpica y *Sclerocystis sinuosa* fueron siempre abundantes y se observaron también en la vegetación natural. Esporocarpos laxos de *Glomus intraradices* fueron comunes en suelos regados por 65 años. Los demás morfotipos encontrados pertenecieron también al mismo género y fueron separados en aproximadamente 8 diferentes que fueron más comunes en los suelos regados por menor tiempo.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Dirección General de Intercambio Académico (DGAPA), al Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM y al Programa ECOS-SEP-CONACyT-UNAM (U96-M02) por los apoyos otorgados.

Literatura citada

- kinson D. 2000. The beneficial rhizosphere: a dynamyc entity. *Applied Soil Ecology* 15: 99-104.
- ethlenfalvay G. J., Linderman R. G. 1992. Mycorrhiza in sustainable agriculture. American Society of Agronomy, Inc. Special Number 54. 124 p.
- ond W. J. 1998. Effluent irrigation – an environmental challenge for soil science. *Aust. J. Soil Res.* 36: 543-555.
- GS (British Geological Survey). 1998. Protecting groundwater beneath wastewater recharge sites. [Http://www.hrwallingford.co.uk/projects/DFID-KAR/projects/files/R6231.html](http://www.hrwallingford.co.uk/projects/DFID-KAR/projects/files/R6231.html).
- ajuste L. J., Carrillo R., Cota E., Lair R. J. 1991. The distribution of metals from wastewater in the mexican Valley of Mezquital. *J. Water Air and Soil Pollution* 57-58: 763-771.
- ampbell H. W. 2000. Sludge management – future issues and trends. *Water Science and Technology* 41(8): 1-8.
- arrillo R., Cajuste L. J., Hernández L. 1992. Acumulación de metales pesados en un suelos regados con aguas residuales. *Terra* 10 (2): 166-173.
- arrillo R., Cajuste L. 1992. Heavy metals in soils and alfalfa (*Medicago sativa* L.) irrigated with three sources of wastewater. *J. Environm. Sci. Health A27* (7): 1771-1783.
- arrillo R., Cajuste L. 1995. Behavior of trace metals in soils of Hidalgo, México. *J. Environm. Sci. Health A30* (1): 143-155.
- app J. P., Young J. P. W., Merryweather J. W., Fitter A. 1995 Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* 130: 259-265.
- uadra J. 1981 Agricultural land irrigation with wastewater in the Mezquital Valley. En: D'Itri F. M. and Atthié N. Eds. Municipal wastewater in Agriculture. Academic Press, New York, 217-248.
- ahlin S., Witter E., Martensson A., Turner A., Bååth E. 1997. Where's the limit? Changes in the microbiological propieties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biol. Biochem.* 29 (9): 1405-1415.
- Itri F., N. Atthié. 1981. Municipal wastewater in agriculture. Academic Press, New York.
- el Val C., Barea J. M., Azcón-Aguilar C. 1999. Assesing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 11(2-3): 261-269.
- omsch K. H. 1984. Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. *Plant and Soil* 76. 367-378.
- AO, 1988. Soil map of the World. Revised Legend. World Soil resources Report 60, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- eldmann F., Boyle C. 1999. Weed-mediated stability of arbuscular mycorrhizal effectiveness in maize monocultures. *J. Appl. Bot.-Angew. Bot.* 73: 1-5.

- ores L., Blass G., Hernández G., Alcalá R. 1997. Distribution and sequential extraction of some heavy metals from soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Water Air and Soil Poll.* **98**: 105-117.
- ores-Deigadillo L., Hernández-Silva G., Alcalá-Martínez R., Maples-Vermeers M. 1992. Total contents of Cd, Cu, mn and Zn in agricultural soils irrigated with wastewater from Hidalgo, México. *Rev. Int. Cont. Amb.* **8** (1): 37-46.
- iedel J., Langer T., Siebe C., Stahr K. 2000. Effects of long-term wastewater irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and activities in Central Mexico. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 414-421.
- avito M., Müller M. H. 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant and Soil* **1998**: 177-186.
- ller K. E., McGrath S. T. 1988. Pollution by toxic metals in agricultural soils. *Nature* **335** (20): 676.
- ller K. E., Witter E., McGrath S. T. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* (10-11): 1389-1414.
- oflich G., Tauschke M., Kuhn G., Werner K., Frielinghaus M., Hohn, W. 1999. Influence of long-term conservation tillage on soil and rhizosphere microorganisms. *Biol. Fert. Soils* **29**(1): 81-86.
- quot E., Van Tuinen D., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 2000. Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in plant and in soil by nested PCR: applications to the study of the impact of sewage sludge. *Plant and Soil* **226** (2): 179-188
- kobsen I. 1994. Research approaches to study the functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the field. *Plant and Soil* **159**: 141-147.
- hson N. C., Pflieger F. L. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stress. In: Bethlenfalvay G. J., Linderman R. G. Eds. *Mycorrhiza in sustainable agriculture*. American Society of Agronomy, Inc. Special Number 54, 71-99.
- lley W. D., Simpson T. W., Reneau, R. B., McCart G. D., Martens D. C. 1984. Perception of technical personnel on research and education needs for land application of sewage sludge. *Water, Air and Soil Pollution* **22**: 181-185.
- aliq A., Sanders F. E. 2000. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation on the yield and phosphorous uptake of field-grown barley *Soil Biol. and Biochem.* **32**: 1691-1696.
- azari M., Mackay D. M. 1993 Potential of groundwater contamination. *Environm. Sci. Tech.* **27** (5): 794-801.
- endoza M. H. 1981. Principal wastewater agriculture. Land treatment: a viable solution for management of wastewater in the metropolitan area of Valley of Mexico. In: D'Itri F. M. and N. Athié. *Municipal wastewater in Agriculture*. Academic Press, New York, 163-169.
- aranjo P. L. M. F., Biswas A. K. 1997. Water, Wastewater, and environmental security problems: a case study of Mexico City and the Mezquital Valley. *International Water Resources Association* **22** (3).

- Larrosa-Larrocea M. P., Siebe C., Bécard G., Méndez I., Webster R. 2001a. Impact of a century of wastewater irrigation on spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in the soil of Mezquital Valley of Mexico. *Applied Soil Ecology* 16 (2): 149-157.
- Larrosa-Larrocea M. P., Siebe C., Bécard G. 2001b. Potencial colonizador de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de dos suelos regados durante diferente tiempo con aguas residuales en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *En proceso (Parte 3, Cap. I)*.
- Larrosa P. J. L., Siebe C., Cortez A. A. 1994. Variabilidad y distribución espaciales de algunos parámetros físicos y químicos del suelo en el Distrito de Riego 03, Hidalgo, México. *Rev. Inst. de Geología* 11, 62-67.
- Larrosa P. J. L., C. Siebe. 1994. Variabilidad y distribución espaciales de algunos parámetros físicos y químicos del suelo en el Distrito de Riego 03, Hidalgo, México. Parte 2: Cartografía. *Rev. Inst. de Geología* 11: 68-78.
- Johnson A. D., Abbott L. K., Malajczuk N. 1994. Management of mycorrhizas in Agriculture, horticulture and Forestry. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 238 p.
- Lincoln M. J., Taboada M. T., Vilarino A. 1998 Growth, mineral nutrition and mycorrhizal colonization of red clover and cucumber plants grown in a soil amended with composted urban wastes. *Plant and Soil* 205 (1): 85-92.
- Lozano N. 1985. Mexican experience in using sewage effluent for large scale irrigation. FAO Regional Seminar on the treatment and use of sewage effluent for irrigation, Doc. 16, 1-10.
- Siebe C. 1994. Akkumulation, Mobilität und Verfügbarkeit von Schwermetallen in langjährig mit Abwasser bewässerten Böden Zentralmexikos. Hohenheimer Bodenkundliche Hefte 17, Stuttgart, Institut für Bodenkunde und Standortslehre, Universität Hohenheim.
- Siebe C. 1995. Heavy metal availability to plants in soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Wat. Sci. Tech.* 32 (12): 29-34.
- Siebe C. 1998 Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. *Soil Use and Management* 14: 119-122.
- Siebe C., Cifuentes E. 1995. Environmental impact of wastewater irrigation in Central Mexico: an overview. *International Journal of Environmental Health Research* 5: 161-173
- Siebe C., Fischer W. R. 1996. Effect of long-term irrigation with untreated sewage effluents on soil properties and heavy metals adsorption of Leptosols and Vertisols in Central Mexico. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 159: 357-364.
- Smith P. D., Williams S. E., Christensen M. 1988. Efficacy of native vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance. *New Phytol.* 110: 347- 354.
- Soriano T. 1956. El programa agrícola Nacional. Su funcionamiento en el Distrito Nacional no. 3 de Tula, Hidalgo. Tesis, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Ward K. G. 1989. Heavy metals in soils and their environmental significance. *Advances in Soil Science* 9: 113-142.

Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico

M.P. Ortega-Larrocea^{a,*}, C. Siebe^a, G. Bécard^b, I. Méndez^c, R. Webster^d

^a Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-296, 04510, México D.F., Mexico

^b Pôle de Biotechnologie Végétale, Université Paul Sabatier, 24 Chemin de Borde-Rouge, BP 17 Auzeville, 31326 Castanet Tolosan, France

^c Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas (IIMAS), UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., Mexico

^d Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Herts AL5 2JQ, UK

Received 21 January 2000; received in revised form 26 June 2000; accepted 30 June 2000

Abstract

Phosphorus (P) and heavy metals introduced into soil by irrigating with sewage effluent can affect the soil's microflora and, in particular, the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi. We have studied the effect in the Mezquital Valley of Mexico, on two kinds of soil (Leptosol and Vertisol) after both short-term (5 years) and long-term (90 years) irrigation. We did so by replicated sampling of all four combinations of soil type and length of irrigation and then estimating the main effects and interactions by analysis of variance.

Both kinds of soil appear to have accumulated large quantities of P and heavy metals as a result of the irrigation so that concentrations have approximately doubled and now approach the thresholds for healthy soil. The differences between soil types were comparatively small. Phosphorus was the only element for which there was an interaction between soil type and time under irrigation. The Leptosol contained more spores than the Vertisol, irrespective of the length of the irrigation, and both types contained significantly fewer spores after 90 years of irrigation than after only 5 years. The effect was more evident in Vertisols. In contrast, the sporocarpic morphotypes seemed unaffected by the accumulated phosphorus and metals. The sporocarps of *Glomus mosseae* were twice as abundant in the Leptosol as in the Vertisol, but those of *Sclerocystis* were equally prevalent in the two types of soil. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza; Vertisol; Leptosol; Phosphorus; Heavy metals; Sewage effluent

1. Introduction

Irrigation in District 03 in the Mezquital Valley in Central Mexico was planned at the beginning of this century to dispose of Mexico City's wastewater and, at the same time, to make this semiarid region

agriculturally productive. The wastewater has provided the farm crops with nutrients and the soil with organic matter. It has also added pollutants, notably phosphorus (P) and heavy metals, which have accumulated in the soil through the years, mainly in the plough layer (Siebe, 1994). The general characteristics of the District, its soils, irrigation regime, the accumulation of the heavy metals, and the risks to human health due to microbial development in the sewage, have been well-documented (see Siebe

* Corresponding author.

E-mail addresses: mpol@hp.ciencias.unam.mx

(M.P. Ortega-Larrocea), rchara.webster@bbsrc.ac.uk (R. Webster).

and Cifuentes, 1995; Siebe and Fischer, 1996; Siebe, 1998).

There has been no investigation of the effects of the wastewater on the arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, an important biotic component of agricultural soils. The AM fungi can significantly improve the mineral nutrition of crops by effectively enlarging the rhizosphere of the plants that they colonise. They enhance the uptake of phosphorus in particular and that of several micronutrients, but they also may increase the uptake of pollutants such as heavy metals (Lambert et al., 1979; Leyval et al., 1997). However, mycorrhizal colonisation can also confer on plants greater tolerance to toxic metals and other adverse conditions in the soil.

Modern agriculture with its large inputs of nutrient (including P) has tended to depress mycorrhizal populations, though fungal populations tolerant to phosphorus have been noted (Bagyaraj, 1995; Olsen et al., 1999). Heavy metals can be strongly selective, and they could also be responsible for the development of resistant strains of AM fungi (Griffioen, 1994; Leyval et al., 1995; Kaldorf et al., 1999). Thus, mycorrhizal fungi might serve as bioindicators of pollution. Nevertheless, more data and evidence from the field are required before we can use them in this role, as Cairney and Meharg (1999) point out.

Leyval et al. (1997) and Del Val et al. (1999) have reported a decline in the density of AM propagules in soil polluted with heavy metals, whereas Weissenhorn et al. (1995b) found no correlation between the concentrations of heavy metal in the soil and the distribution of propagules. In fact, it seems that the impact of the metals is controlled by the soil's buffering properties (Rathore and Singh, 1995). The time during which the fungi are exposed to pollutants is also important; the longer they have the more they can adapt and thereby alleviate any stress (Griffioen, 1994). Most

studies on the subject have been done on acid soils over short times after adding sludge or on soil subject to concentrated pollutants from sources such as smelters and factories (Miller et al., 1995; Weissenhorn et al., 1995a) and by radioactive wastes (Entry et al., 1999).

We know much less about the impact of long-term irrigation with sewage effluent and the soil's buffering properties regulating this impact, especially in even mildly alkaline conditions. Yet we ought to know what irrigation with sewage does to the soil fungi, and, in particular, how it affects the populations of AM fungi, because they are essential to plant health and soil quality (Haselwandter et al., 1994).

With the foregoing in mind, we set out to investigate what effect, if any, the accumulated phosphorus and heavy metals introduced into the soils of the Mezquital by >90 years of irrigation have had on the indigenous population of AM fungi. By using a rigorous field sampling design, we analysed the variance and correlation between the abundances of free spores and sporocarps with the contents of heavy metals and phosphorus in the soil.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling

There are two principal types of soil in the Mezquital Valley: Eutric Vertusols (V) as defined by FAO (1988) (Typic Pellustert in the US Soil Taxonomy, USDA, 1993) and Mollic Leptosols (L) (FAO, 1988), or Petrocalcic Calciustoll (USDA, 1993). Typical values of the pH and organic carbon and the particle-size distribution of the topsoil (0–20 cm) in the fields sampled are listed in Table 1.

Table 1
General characteristics of the soils; mean values of pH, organic carbon, and particle size distribution

Soil type	Years under irrigation	pH	Organic C (%)	Particle-size distribution		
				Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
Leptosol	5	7.36	1.76	52	34	14
Leptosol	90	7.75	2.38	46	30	24
Vertisol	5	7.49	1.03	36	37	37
Vertisol	90	7.60	2.82	46	26	28

In order to assess the degree to which irrigation with wastewater had affected these soils we sampled as follows. We chose at random eight fields of each combination of soil type and time under irrigation (90 years, long-term, and 5 years, short-term), giving a total of 32 fields. Thus, our design was a completely randomised 2×2 factorial with eight replicates. We had found by estimating variances in a preliminary survey that eight-fold replication should enable us to compare treatments and soils reasonably sensitively. We denote the combinations by V05, V90, L05, L90.

All the fields had recently grown maize, one of the main crops in the region. By restricting our choice in this way, we hoped to minimise the effects of cropping. At the end of autumn 1997, a 3-kg composite sample of 10 cores from the topsoil (0–20 cm) distributed evenly along a central zigzag line across the field was taken in each field. The soil samples were air-dried at room temperature (25°C) and stored at 4°C until we counted the spores of AM in them and analysed them chemically.

2.2. Spore and sporocarp abundance

Free spores and sporocarps of the AM fungi were separated from the soil by wet sieving and decanting from 300 g of mixed soil sample per field (100 g of soil aggregates >10 mm; 100 g of 10–2.38-mm aggregates, 100 g of aggregates <2.38 mm, which were shaken in water; no deflocculating agent was necessary). Spores and sporocarps were counted under a stereoscopic microscope. Permanent slides in polyvinyl alcohol (PVLG) and PVLG-Meltzer's reagents were made for taxonomic determinations, as described by Schenck and Pérez (1990) and at the INVAM Web site, <http://invam.caf.wvu.edu>.

2.3. Chemical analyses

Heavy metals were extracted with Aqua Regia (HCl:HNO₃ in the proportion 2:1 by volume) and determined by atomic absorption spectrophotometry (Perkin–Elmer) to give total soil concentrations. 'Available' phosphorus was extracted with 0.5 M NaHCO₃ and determined colorimetrically as blue molybdate-phosphate complexes under partial reduction with ascorbic acid (Jackson, 1958).

2.4. Statistical analysis

The counts of spores and sporocarps, both transformed to their square roots to stabilise their variances, were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) according to the design. This provided estimates and tests of the effects of treatment (years under irrigation), soil type, and their interactions. The concentrations of available phosphorus and heavy metals were analysed similarly. We also examined the relations between the contents of heavy metals and phosphorus in the soils on the abundance of the arbuscular morphotypes (spores and sporocarps) graphically and by simple correlation analysis. All analyses were done using Genstat (Genstat 5 Committee, 1993).

3. Results

Table 2 lists the means and standard errors of the concentrations of available phosphorus and the metals and the counts of the fungal sporotypes. It does so for each combination of soil type and time under irrigation. It also gives the marginal means, i.e. times pooled for the two soil types and soil types pooled over times because the analysis of variance (see below) showed that with only one exception the main effects were significant.

Table 3 presents the analyses for all the variables in terms of the ratios (*F* statistics) of the mean squares for main effects and interactions to the residual mean squares.

The abundance of intact free spores (SA) ranged from 2 to 482 spores per 100 g of soil. The counts were similar for the two soil types and mainly of the species *Glomus mosseae* and *G. intraradices*. Other species, including *G. geosporum* and few *Acaulospora* spp. were also present. The sporocarpic species were *G. mosseae* (GS), with counts mainly in the range 1–48 sporocarps per 100 g of soil, but with one exceptional count of 144, and *Sclerocystis sinuosa* (SS), with 0–20 sporocarps per 100 g. For each soil type, the mean abundance of free spores was least in the soil that had been irrigated for 90 years, i.e. the more polluted one. The mean abundance of sporocarps was similar in the two soils and for both irrigation treatments. There were more sporocarps of *G. mosseae*

2
 means and standard errors (s.e.) of elements (in mg kg⁻¹) and mycorrhizal sporotypes (as counts per 100 g soil) for the combinations of soil type and years under irrigation and marginal means for years and soil type

Soil type and years	Elements						AM Fungi			
	P	Cr	Cu	Ni	Zn	Pb	Free spores	Sporocarps		
								<i>Glomus</i>	<i>Sclerocystus</i>	
Leptosol	mean	21.1	20.0	11.5	22.1	45.5	18.3	220.0	13.42	4.88
	s.e.	2.2	0.8	0.7	1.2	2.9	5.8	46.0	0.86	1.13
	mean	64.6	43.4	44.4	35.7	160.2	52.1	173.7	11.71	3.63
	s.e.	2.8	2.4	3.0	1.7	17.0	3.0	66.6	5.37	1.19
Vertisol	mean	38.5	23.1	16.0	23.9	78.2	24.9	170.5	7.50	6.50
	s.e.	4.5	0.4	0.2	0.2	3.2	3.0	23.5	1.55	2.19
	mean	63.9	45.3	43.7	41.9	191.1	46.5	73.8	6.62	6.41
	s.e.	4.1	3.8	4.3	2.2	17.0	4.6	15.8	1.77	1.15
Vertisol soils	mean	30.0	21.6	13.8	23.0	61.9	21.6	195.2	10.46	5.69
	s.e.	3.3	0.6	0.7	0.6	4.7	3.2	25.8	1.15	1.21
	mean	64.2	44.3	44.1	38.6	174.6	49.5	123.7	9.17	5.01
	s.e.	2.4	2.1	2.5	1.6	12.3	2.7	35.5	2.81	0.88
Morphotype Leptosol	mean	42.9	31.7	30.0	28.9	102.8	35.2	196.8	12.56	4.25
	s.e.	5.9	3.3	4.5	2.0	17.0	5.4	35.9	2.63	0.81
Morphotype Vertisol	mean	51.2	33.5	28.9	32.3	130.9	35.0	122.2	7.06	6.46
	s.e.	4.4	3.4	4.1	2.6	16.9	3.9	18.5	1.14	1.20
Reference values	European Union ^a		100–150	50–140	30–75	150–300	50–300			
	Switzerland ^b		75	50	50	200	50			

^aThe European Union's guidelines for maximum concentrations of heavy metals in soil (from McGrath, 1986).
^bThe Swiss guide maxima (FOEFL, 1987).

in the Leptosol than in the Vertisol, a difference that the analysis showed to be significant ($p < 0.05$). The abundance of sporocarps of *S. sinuosa* was influenced significantly neither by soil nor by time under

irrigation. No significant interactions (soil × irrigation period) were found among the morphotypes.

Irrigation appears to have substantially increased the amounts of P and metals in the soil; mean concen-

3
 F-ratios (F statistic) in two-way analysis of variance of phosphorus, heavy metals, and abundances of spores and sporocarps (transformed to square root) as response variables

Soil type × years	Elements						AM Fungi		
	P	Cr	Cu	Ni	Zn	Pb	Free spores	Sporocarps	
								<i>Glomus</i>	<i>Sclerocystus</i>
	5.56**	1.31	0.58	7.83**	7.48*	2.26	1.84	4.31*	2.51
	95.58	110.50	151.32	121.63	95.72	44.61	5.22*	1.35	0.15
	6.58*	0.06	1.16	2.39	0.01	0.03	0.20	0.25	0.81

The effect of years is significant at $p < 0.001$ for all the elements.
 Significant at $p = 0.05$; **, significant at $p = 0.01$.

trations were larger in the soil irrigated for 90 years than in that irrigated for only 5 years, typically by a factor of 2 or more (Table 2). Differences between soil types were generally small, and only for Ni (3.4 mg kg^{-1}), Zn (28.1 mg kg^{-1}) and P (8.3 mg kg^{-1}) were the differences significant. The only interaction between soil type and time under irrigation was for phosphorus (Table 3).

The results are perhaps best displayed in graphs such as the examples in Fig. 1 for the contents of phosphorus, copper, and zinc, and for the fungal sporotypes in Fig. 2.

Fig. 1 shows clearly that in the Vertisol the abundance of spores diminishes as the concentrations of phosphorus, copper, and zinc increase. The abundances vary more in the Leptosol than in the Vertisol.

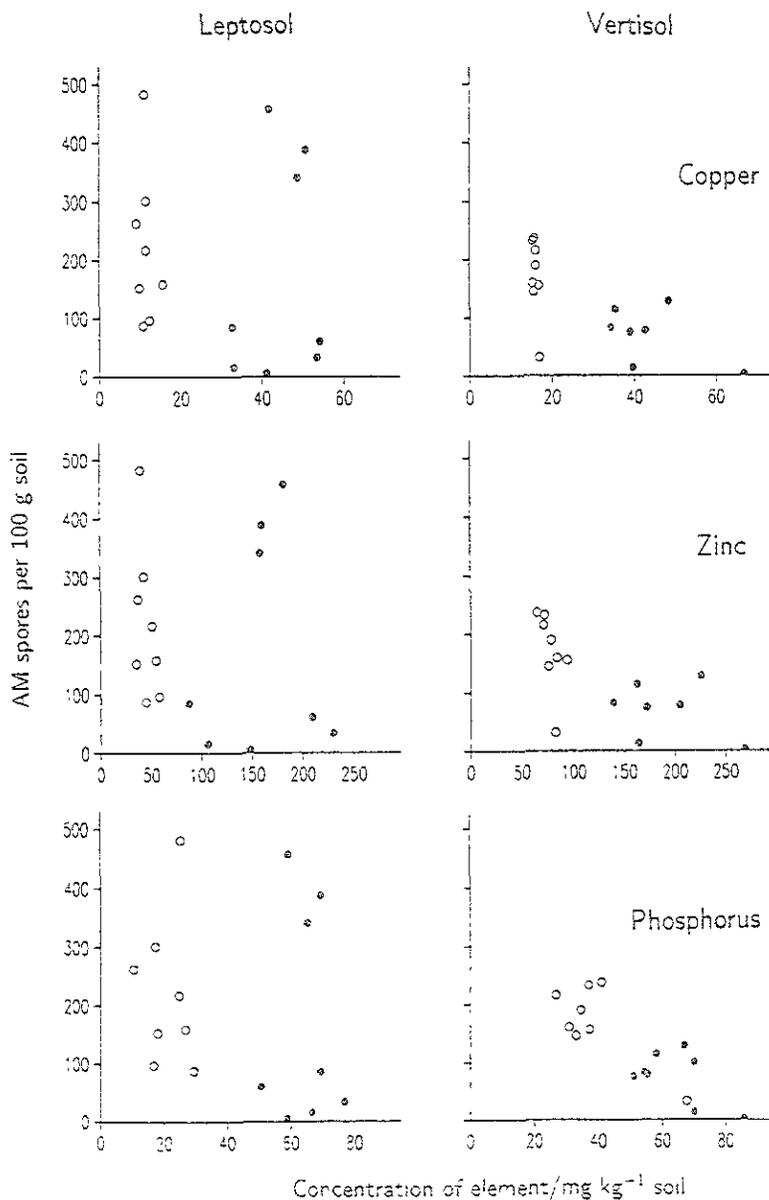


Fig. 1. Graphs of counts of AM spores against concentrations of phosphorus, copper, and zinc for the two soil types. Time under irrigation is distinguished by (○) for 5 years and (●) for 90 years.

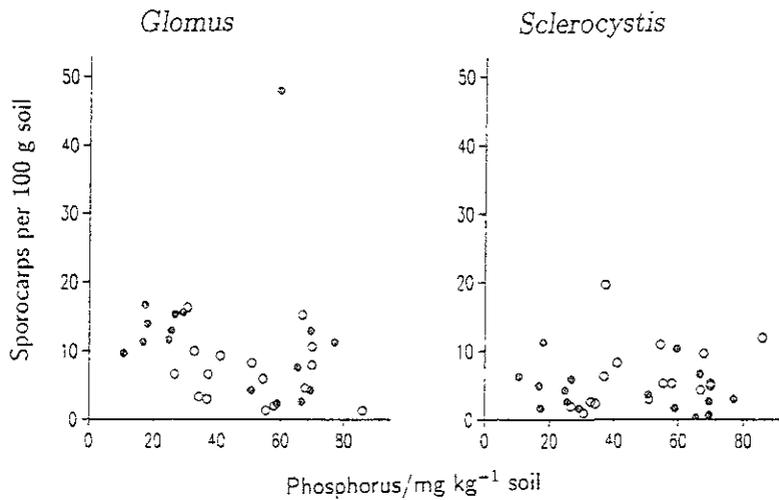


Fig. 2. Graphs of counts of sporocarps for *Glomus* and *Sclerocystis* plotted against concentration of phosphorus. Soil types are distinguished (●) for Leptosol and (○) for Vertisol.

Nevertheless, in five of the eight fields irrigated for 90 years the spore abundance diminished with increasing concentrations of P and metals.

Fig. 2 shows that there was no decrease in the abundance of sporocarps, either of *Glomus* or of *Sclerocystis*, with the increasing concentration of phosphorus, and this was true for all the other elements.

The heavy metals in the soil are strongly associated with time under irrigation; the association ranked from strongest to weakest in the following sequence: Ni > Cr > Zn > P > Pb.

The correlations between fungal morphotypes and contents of the metals and phosphorus were determined separately for the individual combinations of soil type and time under irrigation. Most of the correlation coefficients (r) lay in the range -0.5 to 0.5 , were insignificant and with no common pattern, and we attribute them to sampling fluctuation. The correlations among the various metals were strong, as might be expected, with coefficients, r , typically in the range 0.5 to 0.95 .

Discussion

The increases in the concentrations of the metals accord with those reported by Siebe (1995). She recorded similar increases in concentrations over time, so that after 90 years of irrigation the concentrations in the

soil of individual fields were 3–6 times those of the background. Nevertheless, the averages we report in Table 2 have not yet reached the limits set in policy regulations for total metal content as listed in McGrath (1986), FOEFL (1987) and Mattheus (1996).

The relative abundances of mycorrhizal spores in the polluted soils of the Mezquital Valley are similar to those reported by other authors for soils polluted with heavy metals (Weissenhorn et al., 1995a; Cuenca et al., 1998). *Glomus mosseae* dominates in the free spores in both types of soil, and it seems likely that it is better adapted or less sensitive than other species to irrigation with sewage. This accords with the findings of Raman and Sambandan (1998) for other species in this genus. Nevertheless, its sporocarps also seem more sensitive to pollution than those of *Sclerocystis sinuosa*.

Free spores were more abundant in the Leptosol than in the Vertisol (both irrigation periods). Although the Leptosol is the shallower, it is better drained and aerated, and roots in it suffer less damage as a result of swelling and shrinking, which are so characteristic of Vertisols. The Vertisol, being both deeper and richer in clay, can hold more water than the Leptosol, and therefore it is given more irrigation water. As a result, it also receives more P and metals (Siebe, 1994). Moreover, its larger contents of clay and organic matter (after 90 years of irrigation) enable it to adsorb contaminants more readily (Siebe and Fischer, 1996).

Ninety years of irrigation with wastewater clearly have added large amounts of metal to the soils (Table 2). During the same time, the abundance of spores in the soils seems to have decreased (also evident in Table 2). Effectively there are negative correlations between the contents of heavy metals and those of the spores. We do not know precisely to what extent the metals added to the soil of the Mezquital Valley are available to plants, though we do know (Siebe, 1995) that the amounts that are easily extractable are very small indeed. At the alkaline pH their solubility products are small, and the large cation exchange capacity of the soil means that the metals are strongly sorbed.

Leyval et al. (1995) also found negative correlations ($r < -0.7$) between spore abundance and Pb, Ni, Cu and Zn contents in the soil. Excess of nutrients in the soil, however, can diminish both the colonisation potential of AM fungi and the dependence of the plants on the mycorrhizal symbiosis for nutrient uptake (Höflich and Metz, 1997). Rathore and Singh (1995) reported correlation coefficients between several physical and chemical properties of the soil; in particular, they obtained a positive correlation coefficient, $r = 0.59$, between available P and AM propagules.

Sporocarpic morphotypes were well represented: *Glomus mosseae* occurred as free spores as well as in the form of sporocarps, and many *Sclerocystis sinuosa* sporocarps were also present, probably due to the great affinity of this species to maize (J. Morton, personal communication). In general, the sporocarps were less sensitive to the pollution and eutrophication than free spores, and *Sclerocystis* sporocarps seemed to be the morphotypes least sensitive to pollution.

Friedel et al. (2000) studied the effect of irrigation with wastewater on the organic matter, microbial biomass and microbial activities in the Mezquital Valley recently. They found that the organic matter had increased in the Vertisol, whereas in the Leptosol it had not. This seemed to be because it is protected from microbial attack in the finer pores of the Vertisol and not in the Leptosol in which it is therefore more easily degraded. The authors reported an increased capacity of the microflora to denitrify, and a reduced adenylate energy charge ratio, and they concluded that despite more than 90 years of irrigation with wastewater, the soil microbial biomass and activity remained remarkably resilient; they could find no other seri-

ous deleterious effect. They attribute this to the great buffer capacities of the soils at the alkaline pH (≥ 8).

It seems that the AM fungi, like microflora in general, adapt constantly to the slow increase in pollution, and to the available phosphorus in particular, and that they maintain their symbiosis with their hosts. So, if pollution affects AM fungi in these soils then it could be more important physiologically (e.g. on the symbiotic efficiency) than in the sporulation of the fungi. Sambandan et al. (1992), for example, found that in soil contaminated with copper AM fungi propagated via mycelia rather than by soil-borne spores, but irrigation with sewage could also affect sporulation more than the growth of mycelium, whether inside or outside the roots (Weissenhorn et al., 1995a, b).

5. Conclusions

The two types of soil, Leptosol and Vertisol, clearly harbour different sizes of spore population. They provide distinct physical and chemical environments for the arbuscular mycorrhizal fungi, and these can be more important than the irrigation treatment. However, the abundance of free spores decreased in both soils as a result of 90 years of irrigation with wastewater, and this effect was most marked in the Vertisol. Our data suggest that the increases in the amounts of phosphorus and heavy metals are the cause. The accumulation and availability of phosphorus may have caused a diminution in the numbers of free spores in the Vertisol, but not of the sporocarps. In like manner, the heavy metals seemed to have suppressed sporulation of the AM fungi, but not the sporocarps.

The concentrations of most of the pollutants do not yet exceed those set down in policy regulations (Gutiérrez-Ruiz et al., 1995; McGrath, 1986). Nevertheless, if present practice of irrigating with wastewater continues then they soon will, and damage to the arbuscular mycorrhizal fungi, especially in the Vertisols, is likely to ensue. Already there were only two spores per 100 g soil at the most polluted sampling point. Irrigation with untreated wastewater should be curtailed as a matter of urgency to prevent serious damage to the microbial population. However, more research is needed to establish the impact of heavy metals on AM fungi and to discriminate between their potential to poison the fungi and suppression caused

cess phosphorus. Our results suggest that this re-
 h should be done on Vertisols because they seem
 sensitive. We also need more information on the
 ct of pollution on the AM symbiosis and on the
 of this symbiosis in the transfer of heavy metals
 the soil into plant tissue and from there into the
 an diet.

Acknowledgements

e thank Dr A. Estrada for help with the taxon-
 of the mycorrhizal fungi, Dr A. Andrade, who
 d with the fieldwork, Ms. K. Shimada and Ms.
 nchez for their assistance in soil analyses, Mr.
 inger who did some of the particle-size analy-
 the ECOS Mexico–France Programme (Project
 U02) for some of the funding, and DGAPA
 AM) for a student scholarship.

References

raj, D.J., 1995. Influence of agricultural practices on
 arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *J. Soil Biol.*
15, 109–116.

y, J.W.G., Meharg, A.A., 1999. Influences of anthropological
 tion on mycorrhizal fungal communities. *Environ. Pollut.*
104, 169–182.

a, G., de Andrade, Z., Escalante, G., 1998. Diversity of
 malean spores from natural, disturbed and re-vegetated
 communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biol.*
30, 711–719.

al, C., Barea, J.M., Azon Aguilar, C., 1999. Diversity of
 arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy metal-
 contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 718–723.

J.A., Watrud, L.S., Reeves, M., 1999. Accumulation of
 Cs and ⁹⁰Sr from contaminated soil by three grass species
 colonized with mycorrhizal fungi. *Environ. Pollut.* *104*, 449–
 457.

1988. Soil Map of the World. Revised Legend. World Soil
 Resources Report 60. Food and Agriculture Organization of the
 United Nations. Rome.

(Swiss Federal Office of Environment, Forests, and
 Landscape), 1987. Commentary on the Ordinance relating to
 contaminants in Soil (VSBo of 9 June 1986). FOEFL, Berne.

J.K., Langer, T., Siebe, C., Stahr, K., 2000. Effect of
 long-term wastewater irrigation in Central Mexico on soil
 organic matter, soil microbial biomass and activity. *Biol.*
Fertility Soils *31*, 414–421.

Stat 5 Committee, 1993. Genstat 5 Release 3 Reference
 Manual. Oxford University Press, Oxford.

Griffioen, W.A.J., 1994. Characterization of a heavy metal-tolerant
 endomycorrhizal fungus from the surroundings of a zinc
 refinery. *Mycorrhiza* *4*, 197–200.

Gutiérrez-Ruíz, M.E., Siebe, C., Sommer, I., 1995. Effects of land
 application of wastewater from Mexico City on soil fertility and
 heavy metal accumulation: a bibliographical review. *Environ.*
Rev. *3*, 318–330.

Haselwandter, K., Leyval, C., Sanders, F.E., 1994. Impact of
 arbuscular mycorrhizal fungi upon plant uptake of heavy
 metals and radionucleides from soil. In: Gianinnazi, S.,
 Schuepp, H. (Eds.), *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on
 Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhäuser,
 Basel, pp. 179–196.

Hofflich, G., Metz, R., 1997. Interaktionen ausgewählter Pflanzen-
 Mikroorganismen-Gesellschaften in schwermmetallbelasteten
 Rieselfeldböden. *Die Bodenkultur* *48*, 239–247.

Jackson, M.L., 1958. *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall,
 Englewood Cliffs, NJ.

Kaldorf, M., Kuhn, A.J., Schröder, W.H., Hildebrandt, U., Bothe,
 H., 1999. Selective element deposits in maize colonized by a
 heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus.
J. Plant Physiol. *154*, 718–728.

Lambert, D.H., Baker, D.E., Cole, H., 1979. The role of
 mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper
 and other elements. *Soil Sci. Soc. Am. J.* *43*, 976–980.

Leyval, C., Singh, B.R., Joner, E.J., 1995. Occurrence and
 infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian
 soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water Air
 Soil Pollut.* *84*, 203–216.

Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy
 metal pollution on mycorrhizal colonization and function:
 physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* *7*,
 139–153.

Martheus, P. (Ed.), 1996. *A Global Atlas of Wastewater, Sludge,
 and Biosolids Use and Disposal*. Scientific and Technical
 Report No 4, International Association on Water Quality,
 London.

McGrath, S.P., 1986. The range of metal concentrations in
 topsoils of England and Wales in relation to soil protection
 guidelines. In: Hemphill, D.D. (Ed.), *Trace Substances and
 Environmental Health*. University of Missouri, Columbia, MO,
 pp. 242–252.

Miller, R.W., Azzari, A.S., Gardiner, D.T., 1995. Heavy metals
 in crops as affected by soil types and sewage sludge rates.
Commun. Soil Sci. Plant Analysis *26*, 703–711.

Olsen, J.K., Schaefer, J.T., Edwards, D.G., Hunter, M.N., Galea,
 V.J., Muller, L.M., 1999. Effects of a network of mycorrhizae
 on capsicum (*Capsicum annuum* L.) grown in the field with
 five rates of applied phosphorus. *Aust. J. Agric. Res.* *50*, 239–
 252.

Raman, N., Sambandan, K., 1998. Distribution of VAM fungi
 in tannery effluent polluted soils of Tamil Nadu, India. *Bull.*
Environ. Contamination Toxicol. *60*, 142–150.

Rathore, V.P., Singh, H.P., 1995. Quantification and correlation
 of vesicular–arbuscular mycorrhizal propagules with soil
 properties of some mollisols of northern India. *Mycorrhiza* *5*,
 201–203.

- bandan, K., Kannan, K., Raman, N., 1992. Distribution of arbuscular–arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal-polluted soils of Tamil Nadu, India. *J. Environ. Biol.* 13, 159–167.
- Black, N.C., Pérez, Y., 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi (INVAM). University of Florida, Gainesville, FL.
- Ortega-Larrocea, M.P., 1994. Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residuales en el Distrito de Riego 3, Tula, Hidalgo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 10, 15–21.
- Ortega-Larrocea, M.P., 1995. Heavy metal availability to plants in soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Water Sci. Technol.* 12, 29–34.
- Ortega-Larrocea, M.P., 1998. Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. *Soil Use Manage.* 14, 119–122.
- Siebe, C., Cifuentes, R., 1995. Environmental impact of wastewater irrigation in Central Mexico: an overview. *Int. J. Environ. Health Res.* 5, 161–173.
- Siebe, C., Fischer, W.R., 1996. Effect of long-term irrigation with untreated sewage effluents on soil properties and heavy metal adsorption of Leptosols and Vertisols in Central Mexico. *Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bodenkunde* 159, 357–364.
- USDA, 1993. Soil Survey Manual. United States Department of Agriculture, Washington, DC.
- Weissenhorn, I., Leyval, C., Berthelin, J., 1995a. Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in a soil polluted by atmospheric deposition from a smelter. *Biol. Fertility Soils* 19, 22–28.
- Weissenhorn, I., Mench, M., Leyval, C., 1995b. Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge amended sandy soil. *Soil Biol. Biochem.* 27, 287–296.

Potencial colonizador de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de dos suelos regados durante diferente tiempo con agua residual en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México.

M. P. Ortega-Larrocea^{1*}, C. Siebe¹, G. Bécard².

¹Departamento de Edafología, Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior de Ciudad Universitaria. Apartado Postal 70-296. México D. F.

²Pôle de Biotechnologie Végétale, Université Paul Sabatier. 24 Chemin de Borde-Rouge, BP 17 Auzeville, 31326 Castanet Tolosan, France.

* autor corresponsal: Tel. (52) 56224834, Fax: (52) 56224834. E-mail: mpol@hp.fciencias.unam.mx. Apartado Postal 70-359. 04511. México D. F.

RESUMEN

Se analizó el efecto causado por el riego con aguas residuales a través del tiempo, en el potencial colonizador y en la abundancia de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en dos tipos de suelo. El estudio se llevó a cabo en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México, que es una de las zonas agrícolas regadas con aguas residuales más grandes y antiguas en el mundo. Se muestrearon Leptosoles y Vertisoles irrigados durante 5, 35, 65 y 95 años respectivamente. Se cuantificó la abundancia de esporotipos en campo (*in situ*) y después de un ciclo de propagación en invernadero. El porcentaje de las distintas estructuras micorrízicas fue analizado en raíces de plantas propagadas en estos suelos (*Allium cepa* L.). Se relacionó la abundancia de las esporas en campo con los porcentajes de colonización, así como la diversidad cualitativa de morfoespecies antes y después de la propagación. En los sitios regados por mayor tiempo, disminuye la abundancia y diversidad de esporas y esporocarpos mientras que la colonización de las raíces no es afectada por el tiempo de riego. Es por esto que las raíces micorrizadas pueden tener mayores posibilidades de dispersar la colonización que otros propágulos de HMA en el suelo. Se encontró que el impacto producido por el riego es distinto en las unidades de suelo estudiadas, habiendo un mayor porcentaje de colonización en los Leptosoles. Se confirman resultados de estudios previos en los que se observó que el impacto negativo en estas simbiosis es mayor en los Vertisoles.

Palabras clave: Micorriza arbuscular, Leptosol, Vertisol, colonización, aguas residuales, contaminación.

INTRODUCCION

El Distrito de Riego 03 en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México, es una vasta área utilizada para la irrigación agrícola con aguas residuales. Está considerado dentro de los campos más grandes y antiguos del mundo (Siebe y Cifuentes 1995, Naranjo y Biswas 1997, British Geological Survey 1998) en los que se utilizan las aguas de desecho para la producción agrícola desde hace más de un siglo (desde 1886) (Sánchez, 1985). El Distrito se ubica entre los 19° 53' - 20° 30' de LN y los 98° 59' - 99° 38' de LO y tiene un clima árido con una precipitación media anual entre 400 y 700 mm. La vegetación natural es el matorral xerófilo con *Prosopis laevigata* (Mezquite) como especie dominante. Los suelos que predominan según la FAO (1988) son Vertisoles éutricos (suelos profundos de textura arcillosa) y Leptosoles rendzínicos (suelos menos consolidados de textura franca). La incorporación de los terrenos de cultivo a este sistema de riego ha sido gradual y es una consecuencia del incremento en el volumen de las aguas de desecho provenientes del área metropolitana de la Ciudad de México. Actualmente, la superficie irrigada es superior a las 85 000 Ha y está conformada por terrenos con diferentes años bajo riego y por tanto, con distinto grado de acumulación de contaminantes como detergentes y metales pesados (Siebe y Fischer, 1996) (Tabla 1). La bio-disponibilidad de estos contaminantes es proporcional al tiempo de irrigación y difiere según el tipo de suelo (Siebe 1995, Siebe y Fischer 1996).

El impacto que ha tenido el uso de aguas residuales en diferentes procesos biológicos está convirtiéndose en una problemática a nivel mundial. Dentro de estos procesos están la transferencia de nutrimentos a las plantas, en donde las micorrizas arbusculares juegan un

Tabla 1. Algunas características de los suelos regados con aguas residuales en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México.

Tipo suelo Años bajo riego	Leptosol				Vertisol			
	5	35	65	95	5	35	65	95
pH	7.3	7.8	7.7	7.8	7.5	7.9	8.1	7.6
Arena (%)	52	48	58	46	26	12	21	46
Limo (%)	34	24	24	30	37	32	26	26
Arcilla (%)	14	28	18	24	37	56	54	28
P (Olsen)	18	77	95	122	16	88	96	69
Cd (mg/kg)	0.3	0.7	0.8	1.0	0.2	0.7	0.9	1.95
Cu (mg/kg)	9	20	26	35	11	26	34	40
Pb (mg/kg)	17	24	37	48	17	39	50	56
Zn (mg/kg)	68	101	146	159	62	129	157	276

papel fundamental. Sin embargo, son pocos los estudios que han cuantificado cuál es el impacto de la implementación de estas prácticas agrícolas en las relaciones de los hongos MA con las plantas. En 1986, Angle y Heckman, estudian el efecto de la aplicación de lodos residuales en las simbiosis micorrízicas de la soya y encuentran que no existe un efecto significativo en el porcentaje de colonización de las raíces atribuible a la aplicación de lodos, exceptuando los casos en los que el pH de los suelos permitía la solubilidad de los metales pesados. Arnold y Kapustka (1987) tampoco observan ningún efecto en la colonización radical en suelos contaminados por lodos residuales después de un periodo de abandono de cinco años. Weissenhorn *et al.* (1995) hallan en suelos de textura gruesa mejorados con lodos residuales, que la abundancia de micorrizas arbusculares y la colonización de las raíces están más relacionadas con las concentraciones de fósforo en las raíces, que con el grado de contaminación por metales pesados en los suelos Sainz *et al.* (1998) observan una reducción significativa, e inclusive la completa inhibición, de la colonización radical de plantas de trébol y pepino, cuando se aplicaba al suelo composta de desechos urbanos. Otras investigaciones demuestran aún un efecto positivo en la

colonización radical en suelos contaminados por lodos residuales y deposiciones atmosféricas (Koomen *et al.*, 1990; Turnau, 1996). Sin embargo, es claro que un incremento gradual en la fertilización de los suelos causado por la adición excesiva de nutrimentos aportados con el agua de residual, pueden causar una disminución en los niveles de colonización de las raíces y en consecuencia, en el potencial colonizador de los suelos. Esto puede también reflejarse en la abundancia y diversidad de especies de hongos MA (Sanders y Sheikh, 1983).

Es por esto que el impacto causado por el uso de aguas residuales en diferentes procesos biológicos en los edafosistemas del Valle del Mezquital, comienza a ser estudiado (Friedel *et al.*, 1999 y 2000; Ortega-Larrocea *et al.*, 2001). Recientemente analizamos el impacto del uso de aguas residuales a corto (5 años) y largo plazo (95 años) en estas simbiosis (Ortega-Larrocea *et al.*, 2001). Al respecto, encontramos una disminución en la abundancia de esporas conforme se incrementaron las concentraciones de fósforo disponible y de algunos metales pesados totales, lo que nos permitió atribuir al riego este impacto. Por tanto, se consideró importante analizar los efectos del riego a través del tiempo, en la abundancia y el potencial colonizador de los distintos tipos de suelos.

MATERIALES Y METODOS

Colecta de suelos

La colecta se llevó a cabo en dos unidades de suelo (Leptosoles y Vertisoles) irrigadas con agua residual aproximadamente 5, 35, 65 y 95 años, todos terrenos recién cosechados con maíz (*Zea mays* L.). Cada muestra mixta consistió en suelo rizosférico (0-30 cm de profundidad) de 10 puntos colectados en zig-zag a lo largo de cada parcela, con dos repeticiones por unidad de suelo y tiempo de riego (= 3 parcelas. x 2 suelos x 4 tiempos). Las muestras fueron secadas al aire libre a temperatura ambiente y almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Propagación de los hongos micorrizicos arbusculares

Los suelos secos se tamizaron (2 mm) y se separaron los agregados que contuvieran raicillas. Se colocaron 20 g de suelo tamizado y 280 g de los agregados en macetas de polipropileno (15 cm de alto x 5 cm de diámetro). Se plantaron cebollines variedad Cambrey (*Allium cepa* L.) a los que se les podó la zona radical para estimular el rápido crecimiento de las raíces. Los cultivos se mantuvieron en invernadero y se regaron regularmente con agua corriente durante seis meses. Después de este tiempo, se dejó secar el sustrato y se cortó la parte aérea de las plantas, almacenando el suelo a 4°C hasta su análisis.

Conteo de esporas y porcentajes de colonización

Se hizo el conteo de esporas intactas en los suelos colectados en campo antes y después del cultivo de las plantas. Las esporas se extrajeron por tamizado húmedo y decantación de 500 g del suelo de campo y de la totalidad del suelo de las macetas de propagación (300 g). La totalidad de las raíces contenidas en las macetas de propagación se tiñeron con azul de tripán 0.05 % en lactoglicerol. Se cortaron y homogeneizaron segmentos que se montaron en glicerol y se observaron en el microscopio óptico (200 x). Se cuantificaron las diferentes estructuras de colonización (esporas y vesículas, arbusculos, micelio) en 100 campos de intersección observados según Jakobsen y Nielsen (1983).

Determinaciones taxonómicas y abundancias relativas

Se determinaron cuantitativamente las abundancias de los morfotipos observados en los suelos de campo y en los de propagación. Los diferentes esporotipos reconocibles se

montaron en preparaciones permanentes en alcohol polivinílico (PVLG) y PVLG-reactivo de Meltzer. Los morfotipos no determinados al nivel de especie se identificaron numéricamente y se registraron fotográficamente.

Análisis estadístico

Los conteos de esporas y esporocarpos se transformaron a logaritmos ($\log(x+1)$) y se sometieron a un análisis de varianza de dos vías (tiempo de irrigación y unidad de suelo). Los porcentajes de colonización totales y de las diferentes estructuras se transformaron a su arco-seno y se sometieron al mismo análisis. Las medias se evaluaron bajo la mínima diferencia significativa (LSD). Se hicieron correlaciones de Spearman para relacionar las variables micorrízicas con el tiempo de irrigación y la unidad de suelo

RESULTADOS

Las abundancias totales de esporas en campo y en macetas de propagación se grafican en la Fig. 1. Aún cuando las abundancias en campo no fueron diferentes estadísticamente, se observa un efecto estimulador en los Leptosoles regados durante 35 y 65 que decrece a los 95 años. En los Vertisoles, las abundancias son significativamente menores en los suelos regados durante 65 y 90 años, que en suelos regados durante 5 y 35 años.

Por otro lado, las abundancias de esporas que fueron propagadas en los mismos suelos después de un ciclo de cultivo en invernadero, disminuyeron casi en un 50 % en comparación a las de campo (Fig. 1). La producción de estas esporas muestra un patrón idéntico para ambos suelos: aumenta ligeramente en los suelos regados por 35 años, significativamente en los regados por 65 y decrece a un nivel intermedio en los regados por 95 años. En este caso las mayores abundancias se dieron en los Vertisoles.

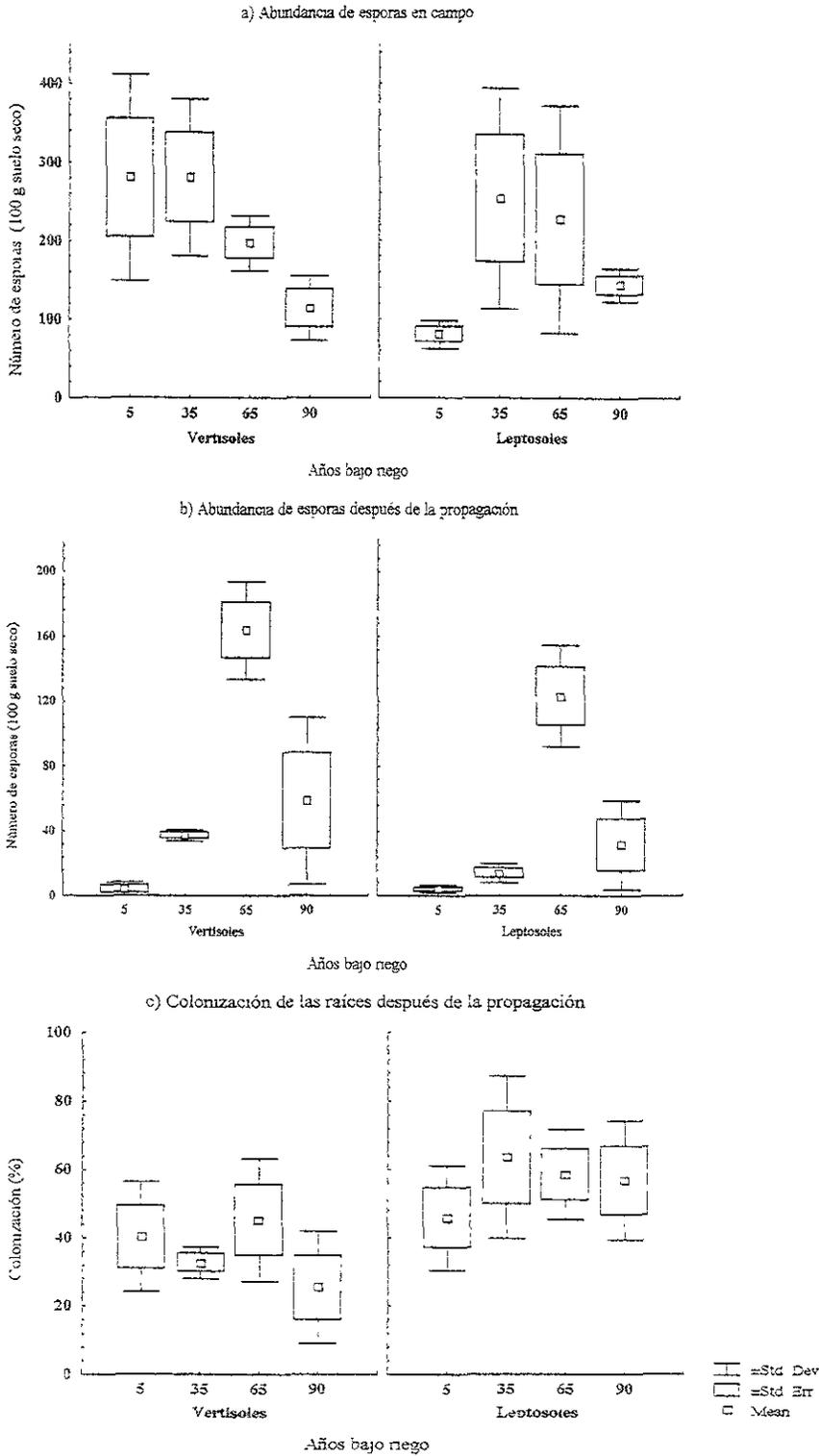


Figura 1. Abundancia de esporas *in situ* después de la cosecha de maíz (a) y potencial colonizador (b y c) de hongos micorrízicos arbusculares en dos suelos del Valle del Mezquital regados con aguas residuales.

La abundancia de esporas en campo y el porcentaje total de colonización de las raíces después de la propagación no están relacionadas ($r = -0.009$). La colonización de las raíces de novo (como una medida del potencial colonizador del suelo) se observó de manera ligera (6%) ó muy intensa (87%) (Fig. 1) en todas las raíces analizadas. Los mayores valores de colonización total fueron observados en los Leptosoles, independientemente del tiempo de irrigación. Las diferencias entre los porcentajes de colonización se deben, sin embargo, al tipo de suelo y no a los años bajo riego ($r = 0.454$, $p < 0.001$).

Las proporciones de las diferentes estructuras observadas (micelio, arbusculos, esporas y vesículas), se ilustran en la Fig. 2. Debido a su abundancia, el micelio intramatricial es el que determina el valor del porcentaje de colonización total ($r = 0.76$, $p < 0.001$) y en menor proporción, la abundancia de esporas y vesículas ($r = 0.50$, $p < 0.01$) y de los arbusculos ($r = 0.44$, $p < 0.01$). A su vez los porcentajes de esporas y vesículas intramatriciales y los de los arbusculos, están relacionados con los de micelio intramatricial ($r = 0.062$, $p < 0.001$ y $r = 0.37$, $p < 0.01$, respectivamente). La abundancia de arbusculos también se asoció con la de las vesículas y esporas intraradicales ($r = 0.41$, $p < 0.01$). Sin embargo, la esporulación extramatricial (abundancia de esporas en el suelo después de la propagación) no está relacionada con la colonización total de las raíces ni con la de las diferentes estructuras. Aún así, se puede observar una tendencia a la disminución de la abundancia de arbusculos conforme incrementa la de esporas intra y extramatriciales. Esto se aprecia mejor en los Vertisoles regados por 65 años en los que ocurrió la mayor esporulación y la menor formación de arbusculos (Fig. 2). Igualmente se observa un ligero aumento en el porcentaje de arbusculos en los mismos suelos regados por 35 y 95 años cuando ocurre una disminución en la producción de esporas (principalmente las intramatriciales). Por otro lado, la producción de vesículas y esporas intraradicales siguió un patrón similar al de esporulación extramatricial y de campo. La abundancia en conjunto de todas las estructuras de almacenamiento, vesículas, esporas (intra y extraradicales) y esporocarpos, tanto en campo como después de su propagación, están correlacionadas entre sí positivamente ($p < 0.05$) y tienen un comportamiento similar en ambos suelos.

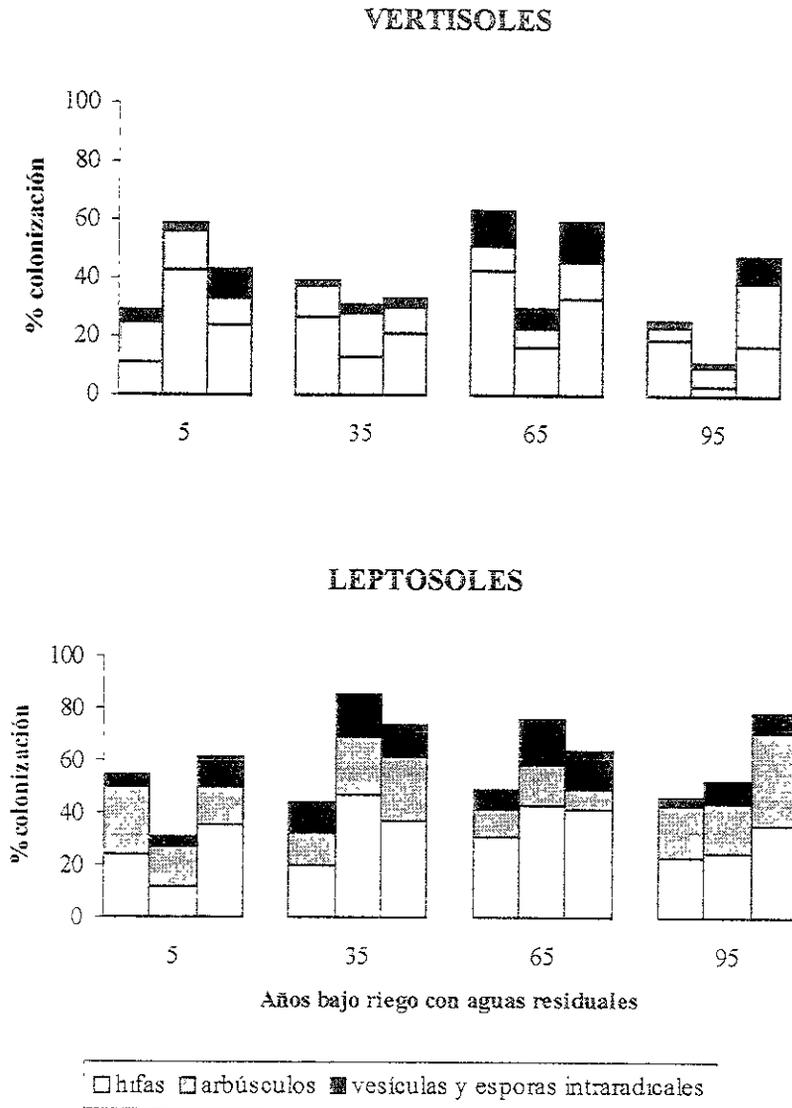


Figura 2. Porcentaje de colonización de diferentes estructuras de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de cebollas (*Allium cepa* L.) cultivadas en invernadero durante seis meses, en suelos regados con aguas residuales.

Las abundancias de las especies de esporocarpos encontradas, *Glomus mosseae* y *Sclerocystis sinuosa*, están influenciadas por el tiempo de irrigación, reguladas por el tipo de suelo y relacionadas directamente entre ambas ($r = 0.723$, $p < 0.001$) (Fig. 3). Para estos propágulos, se observa un efecto estimulador en los Vertisoles regados durante 35 y 65 años mientras que en los Leptosoles la estimulación se da únicamente en aquellos regados durante 35 años.

Las abundancias relativas de los morfotipos caracterizados se presentan en la Tabla 2. En general, ambos suelos presentan un número similar de morfotipos *in situ* o después de la propagación. En campo, la riqueza de éstos y su abundancia relativa es mayor conforme aumenta el tiempo de riego, nuevamente hasta los 65 años, después de los cuales ambas decrecen. Algunos morfotipos se encontraron con mayor frecuencia en alguno de los dos suelos como *Glomus aggregatum* en los Leptosoles y *Glomus* sp.⁵ en los Vertisoles. Solamente un morfotipo (*Glomus* sp.⁷) se encontró únicamente en los Leptosoles regados por el mayor tiempo. Es difícil establecer en forma definitiva la total ausencia de alguno de estos morfotipos en los suelos, dada la dificultad de identificar los ejemplares en campo. Después de la propagación en un hospedero diferente al cultivo de campo, se observa una drástica disminución en la diversidad de morfotipos observados (de ocho a tres).

DISCUSION

Los valores absolutos de abundancias en campo fueron similares a los encontrados anteriormente para los mismos tipos de suelos regados con agua residual durante 5 y 95 años (Ortega-Larrocea *et al.* 2001). Sin embargo, en este estudio, las menores abundancias no corresponden a los Vertisoles como se había observado anteriormente. Sin embargo, continúa en los Vertisoles la tendencia al decremento en el número de esporas conforme incrementa el tiempo de irrigación. En suelos contaminados por lodos residuales, la disminución en la densidad de esporas se relaciona con una mayor concentración de metales pesados (Leyval *et al.* 1995, Dei Val *et al.* 1999). A pesar de que no cuantificamos

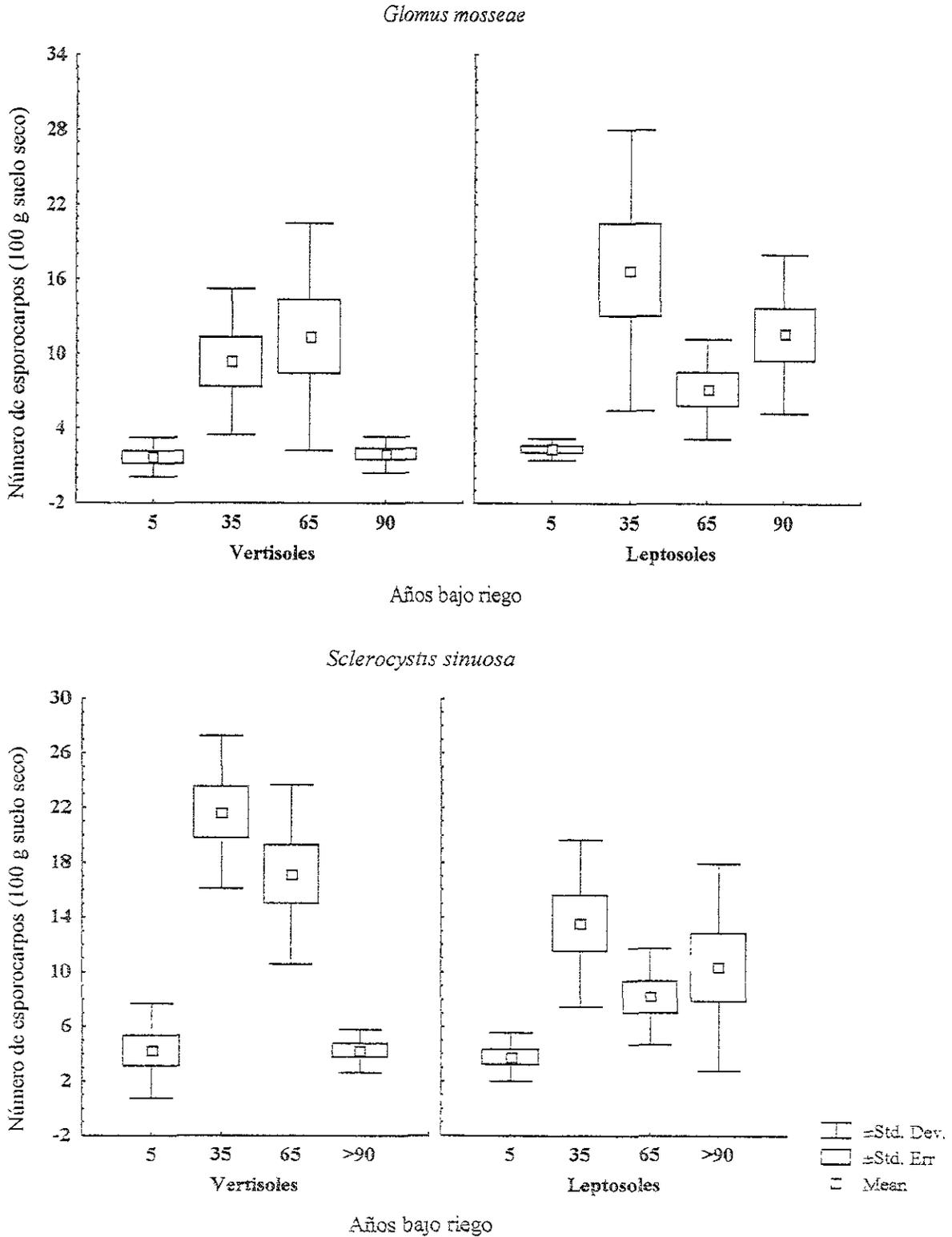


Figura 3. Abundancia in situ de esporocarpos de micorriza arbuscular en dos suelos del Valle del Mezquital regados con aguas residuales.

Tabla 2. Abundancias relativas de morfotipos de hongos micorrízicos arbusculares del Valle del Mezquital, Hidalgo, México. C = abundancia de esporas en campo, P = abundancia de esporas después de su propagación. X = baja, XX = media, XXX = alta. ¹ *Glomus* que corresponde a la descripción de *geosporium*. ² *Glomus* de paredes delgadas. ³ *Glomus* transparente con múltiples capas. ⁴ *Glomus* formado en esporocarpos laxos. ⁵ *Glomus* que corresponde a la descripción de *fasciculatum*. ⁶ Pequeños *Glomus* (< 50 µ), transparentes y en esporocarpos laxos. ⁷ *Glomus* libre, amarillo oscuro con paredes unitarias que corresponde a la descripción de *claroidium*. ⁸ *Glomus* que corresponde a la descripción de *lamellosum*. Las ilustraciones de estos morfotipos se presentan en el Apéndice 3.

Tipo de suelo y tiempo bajo riego	L05		V05		L35		V35		L65		V65		L95		V95	
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
<i>Glomus mosseae</i>	XX	XX	XXX	XX	XX	XX	XX	XX								
<i>Glomus aggregatum</i>	XX	-	X	XX	-	-	-	-	-	X	XXX	XXX	XX	X	-	-
<i>Glomus</i> sp. 1 ¹	X	-	X	-	-	-	XX	-	XX	XX	XX	X	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp. 2 ²	-	-	-	-	-	-	-	X	-	X	XX	-	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp. 3 ³	-	-	X	-	X	-	X	-	-	-	XX	-	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp. 4 ⁴	X	-	-	-	XX	-	-	-	X	X	X	-	-	XXX	-	-
<i>Glomus</i> sp. 5 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	XX	-	-
<i>Glomus</i> sp. 6 ⁶	X	XX	-	XX	-	X	-	XX	-	-	XX	XX	X	XXX	-	XX
<i>Glomus</i> sp. 7 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	XX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp. 8 ⁸	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gigaspora</i> sp	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
<i>Sclerocystis sinuosa</i>	XX	-	XX	-	XXX	-	XX	-	XX	XX	XX	XX	-	XX	-	X

directamente las concentraciones de metales en este estudio, éstos se incrementan proporcionalmente conforme aumentan los años bajo riego principalmente en los Vertisoles (Tabla 1). Por otro lado, el efecto estimulador causado por el tiempo de riego que se manifiesta in situ únicamente en los Leptosoles (a los 65 años) (Fig. 1), muestra la importancia del tipo de suelo cuando son regados con agua residual por los mismos periodos. Algo similar se observó anteriormente en la abundancia de esporocarpos a concentraciones intermedias de fósforo y metales pesados, en suelos regados durante 5 y 95 años (Ortega-Larrocea et al., 1999). Sin embargo cuando la abundancia no se asocia con las concentraciones de contaminantes, este efecto no puede ser apreciado significativamente en estos dos tiempos de riego debido a la similitud en las abundancias (Fig. 2) (Ortega-Larrocea et al. 2001). Cuando se analizan tiempos de riego intermedios (35 y 65 años) notamos claramente este efecto estimulador también en la abundancia de esporocarpos en campo. Con relación a Glomus mosseae, este fenómeno sólo se observó en la formación de esporocarpos y no en la de esporas libres. Esto puede adjudicarse a un ambiente nutrimental óptimo, en el que el balance adecuado de carbohidratos en la raíz permitiera al hongo invertir una mayor energía en la formación de estas estructuras complejas. A esto se añade la estrecha relación que existe entre la abundancia de los esporocarpos de esta especie y el porcentaje de micelio intramatricial ($p < 0.01$) encontrados únicamente para esta especie (datos no mostrados). En el caso de S. sinuosa y con base en lo observado en estudios anteriores, continuamos pensando que su abundancia en el suelo está más asociada al cultivo del hospedero adecuado para esta especie, ya que la formación de esporocarpos viables de novo no es del todo común de observar en cultivos en maceta.

El decremento en la abundancia de esporas después de un ciclo de propagación tanto como el mismo patrón de esporulación que se presenta en ambos suelos, nos permite atribuir esta baja densidad al estado nutrimental de las plantas cultivadas. Durante el tiempo en el que se mantuvieron los hospederos en cultivo, no se les adicionó alguna solución nutritiva. La esporulación es un proceso relacionado directamente con el estatus nutrimental de la planta (Gaur y Adholeya 2000), por lo que se favoreció en los suelos más ricos en nutrimentos. Tales suelos corresponden a los Vertisoles regados por mayor tiempo, y seguidos en este orden, los Lepsoles. Aún en estas condiciones se dió nuevamente un

decremento de esporas en ambos casos a los 95 años, tal y como se observó *in situ*. Esto nos indica que el efecto del riego persiste aún después de un ciclo de propagación sin aplicación de aguas residuales y nos permite corroborar nuevamente que la disminución de esporas en los suelos irrigados por mayor tiempo es una consecuencia de la acumulación de nutrimentos como el fósforo (Ortega-Larrocea *et al.* 2001).

Por otro lado, la falta de relación entre la abundancia de esporas en campo y la posterior colonización de las raíces, ha sido ya descrita anteriormente. Leyval *et al.* (1995) observan que el número de esporas en el suelo no siempre corresponde a la abundancia de la micorriza y está poco relacionado con el porcentaje de colonización de las raíces. Es probable que se deba a que la estimación del potencial colonizador de los suelos mediante conteos de esporas o de porcentajes de colonización en muestras de campo, no estén evaluando el estado de viabilidad de dichos propágulos (Franson y Bethlenfalvay, 1989). De igual manera significa que el potencial colonizador en estos suelos está dado por la abundancia de otros propágulos como las raíces previamente colonizadas. Se ha visto que la disminución en la abundancia de esporas debida al incremento de las concentraciones de fósforo en el suelo, no está igualmente relacionada con la disminución en la abundancia de otros propágulos (Leyval *et al.* 1995). Gaur y Adholeya (2000) atribuyen la colonización de las raíces al número de propágulos totales en el suelo, más que a la abundancia de esporas.

En ninguno de los suelos se observó un impacto causado por el riego en la colonización de las raíces. Esto puede ser una consecuencia del prolongado tiempo de cultivo que permite a esta simbiosis alcanzar un nivel máximo de colonización en las raíces. Sin embargo los cultivos que se desarrollan en estos suelos, principalmente maíz y alfalfa, son cultivados durante más de tres meses en los mismos. Es por esto que consideramos importante el evaluar el potencial colonizador del suelo después de un tiempo de cultivo prolongado. De modo que el estatus micorrízico de las raíces después de este tiempo de cultivo fuera más cercano al que se pudiera encontrar en campo cuando las raíces en el suelo colonizan nuevamente las plantas en la siguiente cosecha. Boucher (1999) encuentra que los porcentajes de colonización en maíz son muy variables según las especies que lo colonicen. Sin embargo, las diferencias en este estudio fueron debidas únicamente al

tipo de suelo, lo que confirma nuevamente que los que tienen una textura más favorable para el crecimiento y desarrollo radical favorecen el desarrollo de la micorriza (Wilson y Trinick 1983, Ortega-Larrocea et al. 2001). Saif (1981, 1983) estableció que los endófitos de MA responden a la atmósfera del suelo: a una mayor oxigenación, se incrementa la longitud y los porcentajes de los segmentos radicales colonizados, así como la producción de vesículas y arbuscúlos. Gaur y Adholeya (2000) encontraron que la habilidad de la MA para recolonizar, está directamente relacionada con las propiedades del suelo como la compactación y la retención de agua. En suelos contaminados por lodos residuales, Leyval et al. (1995) observaron que las diferencias en la abundancia de esporas propagadas se debían más a la textura de los suelos, que a la concentración de metales pesados. Los suelos de textura pesada afectan la colonización por la restricción del crecimiento radical ocasionado por el contenido de arcillas. Estos resultados apoyan nuestras observaciones anteriores en los Vertisoles de textura arcillosa, en los que la simbiosis se vuelve más susceptible a sufrir el impacto provocado por el riego.

Teóricamente, el principal efecto causado por el tiempo de irrigación en la colonización radical, sería atribuible al aumento en las concentraciones de fósforo de los suelos (Tabla 1). Adicional a este estudio, tampoco se ha observado algún impacto determinante debido al fósforo en la colonización. Hetrick et al. (1984) argumentan que su aumento no sólo limita el crecimiento de la MA, sino que también regula su efectividad, pudiendo transformar esta relación en parásita. Esto lo atribuyen a que las plantas no crecen lo adecuado por el gasto que representa el mantenimiento del hongo en las raíces al no disminuir su abundancia (Bethlenfalvay et al. 1983). Gavito y Varela (1995) obtienen una mayor tasa de colonización en suelos fertilizados con fósforo mineral. Olsen et al. (1999) observan que la aplicación de fósforo como fertilizante no produce cambios en la colonización siempre y cuando el inóculo en los suelos sea elevado. Thorne et al. (1998) encuentran que la adición de composta de lodos residuales disminuye la colonización arbuscular pero no el porcentaje de micelio intramatricial.

En nuestro estudio, los porcentajes de las diferentes estructuras dentro de la raíz, nos permitieron obtener mayor información acerca de la dinámica de esta colonización. Durante

la fase activa de la simbiosis se presentó una mayor cantidad de estructuras de intercambio que disminuyen cuando el hongo empleó su energía en la producción de esporas. Esta etapa se prolongó en los suelos regados por mayor y menor tiempo. Estas observaciones coinciden en gran parte con lo reportado por Koomen *et al.* (1990) y Angle y Heckman (1986) quienes indican que el efecto de los metales pesados retrasa la colonización más que suprimirla. Ellos encontraron una intensa colonización en poro (*Allium porrum* L.) después de cuatro meses de crecimiento en suelos contaminados por metales provenientes de lodos residuales. Nosotros obtuvimos igualmente una intensa colonización en una especie similar (*Allium cepa* L.) en suelos regados con aguas residuales.

Nosotros atribuimos esta disminución a una consecuencia de la mayor disponibilidad del fósforo que provoca que los hospederos tengan a su vez una mayor demanda de carbohidratos (Olsen *et al.* 1999). No hay una evidencia directa de que el contenido de metales pesados en los suelos afecte directamente la esporulación como en el caso del fósforo. Por otro lado, está el hecho de que las concentraciones de metales pesados disponibles en estos suelos no son tan elevadas como las de fósforo. Aún cuando no fueron cuantificadas las concentraciones de fósforo en las raíces, se conoce que a elevadas concentraciones de éste, se altera el balance de carbohidratos trasladados a la raíz con la subsecuente inhibición del hongo para formar estructuras de reserva (Olsson *et al.* 1997). El fósforo no afecta directamente la viabilidad de los propágulos, existiendo especies tolerantes que colonizan y estimulan el crecimiento vegetal a elevados niveles del mismo (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1983). Cuando se absorbe el fósforo, el contenido de carbohidratos en la raíz se incrementa rápidamente la biomasa de micelio extramatricial y la formación de esporas se ve favorecida (Olsson *et al.* 1997, Mollier y Pellerin 1999). Por tanto, a concentraciones elevadas de fósforo disponible en el suelo, la colonización se debe desarrollar rápidamente antes de que la concentración del mismo en las raíces impida la penetración del hongo. También se han comprobado cambios en la calidad y/o cantidad de los exudados radicales debidos al estatus de nutrición fosforada de las raíces que repercuten en una inhibición de la ramificación de las hifas generadas por el micelio de esporas germinadas (Bécard and Fortin 1988, Nagahashi *et al.* 1996, Buée *et al.* 2000) Esto reduce la superficie de contacto disminuye las probabilidades del hongo de colonizar las raíces

(adicional al tiempo en que las esporas invierten en germinar si las condiciones son adecuadas). Como una consecuencia, las raíces en el suelo alcanzan rápidamente concentraciones internas de fósforo que pudieran impedir la colonización. Podemos pensar que es más rápido colonizar nuevas raíces a través del recrecimiento de las hifas preexistentes que mediante la germinación de las esporas. La disminución en la abundancia total de esporas junto con los elevados niveles de colonización en los suelos regados por mayor tiempo, pueden ser la razón por la que las raíces colonizadas puedan ser los principales propágulos tal y como lo observan Gaur y Adholeya (2000). A esto se suma el que exista una dominancia de las especies del género Glomus cuyo micelio intramatricial es altamente regenerativo en contraste con el de las especies del género Gigaspora.

A largo plazo, la disminución de la cantidad de esporas podría tener un impacto negativo que se reflejaría en el potencial colonizador de los suelos cuando no fueran cultivados continuamente. Aunque se ha demostrado la sobrevivencia del micelio bajo condiciones adversas (McGonigle y Miller 1999), su viabilidad puede disminuir y la densidad de esporas en los suelos pueden ser entonces los propágulos efectivos en el suelo (Sanders and Sheikh 1983, Kabir et al. 1999). Por todo esto, se considera importante determinar la viabilidad inicial de los propágulos al inicio del cultivo en el campo (Nehl et al. 1998).

La reducción en la riqueza de especies en los suelos agrícolas y en suelos contaminados se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios (Ietswaart et al., 1992; Johnson y Pflieger 1992; Weissenhorn, 1995; Hoflich et al. 1999). Feldmann y Boyle (1999) encontraron una menor diversidad de morfotipos como consecuencia del cultivo de maíz. Efectivamente nosotros encontramos una importante disminución en el número de morfotipos en los Vertisoles regados por 95 años que podría deberse a una mayor continuidad en las cosechas debida al riego. Sin embargo, asociamos el impacto del riego en los HMA según los modelos de diversidad de Giller et al. (1998). Ellos establecen dos comportamientos posibles de las poblaciones nativas ante cualquier tipo de estrés. El primero en el que bajo condiciones intermedias del mismo, se incrementa la diversidad y/o abundancia conforme aumenta la presión de selección a la que están sujetas; pasando

ciertos niveles de tolerancia ambas comienzan a decrecer progresivamente. En el segundo caso, la diversidad y/o abundancia decrecen directamente conforme aumenta la situación de estrés. En los Leptosoles, la micorriza se comporta de acuerdo al primer modelo y en los Vertisoles al segundo. Del mismo modo, Leyval y Vandenkoorhuyse (1996) observan una disminución en la abundancia y diversidad de HMA en suelos agrícolas cuyas concentraciones de metales estuvieron por debajo de las Normas Europeas. Del Val *et al.* (1999) encuentran un incremento en la riqueza y diversidad de especies de MA en suelos que recibieron concentraciones intermedias de lodos residuales y con niveles de metales pesados inferiores a los límites.

CONCLUSIONES

En los suelos regados con aguas negras en el Valle del Mezquital, la abundancia de esporas de hongos MA está siendo afectada. Esto fue demostrado en suelos de campo (*in situ*) y en macetas de propagación. Las principales diferencias se encontraron en los suelos regados durante 95 años ($p < 0.01$) y posteriormente en los irrigados durante 35 y 65 años. Sin embargo, el potencial colonizador de los suelos no disminuye como consecuencia del riego, y la colonización radical y su dinámica (abundancia de micelio intraradical, arbuscúlos, vesículas y esporas) es tan intensa como en los suelos regados por el menor tiempo (5 años). La colonización está influenciada completamente por el tipo de suelo siendo elevada en los Leptosoles y media en los Vertisoles regados por los mismos periodos de tiempo ($p < 0.0001$). Un efecto estimulador en la abundancia y diversidad de esporas se observa en los Leptosoles regados por 35 y 65 y en ambos suelos en los esporocarpos.

Nuestras observaciones nos permiten concluir que el riego con agua residual debe ser adaptado a cada tipo de suelo para evitar la disminución de la MA. La elevada colonización observada aún en los suelos más contaminados plantea la interrogante de cuáles son las

especies adaptadas y que esporulan menos. Esto nos permitiría seleccionar a las especies adaptadas al riego con agua residual para futuros programas de manejo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. A. Andrade por su ayuda en el trabajo de campo, al P. de B. I. A. Pérez por la asistencia en el experimento en invernadero, a la Dra. M. A. Aladro por el equipo proporcionado en los registros fotográficos y muy especialmente al Dr. C. Walker por la revisión taxonómica de algunas de las especies. Esta investigación transcurrió con apoyo del programa ECOS-SEP-CONACyT-ANUIES (M96U-02) y de la DGAPA de la UNAM.

LITERATURA CITADA

- Angle J. S., J. R. Heckman. 1986. Effect of soil pH and sewage sludge on VA mycorrhizal infection on soybeans. *Plant and Soil* **93**: 437-441.
- Arnold K., B. Kaputka. 1987. VA mycorrhizal colonization and spore populations in abandoned agricultural field after five years of sludge additions. *Ohio J. of Science* **87**: 112-114.
- Bécard G., J. A. Fortin. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation on Ri-T-DNA transformed roots. *New Phytol.* **108**: 211-218.
- Bethlenfalvay G. J., H. C. Bayne , R. S. Pacovsky. 1983. Parasitic and mutualistic association between a mycorrhizal fungus in soybean. *Physiologia Plantarum* **57**: 543-549.
- Boucher A., Y. Dalpé, C. Charest. 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal colonization of four species of *Glomus* on physiological responses of maize. *J. Plant Nutr* **22** (4-5): 783-797.
- Buée M., M. Rossignol, A. Jauneau, R. Ranjeva, G. Bécard. 2000. The Pre-Symbiotic Growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *MPMI* **13** (6): 693-698.

- Del Val C., J. M. Barea, C. Azcón-Aguilar. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environm. Microbiol.* **65** (2): 718-723.
- Feldmann F., C. Boyle. 1999. Weed-mediated stability of arbuscular mycorrhizal effectiveness in maize monocultures. *J. Appl. Bot.-Angew. Bot.* **73**: 1-5.
- Franson R. L., G. J. Bethlenfalvay. 1989. Infection unit method of vesicular-arbuscular mycorrhizal propagule determination. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **53**: 754-756.
- Fridel J. K., T. Languer, J. Rommel, C. Siebe, M. Kaupenjohann. 1999. Increase in denitrification capacity of soils due to addition of alkylbenzene sulfonates. *Biol. Fert. Soils* **28**: 397-402.
- Fridel J. K., T. Langer, C. Siebe, K. Stahr. 2000. Effects of long-term wastewater irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and activities in Central Mexico. *Biol. Fert. of Soils* **31**:414-421.
- Gaur A., A. Adholeya. 2000. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza* **10**: 43-48.
- Gavito M. E., Varela L. Response to criollo maize to single and mixed species inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **176**: 101-105.
- Gianinazzi-Pearson V., S. Gianinazzi. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. *Plant and Soil* **71**: 197-209.
- Giller K. E., E. Witter, S. P. McGrath. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* **30** (10-11): 1389-1414.
- Hetrick B. A. D. , Bockus W. W., J. Bloom. 1984. The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the growth of Kansas winter wheat. *Can. J. Bot.* **62**: 735-740.
- Hoflich G., Tauschke M., Kuhn G., Werner K , Frielinghaus M., Hohn, W. 1999 Influence of long-term conservation tillage on soil and rhizosphere microorganisms. *Biol. Fert. Soils* **29** (1): 81-86.
- Ietswaart H. J., J. W. A. Griffioen, W. H. O. Ernst. 1992. Seasonality of VAM infection in tree populations of *Agrostis capillaris* (Graminae) on soil with or without heavy metal enrichment. *Plant and Soil* **139**: 67-73.
- Koomen I. S., P. McGrath, K. Giller. 1990. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils conamined with heavy metals from past sewage applications. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 871-873
- Jakobsen I., N. E. Nielsen. 1983. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in field-grown crops. I. Mycorrhizal infection in cereals and peas at various times and soil depths. *New Phytol.* **93**: 401-413.

- Johnson N. C., Pflieger F. L. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stress. In: Bethlenfalvay G. J., Linderman R. G. Eds. *Mycorrhiza in sustainable agriculture*. American Society of Agronomy, Inc. Special Number 54, 71-99.
- Kabir Z., O'Halloran I. P., C. Hamel. 1999. Combined effects of soil disturbance and fallowing on plant and fungal components of mycorrhizal corn (*Zea mays* L.). *Soil Biol. Biochem.* 31 (2): 307-314.
- Leyval C., B. R. Singh, E. Joner. 1995 Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metal and soil properties. *Water, Air and soil pollution* 84: 203-216.
- Leyval C., P. Vandenkoorhuysse. 1996. heavy metal pollution on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a old arable experiment. In: *Arbuscular Mycorrhizas in sustainable soil-plant systems*. S. Gianinazzi, H. Shuepp. Eds. p. 86. Europ, Luxemburg.
- McGonigle T. P., M. H. Miller. 1999. Winter survival of esxtraradical hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *Applied Soil Ecol.* 12: 41-50.
- Mollier A. S. Pellerin. 1999. Maize root system growth and development as influenced by phosphorous deficiency. *J. Exp. Bot.* 50 (333): 487-497.
- Muthukumar T., K. Udaiyan. 2000. Influence of organic manures on arbuscular mycorrhizal fungi associated with vigna unguiculata (L.) Walp. In relation to tissues nutrients and soluble carbohydrate in roots under field conditions. *Biol. Fertil. Soils* 31: 114-120.
- Nagahashi G., D. D. Douds, G. D Abney. 1996. Phosphorous amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. *Mycorrhiza* 6: 403-408
- Naranjo P. L. M. F., A. K. Biswas. 1997. Water, Wstewater, and environmental security problems: a case study of Mexico City and the Mezquital Valley International Water Resources Association 22(3).
- Nehl D B., S. J. Allen, J F. Brown. 1998. Slow arbuscular mycorrhizal colonization of field-grown cotton caused by environmental conditions in the soil. *Mycorrhiza* 8 (3): 159-167.
- Olsen J K., J. T. Schaefer, D. G. Edwards, M. N. Hunter, V. J. Gale, L. M. Muller. 1999. Effects of a network of mycorrhizae on capsicum (*Capsicum annuum* L.) grown in the field with five rates of applied phosphorous. *Aus. J. Agric. Res.* 50 (2): 239-252.
- Olsson P. A., E. Bååth, I. Jakobsen. 1997 Phosphorous effects on the mycelium and storage structures of an arbuscular mycorrhizal fungus studied in the soil and roots by analysis of fatty acids signatures. *Applied and Environm. Microbiol.* 63 (9): 3531-3538

- Ortega-Larrocea M. P., C. Siebe, G. Bécard, I. Méndez, R. Webster. 2001a. Impact of a century of wastewater irrigation on spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in the soil of Mezquital Valley of Mexico. *Applied Soil Ecology* 16 (2): 149-157.
- Saif S. R. 1981. The influence of stage of root development on vesicular-arbuscular Endogonaceous spore population in field-grown vegetable crops. Summer grown crops. *New Phytol.* 79: 341-348.
- Saif S. R. 1983. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 95. 405-417.
- Sainz M. J., M. T. Taboada-Castro, M- T., A. Vilarino. 1998. Growth, mineral nutrition and mycorrhizal colonization of red clover and cucumber plants grown in a soil amended with composted urban wastes. *Plant Soil* 205 (1): 85-92.
- Sanders F. E., N. A. Sheikh. 1983. The development of vesicular arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems. *Plant and Soil* 71: 223-246.
- Siebe 1994. *Akkumulation, Mobilität und Verfügbarkeit von Schwermetallen in langjährig mit Abwasser bewässerten Böden Zentralmexikos*. Hohenheimer Bodenkundliche Hefte 17, Stuttgart, Institut für Bodenkunde und Standortlehre, Universität Hohenheim.
- Siebe C. 1995. Heavy metal availability to plants in soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Wat. Sci. Tech.* 32 (12): 29-34.
- Siebe C. 1998. Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. *Soil Use and Management* 14: 119-122.
- Siebe C., E. Cifuentes. 1995. Environmental impact of wastewater irrigation in Central Mexico: an overview. *International Journal of Environmental Health Research* 5: 161-173
- Siebe C., W. R. Fischer 1996. Effect of long-term irrigation with untreated sewage effluents on soil properties and heavy metals adsorption of Leptosols and Vertisols in Central Mexico. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 159: 357-364.
- Thorne M. E., B. A. Zamora, A. C. Kennedy 1998. Sewage sludge and mycorrhizal effects on sear bluebunch wheatgrass in mine spoil. *J. Environ. Qual.* 27 (5): 1228-1233.
- Turnau K. 1996. Plant and fungal strategies on industrial wastes rich in Zn, Cu and Pb In: S. Gianinazzi y H. Schuepp, eds. *Arbuscular Mycorrhizas in sustainable soil-plant systems*. COST Action 8. 21. p. 99. EUROP, Luxemburg.
- Weissenhorn I., M. Mench, C. Leyval. 1995 Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended sandy soil *Soil Biol. Biochem.* 27 (3): 287-296

Conclusiones del capítulo I.

Un muestreo intenso en campo y estudios posteriores en invernadero de los suelos del Valle del Mezquital regados con aguas residuales, nos permitieron establecer las siguientes observaciones en cuanto a la dinámica de las simbiosis micorrízicas arbusculares.

- 1) El tipo de suelo, es un factor que independiente del riego con agua residual, determina la productividad de los hongos MA, siendo el Leptosol el que más favorece la colonización radical y la esporulación.
- 2) El impacto por el riego con aguas negras a través del tiempo está siendo regulados también por el tipo de suelo y causa una disminución en la esporulación del hongo en los suelos más contaminados o regados por el mayor tiempo, lo que se aprecia claramente en los Vertisoles. Esto se debe a que sus características son más homogéneas porque son suelos más arcillosos, con menor oxigenación y retienen más los contaminantes, lo que los hace ser más susceptibles al riego y a la regulación de las simbiosis MA.
- 3) A pesar de que no se observa una inhibición ni tampoco una disminución del potencial colonizador de los suelos con elevadas concentraciones de fósforo, éste junto con los metales pesados, están correlacionados directamente con la disminución en la abundancia y diversidad de esporas, inclusive de las esporas y vesículas intraradicales en Leptosoles y Vertisoles regados por más de 90 años.

- 4) El potencial colonizador de los suelos no está influenciado por la abundancia de esporas si no por otros propágulos del suelo como las raíces colonizadas. Estas garantizan la continuidad de las simbiosis en los suelos más contaminados. Sin embargo, la disminución en la abundancia de esporas puede tener importantes repercusiones en su manejo ya que se podría ver afectada la diversidad y abundancia de estos hongos en periodos de descanso en los que el suelo se encuentre sin hospederos.

- 5) Junto con los estudios edafológicos que se tienen bien caracterizados para la zona, se infiere que es necesario llevar a cabo un manejo diferencial de los suelos regados por los mismos periodos de tiempo. El incremento en el tiempo de riego podría hasta cierto limite *estimular* a las simbiosis en Leptosoles y *disminuirla* paulatinamente en Vertisoles. Las prácticas agrícolas recomendables serían las que impidieran alcanzar los niveles de contaminación de los suelos regados por mayor tiempo y reducir o suspender el elevado aporte de nutrimentos en los suelos regados por un siglo, de modo que la abundancia de esporas no disminuyera en los primeros y las poblaciones se pudieran restablecer en los segundos.

CAPITULO DOS. ESTUDIOS EN INVERNADERO.

Transferencia de metales pesados y fósforo vía hongos micorrízicos arbusculares y su efecto en la translocación.

1. Resumen. 68
2. Introducción. Contribución de la micorriza arbuscular a la transferencia de metales pesados a las plantas. 70
3. Resultados. Efecto del tiempo bajo riego con agua residual en el crecimiento y absorción de metales pesados en el maíz. 78
4. Transferencia vía hongos micorrízicos arbusculares de algunos metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) provenientes del riego con agua residual y su translocación en un cultivo de maíz. 89
5. Efecto de la contaminación por agua residual en la adaptación de especies de hongos micorrízicos arbusculares en Vertisoles regados durante 5 y más de 90 años con agua residual. 99

Resumen

Se estudió bajo condiciones de invernadero, el efecto de la contaminación del suelo por el riego con aguas residuales a corto y largo plazo, en el crecimiento y absorción de fósforo y metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) en plantas de maíz con y sin micorrizas arbusculares. El estudio se llevó a cabo en suelos de tipo Vertisol irrigados durante 5 (V05) y más de 90 años (V90) con agua residual. Se probaron diferentes inóculos de hongos provenientes de estos suelos regados durante largo (M90) y corto tiempo (M05) y de Vertisoles nunca regados con aguas residuales (MT), a los que se les aplicó agua residual o destilada durante el experimento.

Se observó un efecto dominante del tiempo de irrigación en el crecimiento de las plantas y en las concentraciones (mayores del doble) de Cd, Cu, Zn y P en los tejidos y en los suelos de los tratamientos V90. Aunque los niveles de Pb en el suelo también se atribuyeron al tiempo de irrigación, su concentración en los tejidos de las plantas no se relacionó con la del suelo. No se observó ningún efecto significativo debido al riego con agua residual o destilada en la absorción de metales y fósforo durante el crecimiento del cultivo aún en los tratamientos V05.

La formación de la simbiosis micorrízica se llevó a cabo únicamente en los suelos V05 debido a un efecto inhibitorio causado por el aumento en la disponibilidad del fósforo debido a la radiación gamma en los V90. En las plantas micorrizadas se observó una disminución en los pesos secos de los tejidos en comparación a las plantas que no recibieron inóculo. Esta disminución fue proporcional a la colonización de las raíces y a la esporulación de los hongos. Se apreció un efecto claro de la micorriza en la absorción de fósforo, independientemente del origen de los distintos inóculos probados. Sin embargo, sólo se observó un incremento significativo en la absorción y translocación de los metales estudiados en todos los tejidos (raíz, tallo y hoja) causado por el aislado M90, principalmente a nivel de raíz. Esta mayor absorción en las raíces debida a la micorrización, no correspondió a una mayor translocación por parte de la planta de estos elementos *versus* los tallos y las hojas, por lo que se interpreta como una bioacumulación

en las raíces. Esto provocó que la translocación de los metales hacia las partes aéreas fuera ligeramente menor en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas. La absorción de los metales no se correlacionó con la abundancia de los hongos dentro de las raíces (colonización radical). Es probable que el inóculo M90 tenga una mayor habilidad en la absorción de estos metales debido probablemente a que ha estado sometido durante mayor tiempo al riego con agua residual. Cuando este cultivo fue propagado en condiciones de menor contaminación como lo son los suelos V05, su esporulación se ve estimulada. Esto no se observó en el aislado M05 propagado en las mismas condiciones (V05)

Todos los morfotipos encontrados fueron muy similares en los tres tipos de inóculo (M05, M90 y MT), predominando en todos los cultivos propagados en condiciones de invernadero *G. mosseae*, *G. aggregatum* y *G. clarum*. La presencia de *G. mosseae* se encontró en todos los casos de este estudio y en investigaciones previas de campo por lo que se considera que es una especie altamente aclimatizada a las condiciones de riego con agua residual y posiblemente en vías de adaptación.

INTRODUCCION

Contribución de los hongos MA en la absorción de metales pesados a las plantas.

La reutilización de aguas residuales en la agricultura enriquece a los suelos con materia orgánica y diversos macronutrientes y contribuye a los procesos de reciclaje de éstos últimos (Moore, 1988; Campbell, 2000). Tal es el caso del fósforo que es un elemento de muy baja disponibilidad natural (Raghothama, 1999) y limitante en el crecimiento de los cultivos (Schachtman et al., 1998). La aplicación de las aguas residuales ha permitido además, la explotación de los suelos de las zonas áridas y semiáridas. También se ha observado un mayor rendimiento de las cosechas a nivel de biomasa en cultivos regados con lodos o aguas residuales (Kelley et al., 1984). Sin embargo, la calidad de los productos generados puede verse afectada por la incorporación al suelo y a los cultivos de parásitos de las plantas y patógenos del hombre, así como de distintos elementos potencialmente tóxicos (Giller y McGrath, 1988; US-EPA, 1992; Siebe y Cifuentes, 1995). Dentro de éstos, los más estudiados han sido los metales pesados debido a su acumulación y transferencia a distintos niveles de la cadena trófica (Williams et al., 1984; Miller et al., 1995b; Tsadilas et al., 1995; Smith et al., 1996). Muchos son los factores bióticos y abióticos que intervienen en la absorción de estos elementos por las plantas y su acumulación en los tejidos (Sadiq, 1985, Das et al., 1997). Dentro de los primeros, podemos destacar el papel de los microorganismos del suelo involucrados en la adquisición de contaminantes por las plantas, ya sea porque favorecen la mineralización de compuestos que los contengan (Domsch, 1984, Juwarkar et al., 1988) o porque contribuyen a una absorción directa, como las simbiosis micorrízicas (Morel, 1985; Giller et al., 1998). En los suelos agrícolas, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbiosis de la mayoría de los cultivos, cuya función es aumentar la absorción y por ende la translocación de fósforo y diversos nutrientes del suelo hacia las plantas (Munyanziza et al., 1997).

A pesar de que la contribución de los hongos micorrízicos arbusculares en la absorción de metales pesados se ha puesto en evidencia (Bürkert y Robson, 1994; Weissenhorn et al., 1995a), el papel de esta simbiosis en la bioacumulación o bio-protección de las plantas no se ha podido establecer claramente para la mayoría de los metales estudiados (Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn). Esto se debe a que la absorción de estos elementos está determinada por diversos factores como la concentración y el tipo del metal, su solubilidad y las condiciones fisico-químicas del suelo, y finalmente de la especie vegetal y de hongo micorrízico (Suzuki et al., 2001). Por lo general, cuando los metales en los suelos se encuentran en concentraciones muy bajas (trazas) y son requeridos como micronutrientes para el crecimiento vegetal, la micorriza arbuscular favorece su absorción (Manjunath y Habte, 1988; Raju et al., 1990; Marschner and Dell, 1994; Liu et al., 2000). Sin embargo, cuando las concentraciones en los suelos son elevadas, se ha observado un efecto bioacumulativo en las plantas micorrizadas. Algunos de estos metales se concentran a nivel de las raíces y la translocación por las plantas a las partes aéreas es menor que en las plantas no micorrizadas (Languerau-Leman, 1999). Por tanto, las simbiosis micorrízicas pueden ser ambivalentes y funcionar como bioacumuladoras en las raíces y a su vez, bio-protectoras de la traslocación a las partes aéreas (Shetty et al., 1995). Quizá esto se deba únicamente al hecho de que los metales quedan retenidos en la biomasa fúngica (González-Chávez, 2000) y no a una regulación específica por parte del endófito.

La mayor parte de los estudios dedicados a dilucidar la contribución de los HMA en la transferencia y por ende en la translocación de metales, se han realizado con concentraciones y especies metálicas conocidas, que son añadidas al suelo o a sustratos artificiales de manera controlada (Gildon y Tinker, 1983a; Díaz et al., 1996, Guo et al., 1996; Liu et al., 2000). Poco se sabe de la contribución de los hongos en suelos con concentraciones variables y menos aún, en suelos alcalinos regados con aguas residuales. Desde el punto de vista del hongo, e independientemente de la contaminación por metales pesados, la problemática de estos suelos es la elevada incorporación de fósforo que se adiciona lenta, pero constantemente con el agua de riego (Sharpley y Rekolainen, 1998; Sibbesen y Sharpley, 1998). Esto significa que las poblaciones de hongos MA en el suelo

están siendo sometidas a concentraciones cada vez mayores de este elemento, lo que podría repercutir negativamente en la efectividad de la simbiosis. Por tanto, es posible que con el tiempo, el riego promueva a una selección de las especies de hongos. Esta selección puede ser fisiológica, como la regulación en la expresión de genes transportadores de fosfatos y por tanto genética, como la sobrevivencia de hongos con el genoma adecuado para llevar a cabo esta regulación (Gildon y Tinker, 1983a; Maldonado et al., en prensa).

En los suelos ligeramente alcalinos del Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo, México, se pueden encontrar poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares que han estado expuestas al riego con aguas residuales no tratadas durante diferentes periodos de tiempo (desde cinco hasta cerca de cien años) (Siebe y Cifuentes, 1995). Con el tiempo, el volumen generado y utilizado de estas aguas ha aumentado y como consecuencia, su incorporación a los terrenos de siembra. De este modo en el Valle del Mezquital existen terrenos regados ininterrumpidamente y otros de reciente incorporación al riego, que anteriormente eran cultivados bajo el sistema de temporal. En estudios previos (Ortega-Larrocea et al., 2001; parte 3 del capítulo 1) se ha visto que la elevada disponibilidad de fósforo en los suelos regados por largo tiempo, no ha causado una disminución en el potencial colonizador de los hongos MA en los suelos. Si bien se observa que hay una disminución en la abundancia de esporas, esporocarpos y vesículas, la colonización total de las raíces es elevada y se mantiene inalterada.

El hecho de que no exista una inhibición de la colonización micorrízica arbuscular en las plantas de los suelos más contaminados puede tener implicaciones importantes como:

- a) Que exista una adaptación en la dinámica de la colonización de los hongos MA debida a una posible disminución de la necesidad de las plantas de esta simbiosis (micotrofia) como consecuencia de una mayor disponibilidad de fósforo en los suelos.
- b) Que el endófito pudiera tener alguna participación en la absorción de contaminantes como metales pesados.

Para corroborar la primera hipótesis, se seleccionaron distintos inóculos de hongos MA provenientes de suelos irrigados por distintos periodos con agua residual (5 y más de 90 años y nunca antes regados) y fueron inoculados en plantas de maíz que crecieron en estos suelos. Estos aislados se sometieron a condiciones de mayor, menor o igual grado de contaminación (en relación a las concentraciones de fósforo y metales pesados totales). A su vez, se estudio del efecto inmediato del riego con tratamientos regados con aguas residuales y regados con agua destilada. La tolerancia de los hongos MA al riego con aguas residuales se estudió únicamente a través de la abundancia de las esporas y de la diversidad de sus morfotipos.

En el segundo caso se consideró que los hongos MA pudieran contribuir a la transferencia (que es la absorción de nutrimentos del suelo a las raíces) y como consecuencia en la translocación (que es la distribución de estos elementos en los tejidos de las plantas de las raíces a las partes aéreas) de contaminantes a las plantas en estos suelos. Para esto se cuantificaron las concentraciones de metales pesados y de fósforo en las aguas de riego, en los suelos y en los tejidos de las plantas micorrizadas con los inóculos anteriormente descritos y fueron comparadas con las plantas no micorrizadas.

El objetivo principal de este estudio fue le de conocer los efectos del riego con agua residual a corto y largo plazo en la absorción de metales pesados y fósforo en plantas de maíz micorrizadas, así como el de cuantificar si a través de la abundancia y diversidad de esporotipos es posible notar algún proceso de aclimatación de estos hongos a estas condiciones.

MATERIALES Y METODOS

Diseño Experimental

El experimento se llevó a cabo en Vertisoles del Distrito de Riego 03, del Valle Mezquital, Hidalgo. En los estudios de campo previos (capítulo anterior), el impacto del riego con agua residual en las simbiosis MA se apreció de manera más clara en estos suelos. Los tratamientos micorrízicos fueron diseñados en un experimento de inóculos

cruzados en los que los inóculos provinieron de los Vertisoles regados por distintos periodos con agua residual. El mayor de ellos fue de 90 años (inóculo denominado M90) y el menor periodo fue de 5 años (inóculo M05). El control positivo provino de Vertisoles nunca irrigados ni cultivados agrícolamente (inóculo MT). El control negativo fueron las plantas sin inóculo micorrízico (M-).

En el mismo diseño experimental, estudiamos el efecto de la acumulación de fósforo y metales pesados totales en los suelos del efecto directo de la aplicación con agua residual durante el crecimiento del cultivo. Para esto, se diseñaron tratamientos regados con agua residual (AR) y / o destilada (AD).

La repartición de los tratamientos fue completamente aleatorizada y el diseño fue multifactorial con 2 suelos (V)5 y V90) x 4 aislados (M-, MT, M05, M90) x 2 riegos (AD y AR) = 16 tratamientos con ocho replicados cada uno (un total de 128 unidades experimentales). Los tratamientos se identificaron con las siguientes nomenclaturas:

Inóculo	Tipo de suelo	Riego									
M90	V05	AR	M05	V05	AR	MT	V05	AR	M-	V05	AR
M90	V05	AD	M05	V05	AD	MT	V05	AD	M-	V05	AD
M90	V90	AR	M05	V90	AR	MT	V90	AR	M-	V90	AR
M90	V90	AD	M05	V90	AD	MT	V90	AD	M-	V90	AD

Colecta y esterilización de suelos

Los Vertisoles se colectaron en el Distrito de Riego 03 en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. Las parcelas de cada tipo de suelo (V05 y V90) con el menor y mayor contenido de metales pesados totales y fósforo disponible, respectivamente, fueron

seleccionadas con base en un estudio previo (Ortega-Larrocea *et al.*, 2001). De cada una de estas parcelas se colectaron 10 muestras de suelo de aproximadamente 22 kg cada una. Las muestras se tomaron en una línea paralela al canal de riego de cada parcela. De cada tipo de suelo se separaron 5 kg de macroagregados con raicillas. Todas las muestras fueron secadas al aire a temperatura ambiente. Los suelos fueron molidos, tamizados (2 mm) y homogeneizados en una revoladora. Las repeticiones consistieron en 2 kg de cada tipo de suelo que fueron repartidos en bolsas de polietileno esterilizadas por radiación gamma a 30 kgrays. Esta dosis fue seleccionada con base en un estudio previo de recrecimiento de microorganismos de los suelos sometidos a distintas dosis de radiación y que fueron sembrados en medios de cultivo.

El inóculo que correspondió al aislado MT fue colectado de la rizosfera de plantas de mezquite (*Prosopis laevigata*) y maguey (*Agave atrovirens*) de Vertisoles circundantes a los campos agrícolas.

Inoculación de plantas

El inóculo micorrízico y bacteriano de cada suelo fue aislado a partir de 4.8 kg de los macroagregados separados inicialmente (calculados con base en el 10 % del peso seco del suelo de cada unidad experimental). La extracción se hizo el día de la inoculación por tamizado en húmedo (2.38, 0.96, 0.25 y 0.037 mm) y decantación. El primer litro extraído de este lavado fue recuperado y conservado en frío hasta la siembra. Por otro lado, el contenido de cada tamiz fue dispersado en 2 L de agua y decantado después de 15 s recuperando cada fracción en el tamiz más fino. La muestra final fue homogeneizada, pesada en húmedo y repartida con el mismo peso entre el no. de repeticiones. 24 horas antes, se regó cada maceta con agua destilada hasta la capacidad de campo. A cada una se le añadió el peso correspondiente del inóculo en un orificio central de 2 cm de profundidad y sobre el inóculo se colocó una semilla de maíz (*Zea mays* L.). Las semillas de todos los tratamientos provinieron de una sola mazorca de una variedad sembrada en el Valle y colectada dos años antes en Vertisoles regados por 95 años. Cada maceta

recibió 10 mL del extracto microbiano correspondiente y se cubrió con una malla mosquitera que fue agujerada en su centro cuando emergió la planta (Fig. 1, Anexo 2).

Cultivo y riego de las plantas

Las plantas se mantuvieron en un invernadero templado (23 ± 7 °C, 61 ± 37 % H. R., fotoperiodo natural) durante 16 semanas y fueron regadas quincenalmente (debido a la gran retención de agua de estos suelos) con agua destilada (AD) y/o residual (AR). Los riegos con agua residual fueron alternados con agua destilada considerando las dosis de aplicación en campo (4 riegos para este cultivo). El agua residual se colectó en el Distrito un día antes de su aplicación en uno de los canales principales cercanos a los suelos colectados y se conservó a 4 °C. En cada riego se homogeneizaron los sedimentos del agua revolviéndola y se rotaron los bloques una posición para evitar efectos de orilla y diferencias en la iluminación.

Cosecha

Una semana después del último riego se realizó la cosecha de las plantas. Estas se fraccionaron en su parte aérea en tallos y hojas y se pesaron en fresco. Las hojas secas no fueron consideradas. Se separaron casi la totalidad de las raíces del suelo manualmente, se lavaron con agua corriente y se registró su peso. Otras variables como altura, número de nudos, de hojas y diámetro de los tallos fueron registradas. Los tejidos de las plantas fueron lavados en HNO₃ (1 N), enjuagados tres veces con agua destilada y secados a 60 °C a peso constante. 10 g del suelo de cada maceta fueron secados a 110 °C hasta peso constante. El resto del suelo fue secado a temperatura ambiente y almacenado a 4° C hasta su análisis.

Parámetros micorrízicos

Las raicillas de los suelos de cada maceta que quedaron después de la colecta de las raíces principales fueron lavadas, aclaradas con KOH 10 % y teñidas con azul de tripán 0.05 % en lactoglicerol. Se hizo una mezcla homogénea y se montaron 10 segmentos al azar en portaobjetos en preparaciones permanentes con alcohol polivinílico (PVLG). Los porcentajes de colonización radical fueron determinados en 100 puntos de intersección a 200 X. Por otro lado, se extrajeron las esporas por tamizado en húmedo y decantación en 25 g de suelo de cada muestra. Se montaron ejemplares permanentes de las mismas en PVLG, PVLG-reactivo de Meltzer para las determinaciones taxonómicas.

Cuantificación de fósforo y metales pesados en aguas, suelos y plantas

Los tejidos de las plantas fueron molidos hasta pasar por un tamiz de 2 mm. Únicamente se cuantificaron los elementos de la mitad de las repeticiones de los tratamientos (n=4) a partir de 0.2 g de cada tejido (que fue el peso mínimo registrado para algunas raíces). Las digestiones de todos los tejidos y suelos se hicieron en horno de microondas (método EPA-3041 H). Los tejidos fueron digeridos con 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) y 3 de agua, aforadas a 50 mL y resolubilizadas con 500 µL de ácido fluorhídrico (HF). A su vez, 0.5 g de suelo fueron digeridos con 10 mL de HNO₃ y los extractos fueron aforados a 50 mL. 40 mL de las muestras de agua residual se digirieron con 10 mL de HNO₃. Para la determinación de los metales solubles en el agua residual, ésta se filtró por 2 µm (Millipore) y se acidificó con 2 mL de HNO₃. Todos los extractos se almacenaron a 4° C hasta su lectura. La determinación de metales pesados totales en suelos (Cd, Cu, Pb y Zn), se realizó con espectrofotometría de absorción atómica (AAS). Las lecturas de metales totales para las plantas y totales y solubles en las aguas residuales, se hicieron bajo inducción acoplada de plasma-masas (ICP-MS). La determinación de fósforo total en los extractos digeridos se llevó a cabo mediante determinación colorimétrica por molibdato, previo ajuste de pH con hidróxido de amonio 4N (Jackson, 1958).

Análisis estadísticos

Cada una de las variables cuantificadas fue sometida a la prueba de Kolmogorov-Smirnov de distribución normal. En los casos en los que no hubo un ajuste a la normalidad, se procedió a la transformación logarítmica ($x + 1$) de las variables. Algunos de estos datos transformados (Cu, Pb, Zn y P en los suelos y Zn en las hojas) se agruparon en dos curvas independientes (ver figura 2 del Anexo 2) que correspondieron a los suelos regados por mayor y menor tiempo. Por este motivo, la prueba de normalidad se aplicó de manera individual para cada uno de estos grupos alcanzando con esto la normalidad de la prueba. Para probar el efecto del riego y tiempo bajo riego, se aplicó un ANOVA de 2 vías y las medias de los tratamientos se sometieron a pruebas de mínima diferencia significativa (LSD). Debido a que no hubo micorrización en los suelos regados por más de 90 años, el efecto de los inóculos se sometió a una ANOVA de 2 vías (riego vs. tipo de inóculo) únicamente para los Vertisoles regados por 5 años. Todas las pruebas fueron hechas en Statistica 98 (StatSoft Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSION¹

1. Efecto del tiempo de irrigación en el crecimiento y absorción de metales pesados en el maíz, en Vertisoles regados con aguas residuales.

En la Tabla 1 se presentan las medias de las variables de crecimiento vegetal a las 16 semanas de desarrollo. Las variables que estuvieron influenciadas por el tiempo de riego con aguas residuales fueron la altura, el número de nudos, el diámetro de los tallos, los pesos fresco y seco de las hojas y su relación con el peso seco. Se observa que la

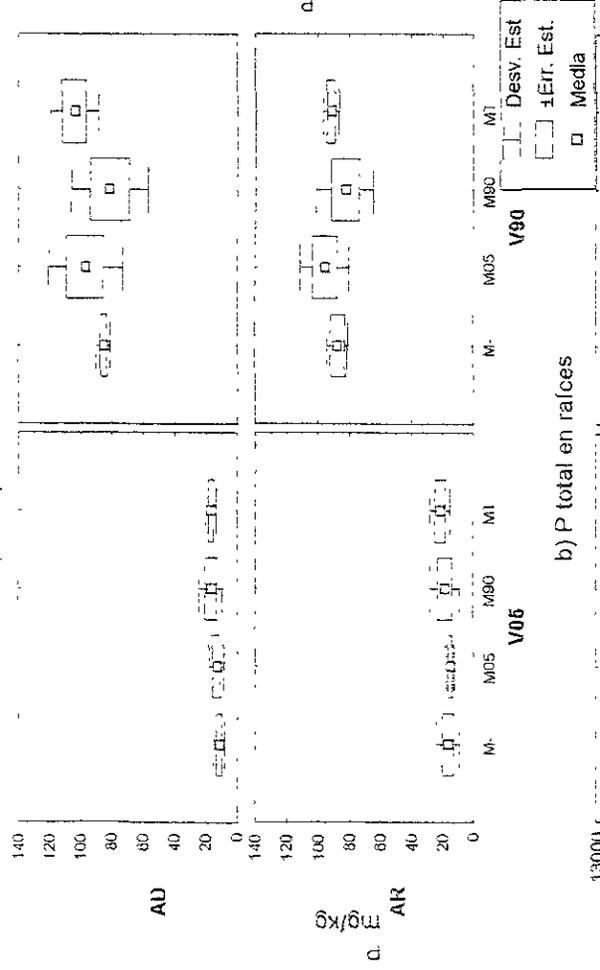
¹ Debido a que en las plantas que crecieron en los suelos más contaminados (V90) no hubo micorrización, el análisis de los resultados y la discusión del efecto del tiempo bajo riego en el cultivo de maíz, se hizo de manera independiente en la sección b para los tratamientos que presentaron micorriza (V05).

Tabla 1. Promedios y desviaciones estándar de las variables de desarrollo determinadas a las plantas de maíz (a las 16 semanas) en suelos regados con aguas residuales ($r=8 \pm d. e.$).

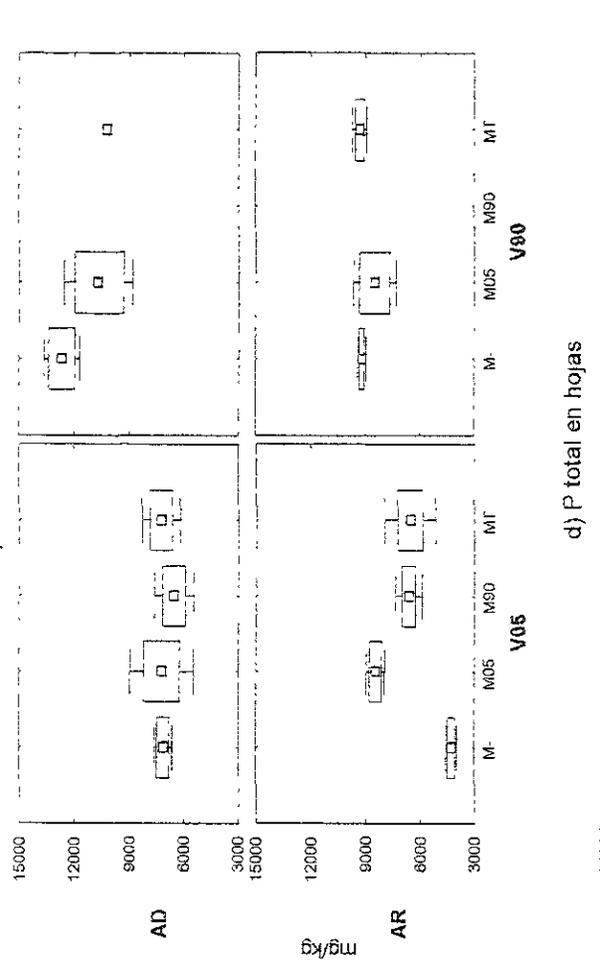
TRATAMIENTO	ALTURA (cm)	HOJAS NUOVOS	DI (cm)	PFH* (g)	PSH (g)	PSH* (g)	PFT* (g)	PST (g)	PST* (g)	PFTV (g)	PFR* (g)	PSR (g)	PSR* (g)	PFTT* (g)	PSIT (g)	PFTV (g)	PSIT* (g)
M-V05AD	161 ± 18	15 ± 1	7 ± 1.6	0.7 ± 0.1	12.8 ± 3.7	4.7 ± 0.7	5.1	41.2 ± 6.6	5.6 ± 1.6	9.4	3.7 ± 0.8	1.0 ± 0.2	3.9	58 ± 9	10.3 ± 2.1	7.2	7.2
M-V05AR	172 ± 15	14 ± 2	8 ± 1.8	0.8 ± 0.1	15.9 ± 1.7	5.7 ± 1.1	5.4	48.3 ± 5.4	5.5 ± 1.2	9.9	3.1 ± 1.6	1.0 ± 0.2	3.1	67 ± 6	11.0 ± 1.6	7.6	7.6
M-V90AD	148 ± 14	15 ± 1	6 ± 1.6	1.0 ± 0.2	18.3 ± 2.0	5.4 ± 0.7	5.6	40.4 ± 3.6	3.6 ± 0.8	12.5	2.4 ± 0.4	0.9 ± 0.3	2.8	61 ± 6	9.5 ± 1.3	8.4	8.4
M-V90AR	151 ± 17	16 ± 2	6 ± 1.6	0.9 ± 0.2	21.4 ± 2.8	6.1 ± 0.7	5.4	43.5 ± 3.3	3.1 ± 0.5	13.6	3.6 ± 2.6	0.8 ± 0.1	3.0	68 ± 4	10.3 ± 0.9	8.2	8.2
M05V05AD	170 ± 17	15 ± 1	7 ± 2.0	0.7 ± 0.1	14.9 ± 1.6	4.4 ± 0.6	5.8	38.8 ± 6.6	5.3 ± 1.2	10.3	7.6 ± 2.6	0.9 ± 0.2	7.7	58 ± 9	9.2 ± 1.6	8.4	8.4
M05V05AR	166 ± 17	15 ± 1	7 ± 1.5	0.8 ± 0.1	12.5 ± 3.8	5.1 ± 0.6	5.3	36.1 ± 3.0	4.8 ± 1.3	9.4	6.2 ± 1.7	1.0 ± 0.3	6.1	55 ± 8	9.5 ± 2.1	7.6	7.6
M05V90AD**	134 ± 18	15 ± 3	6 ± 2.1	0.9 ± 0.2	16.0 ± 3.4	4.6 ± 1.7	6.2	38.7 ± 5.3	3.0 ± 2.6	12.3	4.5 ± 2.1	0.6 ± 0.3	5.2	59 ± 7	9.3 ± 4.2	9.0	9.0
M05V90AR**	136 ± 17	15 ± 2	6 ± 1.6	0.9 ± 0.1	17.1 ± 2.0	5.3 ± 1.2	6.2	34.0 ± 4.0	2.7 ± 0.7	14.0	3.7 ± 1.4	0.9 ± 0.3	5.9	55 ± 6	7.8 ± 1.7	9.4	9.4
M90V05AD	157 ± 16	15 ± 2	7 ± 1.5	0.8 ± 0.2	11.3 ± 1.4	2.9 ± 0.6	4.3	39.7 ± 8.5	4.6 ± 1.1	9.7	4.7 ± 0.4	1.0 ± 0.2	6.1	53 ± 7	9.7 ± 1.7	7.1	7.1
M90V05AR	164 ± 26	15 ± 1	7 ± 1.8	0.7 ± 0.1	16.2 ± 4.0	2.7 ± 0.7	5.9	36.1 ± 4.3	4.7 ± 0.9	11.0	4.7 ± 1.9	1.0 ± 0.2	5.5	57 ± 10	8.5 ± 1.0	8.3	8.3
M90V90AD**	145 ± 14	15 ± 2	6 ± 2.1	0.9 ± 0.2	22.5 ± 3.3	5.1 ± 0.5	7.9	36.6 ± 5.4	3.3 ± 1.5	12.1	6.7 ± 0.9	0.9 ± 0.2	6.2	66 ± 8	9.4 ± 1.7	9.0	9.0
M90V90AR**	144 ± 14	14 ± 3	6 ± 1.0	1.00 ± 0.1	20.5 ± 3.2	5.0 ± 1.4	5.4	47.1 ± 11.0	2.7 ± 1.2	12.8	3.9 ± 1.3	0.7 ± 0.3	4.0	70 ± 9	9.8 ± 2.7	8.3	8.3
MTV05AD	161 ± 27	13 ± 2	6 ± 1.3	0.6 ± 0.2	12.5 ± 3.5	3.1 ± 0.8	5.3	40.5 ± 1.8	3.5 ± 1.4	7.3	3.9 ± 1.4	0.7 ± 0.3	4.6	57 ± 6	7.3 ± 2.5	6.5	6.5
MTV05AR	149 ± 33	15 ± 2	7 ± 2.4	0.7 ± 0.2	15.9 ± 1.6	4.1 ± 0.9	5.6	42.0 ± 8.0	3.8 ± 1.8	10.8	3.5 ± 1.4	1.0 ± 0.6	3.7	61 ± 9	9.5 ± 2.6	7.9	7.9
MTV90AD**	148 ± 17	16 ± 1	6 ± 2.0	1.0 ± 0.2	17.4 ± 4.9	5.0 ± 0.7	5.6	35.3 ± 8.8	3.8 ± 1.0	11.4	4.3 ± 2.5	1.0 ± 0.3	5.4	57 ± 16	9.6 ± 1.0	8.1	8.1
MTV90AR**	130 ± 38	13 ± 4	4 ± 1.4	0.9 ± 0.4	12.4 ± 3.4	5.0 ± 1.1	5.6	29.4 ± 5.1	2.8 ± 1.6	13.2	2.9 ± 1.8	0.7 ± 0.4	3.8	48 ± 11	7.8 ± 2.8	8.5	8.5

M- = tratamiento sin micorriza, M05 = inóculo aislado de Vertisoles regados durante 5 años, M90 = inóculo aislado de suelos regados durante 90 años, MT = inóculo aislado de Vertisoles con vegetación natural; V05 = vertisol regado con agua residual durante 5 años, V90 = vertisol regado durante 90 años con agua residual, AD = riego con agua destilada, AR = riego con agua residual. DT = diámetro de los tallos, PFH = peso fresco de las hojas, PSH = peso seco de las hojas, PFT = peso seco de los tallos, PST = peso seco de los tallos, PFR = peso fresco de las raíces, PFTT = peso fresco total, PSIT = peso seco total. *n=4, ** no hubo micorrización

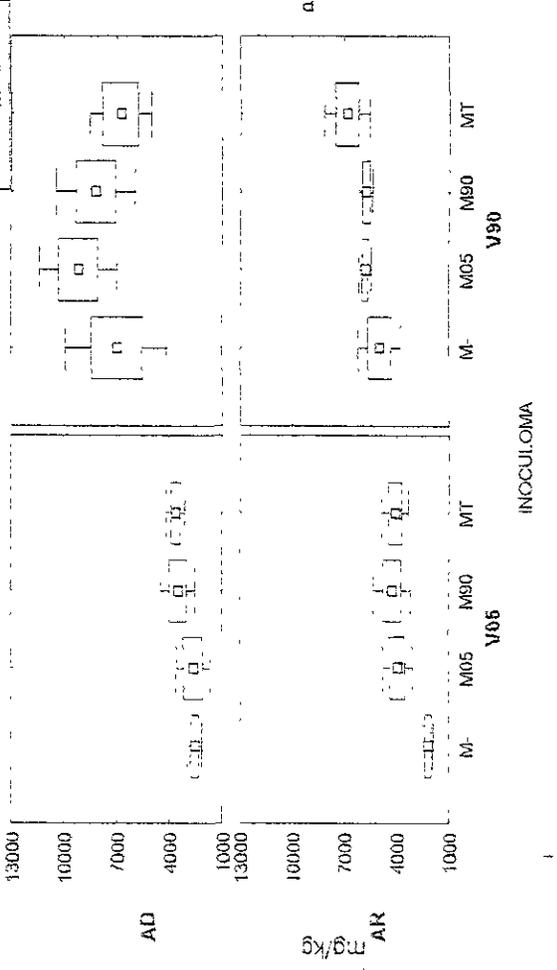
a) P disponible en suelos



c) P total en tallos



b) P total en raíces



d) P total en hojas

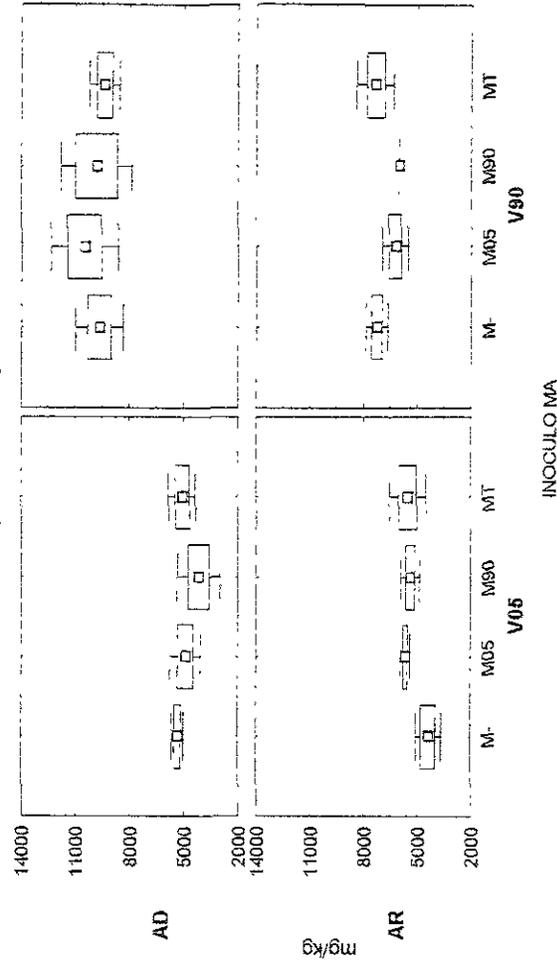
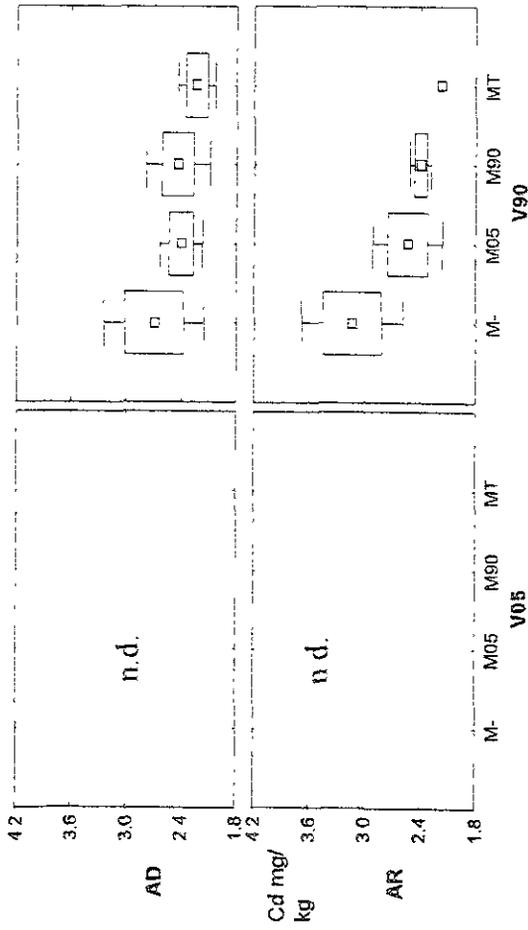
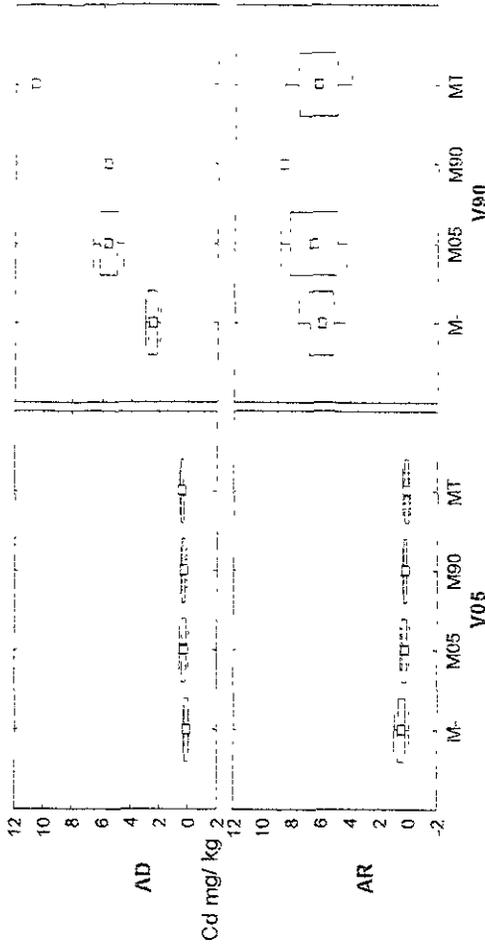


Figura 1. Concentraciones de fósforo disponible en el suelo (a) y en los tejidos (raíz, tallo y hoja) de plantas de maíz micorrizadas en Vertisoles irrigados durante 5 años (V05) y 90 años (V90) con aguas residuales. Las plantas fueron micorrizadas con diferentes inóculos provenientes de suelos nunca regados con aguas residuales ni cultivados agrícolamente (MT), de suelos regados durante 5 años (M05), de suelos regados por 90 años (M90) y el control sin inóculo micorrízico (M-). AD = riego con agua destilada, AR = riego con agua residual. TODAS LAS PLANTAS QUE CRECIERON EN LOS SUELOS V90, NO DESARROLLARON LA MICORRIZA.

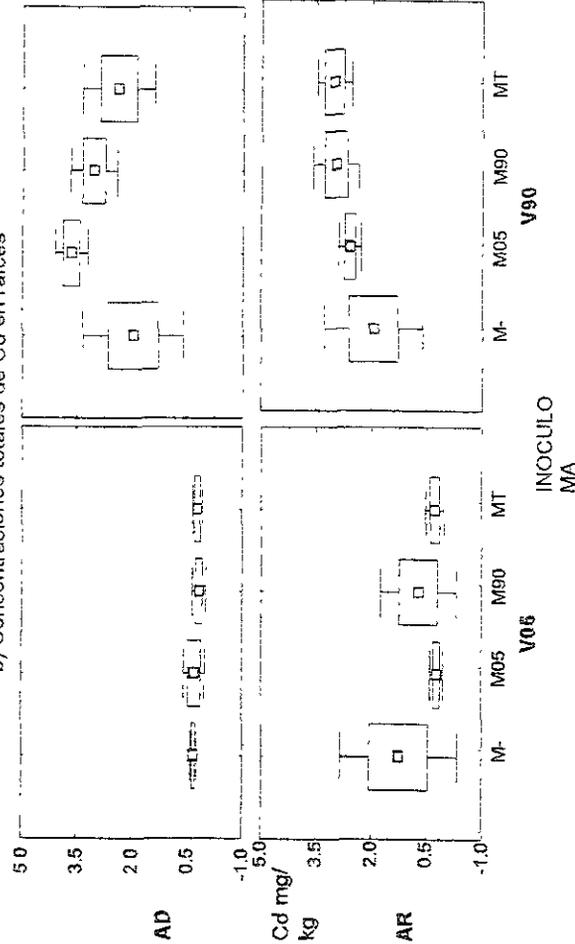
a) Concentraciones totales de Cd en suelos.



c) Concentraciones totales de Cd en tallos.



b) Concentraciones totales de Cd en raíces.



d) Concentraciones totales de Cd en hojas.

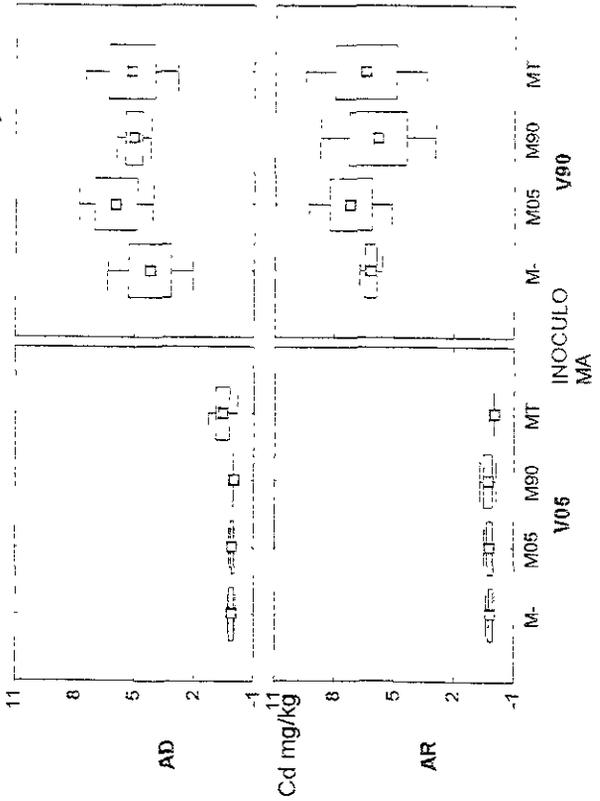
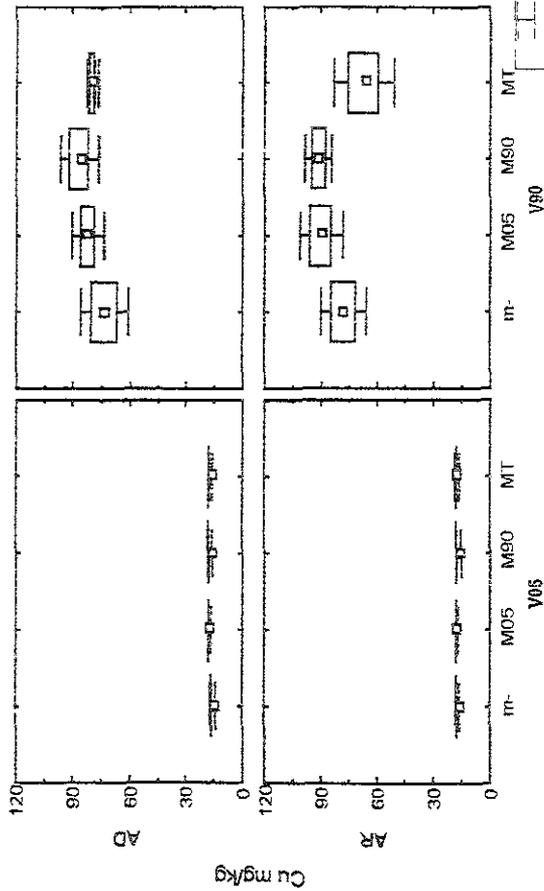
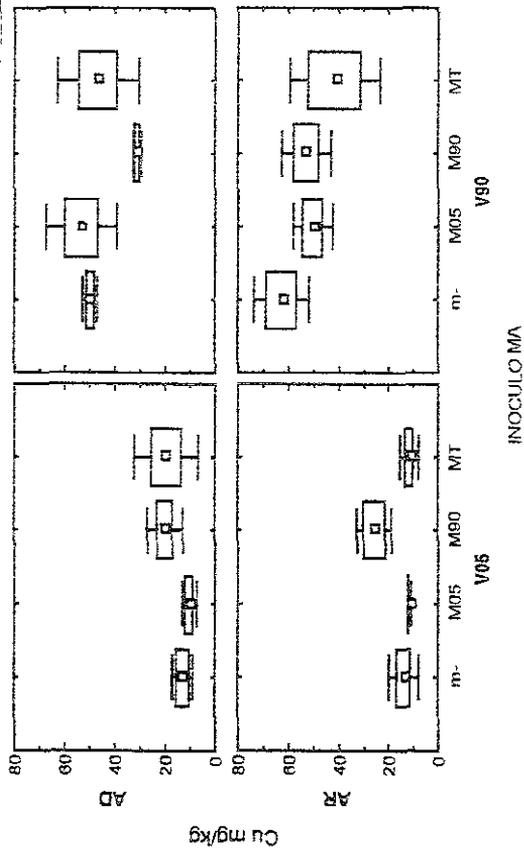


Figura 2. Concentraciones de cadmio en el suelo (a) y en los tejidos (raíz, tallo y hoja) de plantas de maíz micorrizadas en Vertisoles irrigados durante 5 años (V05) 90 años (V90) con aguas residuales y plantas micorrizadas con diferentes inóculos provenientes de aguas residuales en cultivos agrícolas durante 90 años (M05), regados durante 90 años (M90) y el control sin inóculo micorrízico (M-). N. d. = debajo del límite de detección. AD = riego con agua destilada, AR = riego con agua residual. TODAS LAS PLANTAS QUE CRECIERON EN LOS SUELOS V90, NO DESARROLLARON LA MICORRIZA

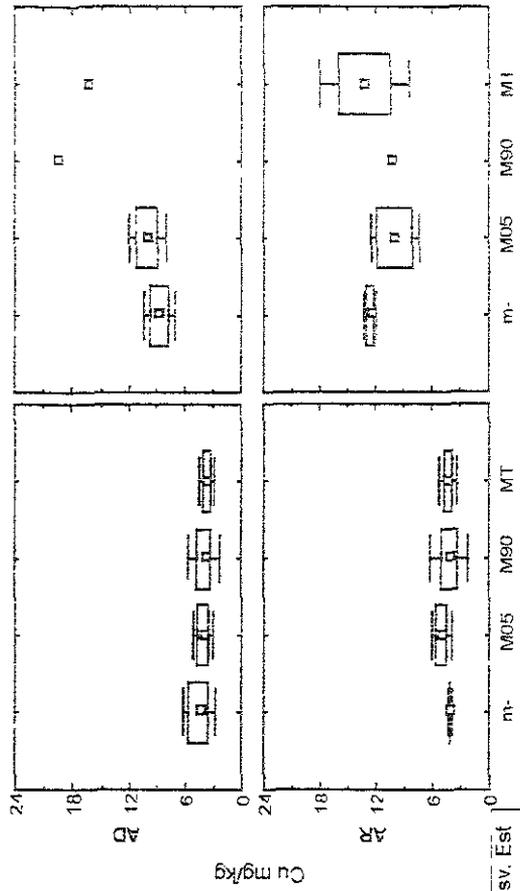
a) Concentraciones totales de Cu en suelos



b) Concentraciones totales de Cu en raíces



c) Concentraciones totales de Cu en tallos



d) Concentraciones totales de Cu en hojas

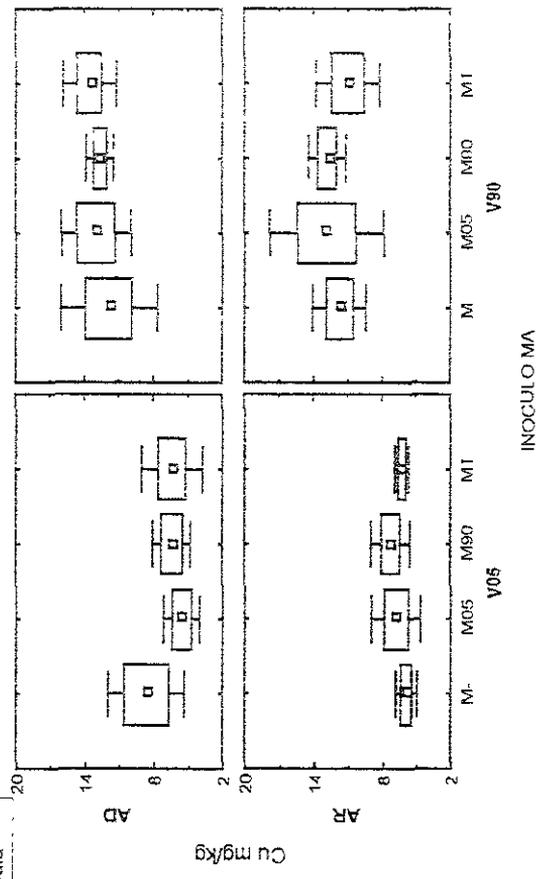
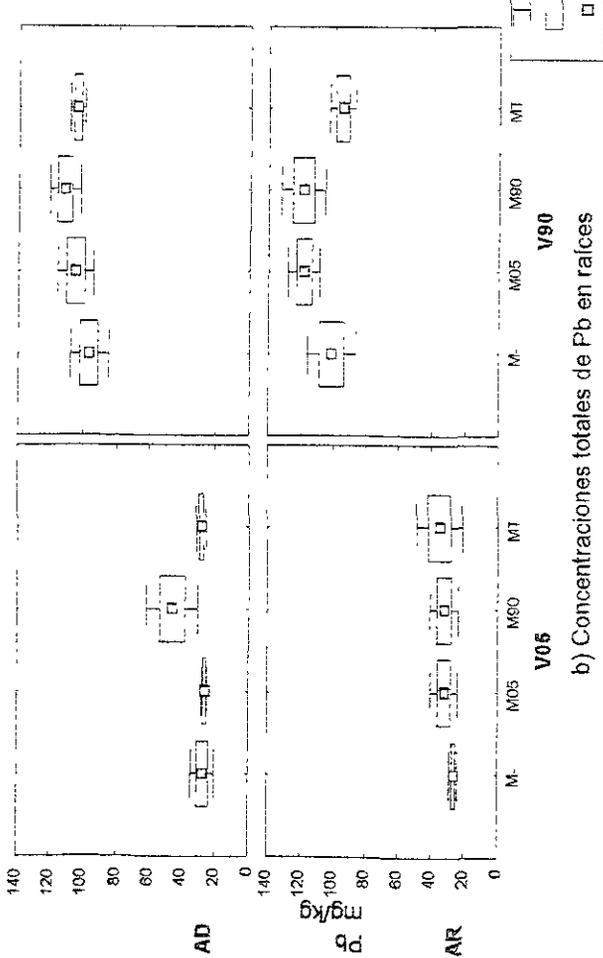
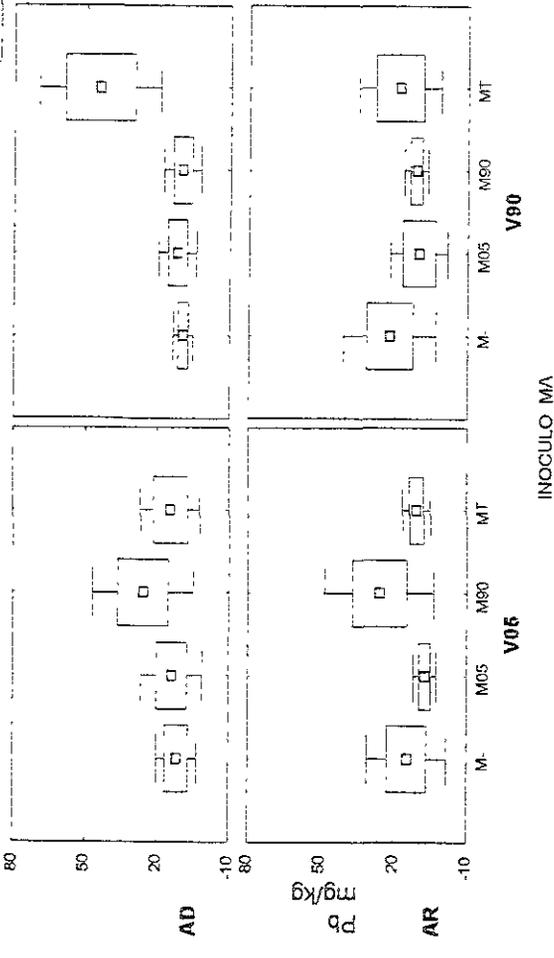


Figura 3. Concentraciones de cobre en el suelo (a) y en los tejidos (raíz, tallo y hoja) de plantas de maíz micorizadas en Vertisoles regados durante 5 años (V05) y 90 años (V90) con aguas residuales y micorizadas con diferentes inóculos provenientes de suelos nunca regados con aguas residuales ni cultivados agrícolamente (MT), de suelos regados durante 5 años (M05), y 90 años (M90) y el control sin inóculo micorrízico (M-). AD = riego con agua destilada, AR = riego con agua residual. TODAS LAS LANTAS QUE CRECIERON EN LOS SUELOS V90, NO DESARROLLARON LA MICORRIZA.

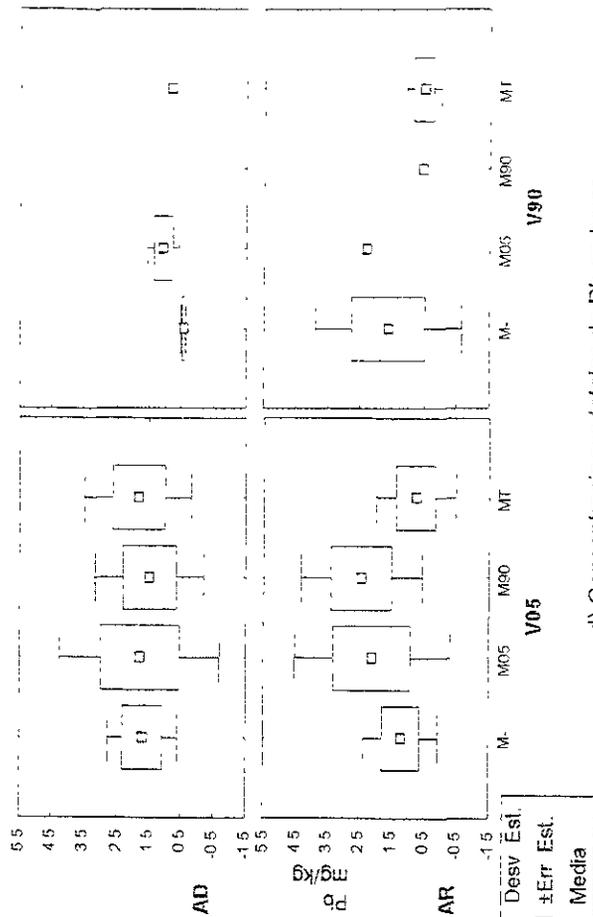
a) Concentraciones totales de Pb en el suelo



b) Concentraciones totales de Pb en raíces



c) Concentraciones totales de Pb en tallos



d) Concentraciones totales de Pb en hojas

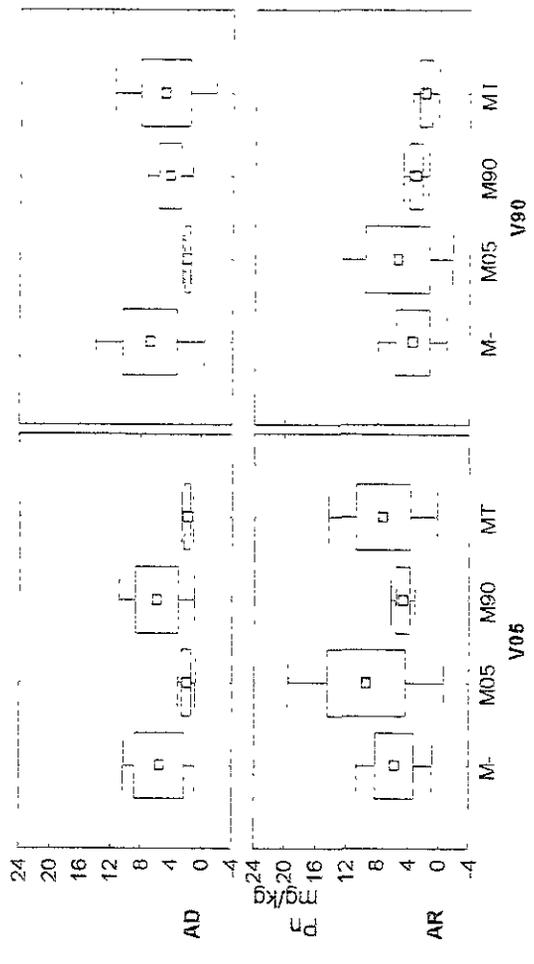
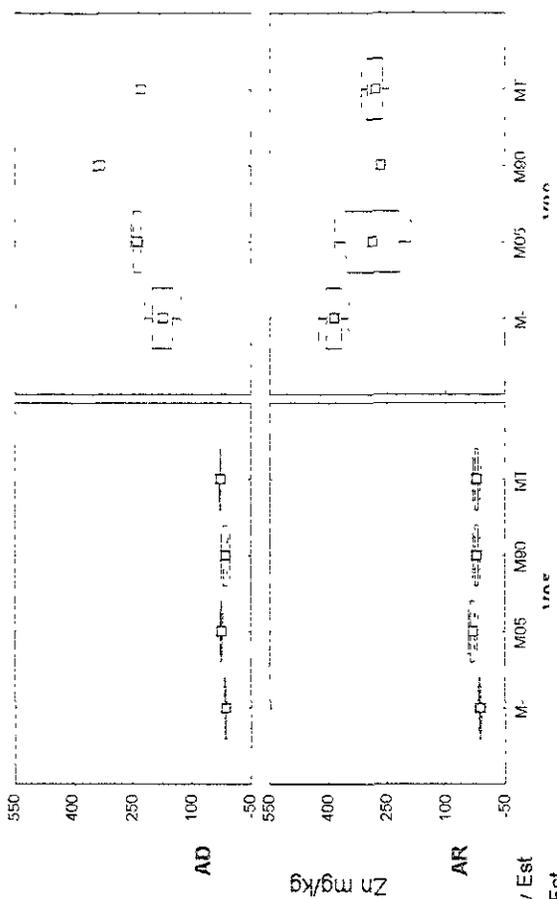
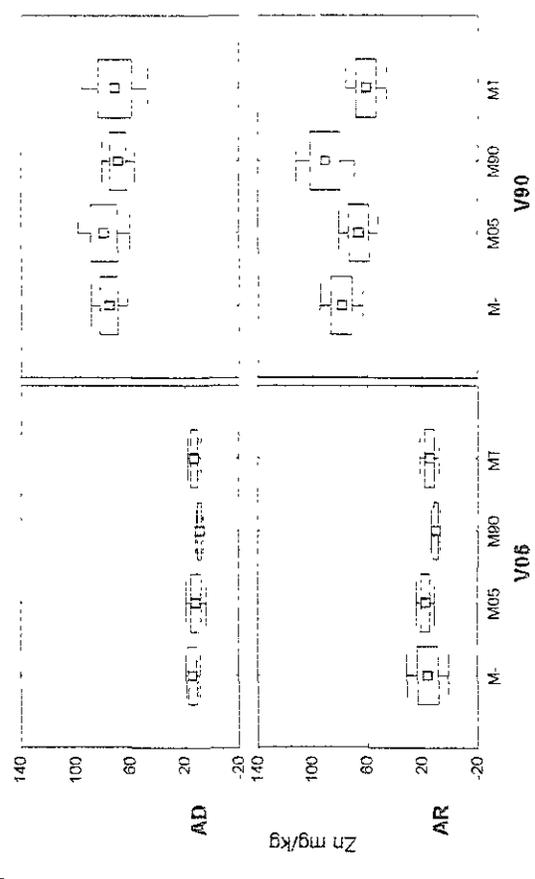


Figura 4. Concentraciones de plomo en el suelo (a) y en los tejidos (raíz, tallo y hoja) de plantas de maíz micorrizadas en vertisoles regados durante 5 años (V90) y 90 años (V90) con aguas residuales e inoculadas con diferentes aislados provenientes de suelos nunca regados con aguas residuales ni cultivados agrícola-mente (MT), de suelos regados durante 5 años (M05), 90 años (M90) y el control sin inóculo micorrízico (M-). AD = riego con agua destilada, AR = riego con agua residual. TODAS LAS PLANTAS QUE CRECIERON EN LOS SUELOS V90, NO DESARROLLARON LA MICORRIZA.

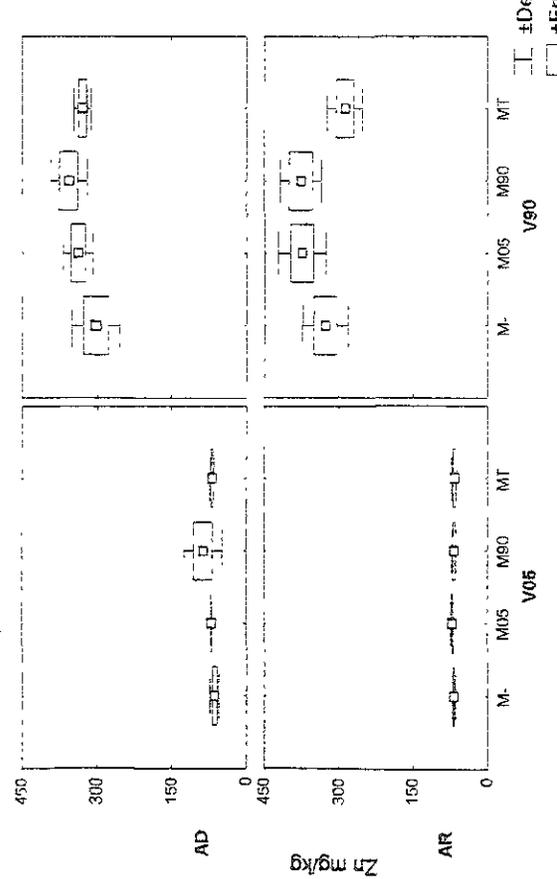
c) Concentraciones totales de Zn en tallos



d) Concentraciones totales de Zn en hojas



a) concentraciones totales de Zn en los suelos



b) Concentraciones totales de Zn en raíces

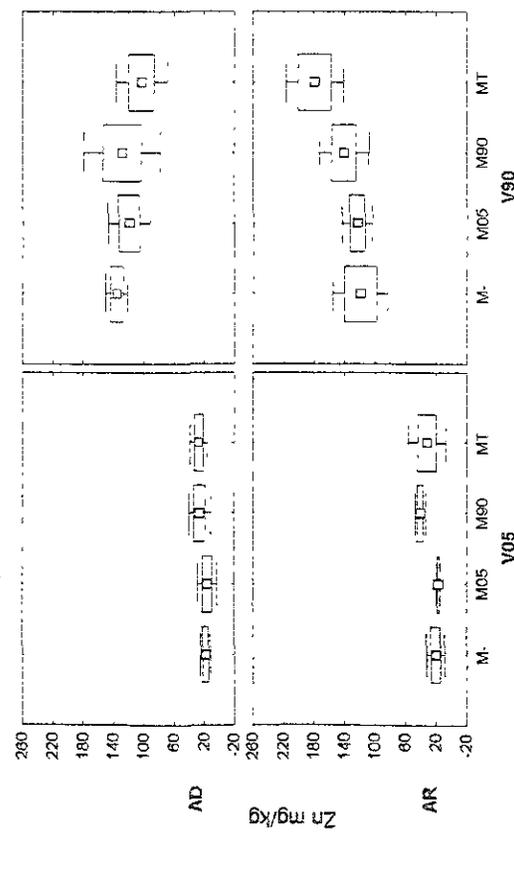


Figura 3. Concentraciones de zinc en el suelo (a) y en los tejidos (tallos, tallo y hoja) de plantas de maíz micorrizadas en Vertisoles regados durante 5 años (V05) y 90 años (V90) con aguas residuales y micorrizadas con diferentes inóculos provenientes de suelos nunca regados con aguas residuales ni cultivados agrícolaemente (MT), de suelos regados durante 5 años (M05), 90 años (M90) y el control sin inóculo micorrizico (M-). AD = riego con agua destilada, AR = riego con agua residual TODAS LAS PLANTAS QUE CRECHIERON EN LOS SUELOS V90, NO DESARROLLARON LA MICORRIZA

Tabla 2. Valores promedio de metales pesados totales (\pm d. e.) en el agua de riego aplicada en el experimento. El valor entre paréntesis corresponde a los de metales solubles.

Elemento (mg / kg)	Agua residual (mg/L)
Cd	0.0033 \pm 0.0015 (n. d.)
Cu	0.13 A73 0.036 (0.016 \pm 0.011)
Pb	0.08 \pm 0.06 (0.01 \pm 0.008)
Zn	0.37 \pm 0.16 (0.03 \pm 0.017)
P	40 (11)
	21 (23)* 83 (145)**

* Concentraciones antes y después () de su esterilización por radiación gamma en Vertisoles regados durante 5 años con agua residual.

Tabla 3. Probabilidad (p) (3 way ANOVA) para diferencias en la absorción de metales pesados y fósforo en los distintos tratamientos.

Elemento	RIEGO	SUELO	MICORRIZA
Cd	< 0.077	n. d.	< 0.496
Cu	< 0.951	< 0.000	< 0.446
Pb	< 0.821	< 0.000	< 0.142
Zn	< 0.915	< 0.000	< 0.645
P	< 0.074	< 0.000	< 0.000

n. d.= no determinado

Tabla 4. Valor de significancia de la translocación de metales pesados y fósforo en plantas de maíz.

Metal	R:T	R:H	T:H
Cd	suelo	suelo	n.s.
Cu	n s	suelo	suelo
Pb	n. s.	n. s.	n. s.
Zn	suelo	n. s.	n. s.
P	inóculo	inóculo	n. s.

n.s = no significativo; R = raíz, T= tallo, H = hoja

Las concentraciones iniciales de los metales totales y fósforo disponible en los suelos antes del cultivo y en las aguas de riego se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones de metales totales fueron las mismas después de la esterilización (datos no mostrados), aunque la disponibilidad del fósforo en los suelos regados por 90 años se incrementó en un 75 %. Gildon y Tinker (1983b) encontraron que la radiación gamma aumentaba ligeramente la disponibilidad de fósforo, pero la solubilidad del cobre era duplicada. Es posible también que la disponibilidad de metales pesados se haya igualmente visto incrementada. Las concentraciones iniciales de metales y fósforo en los dos tipos de suelo son marcadamente diferentes, siendo mayores del doble en aquellos regados por más de 90 años. La concentración de metales totales en el agua de riego fue similar a la indicada por Siebe y Cifuentes en 1995. Después del cultivo, los contenidos de metales y fósforo continuaron siendo mayores del doble en los suelos regados por 90 años, independientemente del tipo de riego con agua destilada o residual. Únicamente en el caso del Cd, los límites de detección (< 1.94 mg/kg) fueron inferiores para los suelos irrigados por 5 años, aún cuando se regaron con agua residual (Figura 1).

El contenido de casi todos los metales y el fósforo por los diferentes tejidos analizados (raíz, tallo y hoja) fue también aproximadamente del doble para las plantas que crecieron en los suelos regados durante más tiempo. En el caso del Pb (Figura 4), si bien su acumulación en los suelos regados por más de 90 años casi se ha triplicado, su traslocación por los tejidos de las plantas no fue significativamente mayor que en los suelos regados por 5 años, ni siquiera cuando éstos fueron regados con agua destilada. Algo similar ocurrió con el P, en donde las concentraciones en los tejidos de las plantas que recibieron el agua residual, fueron similares independientemente del tipo de suelo. Para el Cd, se encontraron en los suelos más contaminados, contenidos superiores en las partes aéreas de las plantas, que en las raíces y un efecto contrario en aquellas que crecieron en los suelos regados por un menor tiempo (con micorriza). Para el Cu y Pb se presentó una mayor acumulación en las raíces que en partes aéreas. El Zn y P se acumularon en mayor cantidad en los tallos. Las concentraciones de Cu en los tejidos fueron similares a las que quedaron en el suelo después del cultivo y para las de Pb, las concentraciones de las plantas fueron mucho menores que las encontradas en el suelo.

Las concentraciones de Zn en los tejidos fueron aproximadas a las que quedaron en los suelos. Debido a que el P es considerado un macronutriente, la cantidad total en los tejidos fue de varios órdenes de magnitud mayores que la del P disponible de los suelos.

El resultado del ANOVA para la mayoría de los metales (Tabla 3), mostró que las diferencias entre los tratamientos se debieron principalmente al tipo de suelo (o sea al tiempo bajo irrigación) y no al efecto del riego o del tipo de inóculo micorrízico (cuando lo hubo en V05), excepto para el fósforo, en el que las diferencias también estuvieron determinadas por el inóculo micorrízico (M⁺ vs. M⁻).

Por otro lado, se hicieron correlaciones generales entre la absorción de los elementos por los tejidos y su concentración en el suelo, mostrando nuevamente altos valores entre todos ellos ($Cd \geq 0.9$, $Cu \geq 0.8$, $Pb \geq 0.3$, $Zn \geq 0.75$ y $P \geq 0.65$). Este análisis confirmó lo observado para el Pb, en el que se obtuvo el más bajo valor de r (< 0.3) en los distintos tejidos. En relación con el riego, los valores para todos los metales también fueron débiles ($r < 0.3$), lo que nos permitió corroborar que el riego inmediato con agua residual no contribuye significativamente a una mayor absorción de estos elementos por los tejidos.

Las correlaciones entre el tipo de suelo y la translocación del Cd en los tallos y en las hojas guardaron una proporción directa con las concentraciones de los suelos en ambos casos. Una correlación positiva se dió entre el contenido de Cu por las hojas y los tallos y su concentración en los suelos regados por más tiempo. En el caso del Zn en los suelos más contaminados, el contenido en el tallo y las hojas se correlacionan positivamente con el del suelo, pero no así los contenidos en la raíz en donde la correlación fue inversamente proporcional a su concentración en el suelo. La translocación de Cd, Cu y Zn en los tejidos de las plantas fue diferente significativamente únicamente para el tipo de suelo y en general entre los tejidos de raíz y los de tallo, así como entre los de raíz y los de hoja (Tabla 4). Una vez más se observa que la translocación del Pb no fue significativamente distinta entre ningún tejido ni ningún tratamiento. Esto es curioso aunque su concentración en los suelos también se relaciona con el tiempo de irrigación, su absorción por las plantas de maíz no está relacionada ni con el tiempo de riego ni con el tipo de riego. Las correlaciones encontradas para este metal también indican que su

comportamiento es completamente diferente a la de los otros elementos como lo observado por Berthet et al. (1984a).

Es claro que el contenido de los contaminantes en los suelos aumenta por el riego con agua residual; el Cd, se encuentran debajo del límite de detección (1.94 mg kg^{-1}) en los suelos regados por un periodo de tiempo muy corto pero su concentración aumenta hasta 3.3 mg kg^{-1} después de 90 años bajo riego. Los incrementos en metales pesados totales y fósforo de los suelos así como los de los tejidos en los tratamientos correspondientes a los V90, demuestran que su acumulación se debe al tiempo de irrigación y no a la aplicación directa e inmediata del riego con agua residual durante un cultivo. Esto se puede apreciar más claramente después de haber aplicado cuatro riegos con agua residual en condiciones de invernadero. En contraste con los suelos que reciben lodos residuales, los suelos regados con agua residual no tratada necesitan de un largo periodo de tiempo para que los metales se acumulen en el (Berthet et al., 1984b). Sin embargo, a la vez se confirma nuevamente que la biodisponibilidad de estos contaminantes aumenta con relación a su acumulación en los suelos por el tiempo que han sido regados, así como el equilibrio que estos guarden con el suelo (Schirado et al., 1986; Siebe, 1995; Probert y Moody, 1998). Esto lo describió Siebe (1998) en los mismos suelos del Valle del Mezquital en donde encontró una relación proporcional entre la concentración de metales totales y los bio-disponibles.

2. Transferencia vía hongos micorrízicos arbusculares, de algunos metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) provenientes del riego con agua residual y su translocación, en un cultivo de maíz.

Los tratamientos en los que se pudo apreciar el efecto de la micorrización correspondieron únicamente a los suelos regados durante 5 años (V05). En estos tratamientos no se observaron diferencias significativas debidas al riego ni al tipo de inóculo que estuvieran relacionadas con las variables de número de hojas, número de nudos y diámetro de los tallos (Fig. 6a). Se observa que el riego con agua residual en invernadero produjo un ligero incremento en los pesos secos de las hojas, lo que también

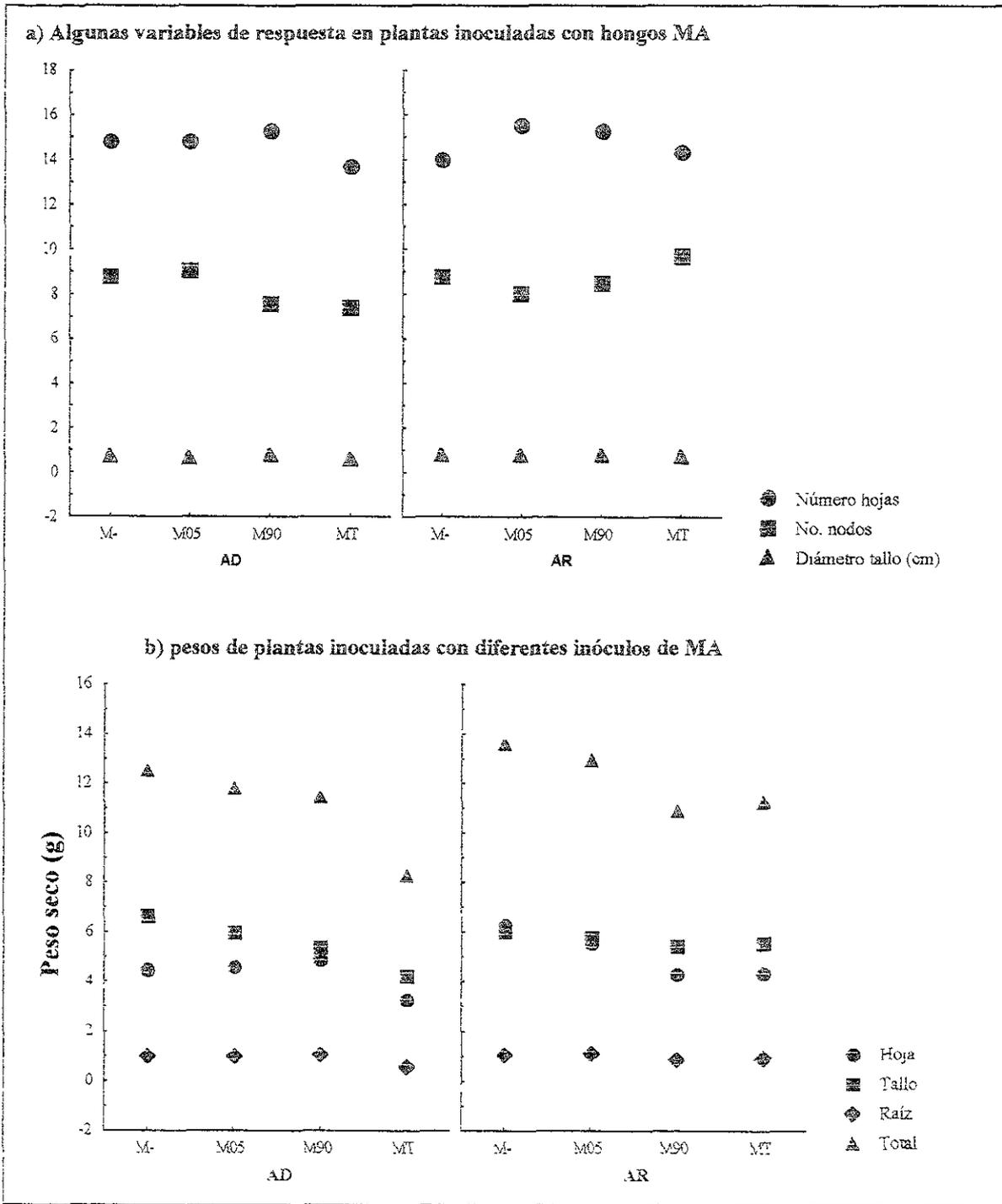


Figura 6. Variables de respuesta en plantas de maíz micorrizadas con distintos inóculos de hongos MA ($n=4$). M- = plantas sin micorriza, M05 = inóculo proveniente de Vertisoles regados durante 5 años con agua residual. M90 = inóculo de Vertisoles regados durante más de 90 años. MT = inóculo de vegetación natural nunca regada ni cultivada agrícolamente.

se refleja en los pesos secos totales (Fig. 6b). Para cada una de las estructuras (hoja, tallo y raíz) se observó que los mayores pesos correspondieron a las plantas no micorrizadas. Esta disminución fue diferente según el origen del inóculo: el proveniente de vegetación natural (MT) fue el que produjo una mayor reducción ($p < 0.05$). Este decremento en los pesos secos en las plantas micorrizadas puede deberse a un efecto costo-beneficio de la simbiosis que puede no verse reflejado en la altura, el diámetro de los tallos ó el número de hojas. Esto se ha observado a menudo en otros cultivos e inclusive en plantas sometidas a deposiciones ácidas (Killham y Firestone, 1983). Es interesante que el inóculo MT que nunca estuvo sometido a la influencia del cultivo, fuera el que hiciera más notorio este efecto. Factores como el cambio de hospedero y su estacionalidad o el riego constante, podrían estar estimulando el desarrollo de los hongos de este inóculo, en comparación a las condiciones fisiológicas perennes en las que se desarrollan sus hospederos naturales, ya que fueron aislados de plantas de mezquite y maguey. Esto también se adjudica al aumento en la esporulación y en la colonización de las raíces en comparación al inóculo inicial de campo (datos no mostrados). Algo similar ocurre con el aislado M90, en el que igualmente se observó un aumento en su esporulación debido quizás a una disminución de las condiciones de contaminación del suelo (ver capítulo I).

Por otro lado, se encontró una relación positiva directamente proporcional entre el porcentaje de colonización en las raíces y la abundancia de esporas producidas en los suelos (Figura 7a). Aún con esta concordancia, el peso seco de las raíces no presenta ninguna relación con el porcentaje de colonización (Fig. 7b). Tanto la abundancia de esporas, como los porcentajes de colonización están más relacionados con la procedencia del inóculo que con el riego con agua residual (Figs. 8 a y b).

Las diferencias significativas en la transferencia de metales y fósforo, se presentaron únicamente para la absorción de Cu y de P (Tabla 5). Gildon y Tinker concluyeron desde 1983 que la dinámica de absorción del Cu es muy semejante a la del fósforo. Este elemento tiende a formar complejos muy estables con la materia orgánica del suelo y es muy poco disponible, al igual que el fósforo. Como lo observado anteriormente para las plantas no micorrizadas, tampoco hubo diferencias atribuibles al riego para ninguno de los elementos. La concentración de fósforo fue mayor en las raíces de las plantas

Tabla 5. Valor de probabilidad (2 way ANOVA) para diferencias entre los tipos de inóculo (M-, M05, M90 y MT) y el riego con agua destilada o residual.

Elemento	MICORRIZA	RIEGO
Cd	< 0.870	< 0.576
Cu	< 0.040	< 0.489
Pb	< 0.163	< 0.800
Zn	< 0.235	< 0.767
P	< 0.015	< 0.157

Tabla 6. Prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) entre los aislados micorrízicos y la absorción de metales y fósforo.

Elemento	Tejido	Inóculo
Cd	Raíz	M- vs. M90 *
Cu	Raíz	M- vs. M90 **
		M05 vs. M90 **
		M90 vs. MT **
Pb	Raíz	M- vs. M90 *
		M05 vs. M90 **
Zn	Raíz	M- vs. M90 *
		M05 vs. M90 *
P	Hoja	M- vs. M90 *
	Raíz	M- vs. M05 *
		M- vs. M90 **
		M- vs. MT **
	Tallo	M- vs. M05 *

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Tabla 7. Valores medios de colonización (%) y no. de esporas (100 g) de los diferentes inóculos de HMA después de su propagación en plantas de maíz. ($n = 8 \pm e. s.$)

Aislado	esporas	colonización
M-	0 ± 0	0 ± 0
M05	318 ± 72	30 ± 7
M90	510 ± 171	51 ± 5
MT	1907 ± 516	57 ± 11

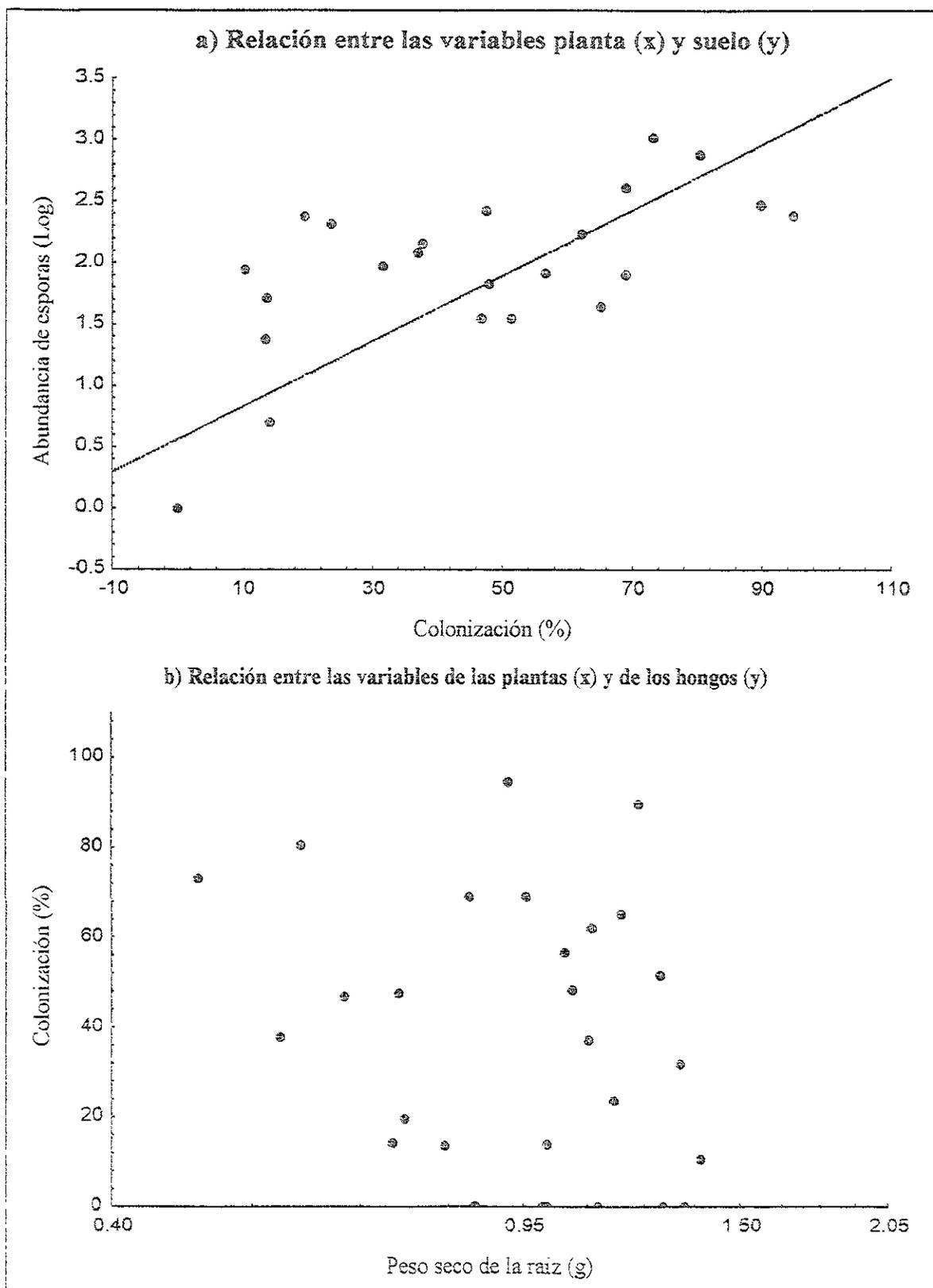


Figura 7. Correlación entre el porcentaje de colonización de raíces de maíz micorrizadas y el número de esporas en el suelo (a). Correspondencia entre el porcentaje de colonización de las raíces y su peso seco (b).

micorrizadas, sirviendo éstas como un órgano de reserva de este elemento. Debido a esto, hubo una mayor translocación en los tejidos raíz-tallo y raíz-hoja en las plantas no micorrizadas (Fig. 10), por lo que fueron diferentes significativamente del resto de los aislados al nivel de la raíz, principalmente para el inóculo M05. La translocación tallo-hoja fue similar en todos los casos. Sin embargo, cuando el riego se hizo con agua destilada, estas diferencias se hicieron mucho más evidentes, lo que confirma una vez más, la contribución de los hongos MA en la absorción del fósforo del reservorio del suelo (Cui y Caldwell, 1996).

Las pruebas de mínimas diferencias significativas (Tabla 6) muestran que aún cuando no hubo diferencias en los contenidos de Cd a nivel de la raíz, las plantas no micorrizadas absorbieron más de este elemento en este tejido (Fig. 9) En el caso del Cu, las diferencias se presentaron entre el inóculo M90 y el resto de los inóculos ($p < 0.05$). En el caso del Pb, se dió la mayor absorción en las plantas micorrizadas con este mismo inóculo (M90) a nivel de suelo ($p < 0.05$) (datos no mostrados) y entre las plantas no micorrizadas y el inóculo M05 a nivel de la raíz ($p < 0.05$). La absorción de Zn únicamente presentó diferencias a nivel de la raíz entre el inóculo M90 y el M05 ($p < 0.05$). Finalmente para el P, las diferencias se presentaron entre los inóculos M90 y MT a nivel de raíz ($p < 0.01$) y en el tallo entre las no micorrizadas y el inóculo M05 ($p < 0.01$) y entre los inóculos M05 y M90 ($p < 0.05$).

Finalmente, se analizaron las correlaciones entre los porcentajes de colonización de las plantas y su correspondiente absorción de metales y fósforo en las raíces (Fig. 11). Esto nos permitió confirmar que hay una tendencia negativa en la absorción de Cd y el porcentaje de colonización mientras que para la absorción de Zn y P esta tendencia fue positiva. Gildon y Tinker (1983b) encuentran también una relación negativa entre el porcentaje de colonización y la concentración de Cd y Zn en el suelo. Para el caso del Cu y del Pb, no se pudo detectar ninguna relación con la colonización radical en este estudio a pesar que de la absorción del primero se incrementó por las simbiosis MA. Esto confirma la eficiencia en la absorción del inóculo M90, el cual sin tener la mayor colonización transfirió la mayor cantidad de este metal (algunas ilustraciones de la colonización en este aislado se muestran en la Figura 3 del Anexo 2). Weissenhorn et al.

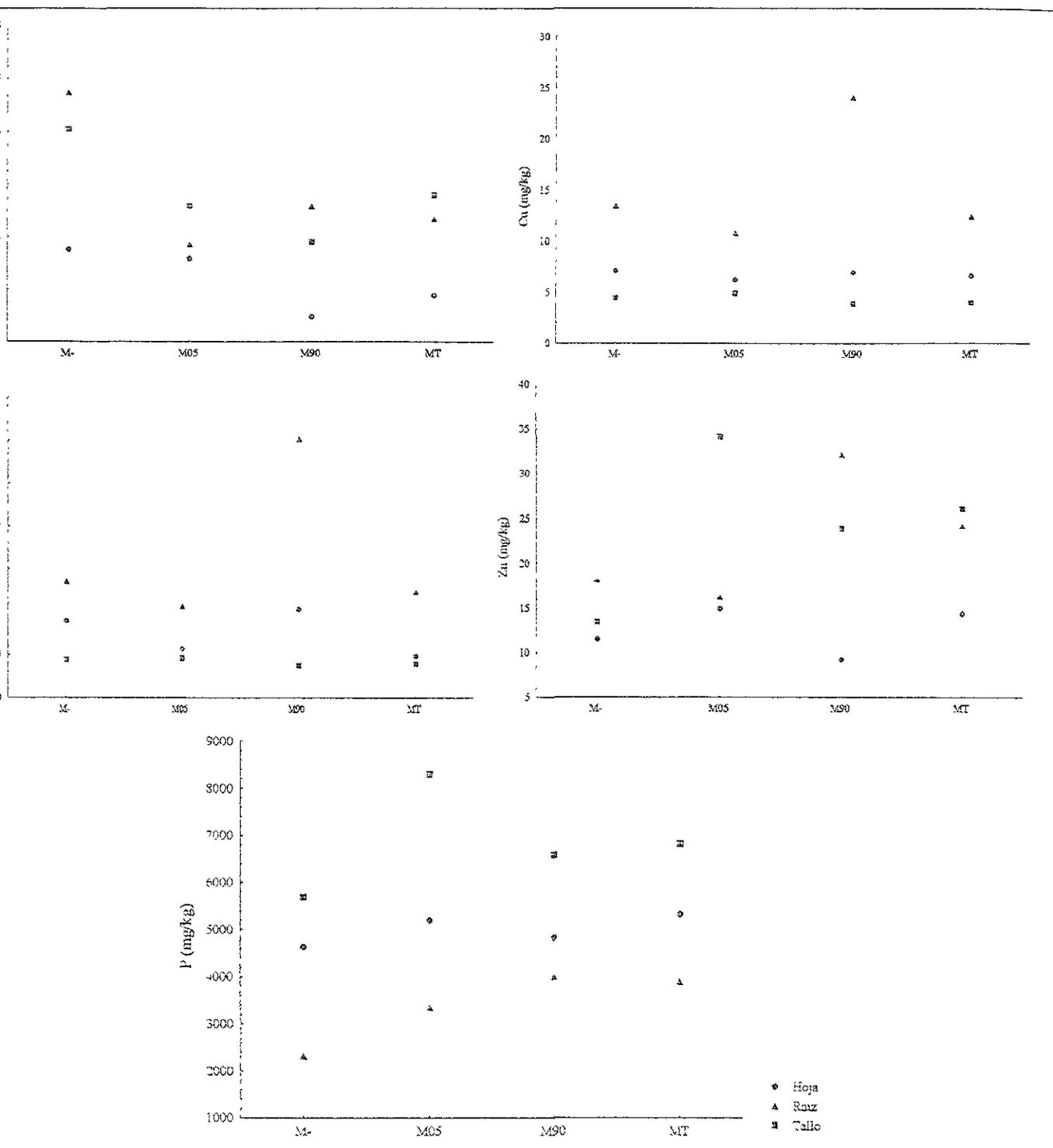


Figura 9. Absorción de metales pesados y fósforo (mg/kg) por diferentes inóculos de MA. M- = tratamientos sin micorriza, M05 = tratamientos con un inóculo proveniente de suelos regados durante 5 años con aguas residuales, M90 = inóculo de suelos regados durante más de 90 años, MT = inóculo de suelos que no han sido regados ni cultivados agrícola-mente.

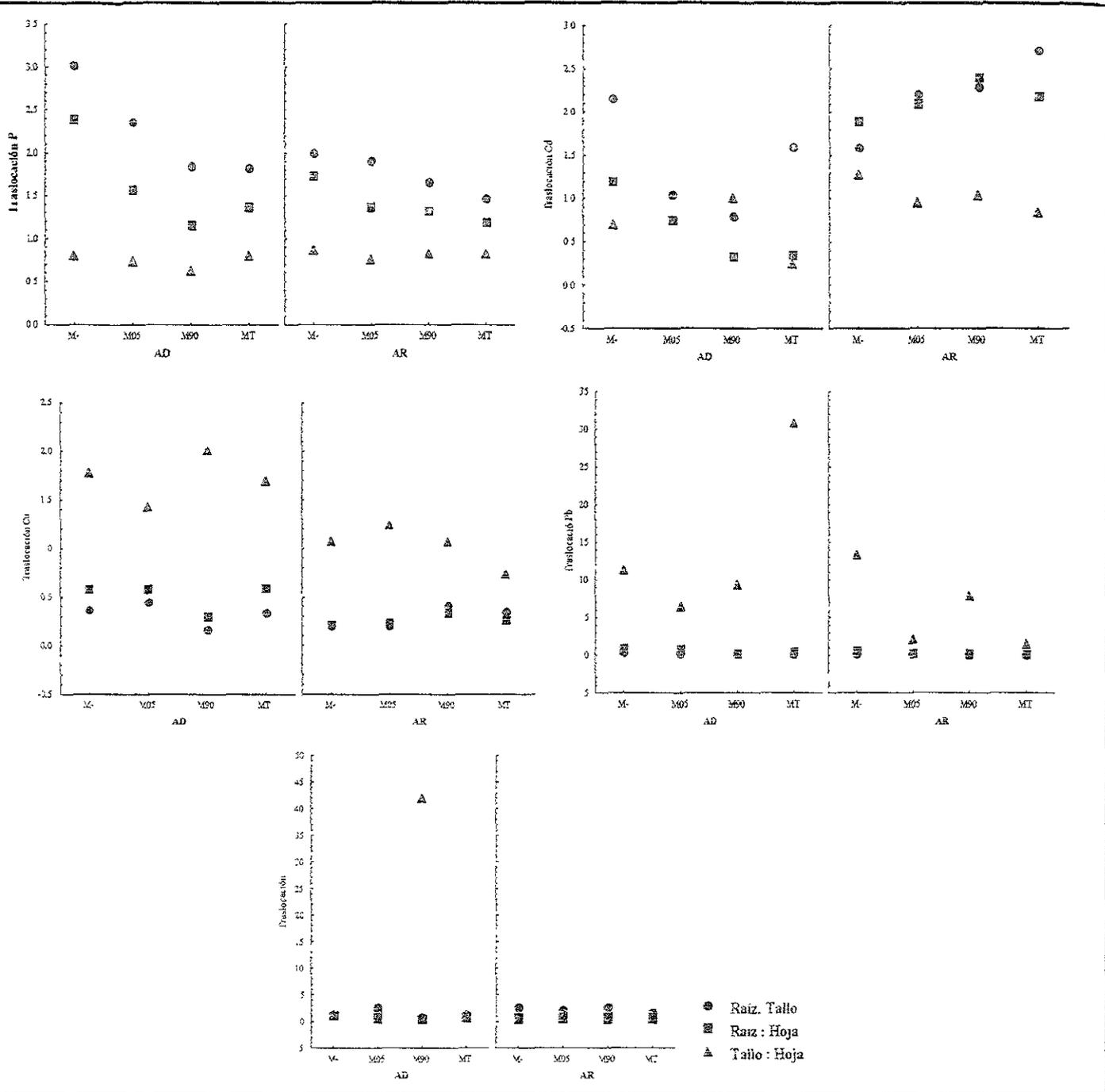


Figura 10. Valores absolutos de traslocación de metales pesados en un cultivo de maíz por diferentes inóculos de hongos MA (M05, M90 y MT) en relación a plantas no micorrizadas (M-). R-T = translocación raíz versus tallo, R-H = raíz versus hoja y T-H = tallo versus hoja. DW = agua destilada, WW = agua residual.

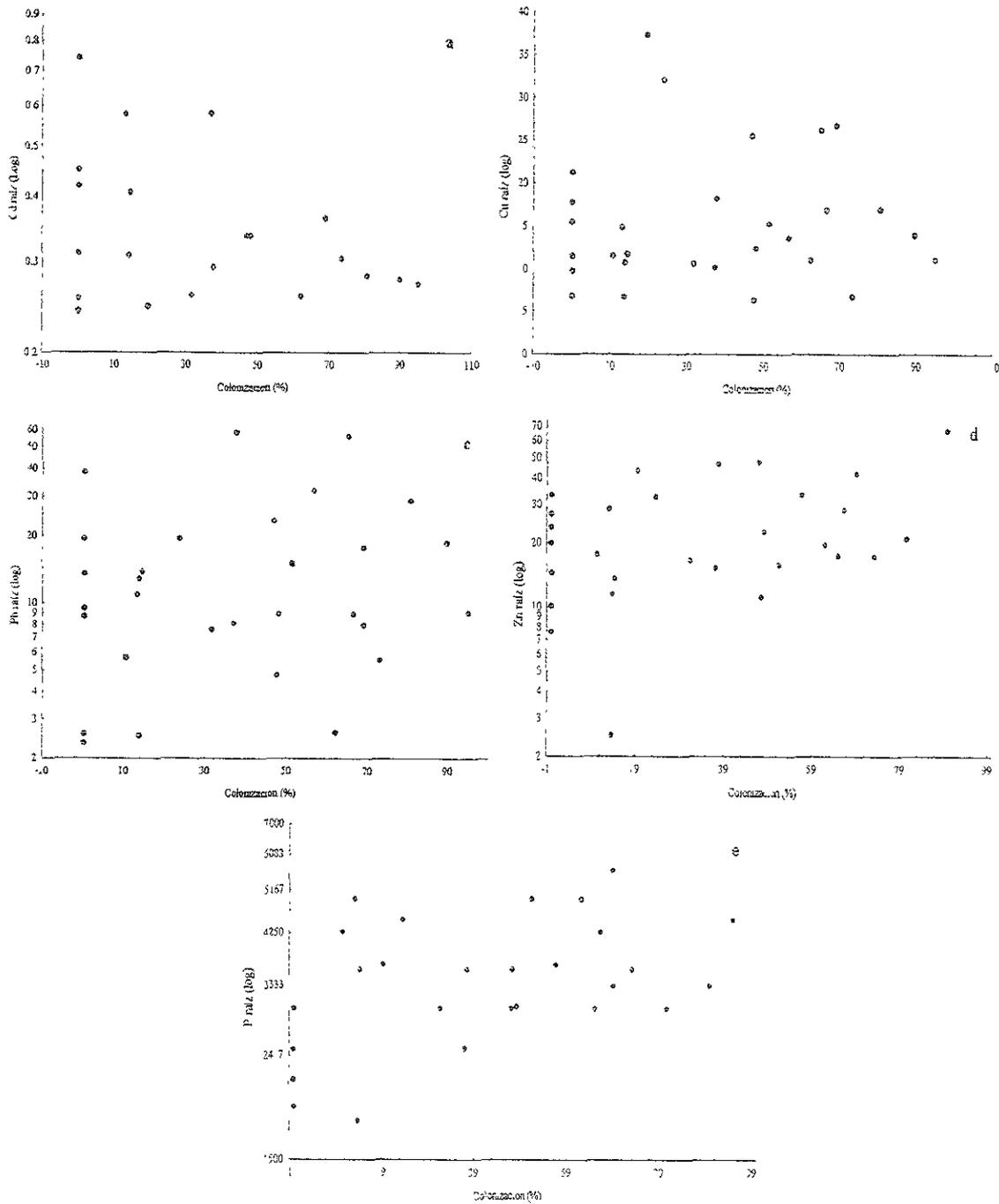


Figura 11. Relación entre los porcentajes de colonización de plantas micorrizadas y su concentración de metales pesados y fósforo en raíces de plantas de maíz. a) Log Cd, b) Log Cu, c) Log Pb, d) Log Zn, e) Log P

(1995 b y c) tampoco observaron un efecto de las simbiosis en la acumulación y transferencia del plomo en plantas de maíz en dosis bajas o elevadas.

Las plantas que más transfirieron fósforo (Fig. 9) fueron efectivamente las que mayor colonización tuvieron (Fig. 8b) y que correspondieron al inóculo MT. Esto concuerda con lo observado por Hernández et al. (2000), quienes encuentran una relación directa entre la absorción de P y la cantidad de arbusculos en las raíces. Sin embargo, esto no fue así en el caso del Zn en donde las plantas que mayor colonización tuvieron fueron las que absorbieron cantidades intermedias de este metal (Fig. 10) y que corresponden a las micorrizadas con el inóculo MT. Guo et al. (1996) y Fidelibus et al. (2001) observan que el origen geográfico de los inóculos puede estar relacionado con su efectividad. Heijden y Kuyper (2001) argumentan que esta capacidad de translocar los nutrimentos por los hongos MA se debe atribuir más al propio metabolismo de las plantas que a un efecto de los inóculos micorrízicos. Por tanto, sería interesante demostrar la capacidad de estos inóculos en otros cultivos.

Las pruebas de significancia para las concentraciones de los distintos metales en los tejidos (Tabla 6) indican que las plantas micorrizadas con el inóculo M90 a nivel de la raíz fueron diferentes significativamente a las plantas no micorrizadas. Esto fue evidente para la absorción del Cu. En relación con los otros tejidos, únicamente se observa una diferencia en la transferencia del Zn por este inóculo. También se presentaron diferencias significativas entre este inóculo y el de los suelos regados por 5 años en la transferencia de Cu, Pb y Zn. Weissenhorn et al. (1995c) y Guo et al. (1996) encontraron de igual manera, una mayor acumulación de Cu y Zn en plantas de maíz micorrizadas. Brune et al. (1995) encontraron en *Hordeum vulgare* una mayor translocación de Cd y Zn en las partes aéreas. La composición de las especies de los diferentes inóculos puede ser la causa de estas diferencias. Recientemente (2001) Purakayastha y Chhonkar observaron que plantas de arroz inoculadas con *Glomus etunicatum* fueron mucho más efectivas en la captación de Zn que las no micorrizadas.

Es necesario precisar que las concentraciones de metales pesados en los suelos de este estudio en los que ocurrió la micorrización, no fueron lo suficientemente elevadas para que fueran consideradas como tóxicas. Las concentraciones de Zn y Cu se

encontraron dentro del intervalo considerado como suficiente para la nutrición de los cultivos (Kabata-Pendias y Pendias, 1992). Liu et al. (2000) encontraron que la contribución de la micorriza arbuscular en la absorción de micronutrientes era altamente significativa para el Zn, Cu, Fe y Mn en plantas de maíz. Tal es el caso del inóculo M90 en este estudio, que pudo estar favoreciendo la absorción de micronutrientes, pero a su vez, ejerciendo un efecto protector en la traslocación del Cd (Rickner y Höfner, 1996; Grant et al., 1998). El hecho de que no haya diferencias significativas a nivel de los inóculos en relación a la adquisición de fósforo, pero sí en relación a la absorción de metales, indica que la transferencia de estos últimos no está relacionada al estatus nutricional de la planta, como lo argumentaron Haselwandter et al. (1994). Esto se confirma además, con el hecho de que el efecto de este inóculo no es significativo en ningún otro parámetro de crecimiento como peso fresco, seco, altura, etc. ni siquiera en el porcentaje de colonización como Enkhtuya et al. (2000) argumentan.

3. Efecto de la contaminación por agua residual en la aclimatación de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de Vertisoles irrigados durante 5 y más de 90 años.

Debido a que no se pudo observar el comportamiento de los diferentes inóculos en los suelos más contaminados, resulta difícil diagnosticar si existe o no una clara adaptación fisiológica de los hongos MA a un tiempo prolongado de riego con aguas residuales. Los valores promedio de abundancia de esporas analizados en estudios de campo fueron similares a los encontrados para el inóculo V05 pero mucho mayores para los de los suelos V90 (Tabla 7). El impacto directo producido por el riego en los suelos recientemente irrigados con agua residual no es significativo y pudiera estar causando, inclusive, un efecto estimulador. Esto se observó en el potencial colonizador del suelo en tiempos intermedios de irrigación (sección 3 del capítulo I). En este estudio se observó principalmente en el inóculo MT que nunca había sido expuesto al riego (Figs. 8 a y b), en donde se encontró una abundancia cercana a las 2 000 esporas por 100 g de suelo. Esta cantidad no tiene ninguna relación con la abundancia original de campo (menos de 100

esporas por 100 g de suelo). Es probable que esta esporulación masiva se deba al hecho de que el inóculo provino de plantas perennes, en donde la densidad esporal de los suelos es naturalmente muy baja, aunado al efecto confinador observado en la propagación en maceta de los hongos MA. El cambio de hospedero y de estacionalidad y de manejo y del régimen nutrimental proporcionado por el riego, pudieron ser las causas de esta estimulación (Collins et al., 1992). Algo similar ocurrió para el inóculo M90 que fue propagado bajo condiciones de menor disponibilidad de P de las que provenía. Como se discutió anteriormente, el contenido de carbohidratos de las raíces de las plantas cuando crecen en condiciones de poca disponibilidad de este elemento, estimula la esporulación.

Por otro lado, los morfotipos que se encontraron fueron muy similares para todos los inóculos, predominando las especies *Glomus mosseae*, *Glomus claroideum* y *Glomus aggregatum* (*intraradices*). La presencia universal de estas especies en suelos cultivados, así como en suelos contaminados, nos permite confirmar que son especies altamente resistentes a las condiciones de disturbio y comunes a la mayoría de los suelos cultivados en el mundo (Pawlowska et al., 2000). Otras morfoespecies también se presentaron con mucha menor abundancia o no se encontraron de manera uniforme, por lo que no fueron consideradas para los estudios de adaptación (ver Anexo 3).

El incremento en la colonización de las raíces correspondió del mismo modo a un aumento en la esporulación (Fig. 7 a) y los distintos morfotipos encontrados estuvieron casi igualmente representados en todos los aislados y tratamientos. Es por esto que las diferencias en la esporulación pudieran atribuirse más a un efecto de los tratamientos que de las especies que colonizan estas raíces. Algunas de las posibles respuestas en la adaptación de los hongos al riego con agua residual se esquematizan en la figura 12. Tres son las posibles respuestas que se representan en esta figura, entre muchas otras, como resultado de la exposición de los hongos MA a esta contaminación: la disminución de la abundancia y / o de la diversidad de las especies de los suelos menos contaminados cuando se han expuesto a condiciones de mayor contaminación y *viceversa* (casos *a* y *c*, respectivamente). El tercer caso (caso *b*) es que no se presenten cambios ni en la abundancia o en la diversidad cuando uno de los inóculos son propagados en las mismas condiciones de contaminación. De este modo, el caso *a* corresponde al inóculo M90 en el que se cuantificó un incremento en su abundancia cuando se propagó en los suelos V05

de menor contaminación. El caso *b* corresponde al inóculo M05 que se mantuvo sin cambios significativos en su abundancia después de haber sido propagado en las mismas condiciones de contaminación. El caso *c* correspondería a una disminución en la abundancia de los hongo al ser propagados en condiciones de mayor contaminación. Este correspondería al aislado MT en el que este efecto no pudo ser apreciado debido a que las concentraciones de contaminantes en los suelos V05 no son lo suficientemente elevadas para causar este efecto, sino contrariamente, se ha discutido que causan un efecto estimulador en estos suelos (Waaland y Allen, 1987).

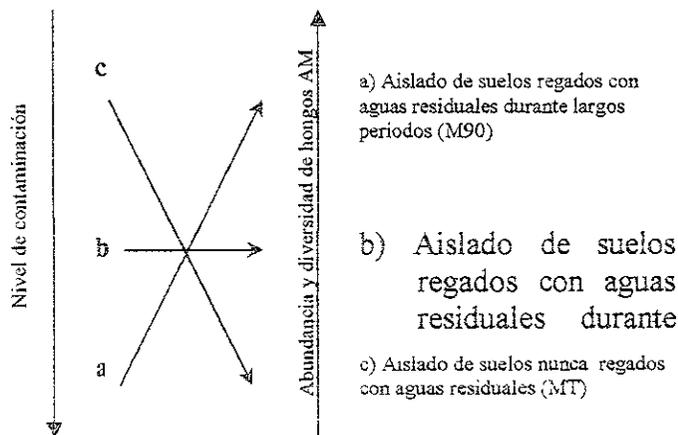


Figura 12. Algunas posibles respuestas de la adaptación de los hongos AM al riego con aguas residuales en el Valle del Mezquital en México

Conclusiones

La transferencia de fósforo y metales pesados en el maíz cultivado en Vertisoles irrigados durante 5 y más de 90 años con agua residual en el Distrito de Riego 03 fue mayor en las plantas que crecieron en los más regados por el mayor tiempo debido a su acumulación en los mismos. Como una consecuencia, las plantas que crecieron en estos suelos presentaron un menor desarrollo.

Sin embargo, después de cuatro aplicaciones, el aporte de fósforo y de metales por el riego con agua residual, no causa efectos significativos para el desarrollo del cultivo, ni un aumento en la concentración de estos elementos en los tejidos o algún efecto en la abundancia esporal y colonización de la micorrización arbuscular.

El aumento en la disponibilidad del fósforo (en un 75 %) debido a la radiación gama en los suelos regados por más de 90 años pudo ser la causa más probable de la inhibición de la micorrización en todos los tratamientos que recibieron inóculo en este suelo. Existen otras posibilidades como que la radiación cause otras modificaciones químicas que tengan un impacto negativo en la estas simbiosis.

En los suelos regados durante aproximadamente 5 años con aguas residuales, los hongos MA contribuyen a una mayor transferencia (absorción) de algunos elementos como el Cu, Pb, Zn y fósforo en este cultivo. Además, se observó que las plantas micorrizadas presentan una menor biomasa en su peso seco.

Los distintos inóculos de hongos MA tienen una capacidad diferente de transferir estos elementos, siendo el originario de los suelos regados por mayor tiempo (inóculo M90), el más eficaz en la transferencia de todos estos elementos. Los aislados nunca sometidos al riego con agua residual, o sometidos durante poco tiempo (5 años aproximadamente) presentaron capacidades similares de translocación.

Es posible que una disminución o mantenimiento de las condiciones de estrés producidas por los niveles de contaminación a los que fueron expuestos los distintos inóculos en este diseño experimental, ejerzan un efecto estimulador en la abundancia de

esporas cuando hay una disminución y ningún efecto aparente cuando éstas condiciones se mantienen.

En este estudio se confirma que *Glomus mosseae* y *Glomus aggregatum*, son especies altamente resistentes a las condiciones de contaminación que prevalecen en estos suelos, particularmente a las elevadas concentraciones de fósforo. La ubicuidad de *G. mosseae* en todos los estudios realizados hasta ahora (ver Lámina I y figura 3 del Anexo 3) muestra que ésta es una especie ideal para estudiar los mecanismos fisiológicos y genéticos por los que los hongos MA son resistentes o posiblemente se adaptan a la contaminación por el riego con agua residual.

Literatura citada

- Berthet B., C. Amiard-Triquet, C. Metayer, J. C. Amiard. 1984a. Étude des voies de transfert du plomb de l'environnement aux végétaux cultivés; application à l'utilisation agricole de boues de station d'épuration. *Water, Air, and Soil Pollution* **21**: 447-460.
- Berthet B., C. Metayer, J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet. 1984b. Étude de la forme physico-chimique et de la biodisponibilité du cuivre dans des systèmes culturaux expérimentaux; application à l'utilisation agricole de boues de station d'épuration. *Water, Air and Soil Pollution* **23**: 293-307.
- Brune A., W. Urbach, K. J. Dietz. 1995. Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmatic compartementation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn- stress. *New Phytol.* **129**: 403-409.
- Bürkert B., A. Robson. 1994. ⁶⁵Zn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root-free sandy soil. *Soil Biol. Biochem.* **26**(9): 117-1124.
- Campbell H. W. 2000 Sludge management – future issues and trends. *Water Science and Tech.* **41** (8): 1-8.
- Collins N., D. Tilman, D. Wedin. 1992. Plant and soil controls on mycorrhizal fungal communities. *Ecology* **73** (6): 2034-2042.
- Cui M., M. M. Caldwell. 1996. Facilitation of plant phosphate acquisition by arbuscular mycorrhizas from enriched soil patches. II. Hyphal exploiting root-free soil. *New Phytol.* **133**. 461-467.

- Das P., S. Samantaray, G. R. Rout. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environm. Poll.* **98** (1) 29-36.
- Díaz G., C. Azcón-Aguilar, M. Honrubia. 1996. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant and Soil* **180**: 241-249.
- Domsch K. H. 1984. Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. *Plant and Soil* **76**: 367-378.
- Enkhtuya B., J. Rydlová, M. Vosátka. 2000. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. *Applied Soil Ecol.* **14**: 201-211.
- Fidelibus M. W., C. A. Martin, J. C. Stutz. 2001. Geographic isolates of *Glomus* increase root growth and whole-plant transpiration of Citrus seedlings grown with high phosphorous. *Mycorrhiza* **10** (5) 231-236.
- Gildon A., P. B. Tinker. 1983a. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **95**: 247-261.
- Gildon A., P. B. Tinker. 1983b. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. II. The effects of infection on uptake of copper. *New Phytol.* **95**: 263-268.
- Giller K. E., S. P. McGrath. 1988. Pollution by toxic metals on agricultural soils. *Nature* **335** (20): 676.
- Giller K. E., E. Witter, S. McGrath. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil. Biol. Biochem.* **30** (10/11): 1389-1414
- Grant C. A., W. T. Buckley, L. D. Bailey, F. Selles. 1998. Cadmium accumulation in crops. *Can. J. Plant Sci.* **78**. 1-17
- González-Chávez M. C. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi from As/Cu polluted soils. Contribution to plant tolerance and importance of the external mycelium. Tesis Doctoral, University of Reading, U. K. 219 p.
- Guo Y., E. George, H. Marschner. 1996. Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of Cadmium and nickel in bean and maize plants. *Plant and Soil* **184** 195-205
- Haselwandter K., C. Leyval, F. S. Sanders. 1994. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on plant uptake of heavy metals and radionucleotides from soil. In: Gianinazzi S., H.

- Schuepp. (Eds.), *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Pp. 179/189. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Heijden Van de E. W., T. W. Kuyper. 2001. Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis? *Plant and Soil* **230** (2): 161-174.
- Hernández G., G. Cuenca, A. García. 2000. Behaviour of arbuscular mycorrhizal fungi on *Vigna luteola* growth and its effect on the exchangeable (^{32}P) phosphorous of soil. *Biol. Fert. Soils* **31**: 232-236.
- Jackson, M. L. 1958. *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Juwarkar A., S. A. Dutta, R. A. Pandey. 1988. Impact of domestic wastewater on soil microbial populations. *Water, Air and Soil Pollution* **39**: 169-177.
- Kabata-Pendias A., H. Pendias. 1992. *Trace elements in soils and plants*. 2nd. Edition. CRC Press, Florida, U S. A.
- Kelley W. D., T. W. Simpson, R. B. Reneau, Jr. G. D. McCart, D. C. Martens. 1984. Perception of technical personnel on research and education needs for land application of sewage sludge. *Water, Air and Soil Pollution* **22**: 181-185.
- Killham K., K. Firestone. 1983. Vesicular-arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. *Plant and Soil* **72**: 39-48.
- Languereau-Leman F. 1999. *La tolérance aux métaux lourds d'Arrhenatherum elatius (L.) Beauv. Ex J. & C. Presl*. Tesis doctoral, Université de Lille 2. 165 p.
- Liu A., C. Hamel, R. I. Hamilton, B. L. Ma. D L. Smith. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* **9**: 331-336.
- Manjunath A., M. Habte. 1988. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and the uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*. *Plant and Soil* **106**: 97-103.
- Maldonado-Mendoza I. E., G. R. Dewbre, M. J. Harrison. S. F. A phosphate transporter gene (*GiPT*) from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, is regulated in response to phosphate in the environment. En prensa.
- Marschner H., B. Dell. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**: 89-102.

- Miller R. W., M. L. Al-Khazraji, D. R. Sisson, D. T. Gardiner. 1995a. Alfalfa growth and absorption of cadmium and zinc from soils amended with sewage sludge. *Agric. Ecosyst. & Environm.* **53**: 179-184.
- Miller R. W., A. S. Azzari, D. T. Gradiner. 1995b. Heavy metals in crops as affected by soil types and sewage sludge rates. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **26** (5&6): 703-711.
- Moore P. D. 1988. Essential elements from waste. *Nature* **333**: 706.
- Morel J. L. 1985. Contribution à l'étude des transferts de métaux lourds dans le système sol-plante: le rôle des mucilages racinaires. *C. R. Acad. Agr. de France* **71** (10): 1121-1122.
- Munyanziza E., H. K. Kehri, D. J. Bagyaraj. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agro-ecosystem function in the tropics: the role of mycorrhiza in crops and trees. *Applied Soil Ecol.* **6**: 77-85.
- Ortega-Larrocea M. P., C. Siebe, G. Bécard, I. Méndez, R. Webster. 2001. Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. *Appl. Soil Ecology* **16**: 149-157.
- Pawlowska T. E., R. L. Chaney, M. Chin, I. Charvat. 2000. Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal-contaminated landfill. *Applied & Environm. Microbiol.* **66** (6): 2526-2530.
- Probert M. E., P. W. Moody. 1998. Relating phosphorous quantity, intensity, and buffer capacity to phosphorus uptake. *Aust. J. Soil Res.* **36**: 389-393
- Purakayastha T. J., Chhonkar P. K. 2001. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus etunicatum* L.) on mobilization of zinc in wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Biology and Fertility of soils* **33** (4): 323-327.
- Raghothama K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 665-693.
- Raju P. S., B. Clark, J. R. Ellis, J. W. Maranville. 1990. Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. *Plant and soil* **121**: 165-170.
- Rickner B., W. Höfner. 1996. Bedeutung der arbuskulären Mykorrhiza (AM) für die Schwermetalltoleranz von Luzerne (*Medicago sativa* L.) und Hafer (*Avena sativa* L.) auf einem klärschlammgedüngten Boden. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **159**: 189-194.

- Sadiq M. 1985. Uptake of cadmium, lead and nickel by corn grown in contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution* **26**: 185-190.
- Schachtman D. P., R. J. Reid, S. M. Ayling. 1998. Phosphorous uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* **116**: 447-453.
- Schirado T., I. Vergara, E. B. Schalscha y P. F. Pratt. 1986. *J. Environm. Qual.* **5** (1):9-12.
- Sharpley A. N., S. Rekolainen. 1998. Phosphorous in agriculture and its environmental implications. In: H. Tuney, O. T. Carton, P. C. Brookers, A. E. Johnston. Eds. Pp. 1 – 53. *Phosphorus Loss from Soil to Water*. CAB International. 467 p.
- Shetty K. G., B. A. D. Hetrick, A. P. Schwab. 1995. Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. *Environm. Poll.* **88**: 307-314.
- Sibbesen E., A. N. Sharpley. 1998. Setting and justifying upper critical limits for phosphorous in soils. In: H. Tuney, O. T. Carton, P. C. Brookers, A. E. Johnston. Eds. Pp. 151 – 175. *Phosphorus Loss from Soil to Water*. CAB International. 467 p.
- Siebe C. 1995 Heavy metal availability to plants in soils irrigated with wastewater from Mexico City. *Water Sci. Technol.* **12**: 29-34.
- Siebe C., E. Cifuentes. 1995. Environmental impact of wastewater irrigation in Central Mexico: an overview. *Inter. J. Environm. Health Res.* **5**: 161-173.
- Siebe C. 1998. Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. *Soil Use Manage.* **14**: 119-122.
- Smith C. J., P. Hopmans, F. J. Cook. 1996. Accumulation of Cr, Pb, Cu, Ni, Zn, and Cd in soil following irrigation with treated urban effluent in Australia. *Environm. Poll.* **94** (3): 317-323.
- Suzuki H., H. Kumagai, K. Oohashi, K. Sakamoto, K. Inubushi, S. Enomoto. 2001. Transport of trace elements through the hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus into marigold determined by the multitracer technique. *Soil Science and Plant Nutrition* **47** (1): 131-137
- Tsadilas C. D., T. Matsi, N. Barbayiannis, D. Dimoyiannis. 1995. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **26** (15&16): 2603-2619
- U. S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. *Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge*. USEPA. Ohio. 152 p.

- Weissenhorn I., M. Mench, C. Leyval. 1995. Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge amended sandy soil. *Soil Biol. and Biochem.* 27: 287-296.
- Weissenhorn I., C. Leyval, J. Bertelin. 1995 b. Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in a soil polluted by atmospheric deposition from a smelter. *Biol. Fert. Soils* 19: 22-28.
- Weissenhorn I., C. Leyval, G. Belgy, J. Bertelin. 1995 c. Arbuscular mycorrhizal (AM) contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5: 245-251.
- Williams D. E., J. Vlamis, A. H. Pukite, J. E. Corey. 1984. Metal movement in sludge-treated soils after six years of sludge addition: 1. Cadmium, copper, lead, and zinc. *Soil Science* 137 (5): 351-359

CAPITULO TRES. ESTUDIOS EN LABORATORIO

Variabilidad genética en distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares sometidos a distintos periodos de cultivo con aguas residuales.

1. Introducción. Técnicas moleculares en el estudio de la variabilidad de la micorriza arbuscular. 110
2. Análisis de la variabilidad de la región M13 de diferentes cultivos de *Glomus mosseae* (hongo micorrízico arbuscular) proveniente de suelos regados con aguas residuales. 117

1. Técnicas moleculares en el estudio de la variabilidad de HMA.

La taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares ha sido una controversia (*Glomomycota* Schuessler et al., 2001). Su clasificación hasta el año 2000 se ha basado en caracteres morfológicos de las estructuras de resistencia como las esporas (Zigomicetes). Estas estructuras pueden presentarse dentro de una especie, en una amplia gama de variedades e inclusive ser dimórficas bajo circunstancias aún inespecíficas, por ejemplo dos esporas maduras de la misma especie de tamaño y aspecto muy distintos (Walker y Trappe, 1993). Dentro de los principales problemas por los que no se ha logrado desarrollar una filogenia natural para la taxonomía de este grupo están el que se desconoce su fase sexual si es que la presentan y, su cultivo axénico no ha podido ser logrado.

Las técnicas de genética molecular actualmente se han podido utilizar para conocer más de la biología, evolución y ecología de este complicado grupo (Simon et al., 1993; Zezé et al., 1998; Requena et al., 1999; Schuessler et al., 2001). Las esporas de los hongos MA son de las más grandes del Reino Fungi, al igual su genoma es de 50 a 100 veces mayor que en los otros grupos (10^9 nucleótidos) (Franken, 1999). Los estudios genéticos recientes han confirmado que la reproducción de los hongos MA ha sido asexual desde su aparición hace 400 millones de años. Aún así, esta simbiosis es la más representada en todos los edafocistemas del planeta. Algunas posibles explicaciones se basan en la teoría de que las esporas pueden ser vistas como una población de núcleos y no como un individuo como tal. Una espora de un hongo MA puede contener miles de núcleos probablemente haploides que pueden tener diferentes genotipos (Beard y Pfeffer, 1993; Franken, 1999; Harrison, 1999; Gianinazzi-Pearson et al., 2001). Esto nos permite imaginar la dificultad de definir el concepto de especie en este grupo de organismos cuando la variabilidad genética intra-esporal puede ser mayor que la que se encuentre entre esporas de la misma especie (Franken, 1999; Harrison, 1999; Schwarzott et al., 2001).

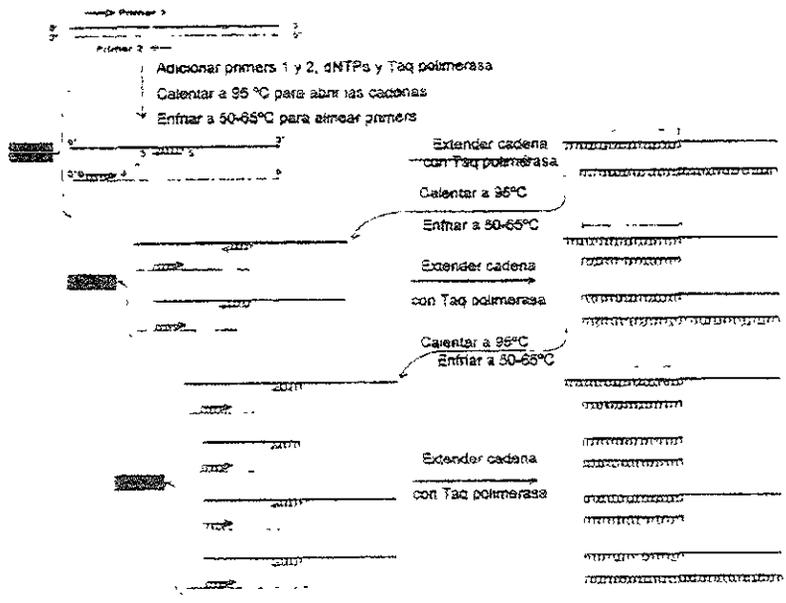
Existen varios métodos de PCR que han sido utilizados para explorar el polimorfismo de los hongos MA como los análisis RFLP, RAPD y la amplificación de

regiones repetidas del genoma (*genomic fingerprint*), cada uno con múltiples variantes. (Clapp et al., 1995) (Fig. 1). Todas estas variantes implican la amplificación de regiones muy específicas del genoma a través de la manipulación de distintos primers y distintos protocolos de amplificación. Los primers han sido diseñados con una alta especificidad para obtener productos amplificados aún de una sola espora. Estos pueden usarse en la identificación o cuantificación de los hongos MA a partir de una espora o de un aislado dentro de las raíces (Harney et al., 1997; Bago et al., 1998; Lanfranco et al., 1998, Chelius et al., 1999; Redecker, 2000). Uno de estos primers considerado como universal para esta simbiosis fue el VANS1, diseñado a partir de secuencias homólogas de la pequeña sub- unidad ribosomal 18 S (Simon et al., 1992). Sin embargo, el diseño de este primer que se creyó universal para estos hongos, se ha encontrado que no siempre se ha conservado lo suficiente dentro de este grupo de hongos para ser tan específico, teniendo como consecuencia, la no exclusión de organismos relacionados (Redecker, 2000).

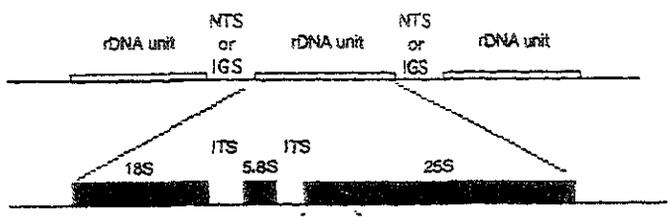
Independientemente del diseño del primer se tiene el problema de la gran variabilidad intra-específica antes mencionada en los hongos MA (Clapp et al., 1999; Lanfranco et al., 1999). Sanders et al. (1995) observan que la región ITS en estos hongos puede estar representada por más de una secuencia dentro de la misma espora (Hijri et al. 1999). Por esta razón las esporas de la misma especie podrían variar significativamente en esta región. Los estudios al nivel de campo pueden entonces resultar en un complicado proceso RAPD y RFLP han sido empleados en estos estudios pero métodos más simples como la amplificación de las regiones repetitivas del genoma como los minisatélites, han sido preferibles (Dumas-Gaudot et al., 1998, Martin et al., 1998). El DNA minisatélite se le nombra a regiones cortas repetidas del genoma de los eucariotes que están arregladas en segmentos simples hipervariables de bases no mayores de tres nucleótidos. Estos segmentos están contenidos en loci cuya selección natural es neutra (es decir no es deletérea en el caso de la aparición de mutaciones) y su herencia es directa (no se segrega en la duplicación del DNA) (Sanders et al., 1996). Se ha comprobado que la tasa de mutación de estas regiones del DNA es muy alta (Longato y Bonfante, 1997) y es por esto que exhiben una enorme variabilidad. Esta característica es la que ha permitido que sean usados para detectar variaciones muy pequeñas con una cantidad mínimo de material genético inicial (Stendlid et al., 1994) (Fig. 2). Para los estudios que requieren de

Region a amplificar

a



b



c

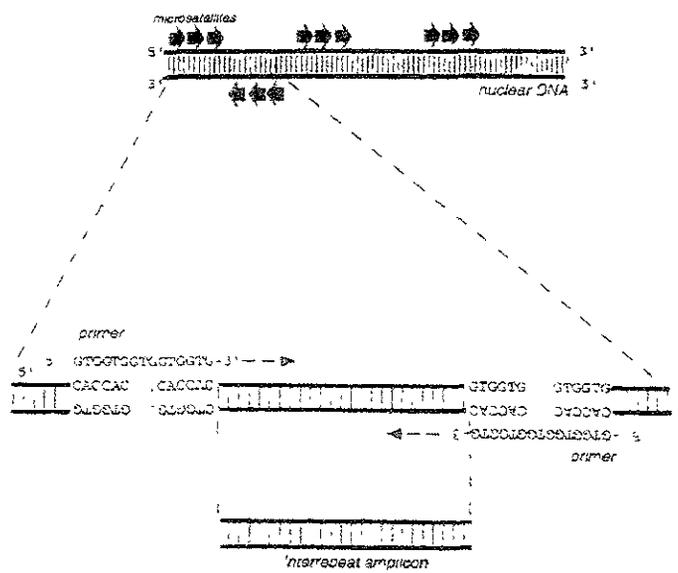


Figura 1. Técnicas de biología molecular que utilizan el PCR en el estudio de regions conservadas del genoma para análisis de filogenia (principalmente análisis RFLP), de identificación de especies (principalmente RAPD) y/o diversidad en poblaciones por huellas del genoma (secuencias repetitivas). a). Reacción en cadena de la polimerasa (tomado de Vázquez et al., 2000). b). Los genes ribosómicos están ordenados en unidades formadas por grupos repetitivos separados por espacios de no transcripción (NTS or IGS). Cada una de estas unidades contiene tres subunidades de 1.8, 5.8 y 28 S separadas por espacios de transcripción (ITS) (imagen de Mitchell et al., 1995). El análisis de los fragmentos polimórficos de restricción (RFLP) usa el ADN de los genes ribosómicos porque tienen sitios específicos de restricción conservados para cualquier organismo con ciertas secuencias variables que pueden generar patrones polimórficos con el diseño de primers específicos que se hibridan con marcadores de prueba (Redecker et al., 1997). A diferencia del análisis de Amplificación del ADN polimórfico al azar (RAPD) que se basa en primers pequeños al azar y que permiten observar patrones de bandeo específicos después de la amplificación con varios primers diseñados. c. Amplificación de secuencias repetitivas de organismos eucarióticos (regions satélite) que usan diferentes primers para estas secuencias particulares (tomado de Martín et al., 1998).

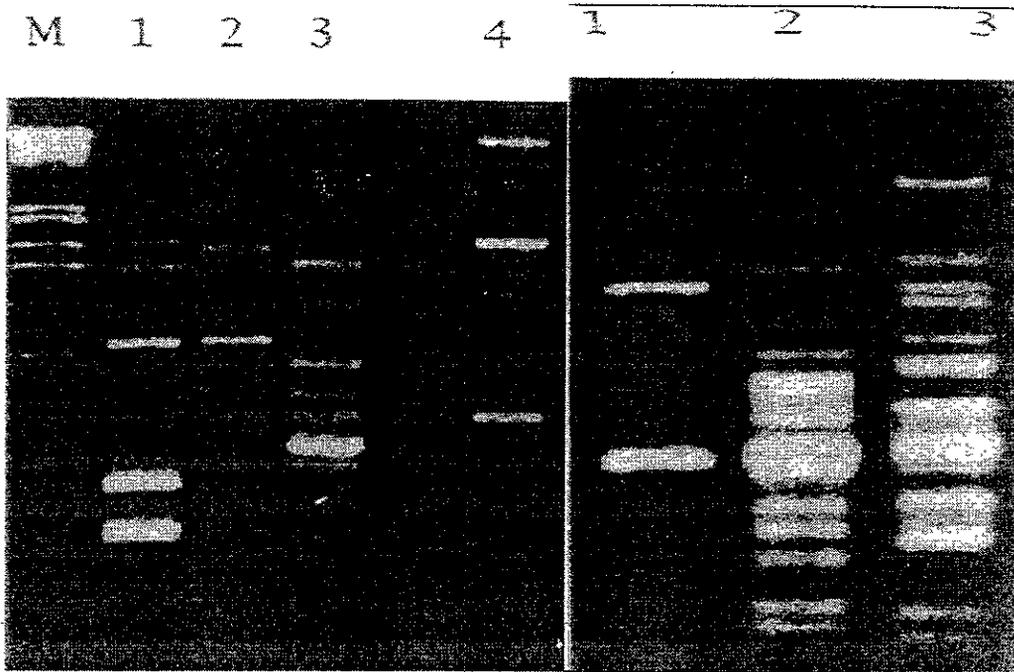


Figura 2. Amplificaciones de regiones minisatélite de hongos micorrízicos arbusculares. Las imágenes provienen de Longato y Bonfante (1997). Izquierda: se observan diferentes patrones en las bandas con la amplificación con el primer $(GTG)_5$ de tres especies de Glomales. La línea 1 corresponde a *Acaulospora laevis*; línea 2, la misma especie después de tres años de propagación en maceta; línea 3, *Scutellospora* sp.; línea 4, *Glomus versiforme*. Imagen derecha: bandas obtenidas con la amplificación con el primer $(TGTC)_4$ a partir de tres distintos aislados de *Glomus mosseae* del mismo cultivo pero propagados durante 12 años en distintos laboratorios. M = Lambda ADN digerido con el *ECOR I-Hind III*.

reproducibilidad en la posterior identificación de aislados, este tipo de análisis reduce la creación de artificios producto de la amplificación (Martin et al., 1998). Problemas como este se han encontrado usando técnicas como RALP. Otra de las ventajas de esta técnica es que no se requiere la secuenciación del material amplificado y de que un solo primer es necesario para la amplificación de estas regiones.

Sanders et al. (1995) predijeron la posibilidad de utilizar el análisis minisatélite para los hongos MA. Lanfranco et al. (1995) realizaron los estudios pioneros e identificaron bandas particulares para cada especie de hongo MA que probaron. Posteriormente Gadkar et al. (1997) llevaron a cabo estudios con el primer llamado M13 (encontrado originalmente en el fago M13, Riscar et al., 1988) para amplificar segmentos minisatélite de especies del género *Gigaspora*. El mismo año, Zézé y col. observaron una mayor variabilidad entre esporas hermanas de *Gigaspora margarita* producidas a partir de una sola espora madre.

En el presente estudio quisimos probar la hipótesis de que los factores de estrés a los que han estado siendo sometidas las poblaciones de hongos MA por largos periodos como el riego con aguas residuales, han permitido la posibilidad de seleccionar algunos aislados con capacidades adaptativas. En estudios previos mostramos cómo los hongos que han estado sometidos a largos periodos al riego han tenido estrategias de reproducción a través del micelio intraradical preferentemente que sobre la esporulación (capítulo 1). Además se mostró que los inóculos de los suelos con distintos niveles de contaminación, tienen capacidades distintas de absorber metales pesados (capítulo dos). Es posible que estas diferencias en los comportamientos sean diferencias fenotípicas que han seleccionado ciertos genets.

Por otro lado, la especie de hongo MA más representativa y que se encontró en estudios previos (capítulos 1 y 2) fue *Giromus mosseae*. Este morfotipo se encontró en todos los muestreos de campo e invernadero, antes y después de la propagación de las plantas. Por otro lado, esta es una de las especies más ubicuas y de las cuales se tiene mayor información acerca de su biología molecular (Lanfranco et al., 1995; Dodd et al., 1996; Tahiri-Aloui and Antoniw, 1996; Edwards et al. 1997, Longato and Bonfante, 1997; Millner et al., 1998; Vandenkoorhuysen and Leyval, 1998, entre otros).

El principal objetivo de este estudio fue reconocer cultivos de origen geográfico diferente de una misma especie de hongo MA en suelos regados con aguas residuales. Estos inóculos provinieron de cultivos propagados en invernadero en suelos regados con aguas residuales durante 5 y 90 años. Si las diferencias en los inóculos se correlacionan con diferencias en sus orígenes esto pueda ser atribuido posiblemente a adaptaciones genéticas al riego con agua residual.

Materiales y Métodos

Aislamiento de esporas de *G. mosseae*

Se utilizaron los mismos Vertisoles regados durante cinco años con aguas residuales de los experimentos en invernadero del capítulo dos que fueron conservados a 4 °C (ver Materiales y métodos del capítulo 2). El aislamiento de las esporas se realizó con un máximo de tiempo de una hora previo al análisis molecular por el método de tamizado húmedo y decantación. Las esporas aisladas fueron resuspendidas en agua estéril y limpiadas durante 15 segundos en ultrasonido para facilitar la separación de las esporas de los clusters y al mismo tiempo, limpiar su esporosfera de la máxima cantidad de partículas. Debido a que los suelos contenían un cultivo mixto de esporotipos a nivel de especie, se llevó a cabo el aislamiento en frío, únicamente de las esporas de *G. mosseae* bajo el microscopio estereoscópico. Se seleccionaron esporas de apariencia saludable (con un contenido citoplasmático abundante en lípidos) y que fueron desinfectadas en una solución de cloramina T 2 % durante 15 minutos, lavadas con agua destilada estéril y resuspendidas en tubos Eppendorf estériles con antibiótico (streptomicina-gentamicina 0.2 %). El vial fue agitado durante un minuto y las esporas se colocaron con una pipeta estéril en un recipiente estéril en frío con agua destilada estéril a 4° C

Condiciones del PCR

Extracción del ADN

Cada muestra consistió en una espora intacta de *G. mosseae* colocada en 5 μL de agua MiliQ estéril en el fondo de tubos Eppendorf de 100 μL . La extracción del DNA se realizó bajo el microscopio estereoscópico con ayuda de un micro-mortero dentro del tubo.

La matriz del PCR se estandarizó con el siguiente protocolo:

- 5 μL DNA
- 5 μL Tp Taq 10 x
- 5 μL dNTP (0.25 mg de cada uno)
- 5 μL MgCl_2
- 1 μL Taq (1 U/ μL)
- 1 μL blotto
- H_2O hasta los 50 μL

Este mix fue homogeneizado con una centrifuga manual. A cada tubo se le añadió una gota de aceite mineral para evitar la evaporación.

Amplificación

Se llevaron a cabo 45 ciclos de amplificación en un termociclador con el siguiente programa: 4 min de denaturación a 92 °C, 45 ciclos de alineación a 55 °C durante 1 min, 2 min de síntesis a 72 °C, 1 min de denaturación a 92 °C, y una etapa final de síntesis de 10 min a 72 °C, conservándose esta solución a 4 °C

Electroforesis

La electroforesis consistió en un gel de agarosa 1.8 g / 150 mL de buffer TBE (Tris base- Acido bórico EDTA =.5 M ph 8) y 15 μL de BET (bromuro de etidio). 5 μL del producto PCR con 3 μL del tampón de carga (Promega) se colocaron en cada pozo. La migración se llevó a cabo a 100 V durante 20 minutos. Después de la electroforesis, se tomaron registros fotográficos bajo luz UV.

Banding pattern analysis

En cada microfotografía, se midió la distancia de las bandas observadas y se referenciaron con la banda de 1500 pares de bases del marcador de peso molecular (considerando este punto como distancia cero). Se graficaron las distancias en centímetros de cada banda del marcador de peso, contra las de las bandas de los individuos que fueron leídas para cada gel. Se ajustó una regresión exponencial a través de la cual se obtuvo el peso molecular aproximado de cada banda con la que se calculó el valor del PM de las bandas de cada individuo. La matriz de estos perfiles se representa en la Tabla 3 del apéndice 2.

Los perfiles obtenidos en el análisis interr-minisatélite fueron procesados calculando la fracción (F) de los fragmentos de cada banda que co-migraron (bandas con las mismas características de migración): $F = 2 n_{xy} / (n_x + n_y)$ donde n_{xy} es el número de bandas co-migradas y n_x y n_y es el número de bandas de un perfil x y de un perfil y. El índice de similitud (S) se calculó en relación a $S = 1 - F$ (Lynch, 1990). Las distancias genéticas (D) fueron computarizadas usando el método UPGMA en el software Neighbor de Phylip (versión 3.5c Copyright 1991-1993 por Joseph Felsenstein). El dendograma se contruyó con software NJPlot disponible en Phylip.

RESULTADOS

2. Análisis de la variabilidad de la región M13 de diferentes inóculos de *Glomus mosseae* (HMA) de Vertisoles regados con aguas residuales.

Se obtuvieron perfiles de un total de 114 individuos de los dos cultivos de *G. mosseae* (55 de M90 y 59 de M05) La representación de cada perfil se presenta en la Tabla 3 del apéndice 2 Las distintas letras mayúsculas indican un perfil diferente, obteniéndose un total de 70 de ellos. El tamaño del peso molecular de las bandas fue obtenido mediante un ajuste gráfico en relación al marcador de peso molecular calculado para cada gel. Es por esto que se presenta un rango en el cual se consideraron los límites de las bandas observadas y su promedio La figura 3 muestra la fotografía de algunos de

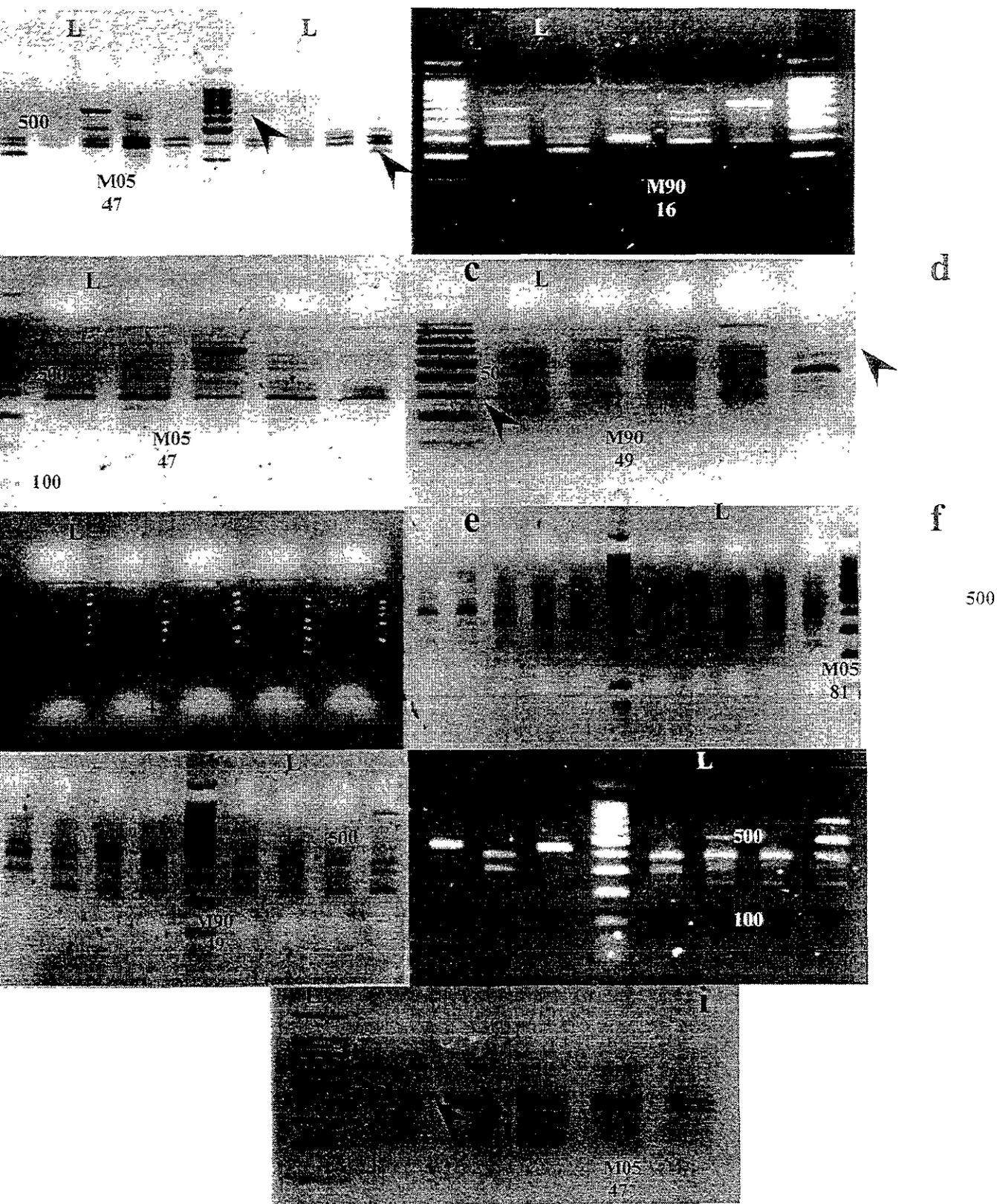


Figura 3. Amplificación del genoma minisatelite por PCR de diferentes inóculos de *Glomus mosseae*. M90 = inóculo proveniente de suelos regados durante más de 90 años con agua residual, M05 = inóculo proveniente de suelos regados durante 5 años con agua residual, MT = inóculo proveniente de suelos nunca regados con agua residual ni cultivados agrícolamente. L = DNA ladder 100 bp

los perfiles obtenidos. Cabe aclarar que los perfiles de estas imágenes no fueron consideradas para el análisis sino únicamente para su ilustración. La Tabla 1 muestra los valores de S calculados entre los individuos dentro de cada cultivo y entre los cultivos. El valor de S entre ambos cultivos (M05-M90) fue del 80 %.

El análisis UPGMA se llevó a cabo con 70 perfiles diferentes y su representación se presenta en la figura 4. Se distingue la formación de dos grupos principales (I y II). A su vez, el grupo II se subdivide en los grupos IIA y IIB. Un grupo más pequeño se puede encontrar en el IIBi y IIBii que no se considera en la Tabla 2 en la que se representan los porcentajes de los individuos que forman cada uno de estos grupos.

Discusión

Se encontró una gran variedad en los perfiles: 70 tipos distintos que correspondieron a un 61.4 % del total de los caracterizados. Muy pocos de estos perfiles fueron idénticos, destacando siete de ellos en el aislado M90 (Perfil W, Tabla 3, apéndice 2). Esto habla de la gran variabilidad intra-específica que podemos encontrar con este tipo de análisis, en adición a la que naturalmente presentan estos organismos. Se pudieron distinguir hasta un total de 21 bandas de distinto peso molecular. La presencia de ciertas bandas fue constante en la mayor parte de los individuos analizados. Las bandas que fueron comunes ambos cultivos fueron las de 651, 613, 432, 340 y 245 pares de bases (pb). Otras bandas fueron comunes únicamente al tipo de cultivo como la 1294, 1148 y 696 para el M90 y las 1500, 220 y 193 para el M05. Sin embargo, la presencia de estas bandas no significa que caracterizaran al cultivo dado que se presentaron en menos del 10 % de los individuos. De este modo, surgió el interés de analizar la similitud de los cultivos entre sí (Tabla 1) y se observó que entre los cultivos M05-M90 se presentaron los menores valores de este índice (38 %) pero también los mayores (92 % entre la muestra 116 de M90 y la 102 de M05). Los individuos del cultivo M05 fueron más similares entre las muestras que los conformaron con el valor más pequeño encontrado del 64 % en relación al 40 % del valor menor encontrado en los M90. A pesar de esto, el aislado M05 muestra una mayor diversidad de perfiles encontrándose repartido en más grupos (Fig. 4). La mayoría de los individuos de este aislado se encuentran en el grupo

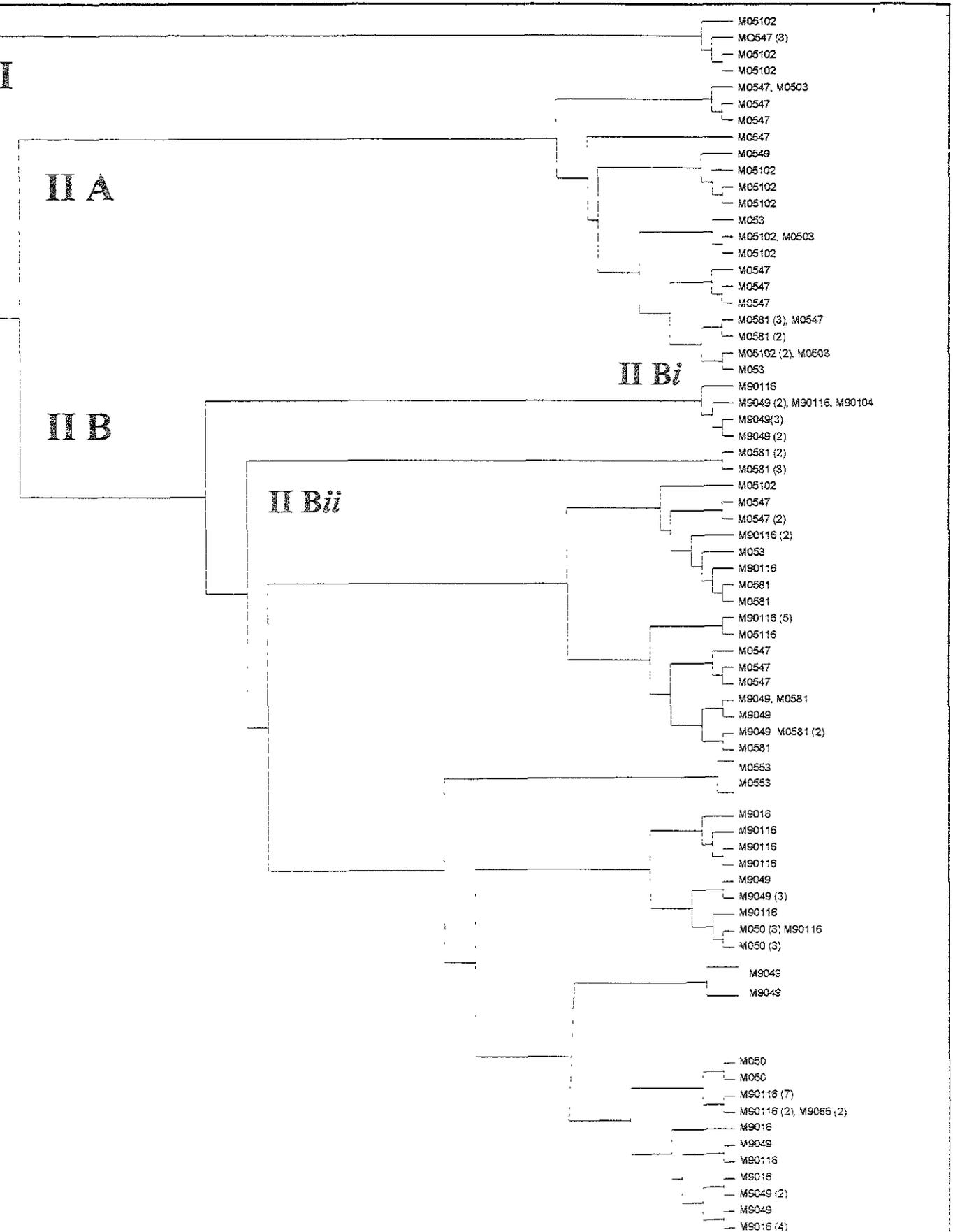


Figura 4. Dendrograma de dos cultivos de *Glomus mosseae* (HMA) provenientes de suelos regados con aguas residuales durante 5 (M05) y más de 90 años (M90). Los números después del cultivo presentan el número de muestra. Los números entre paréntesis representan el número de individuos encontrados con ese perfil.

Tabla 1. Índice de similitud (S) entre diferentes cultivos y dentro del mismo cultivo de *G. mosseae*.

Cultivo	Maceta	S
M90-M90	16-49	0.71
	16-65	0.53
	16-116	0.88
	16-104	0.5
	49-65	0.52
	49-116	0.76
	49-104	0.4
	65-116	0.7
	65-104	0.54
	116-104	0.47
M90-M05	16-3	0.7
	16-47	0.72
	16-81	0.83
	16-102	0.87
	49-3	0.67
	49-47	0.83
	49-81	0.79
	49-102	0.74
	65-3	0.67
	65-47	0.74
	65-81	0.53
	65-102	0.67
	116-3	0.76
	116-47	0.84
	116-81	0.8
116-102	0.92	
M05-M05	104-3	0.5
	104-47	0.47
	104-81	0.38
	104-102	0.53
	P3-47	0.76
	P3-81	0.8
M05-M90	3-102	0.74
	47-81	0.64
	47-102	0.83
	81-102	0.78

Tabla 2. Porcentaje de individuos de cada cultivo de *G. mosseae* que formaron los grupos principales del dendograma de la figura 4.

Cultivo	I	IIA	IIB
M05	10	44	46
M90	0	0	100

M05, M90 = Provenientes de suelos regados durante 5 y 90 años con aguas residuales respectivamente.

IIA (65%) y sólo el 10 % en el grupo I (cuya similitud entre sus propios individuos es bastante alta alcanzando el 83 % entre las muestras 47-102). El 25 % de los individuos del cultivo M05 se encuentran en el grupo IIB mientras que en el 79 % de los M90 están en este grupo. Los grupos I y IIA son exclusivos del cultivo M05 y representan el 54 % del total de los perfiles encontrados para este cultivo. El grupo IIBi está formado exclusivamente de individuos del cultivo M90 (18 %). Esto significaría que hay 54 % de probabilidades de que al amplificar una espora al azar del cultivo M05 con el mismo análisis, ésta pueda ser identificada en estos grupos (I y IIA) mientras que sólo se tiene el 18 % de posibilidad de que correspondiera al grupo IIBi si se analizara una del cultivo M90. Sin embargo, también hay individuos de ambos cultivos formando parte de este grupo IIB y algunos de ellos con el mismo perfil como los M9049 y M0581 y los M90116 y M050. Esto es lógico considerando que se están analizando individuos de la misma especie.

Longato y Bonfante (1997) emplean el análisis de minisatélite (primer TGTC₄) para observar la variabilidad intra-específica de esta especie (Fig. 3). Ellas amplificaron tres aislados de un cultivo del mismo origen pero que fue propagado en diferentes laboratorios del mundo durante más de doce años. Encontraron diferencias en el patrón de bandeo e índices de similitud mucho menores que los que nosotros encontramos en la misma especie (48-54 %). Esto se podría deber a que los valores de S fueron calculados para el total de la población analizada y no a partir de un solo individuo. Sin embargo, cuando se calculan los valores dentro de estos mismos cultivos (Tabla 1), observamos que los valores de S disminuyen para algunos de ellos y son similares a los obtenidos por estas autoras. Por otro lado, el patrón de bandas que desarrollan sus aislados es muy similar para dos de ellos y el otro no desarrolla claramente muchas de las bandas de menor peso molecular. También podemos distinguir que obtuvieron la amplificación de una gran cantidad de bandas (cerca de 21 tamaños distintos) como nosotros obtuvimos con el primer M13. En el mismo trabajo se analizan tres especies de distintos géneros amplificadas con el primer GTC₅. Los perfiles de dos aislados de *Acaulospora laevis* (uno de ellos propagados durante tres años en maceta) conservan un patrón de bandeo casi idéntico, variando únicamente en la intensidad de algunas bandas. A pesar de que no se discute la variabilidad inter-específica de estas especies en términos de su índice de

similitud, podemos ver en el esquema que los tres perfiles que encontraron varían significativamente en la distribución de sus bandas, casi de una manera similar en la que se observa para uno de los tres cultivos de *G. mosseae* discutido anteriormente. Esto se vió previamente en los trabajos de Lloyd et al. (1996) en esta especie y en lo encontrado por Zezé et al. (1997) en esporas de *Gigaspora margarita* producidas a partir de un cultivo monospórico con el mismo primer M13.

Lo discutido anteriormente nos muestra lo difícil que es poder interpretar los valores absolutos o relativos calculados con estos índices usando técnicas moleculares (aún para individuos de la misma especie). El grado de variabilidad intra-específica de los individuos del mismo aislado hace que la interpretación sea difícil y deba ser vista cuidadosamente antes de poder discutir la variabilidad inter-específica. Redecker (2000) menciona también la problemática de la resolución y repetibilidad al analizar especies relacionadas o aislados de la misma especie, usando otros métodos moleculares como secuencias de DNA ribosomal, y concluye que estas desventajas no han sido superadas todavía.

En el presente estudio, no es posible llevar a cabo una correlación de los distintos grupos encontrados con la posible adaptación de *Glomus mosseae* al riego con agua residual. Esto se debe a que las diferentes esporas que fueron amplificadas no pertenecen a un aislado previamente caracterizado como resistente a estas condiciones, como los serían esporas de un cultivo monospórico propagado en estas condiciones. Los individuos provenientes del cultivo M05 han estado sujetos al riego con agua residual durante menos tiempo y por lo mismo, la intensidad de los ciclos de cultivo por la que han sido propagados es menor que en los del cultivo M90. Los suelos regados por 5 años fueron cultivados anteriormente como terrenos de temporal produciendo un máximo de dos cultivos anuales. Las implicaciones de tener varios ciclos anuales por más de 90 años posiblemente expliquen parte de la variabilidad encontrada en los individuos de este estudio. La poblaciones autóctonas de hongos MA comenzaron a tener el impacto del riego con agua residual hace alrededor de cien años. En este tiempo tuvieron al menos 180 ciclos de propagación bajo estas condiciones. Por otro lado, también es posible que las condiciones de propagación que se llevaron a cabo en este estudio aún cuando el

estrés por el riego se siguió conservando, hayan podido seleccionar individuos más aptos a este tipo de propagación (por confinamiento) y por ende de sus genets.

Sería interesante probar si los individuos con los perfiles menos similares del mismo cultivo como los M05102, M0547 y M9049 encontrados en los tres grupos más divergentes, muestran distintas capacidades para desarrollar la simbiosis en suelos con distintos niveles de contaminación. Lo mismo podría comprobarse con individuos con el mismo perfil pero de distintos cultivos. La posibilidad de hacer grupos de perfiles excluyentes más restringidos con un análisis de amplificación de DNA minisatélite podría resolverse probablemente con un mayor número de individuos amplificados con el objeto de determinar si los grupos I y IIA son completamente exclusivos de los individuos de suelos regados durante 5 años con aguas residuales.

Análisis futuros deben considerar la propagación de aislados obtenidos a partir de una sola espora que permitan evaluar la magnitud de la variabilidad encontrada en individuos de un mismo cultivo. De este modo podríamos obtener con mayor precisión, perfiles bien identificados que correspondieran a individuos bien caracterizados o genets que pudieran ser posteriormente probados en su posible adaptación al riego con aguas residuales o a la transferencia de contaminantes.

También es importante considerar las posibilidades de llevar a cabo otros análisis como RFLP de las regiones ITS, escogiendo los primers adecuados que amplifiquen regiones específicas de estos Glomales. Con la aplicación de distintas herramientas moleculares, podríamos caracterizar de mejor forma la variabilidad encontrada entre los hongos AM que puedan explicar si las poblaciones encontradas en los suelos con distinto grado de contaminación están adaptadas genéticamente. Esto puede sustentarse con mayor evidencia el manejo de prácticas agrícolas convenientes que involucren el uso de estos organismos como bioindicadores y en futuras prácticas de restauración.

Conclusiones

A través de técnicas moleculares adecuadas es posible detectar diferencias entre aislados de distinto origen de la misma especie de hongo MA. En el caso de este estudio, se destaca por vez primera la importancia de la aplicación de estas herramientas para el análisis de la variabilidad de estos organismos en estos suelos. La amplificación con el primer M13 hizo posible establecer diferentes perfiles en especies que han sido regadas con aguas residuales durante cortos y prolongados periodos. Sin embargo, debido a que el riego repercute directamente en la intensidad de los cultivos que se practican, las diferencias encontradas podrían atribuirse a las condiciones de propagación a las que los hongos han estado sujetos. Este estudio preliminar sienta las bases para aplicaciones futuras del análisis microsatélite en micorriza arbuscular, en suelos regados con aguas residuales.

Literatura citada

- Bago B., Y. Piché, L. Simon. 1998. Fluorescently-primed in situ PCR in arbuscular mycorrhizas. *Mycol. Res.* 102 (12): 1540-1544.
- Chelius M. K., E. W. Triplett. 1999. Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rRNA. *Mycorrhiza* 9: 61-64.
- Clapp J. P., A. H. Fitter, J. P. W. Young. 1999. Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellopora* sp. *Mol. Ecol.* 8: 915-921.
- Clapp J. P., J. P. W. Young, J. W. Merryweather, A. Fitter. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* 130: 259-265.
- Dodd J. C., S. Rosendahl, M. Giovanetti, A. Broome, L. Lanfranco, C. Walker. 1996. Inter and Intra-specific variation within the morphologically similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. *New Phytologist.* 133: 113-122.
- Edwards S. G., A. H. Fitter, J. P. W. Young. 1997. Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 101: 1440-44.

- Franken P. 1999. Trends in molecular studies of AM fungi. In: A. Varma, B. Hock eds. *Mycorrhiza* 2nd. Ed. Pp. 37-49. Springer-Verlag, Berlin.
- Gadkar V., A. Adholeya, T. Satyanarayana. 1997. Randomly amplifies polymorphic DNA using the M13 core sequence of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Gigaspora gigantea*. *Can J. Microbiol.* 43: 795-798.
- Harney S. K., F. S. Edwards, M. F. Allen. 1997. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi from: *Artemisa californica* using the polymerase chain reaction. *Mycologia* 89: 547-550.
- Harrison M. J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev.* . 361-389.
- Hijri M., M. Hosny, Tuinen D. v., H. Dulieu. 1999. Intra-specific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. *Fungal Genet. Biol.* 26 (2): 141-151.
- Lanfranco L., Delpero M., Bonfante P. 1999. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* 8: 37-45.
- Lanfranco L., S. Perotto, S. Longato, A. Mello, V. Cometi, P. Bonfante. 1998. Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. In: A. Varma Ed. *Mycorrhiza Manual*. Springer Lab Man Berlin. Pp. 353-372.
- Lanfranco L., P. Wyss, C. Marzachi, P. Bonfante. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Ecol.* 4: 61-68.
- Lloyd MacGlip S. A., S. M. Chambers, J. C. Dodd, A. H. Fitter, C. Walker, J. P. W. Young. 1996. Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133: 103-111.
- Longato S., P. Bonfante. 1997. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol. Res.* 101 (4): 425-432.
- Martin F., G. Costa, C. Delaruelle, J. Diez. 1998. Genomic fingerprint of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. In: A. Varma Ed. *Mycorrhiza Manual*. Springer Lab Man. Berlin. Pp. 463-474.
- Vázquez M. G., Vázquez G. M. S., V. Olalde P. 2000. Estudio genético molecular de la simbiosis micorrizica. *Manual de protocolos básicos*. Cinvestav-IPN, Irapuato; Universidad de Guanajuato. México. 26 p.
- Martin F., G. Costa, C. Delaruelle, J. Diez. 1998. Genomic fingerprint of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. In: A. Varma Ed. *Mycorrhiza Manual*. Springer Lab Man. Berlin. Pp. 353-372.
- Millner P. D., W. W. Mulbry, S. L. Reynolds, C. A. Patterson. 1998. *Mycorrhiza* 8: 19-27.
- Redecker D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi with colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.
- Redecker D., Thierfelder H., Walker C., D. Werner. 1997. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers from ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Appl. Environm. Microbiol.* 63: 1756-1761.

- Requena N., P. Fuller, P. Franken. 1999. Molecular characterization of GmFOX2, an evolutionary highly conserved gene from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, down-regulated during interaction with rhizobacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12 (10): 934-942.
- Risquar A. P., H. G. Jinchrradze, A. I. Prosnjak, P. C. Ivanov, S. A. Limborri. 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA finger-printing of animals, plants and microorganisms. *FEBS letter* 233: 388-392.
- Sanders I. R., a. M. Groppe, T. Boller, A. Wiemkem. 1995. Identification of ribosomal DNA polymorphism in spores of the Glomales: application studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol.* 130: 419-427.
- Sanders I. R., J. P. Clapp, A. Wiemkern. 1996. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems – a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 133: 123-134.
- Schuessler A., Schwarzott D., C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomomycota: evolution and phylogeny. *Mycological Research. In press.*
- Schwarzott D., C. Walker, A. Schuessler. 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution. In press.*
- Simon L., L. Bousquet, R. C. Lévesque. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Simon L., M. Lalonde, T. D. Bruns. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungus colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 291-295.
- Stendil J. Karlsson J O., Hogberg N. 1994. Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycol. Res.* 98: 57-63.
- Tahiri-Aloui A., J. F. Antoniw. 1996. Cloning genes associated with the colonization of tomato roots by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agronomie* 16: 669-707.
- Vandenkoornhuysse P., C. Leyval. 1998. SS rDNA sequencing and PCR-fingerprint reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia* 90 (5): 791-797.
- Van Tuunen D., B. Zhao, V. Gianinazzi-Pearson. 1998. PCR in studies of AM fungi. from primers to application. In: A. Varma Ed. *Mycorrhiza Manual*. Springer Lab Man. Berlin. Pp. 387-400.
- Walker C., J. M. Trappe. 1993. Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycol. Res.* 97. 339-344.
- Zeze A., E. Sulisttyowati, K. Ophel-Keller, S. Barker, S. Smith. 1997. Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita* a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR. *Appl. Environm. Microbiol* 63: 676-678.
- Zeze A. K. Ophel-Keller, S. E. Smith. 1998. DNA isolation and development of molecular tools for the identification and detection of VA mycorrhizal fungi. In: In: A. Varma Ed. *Mycorrhiza Manual* Springer Lab Man. Berlin. Pp. 373-386.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo fue la primera investigación acerca de la dinámica de las simbiosis micorrízicas arbusculares llevada a cabo en uno de los Distritos de Riego más grandes y antiguos del mundo. El trabajo es un estudio general completo de la situación edafocológica y gran parte de la información generada en este trabajo servirá como antecedente para dirigir estudios posteriores más completos. Los resultados se resumen a continuación:

■ Las simbiosis micorrízicas están bien representadas en los suelos agrícolas del Distrito, tanto en los Leptosoles como en los Vertisoles regados durante aproximadamente 5, 35, 65 y más de 90 años con agua residual. A pesar de las crecientes concentraciones de fósforo disponible en estos suelos, las simbiosis no se han visto inhibidas, pero sí ha habido cambios en las estrategias de colonización y reproducción de estos hongos. Por otro lado, el tipo de suelo parece jugar un papel muy importante en el desarrollo de las simbiosis, siendo los Leptosoles un mejor ambiente para la misma.

■ Tanto la abundancia de esporas como la diversidad de los hongos MA en estos suelos, han disminuido conforme aumentan la contaminación de los mismos (los contenidos de fósforo y de metales pesados como Cu, Zn, Pb, Cd). Esto puede ser del mismo modo, una consecuencia de las prácticas agrícolas. Sin embargo, la abundancia de esporas puede disminuir a niveles x en los suelos regados por mayor tiempo, que el potencial colonizador de los mismos disminuya sensiblemente en un futuro.

■ La acumulación de fósforo y metales pesados en los suelos es una consecuencia directa del tiempo de riego con agua residual e influye en una mayor absorción de estos elementos por las plantas. Sin embargo, la aplicación de agua residual durante el periodo de crecimiento de un cultivo, no repercute en una mayor absorción de metales pesados y fósforo por los mismos. Ambos hechos demuestran que la acumulación

paulatina de contaminantes en los suelos y sus efectos en la biodisponibilidad deben ser cuidadosamente monitoreados.

■ Todos los inóculos de MA analizados incrementan la absorción de fósforo en un cultivo de maíz, pero no contribuyen a la absorción de distintos metales. Las plantas micorrizadas absorben más cobre y a su vez menos Cd. El inóculo proveniente de los suelos regados por un mayor tiempo, tiene capacidades distintivas en la absorción de estos metales. Las elevadas concentraciones de fósforo en los suelos parecen tener un efecto en la regulación de la esporulación de los hongos, pero no así en el desarrollo de la colonización intramatricial.

■ La diversidad de especies encontrada en estos suelos corresponde a la que se presenta a nivel mundial para otros suelos agrícolas, con especies del género *Glomus*. Dentro de estas destacan *G. mosseae*, *G. aggregatum* y *G. clarum*. También se encontraron abundantes esporocarpos de *G. mosseae* y *Sclerocystis simuosa*, sin embargo, se pone en duda la viabilidad de éstos últimos.

■ Es probable que los distintos inóculos de *Glomus mosseae* difieran entre sí no sólo fisiológicamente, sino también genéticamente, lo que pudo observarse en una región del genoma hipervariable a través de un estudio molecular. Sin embargo, estas diferencias no implican necesariamente una adaptación a las condiciones de contaminación, sino pueden deberse a condiciones intrínsecas de la intensidad de los ciclos de propagación debidas al manejo de los suelos por el riego agrícola.

■ En este estudio se ha visto nuevamente, la gran plasticidad que las simbiosis MA han desarrollado a lo largo de su evolución. Aunque en este trabajo no se puede definir cuál es exactamente el papel benéfico de las simbiosis para las plantas, sí se puede establecer que los hongos se han adaptado a condiciones en las que éstas no los requieren necesariamente en su nutrición (ni fosforada ni de otros nutrimentos).

PERSPECTIVAS

■ El hecho de que no se observaran diferencias significativas en las abundancias de los hongos (en las raíces) debido al tiempo de riego resulta muy interesante. La mayor parte de los estudios demuestran un efecto contrario en la abundancia de los hongos

en condiciones de alta disponibilidad de nutrimentos y esto demuestra la habilidad de los hongos MA de sobrevivir independientemente de la micotrofia de las plantas. Sin embargo, es posible que sí existan diferencias en relación a la representatividad de las especies que se encuentran dentro de las raíces pero que éstas no pueden percibirse a nivel morfológico. Para identificar estas diferencias será necesario llevar a cabo más estudios moleculares que permitan detectar si la diversidad de MA está relacionada o no con el nivel de contaminación.



Finalmente, este es un estudio más en el que se demuestra que el riego con agua residual tiene un impacto a diferentes niveles en este edafo-ecosistema. Se demuestra nuevamente que la acumulación de contaminantes y su bio-disponibilidad está en función del tiempo de aplicación. Se demuestra nuevamente que el tipo de suelo juega un papel determinante en la amortiguación de este impacto, ahora demostrado en la capacidad de las MA de establecerse en los mismos. Por tanto, se demuestra también que las condiciones de manejo no deben ser iguales para todos los suelos. Es necesario llevar a cabo estudios más detallados de la dinámica de colonización arbuscular en Vertisoles regados durante largos periodos de tiempo.



Es necesario utilizar marcadores genéticos más poderosos para poder caracterizar los inóculos que viven en condiciones de elevada contaminación. Esto podría abrir nuevas posibilidades para utilizar los hongos micorrizicos arbusculares como bioindicadores en la bioremediación de estos suelos.

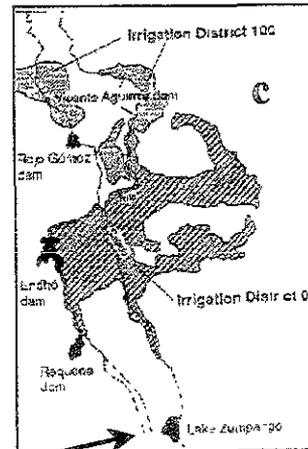
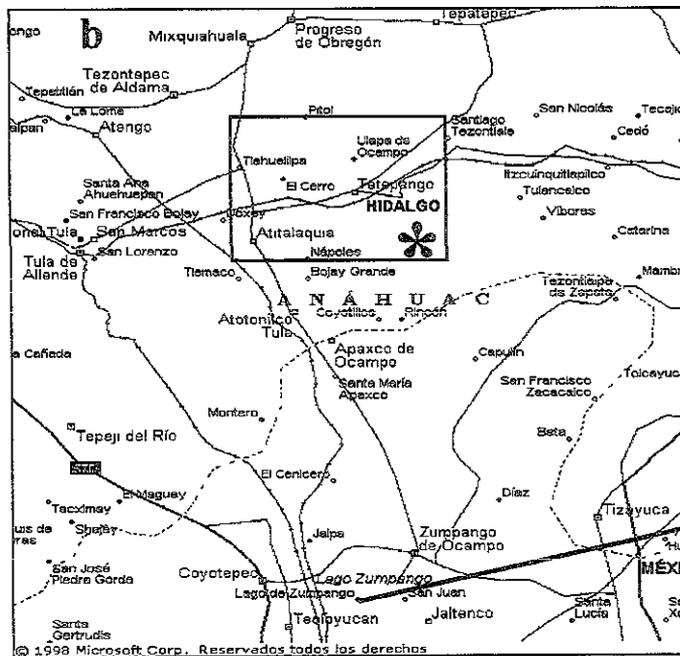
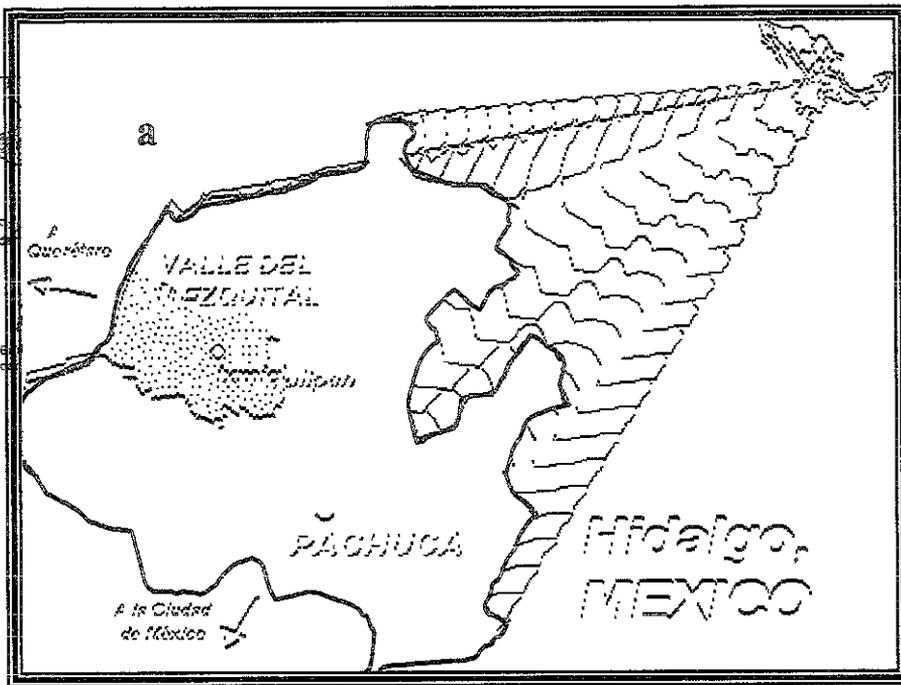


Fig. 1. Localización del Distrito de Riego 03 en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México (Fuente: imágenes transformadas del Atlas Mundial Encarta 99 (b), Microsoft y tomadas de <http://www.oneworld.org/recepac/hidalgo/sedac/elvalle.htm> (a) y Siebe y Cifuentes (1995) (c)). * Localización de los terrenos de colecta (Fig. 2).

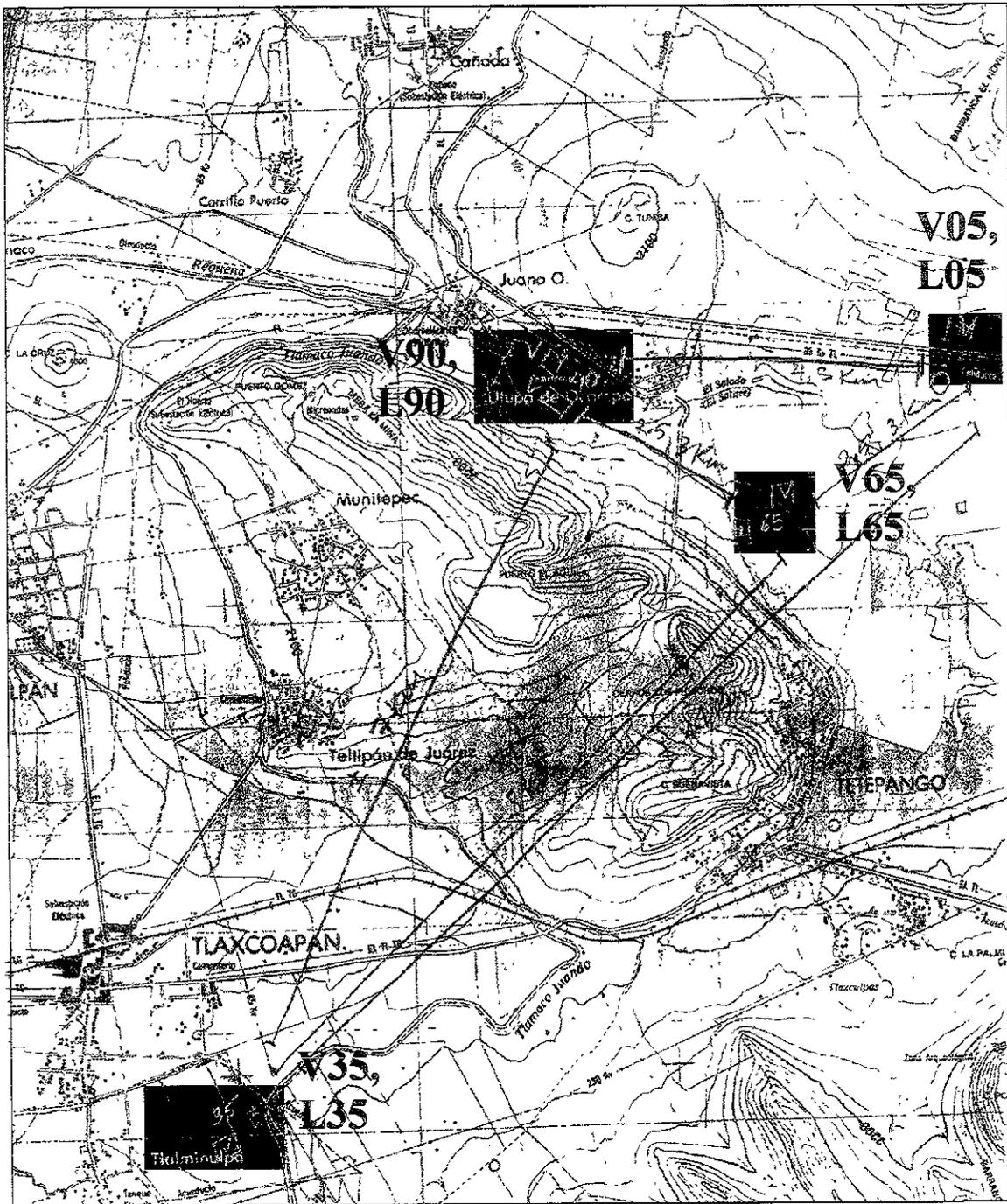


Figura 2. Localización de los terrenos de colecta. Extraído de Secretaría de Programación y Presupuesto. 1982. Carta topográfica 1: 50 000. Mixquiahuala F14C89.

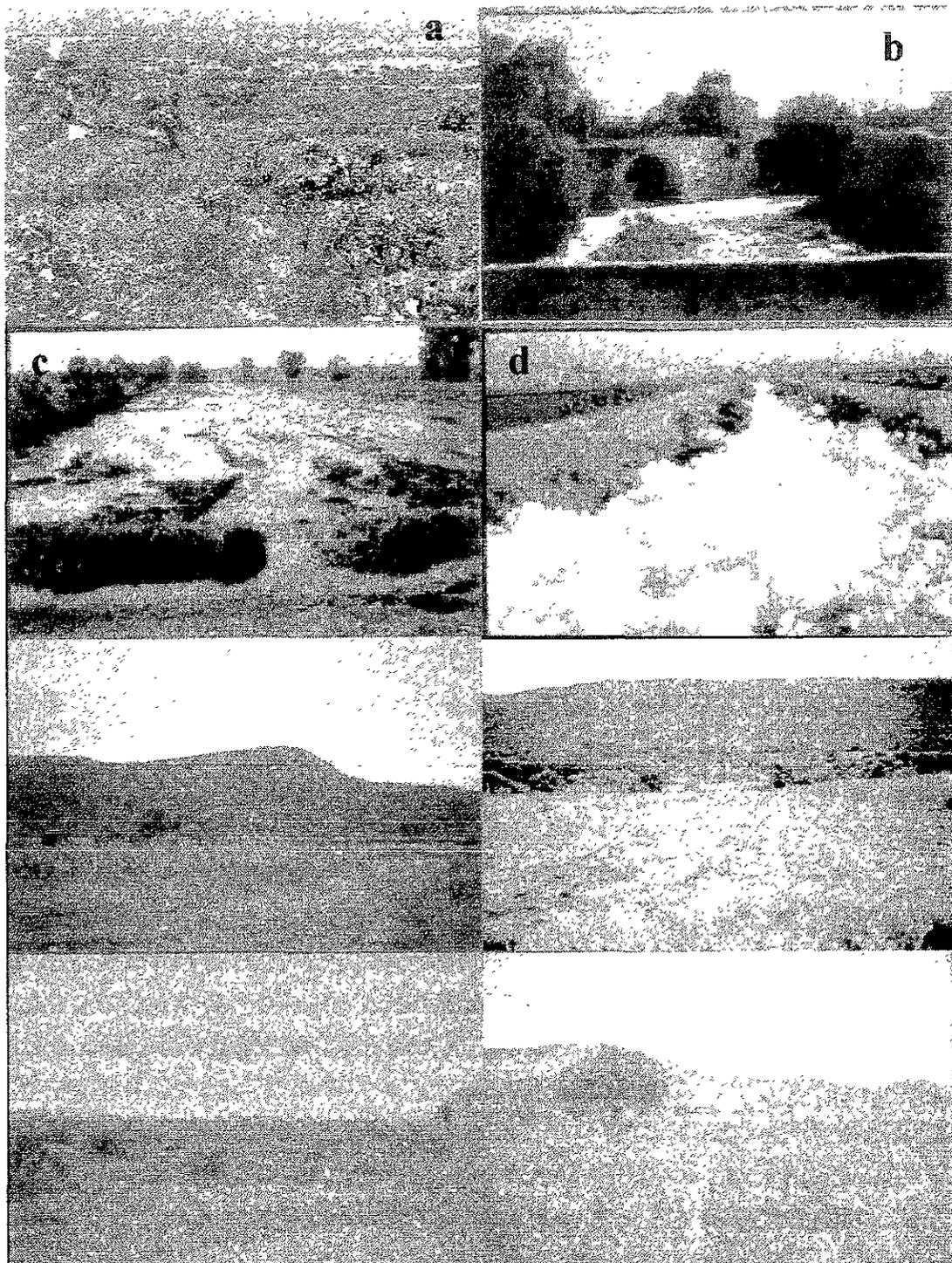


Figura 3. Imágenes del área de estudio en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. A) Vegetación Matorral de *Prosopis* tomado de González (1968). Destacan *Prosopis juliflora*, *Opuntia tunicata*, y *Yuca filifera*. b) Río El Salvador, uno de los principales canales de desagüe de la zona. Siebe, 1994. C) Irrigación con aguas residuales a partir del canal lateral. Siebe, 1994. d) Espuma producida por la fricción del agua y los detergentes contenidos en la misma en un canal de riego. Siebe, 1994. e) Leptosol regado con aguas residuales durante más de 90 años. Ortega, 1997. f) Vertisol regado con aguas residuales por más de 90 años. Ortega, 1997. g) Leptosol regado con aguas residuales durante 5 años (V05), Ortega, 1997. h) Vertisol regado con aguas residuales durante más de 90 años (V90). Ortega, 1997.

Tiempo bajo regado	Esporas en campo (100 g/suelo)*		Después del cultivo (100 g/suelo)		Colonización en invernadero (%)	
	L	V	L	V	L	V
	5	80 ± 8.1a	280 ± 61.8b	4.88 ± 1.06a	41.8 ± 1.74a	45.8 ± 6.5a,c
15	253 ± 66.2b	280 ± 47.1b	14.14 ± 3.83b	37.14 ± 5.44b	63.5 ± 6.8a	32.7 ± 4.9b,c
25	310 ± 7.1b	197 ± 16.6b,c	120.54 ± 27.83c	157.7 ± 24.66c	57.6 ± 6.0a,d	43.2 ± 6.5b,c,d,e
35	143 ± 9.8a	113 ± 19.6c	31.48 ± 7.72b	58.7 ± 19.64b	56.8 ± 9.3a,e	25.4 ± 4.7b

n = 3.

Fig. 1. Abundancias de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en campo y después de su propagación en porcentajes de colonización en raíces de *Allium cepa* L. cultivada en suelos regados con agua residual durante diferentes periodos. L= Leptosol, V= Vertisol. n = 9 ± e. e. Letras diferentes indican diferencias significativas a p < 0.05

Tabla 2. Concentraciones de metales pesados y fósforo (medias \pm d. e.) en plantas de maíz cultivadas en dos Vertisoles regados con aguas negras. M- = tratamiento sin micorriza, M05 = inóculo aislado de Vertisoles regados durante 5 años, M90 = micorriza aislada de suelos regados durante 90 años MT= inóculo aislado de Vertisoles nunca regados; V05 = vertisol regado con agua residual durante 5 años, V90 = vertisol regado durante 90 años con agua residual; AD = riego con agua destilada, AR = riego con agua residual.

Tratamientos			suelo	Raíz	Tallo	Hoja
Cd (mg/kg PS)						
M-	V05	AD	< 1.94	0.33 \pm 0.04	0.12 \pm 0.10	0.12 \pm 0.10
M-	V05	AR	< l. d.	1.27 \pm 0.69	0.45 \pm 0.23	0.18 \pm 0.09
M-	V90	AD	2.7 \pm 0.6	1.99 \pm 0.59	2.51 \pm 0.25	4.23 \pm 0.93
M-	V90	AR	3.1 \pm 0.6	1.95 \pm 0.58	5.98 \pm 0.70	6.18 \pm 0.24
M05	V05	AD	< l. d.	0.30 \pm 0.14	0.26 \pm 0.14	0.07 \pm 0.06
M05	V05	AR	< l. d.	0.23 \pm 0.07	0.22 \pm 0.13	0.20 \pm 0.12
M05	V90	AD	2.4 \pm 0.2	3.66 \pm 0.19	5.59 \pm 0.51	5.97 \pm 0.87
M05	V90	AR	2.5 \pm 0.4	2.59 \pm 0.13	6.54 \pm 1.15	7.23 \pm 0.90
M90	V05	AD	< l. d.	0.17 \pm 0.08	0.29 \pm 0.09	0.00 \pm 0.00
M90	V05	AR	< l. d.	0.73 \pm 0.45	0.23 \pm 0.07	0.29 \pm 0.17
M90	V90	AD	2.4 \pm 0.3	3.06 \pm 0.27	5.63*	5.03 \pm 0.37
M90	V90	AR	2.4 \pm 0.1	2.98 \pm 0.27	8.57*	5.83 \pm 1.25
MT	V05	AD	< l. d.	0.21 \pm 0.06	0.44 \pm 0.07	0.57 \pm 0.32
MT	V05	AR	< l. d.	0.28 \pm 0.1	0.13 \pm 0.11	0.00 \pm 0.00
MT	V90	AD	2.2 \pm 0.2	2.39 \pm 0.42	10.65*	5.16 \pm 1.00
MT	V90	AR	2.2 *	3.01 \pm 0.22	6.25 \pm 1.08	6.44 \pm 1.32
Cu (mg/kg PS)						
M-	V05	AD	15.42 \pm 0.54	12.99 \pm 1.97	4.49 \pm 0.81	8.64 \pm 1.56
M-	V05	AR	16.67 \pm 0.35	13.77 \pm 2.65	4.08 \pm 0.09	5.88 \pm 0.41
M-	V90	AD	73.42 \pm 5.34	49.83 \pm 1.38	8.76 \pm 0.78	11.85 \pm 1.82
M-	V90	AR	77.92 \pm 5.30	62.71 \pm 5.17	12.60 \pm 0.27	11.76 \pm 1.01
M05	V05	AD	17.17 \pm 0.25	10.34 \pm 1.25	4.10 \pm 0.46	5.58 \pm 0.68
M05	V05	AR	17.17 \pm 0.25	11.22 \pm 0.19	5.00 \pm 0.47	6.83 \pm 0.94
M05	V90	AD	82.42 \pm 3.52	53.25 \pm 6.12	10.01 \pm 0.95	12.94 \pm 1.43
M05	V90	AR	89.92 \pm 5.00	50.31 \pm 3.38	9.95 \pm 1.29	12.83 \pm 2.15
M90	V05	AD	17.00 \pm 0.54	19.92 \pm 3.06	3.98 \pm 0.72	6.44 \pm 0.77
M90	V05	AR	16.42 \pm 0.54	25.70 \pm 3.29	4.19 \pm 0.86	7.29 \pm 0.75
M90	V90	AD	86.42 \pm 4.29	31.02 \pm 0.69	19.44*	12.64 \pm 0.52
M90	V90	AR	91.42 \pm 3.11	52.84 \pm 4.21	10.42*	12.82 \pm 0.71
MT	V05	AD	16.17 \pm 0.25	19.50 \pm 5.53	3.76 \pm 0.35	6.38 \pm 1.15
MT	V05	AR	17.17 \pm 0.56	11.56 \pm 1.66	4.32 \pm 0.41	6.31 \pm 0.27
MT	V90	AD	79.67 \pm 1.22	46.68 \pm 7.05	16.58*	13.54 \pm 1.01
MT	V90	AR	67.17 \pm 6.94	41.52 \pm 8.48	13.23 \pm 2.26	11.05 \pm 1.21
Pb (mg/kg PS)						
M-	V05	AD	27.58 \pm 3.01	11.83 \pm 4.02	1.69 \pm 0.52	5.56 \pm 2.36
M-	V05	AR	26.33 \pm 1.09	14.84 \pm 7.05	1.21 \pm 0.50	5.75 \pm 2.14
M-	V90	AD	96.58 \pm 4.76	9.54 \pm 1.78	0.43 \pm 0.04	6.83 \pm 3.10
M-	V90	AR	101.33 \pm 6.45	22.19 \pm 8.20	1.62 \pm 0.98	3.47 \pm 1.94
M05	V05	AD	26.33 \pm 0.75	13.90 \pm 5.55	1.77 \pm 1.07	1.93 \pm 0.94
M05	V05	AR	32.08 \pm 3.54	7.46 \pm 2.05	2.11 \pm 1.05	9.42 \pm 4.37
M05	V90	AD	104.83 \pm 4.72	11.95 \pm 3.44	1.07 \pm 0.23	1.95 \pm 0.26
M05	V90	AR	118.33 \pm 4.15	10.16 \pm 5.50	2.29*	5.44 \pm 3.40
M90	V05	AD	46.08 \pm 6.68	25.95 \pm 9.12	1.48 \pm 0.73	5.90 \pm 2.34
M90	V05	AR	32.08 \pm 3.70	25.98 \pm 9.68	2.44 \pm 0.82	4.68 \pm 0.73
M90	V90	AD	111.58 \pm 4.07	9.93 \pm 3.44	0.00 \pm 0.00	4.25 \pm 1.30
M90	V90	AR	118.83 \pm 5.76	11.53 \pm 2.09	0.56*	3.08 \pm 0.74
MT	V05	AD	28.33 \pm 1.25	14.45 \pm 5.93	1.82 \pm 0.71	1.86 \pm 0.33
MT	V05	AR	35.08 \pm 5.97	10.85 \pm 2.53	0.75 \pm 0.53	7.32 \pm 3.07
MT	V90	AD	104.08 \pm 2.01	44.54 \pm 11.89	0.80*	4.87 \pm 2.86
MT	V90	AR	95.08 \pm 3.36	18.32 \pm 7.95	0.53 \pm 0.25	1.84 \pm 0.74

Tabla 2. Continuación.

			Zn (mg/kg PS)			
M-	V05	AD	63 ± 3.9	17.9 ± 3.3±	14.4 ± 1.1	14.1 ± 2.5
M-	V05	AR	67.5 ± 1.4	20.6 ± 5.1	13.3 ± 1.4	16.2 ± 6.6
M-	V90	AD	302.5 ± 20.7	136.2 ± 6.8	175.0 ± 21.4	75.6 ± 5.6
M-	V90	AR	327.5 ± 20.1	119.1 ± 16.9	387.2 ± 16.6	79.0 ± 6.7
MO5	V05	AD	69 ± 0.6	15.6 ± 5.6	24.0 ± 1.7	11.9 ± 3.2
MO5	V05	AR	70.3 ± 0.9	16.7 ± 1.1	31.0 ± 5.2	17.9 ± 2.8
MO5	V90	AD	337.5 ± 12.9	119.8 ± 12.0	237.6 ± 7.4	79.2 ± 8.2
MO5	V90	AR	375 ± 20.8	123.5 ± 8.5	285.8 ± 48.7	66.6 ± 6.2
M90	V05	AD	86 ± 16.3	25.8 ± 6.5	14.6 ± 4.7	8.9 ± 1.1
M90	V05	AR	66.8 ± 1.8	40.5 ± 3.4	212.0 ± 3.9	10.3 ± 1.4
M90	V90	AD	355 ± 16.0	128.4 ± 21.7	335.8*	69.1 ± 5.2
M90	V90	AR	376.7 ± 19.6	140.4 ± 14.0	266.3*	90.9 ± 9.4
MT	V05	AD	68 ± 1.6	27.4 ± 5.0	27.7 ± 1.0	13.1 ± 2.2
MT	V05	AR	66.2 ± 2.4	31.6 ± 10.6	21.6*	14.8 ± 3.2
MT	V90	AD	327.5 ± 7.4	103.1 ± 14.7	229.6*	71.5 ± 10.4
MT	V90	AR	287.5 ± 15.6	178.9 ± 17.7	279.8 ± 16.6	61.2 ± 6.3
			P (g/kg PS)			
M-	V05	AD	11.7 ± 1.6	2.55 ± 0.20	7.09 ± 0.24	5.32 ± 0.15
M-	V05	AR	16.7 ± 3.3	2.19 ± 0.13	4.29 ± 0.15	4.35 ± 0.33
M-	V90	AD	85.0 ± 1.9	7.00 ± 1.25	12.67 ± 0.49	9.68 ± 0.57
M-	V90	AR	87.6 ± 3.3	5.00 ± 0.57	9.19 ± 0.11	7.26 ± 0.26
MO5	V05	AD	13.2 ± 2.1	2.65 ± 0.45	7.12 ± 0.83	4.89 ± 0.37
MO5	V05	AR	15.4 ± 1.1	3.95 ± 0.37	8.47 ± 0.24	5.65 ± 0.12
MO5	V90	AD	97.2 ± 10.2	9.19 ± 0.95	10.68 ± 0.92	10.50 ± 0.80
MO5	V90	AR	95.8 ± 6.7	5.83 ± 0.14	8.50 ± 0.59	6.25 ± 0.32
M90	V05	AD	16.7 ± 3.2	3.50 ± 0.42	6.51 ± 0.51	4.17 ± 0.51
M90	V05	AR	18.5 ± 4.1	4.27 ± 0.46	6.65 ± 0.32	5.37 ± 0.23
M90	V90	AD	81.5 ± 10.6	8.22 ± 0.97	n.d.	9.83 ± 0.93
M90	V90	AR	82.7 ± 7.9	5.78 ± 0.18	n.d.	6.00 ± 0.0
MT	V05	AD	16.6 ± 1.4	3.63 ± 0.22	7.21 ± 0.50	5.06 ± 0.32
MT	V05	AR	21.7 ± 2.8	4.09 ± 0.33	6.55 ± 0.61	5.51 ± 0.44
MT	V90	AD	104.3 ± 6.7	6.80 ± 0.84	10.17*	9.40 ± 0.37
MT	V90	AR	91.8 ± 2.2	6.88 ± 0.56	9.33 ± 0.20	7.35 ± 0.45

* dato único; n. d., no determinado.

Tabla 3. Perfiles de DNA minisatélite de individuos de *Glomus mosseae* amplificados por PCR con el primer M13.

Cultivo	M90(AR)																												
	49																												
	16	49																											
PM	Muestra	104	105	107	108	109	110	115	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	31	32	34	35	36	37	
RANGO	Media pb	A	A	A	A	B	C	D	E	F	F	D	D	G	H	I	J	K	J	L	M	N	N	O	P	F	Q	R	
1500	1500													X	X														
1305-1382	1344													X	X														
1288-1299	1294																												
1105-1191	1148																												
844-908	876					X															X	X	X						
777-814	794					X																							
734-768	751																												
682-711	696																												
634-667	651	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
591-635	613	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
535-586	560					X								X	X														
494-527	510					X									X														
458-486	472	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
413-450	432	X	X	X	X									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
367-406	386	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
321-358	340	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
284-310	297					X															X	X	X	X	X	X	X	X	X
262-277	270													X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
234-256	245	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
209-230	220						X																						
188-198	193									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Las letras mayúsculas caracterizan un solo tipo de perfil, la intensidad de los caracteres X (negritas) indica la intensidad de las bandas observadas. M90 = inóculo proveniente de suelos irrigados durante 90 años con aguas residuales y regados con agua residual (AR) ó destilada (AD) durante su propagación (AR).

Tabla 4. Continuación

PM ¹	RANGO	Cultivo		M90(AR)																									
		M90(AD)		M90(AR)																									
		Muestra	65	116																									
Ind Num	65	66	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	
Media	S	S	T	E	T	T	U	T	T	V	W	W	W	W	W	X	W	W	Y	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	S	S	
1500																													
1305-1382																													
1288-1299																													
1105-1191																													
844-908																													
777-814																													
734-768	X	X																					X	X	X	X	X	X	X
682-711																													
634-667	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
591-635	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
535-586																													
494-527																													
458-486																													
413-450	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
367-406	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
321-358																													
284-310																													
262-277	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
234-256	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
209-230																													
188-198																													

Las letras mayúsculas caracterizan un solo tipo de perfil, la intensidad de los caracteres X (negritas) indica la intensidad de las bandas observadas. P_b = pares de bases. M90 = inóculo proveniente de suelos irrigados durante 90 años con aguas residuales y regados con agua residual (AR) ó destilada (AD) durante su propagación (AR).

Tabla 1. Continuación.

Cultivo	M490(AD)	M05(AN)			M05(AN)																					
		Muestra	104	3	47	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150							
PM	Ind Num	77	168	169	170	171	172	127	129	130	131	132	133	135	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	
RANGO	Media	E.	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV	AG	AV	AV	AV	AV	AV	
1500	1500																									
1305-1382	1344																									
1288-1299	1294																									
1105-1191	1148								X																	
844-908	876																									
777-814	794																									
734-768	751																									
682-711	696														X											
634-667	651	X					X	X	X	X	X	X	X	X												
591-635	613	X			X		X	X	X	X	X	X	X	X												
535-586	560																									
494-527	510																									
458-486	472		X								X	X	X	X												
413-450	432				X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
367-406	386	X									X	X	X													
321-358	340																									
284-310	297																									
262-277	270																									
234-256	245																									
209-230	220																									
188-198	193																									

Las letras mayúsculas caracterizan un solo tipo de perfil, la intensidad de los caracteres X (negritas) indica la intensidad de las bandas observadas. Pb = pares de bases. M90 = inóculo proveniente de suelos irrigados durante 90 años con aguas residuales y regados con agua residual (AR) ó destilada (AD) durante su propagación (AR).

Tabla 1. Continuación.

		M05(AN)										M05(AN)																		
Cultivo		102																												
Muestra		81																												
PM	Ind. Num	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	148	149	150	151	152	153	154	155	159	160	161	162	
RANGO	Media	AW	AX	P	Q	Q	AJ	AJ	AY	AY	AJ	AZ	AZ	BA	BA	BA	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ	BK	BL	BL	BM
1500	1500													X	X	X														
1305-1382	1344													X	X	X														
1288-1299	1294													X	X	X														
1105-1191	1148													X	X	X														
844-908	876													X	X	X														
777-814 ¹	794													X	X	X														
734-768	751																			X	X									
682-711	696																													
634-667	651	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X	X	X				
591-635	613	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X							X		
535-586	560													X	X	X							X							
494-527	510													X	X	X							X							
458-486	472	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X						X	X	X	X
413-450	432	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X						X	X	X	X
367-406	386																													
321-358	340	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X						X	X	X	X
284-310	297	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X						X	X	X	X
262-277	270																													
234-256	245																													
209-230	220																													
188-198	193																													

1 as letras mayúsculas caacterizan un solo tipo de perfil, la intensidad de los caracteres X (negritas) indica la intensidad de las bandas observadas. Pb = pares de bases. M90 = inóculo proveniente de suelos irrigados durante 90 años con aguas residuales y regados con agua residual (AIR) ó destilada (AD) durante su propagación (AIR).

Tabla 1. Continuación.

PM	Cultivo		M05(AN)					
	Muestra		3					
	Ind Num.	Media	163	164	165	166		
RANGO		IBN	BO	IK	BL			
1500	1500							
1305-1382	1344							
1288-1299	1294							
1105-1191	1148							
844-908	876							
777-814	794							
734-768	751							
682-711	696							
634-667	651			X				
591-635	613	X	X				X	
535-586	560							
494-527	510							
458-486	472	X	X	X			X	
413-450	432	X	X	X			X	
367-406	386							
321-358	340				X		X	
284-310	297							
262-277	270	X	X					
234-256	245	X			X		X	
209-230	220							
188-198	193							

Las letras mayúsculas caracterizan un solo tipo de perfil, la intensidad de los caracteres X (negritas) indica la intensidad de las bandas observadas Pb - pares de bases M90 = inóculo proveniente de suelos irrigados durante 90 años con aguas residuales y regados con agua residual (AR) ó desafiada (AD) durante su propagación (AR).

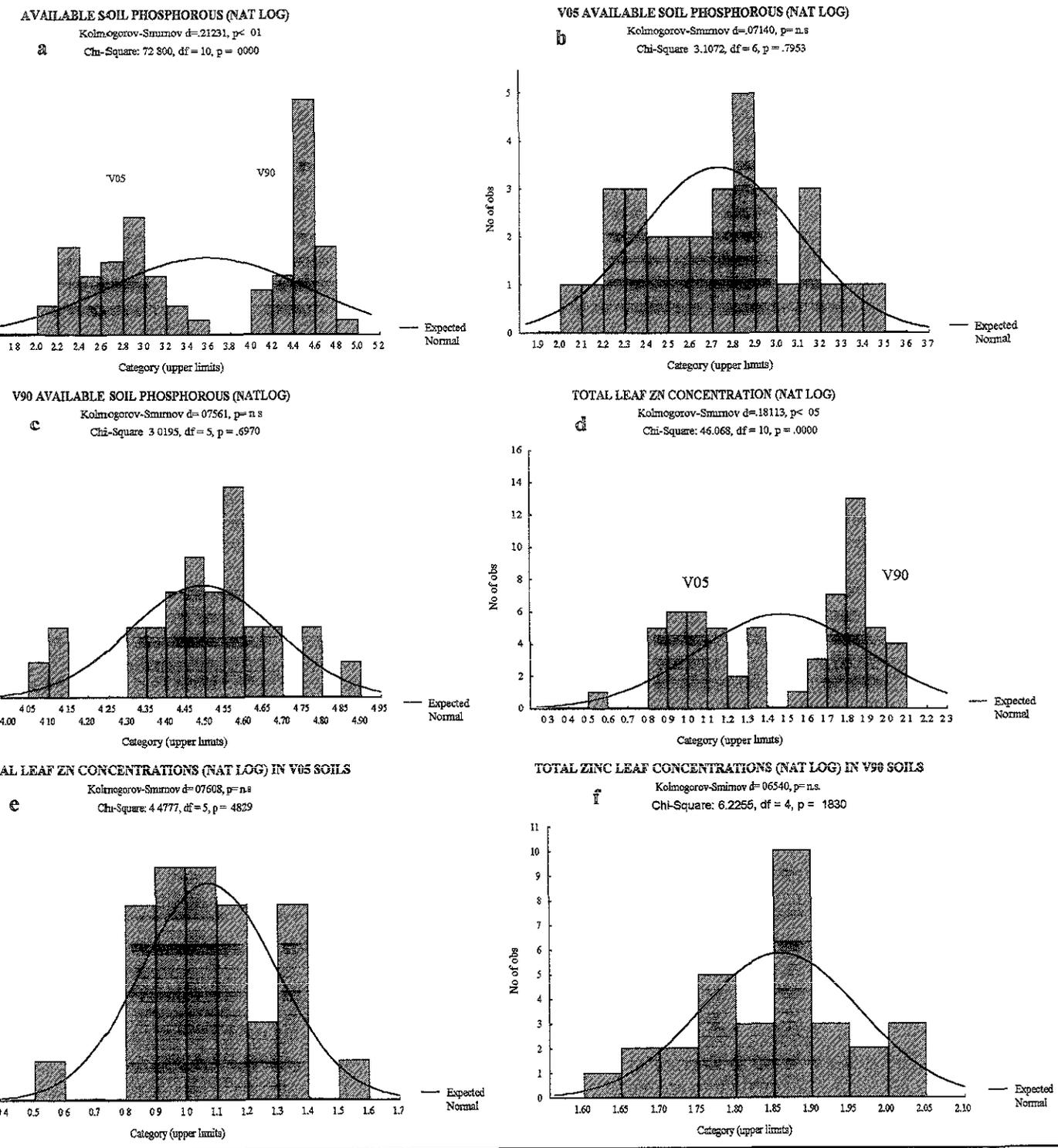


Figura 1. Algunos ejemplos gráficos de la distribución de las concentraciones de P y Zn en los suelos y en las hojas de las plantas cuantificadas en el experimento en invernadero. Aún después de haber sido transformadas a su logaritmo natural, las variables no muestran una distribución normal (la prueba de Kolmogorov-Smirnov es significativa) pero se observa su clara segmentación en dos poblaciones independientes (a y d). Aplicando a cada una de estas poblaciones de manera independiente la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se logra un ajuste a la normalidad de los datos (b, c, e y f).

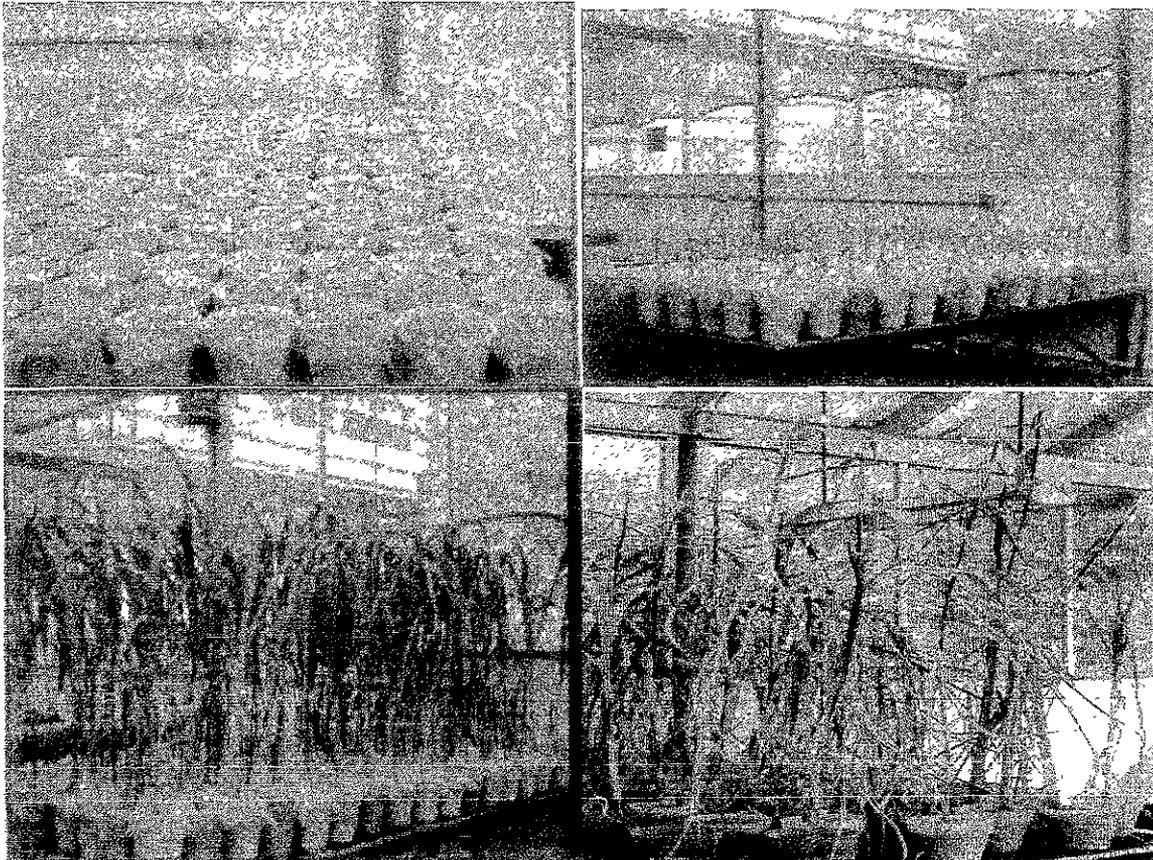


Figura 2. Cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en Vertisoles regados con aguas residuales. A) Inicio del experimento con 16 tratamientos repartidos en bloques al azar. b) Aplicación del primer riego con agua residual a las 4 semanas. c) Aplicación del cuarto riego a las 9 semanas. d) Cosecha de las plantas a las 16 semanas. Fotos P. Ortega, 1999.

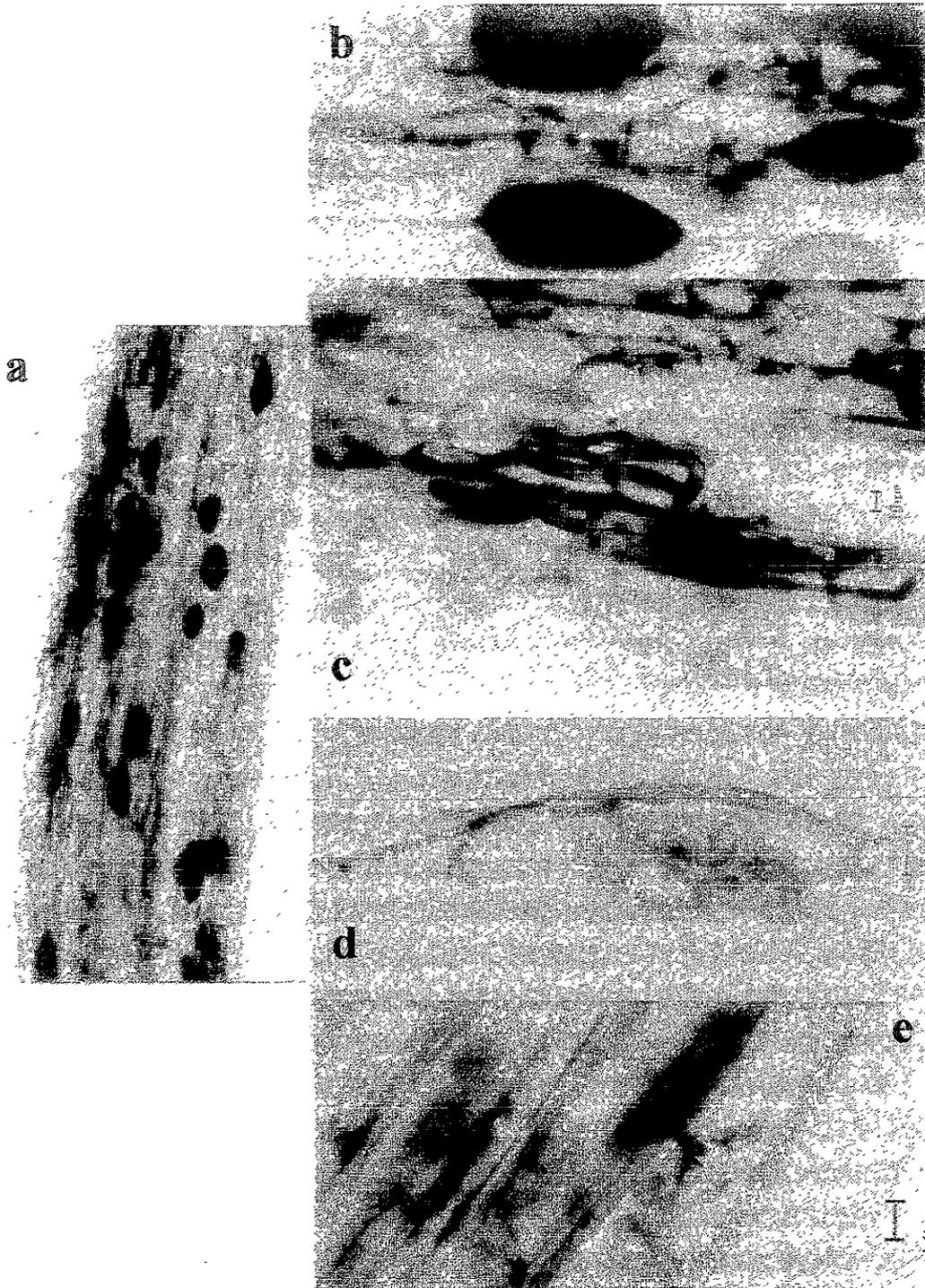
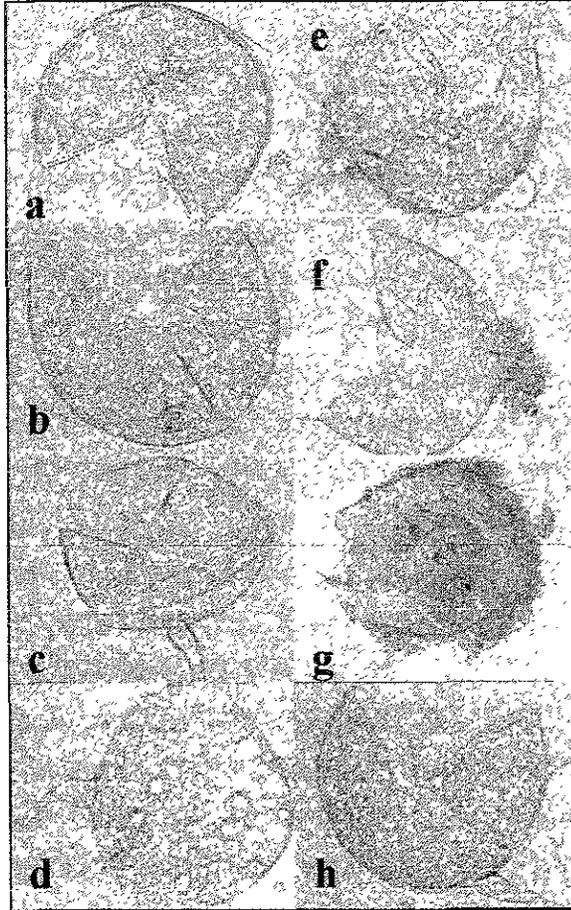


Figura 3. Colonización radical de *Zea mays* L. en Vertisoles regados durante 5 años con aguas residuales y micorrizados con un inóculo proveniente de suelos regados durante más de 90 años (M90) y regados con agua destilada durante la propagación. a) Vista panorámica de la abundante colonización 20x (59.5x). b) Vesículas intramatriciales. 40x (100x). c) Ovillos intracelulares. 200x. d) arbusculo. 200x. e) apresorio (?) 10x (25x).

ANEXOS

A3. ICONOGRAFÍA DE LOS HONGOS MICORRIÍZICOS DEL VALLE
DEL MEZQUITAL, HIDALGO MÉXICO

Glomus mosseae I



Lamina I. *Glomus mosseae* del Valle del Mezquital, Hidalgo, México. a-d. Esporas encontradas *in situ* en Vertisoles regados durante aproximadamente 5 (a), 35 (b), 65 (c) y 95 (d) años con aguas residuales. Esporas en Leptosols regados durante 5 (e), 35 (f), 65 (g) y 95 (h) años, respectivamente.

Sclerocystis sinuosa

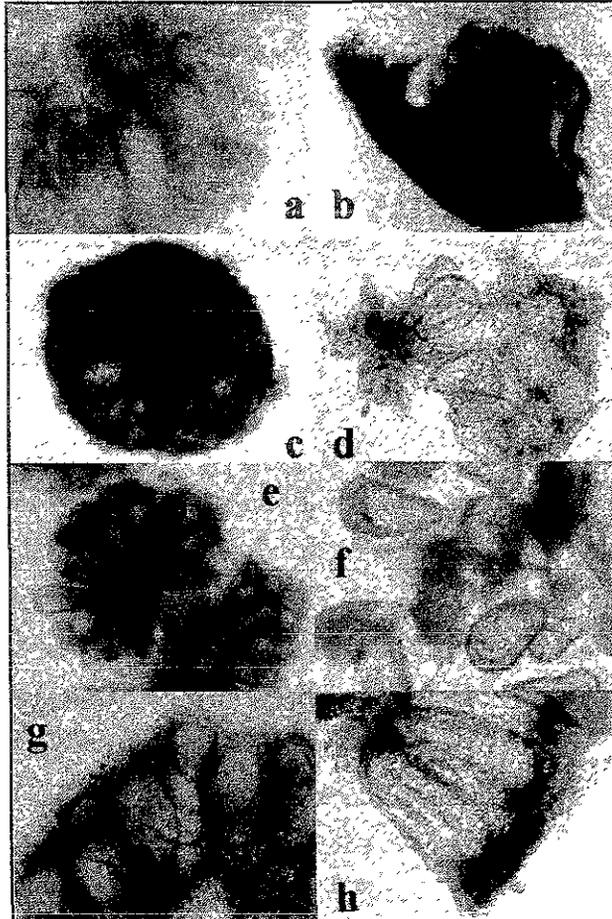


Lámina II. Esporocarpos de *Sclerocystis sinuosa* del Valle del Mezquital, Hidalgo, México. a-b. Esporocarpos encontrados *in situ* en Leptosoles y Vertisoles regados durante 5 años. c-d. Esporocarpos encontrados en Leptosoles y Vertisoles regados durante 35 años, respectivamente. e-h. Esporocarpos encontrados en Leptosoles (e) y Vertisoles (f-h) regados durante 95 años respectivamente.

Diversidad de *Glomus* spp.

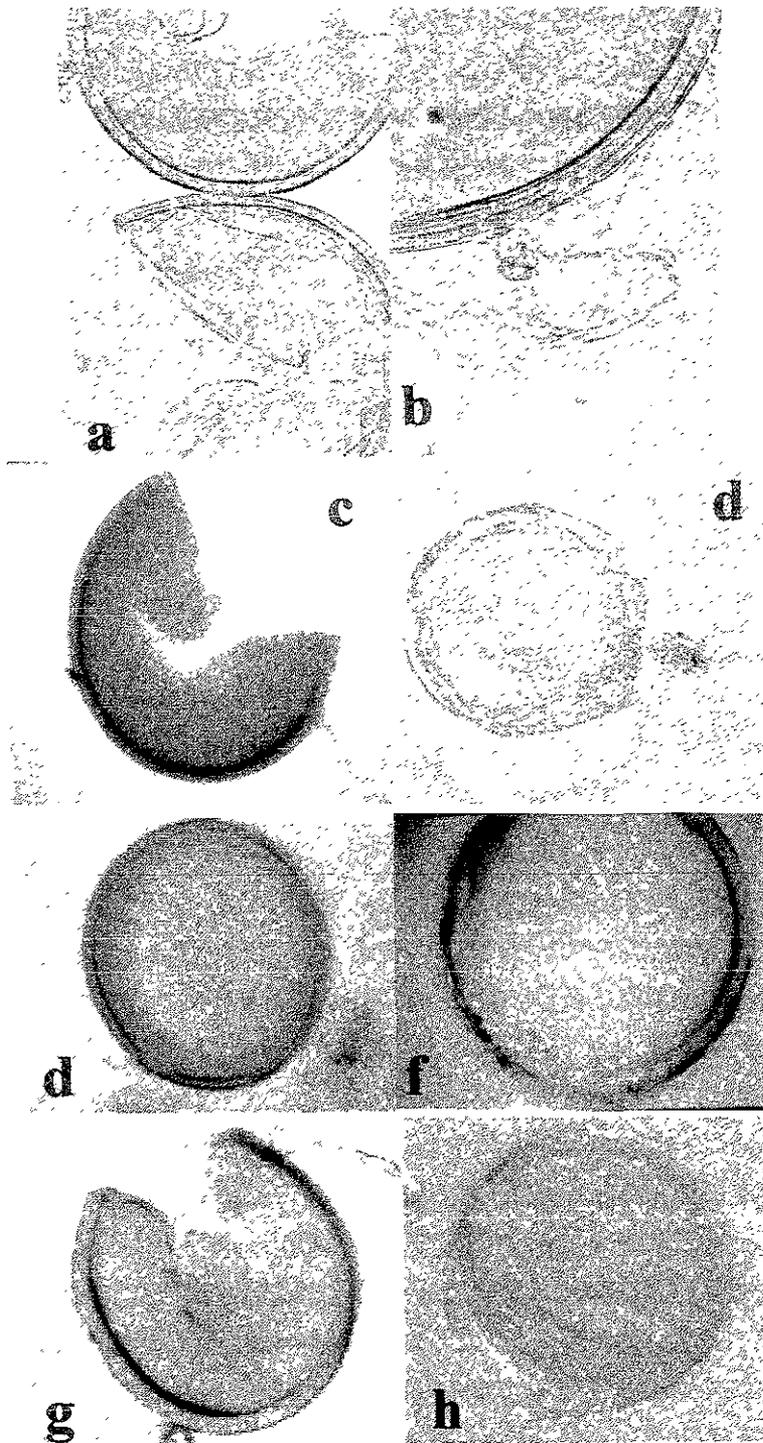


Lámina III. Algunas especies de hongos MA encontradas e en suelos regados con aguas residuales en el Valle del Mezquital. a) *Glomus* que corresponde a lo descrito para *claroidesum* en L65. Tomado a 40x. b) Detalle de la hifa de sostén d la figura anterior. c) *Glomus* que corresponde a la descripción de *geosporum* (?) encontrado en V05. Tomado en 10 x. d) *Glomus* sp. 3 (?) en V35. Tomado en 40x. e) *Glomus* que corresponde a la descripción de *constrictum* (?) en L90. Tomado en 20x. f) *Glomus* que corresponde a la descripción de *lamellosum* (?) en L05. Tomado en 40x. g) *Glomus* sp. 1 (?) en L05 Tomado en 20x. h) *Gomus* sp. (?) en L05. Tomado en 20x.

Esporocarpos laxos de *Glomus* spp.

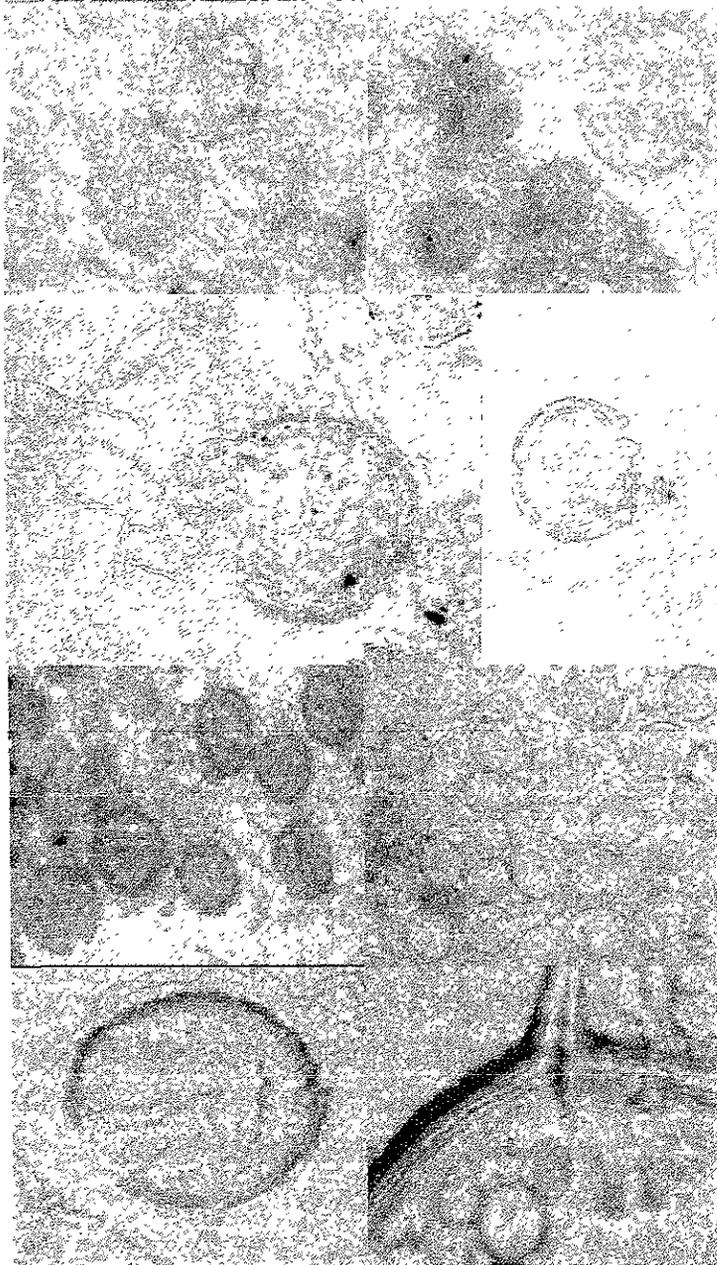
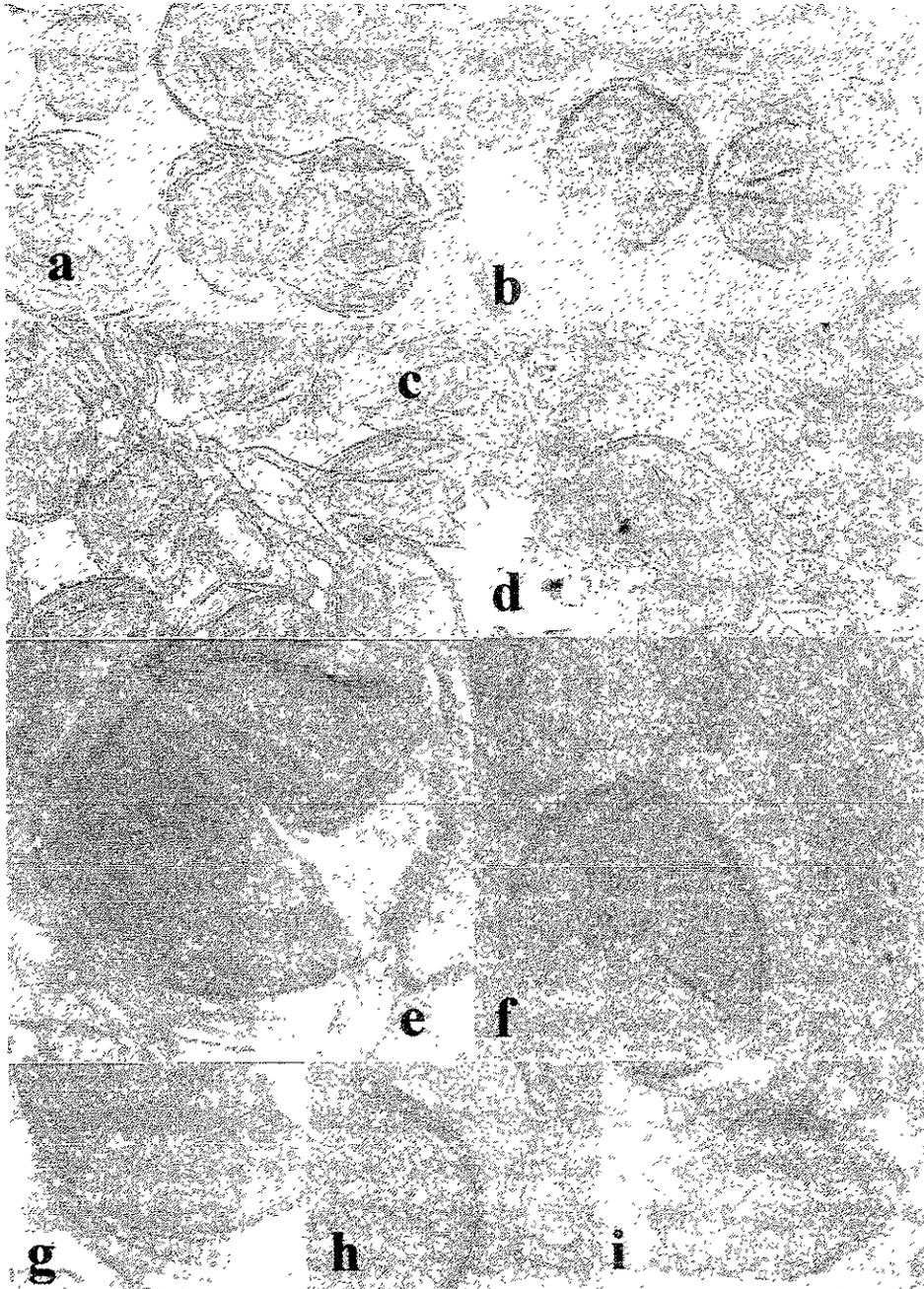


Lámina IV. Esporocarpos laxos de *Glomus* spp. encontrados en suelos regados con aguas s residuales en el Mezquital. a) *Glomus* que corresponde a la descripción de *viscosum* (?) en L90. Tomado en 20x. b) Diferencias en los tamaños del *Glomus* anterior (izquierda) y en la esquina superior derecha *Glomus mosseae*, en L90. Tomado en 10 x. c) Esporocarpo laxo de *Glomus* sp. similar a *occultus* en V65. Tomado en 40x. d) Detalle de la esporosfera de esporas del mismo esporocarpo anterior. Tomado en 100x. e) Reacción al Meltzer de esporocarpos laxos de *Glomus* sp. 4. en L05. Tomado en 10x. f) Esporocarpos laxos del mismo *Glomus* en L90 sin reactivo de Meltzer. Tomado en 10x. g) Espora de los esporacrpos anteriores en L90. Tomado en 20x. h) Detalle de la hifa de sostén de la espóra anterior en donde se observa una pared laminada. Tomado en 100 x. Fotos P. Ortega.

Glomus aggregatum



ina V. a) Esporocarpos laxos de *Glomus aggregatum* (*intraradices*) en Vertisoles regados durante 65 años (V65) con aguasuales en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. Tomado en 40x. b) Mismo esporocarpo reaccionando al Meltzer. Tomado en 40x. c) Detalle de unión de las hifas del mismo esporocarpo. Tomado en 40x. d) Esporas intraradicales en V65. Tomado en 40x. e) Esporas intramatriciales de la misma especie en Leptosoles regados durante 90 años (L90) en donde se observan las múltiples capas. Tomado en 40x. f) Espora intramatricial en L90. Tomado en 20x. g) Detalle de la pared de otra espora en L90. Tomado en 40x. h) Paredes de hifas en Vertisoles regados durante 5 años (V05). Tomado en 40x. i) Espora que muestra poros (de germinación ?) en L95. Tomado en 20x. Fotos P. Ortega.

Glomus fasciculatum

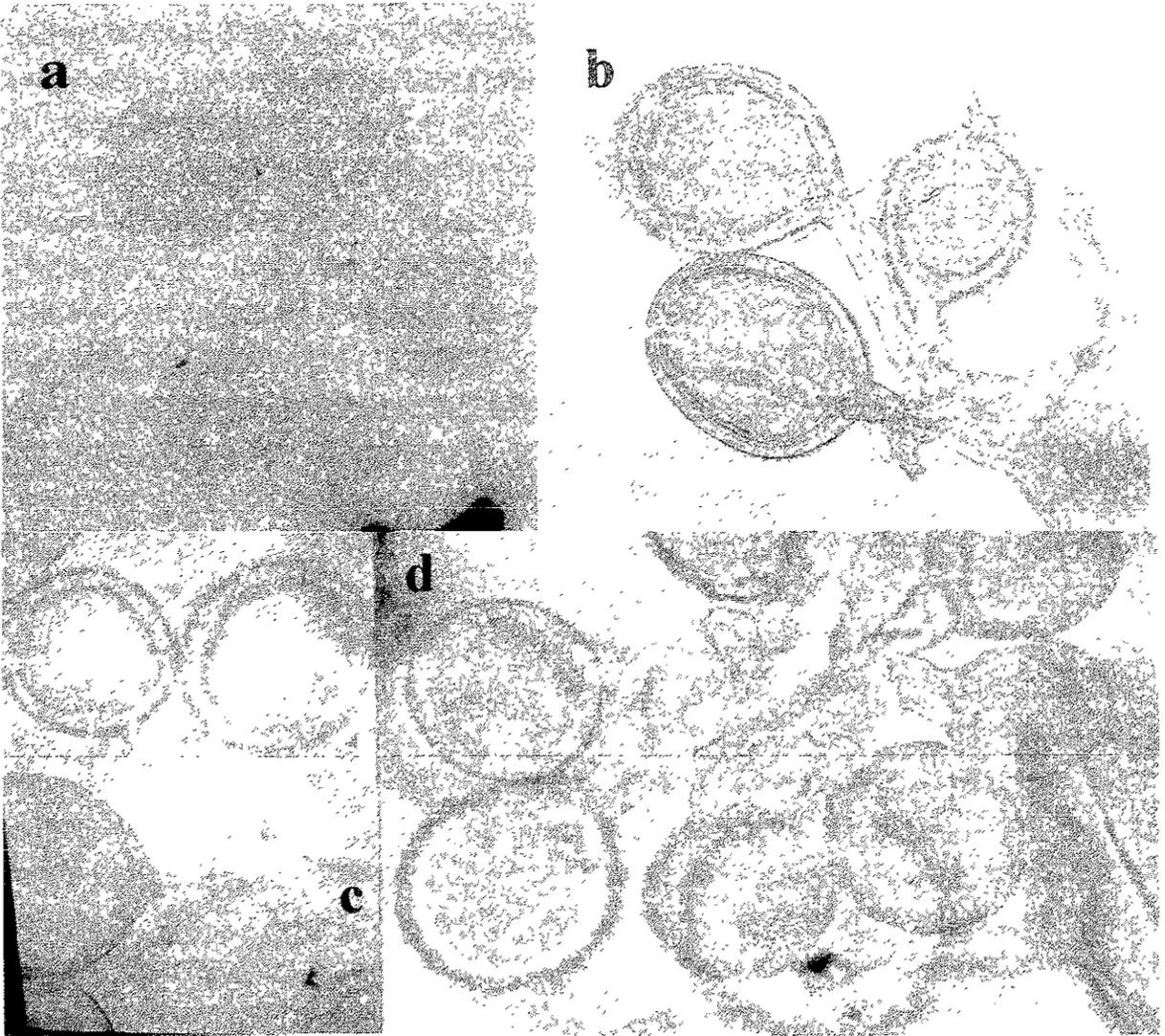


Lámina VI. a) Isotipo de *Glomus fasciculatum* de Walker (W594). Tomado en 10x. b) Esporocarpio laxo encontrado en Leptosoles regados durante 90 años (L90) en el Valle del Mezquital Hidalgo, México. Tomado en 40x. c) Esporocarpio en V05. Tomado en 40x. d) Esporocarpio en L90. Tomado en 40x. Fotos P. Ortega.

Glomus spp.

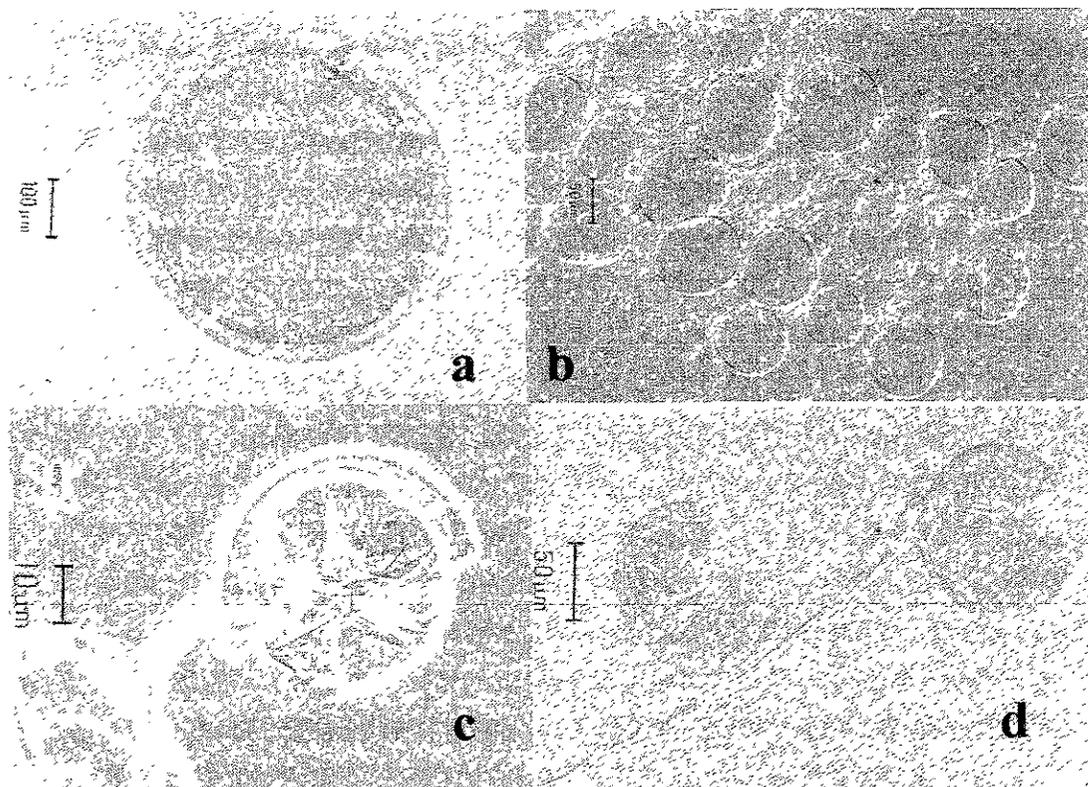


Lámina VI. Algunos hongos micorrízicos encontrados después de la propagación en invernadero de diferentes cultivos de campo, en Vertisoles regados durante 5 años con aguas residuales (V05). A) *Glomus claroideum* (?). Aumento 119x. b) Esporocarpio laxo de *Glomus* sp. originario de V05 y regado con agua negra. Iluminación Nomarski. 50x. c) Espora de un esporocarpio laxo de *Glomus* (*aggregatum*?) originaria de V90 y regada con agua negra. Contraste de fases. 20x a 100x. d) Otras esporas del mismo esporocarpio con iluminación Nomarski. 20x a 83.5x