



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA  
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y  
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

**PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL**

**DIVERSIDAD Y POTENCIAL FITORREMIADOR DE HONGOS DE  
MICORRIZA ARBUSCULAR EN ESPECIES VEGETALES QUE COLONIZAN  
JALES MINEROS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**GUSTAVO PEDRO GARCÍA VELASCO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. CELERINO ROBLES PÉREZ**

Oaxaca, México, Junio de 2016



# INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

## ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 24 del mes de mayo del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: **Diversidad y potencial fitorremediador de hongos de micorriza arbuscular en especies vegetales que colonizan jales mineros**

Presentado por el alumno:

<b>García</b>	<b>Velasco</b>	<b>Gustavo Pedro</b>
Apellido paterno	materno	nombre(s)
Con registro:		
A	1	4
0	3	7
8		

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA  
Director de tesis

Dr. Celerino Robles Perez

Dra. Laila Pamela Partida Martínez

M. en C. Laura Verónica Hernández Cuevas

Dra. Martha Angélica Bautista Cruz

Dr. Jose Luis Chávez Servia

EI PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez  
Director





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 24 del mes de mayo del año 2016, el (la) que suscribe García Velasco Gustavo Pedro alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A140378, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Celerino Robles Pérez y cede los derechos del trabajo titulado, Diversidad y potencial fitorremediador de hongos de micorriza arbuscular en especies vegetales que colonizan jales mineros, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgradoax@ipn.mx](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [gustavo\\_impresion@hotmail.com](mailto:gustavo_impresion@hotmail.com) se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

García Velasco Gustavo Pedro



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

## RESUMEN

Los residuos de minería, coloquialmente llamados “jales”, regularmente contienen altas concentraciones de metales pesados (MP) como plomo, cobre, zinc, manganeso y otros y bajos niveles de nitrógeno, fósforo y materia orgánica. Las altas concentraciones de MP causan efectos adversos en los ecosistemas, además de ocasionar riesgos para la salud humana y animal. A pesar de ello, algunas especies vegetales han sido capaces de colonizar este hábitat, ayudadas posiblemente por la asociación con los microorganismos presentes en su rizósfera, como los hongos que forman micorriza arbuscular (HMA).

Con el objetivo de aislar e identificar especies de HMA asociados a la rizósfera de siete especies vegetales silvestres que han colonizado espontáneamente residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca y su relación con las concentraciones de MP en el suelo, se tomaron muestras de suelo rizosférico y raíces de especies vegetales en cuatro sitios, tres de ellos con residuos de minería y otro sin ellos, como muestra control. Se estimaron el número de esporas, colonización micorrízica e identificación especies de HMA, mediante métodos morfológicos y moleculares, además de las concentraciones de MP en el suelo.

Después, se diseñó un experimento trifactorial completo con tres suelos (jales de minería), dos especies vegetales (*Cynodon dactylon* y *Vachellia pennatula*) y tres tratamientos (ausencia y presencia de HMA, y adición de bagazo de maguey mezcalero compostado), en orden a evaluar la respuesta de *C. dactylon* y *V. pennatula* crecidas en suelos con residuos de minería a la inoculación con consorcios de HMA y adición de bagazo de maguey. Se estimó la colonización micorrízica en las plantas, biomasa vegetal y la cuantificación de la concentración total y extraíble (DTPA) de Pb, Cu, Zn y Mn en los suelos, y la concentración total de estos metales en el tejido radical y aéreo en las plantas, mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Se encontró un número de Glomeromycota de 2 a 833 en 50 g de suelo rizosférico y todas las especies vegetales estuvieron colonizadas (68.3 a 95%). El número de esporas no fue afectado por las concentraciones de MP, sin embargo el porcentaje de colonización fue correlacionado negativamente con las concentraciones del Pb rizosférico ( $R=-0.878^{**}$ ,  $P<0.01$ ).

Mediante métodos moleculares se amplificó la región interna transcrita (ITS) ADNr y se describió la secuencia de ADN de *Entrophora infrequens*. Se identificaron por caracteres morfológicos un total de 15 especies de HMA en los sitios con MP; pertenecientes a los géneros *Acaulospora*, *Ambispora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Claroideoglosum*, *Funneliformis*, *Glomus* y *Rhizophagus*. *Ambispora gerdemannii*, *C. claroideum* y *F. geosporum* fueron las especies más abundantes y dominantes en los sitios con MP, lo que indica su adaptación a las condiciones ambientales locales y a los diversos rangos de concentración de los metales. La diversidad de uno de los sitios (sitio A) fue afectada por los MP en los suelos.

El análisis de correspondencias múltiple (ACM) reveló que las variables de mayor valor descriptivo de la relación entre HMA en especies vegetales y MP fueron: Pb, Mn, *Septoglosum constrictum* y *Acaulospora mellea*. Así mismo, el análisis de correlación canónico (ACoC) revela que ciertas

familias de HMA se correlacionaron significativamente con las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn en el suelo e indica la tolerancia de estas familias de hongos a MP específicos.

El experimento en maceta indicó que la adición de bagazo de maguey compostado incrementó la biomasa en *C. dactylon*; los HMA tuvieron el mismo efecto en *V. pennatula*. Las especies vegetales inoculadas presentaron altos intervalos de colonización (45-75%), con registro de vesículas, esporas intrarradicales y algunas aglomeraciones hifales. La acumulación de Pb, Cu y Zn en los tejidos de las especies vegetales inoculadas con los HMA fue mayor con respecto al tratamiento control y a la adición de bagazo de maguey ( $p < 0.05$ ).

La contribución de los HMA y bagazo de maguey, a la translocación de MP no fue eficiente. En contraste, los HMA incrementaron significativamente la estabilización de Pb, Cu y Zn en las raíces de las plantas ( $p < 0.05$ ). La acumulación de MP en las raíces micorrizadas sugiere un “efecto de dilución” de la concentración en el tejido aéreo. El análisis de componentes principales (ACP) indica que la mayoría de las variables de concentración en los tejidos describieron la acumulación de MP en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

Se concluye que las especies vegetales silvestres que habitan en los residuos de minería están fuertemente asociadas con una comunidad diversa de HMA nativos y que el efecto de los HMA nativos y bagazo de maguey compostado en *C. dactylon* y *V. pennatula* representan un sistema potencial de fitoestabilización de Pb, Cu y Zn en los residuos de minería de San Jerónimo Taviche, Oaxaca, México.

## ABSTRACT

The mine wastes, known colloquially as “tailings”, regularly contain high concentrations of heavy metals (HM) such lead, copper, zinc, manganese, and others, but also of low levels of nitrogen, phosphorous and organic matter. High concentrations of HM adversely affect different ecosystems, but also of cause potential risk to human and animal health. However, some native plant species have been able to colonize this habitat, possibly helped by the association with the microorganisms presents in the rhizosphere, such the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF).

With the objective of isolate and identify to the species of AMF associated to the rhizosphere of seven native plant species with that have colonized spontaneously silver mine wastes in San Jeronimo Taviche, Oaxaca and its relationship with concentrations of HM in the soil, rhizospheric soil samples were taken and roots of plant species in fourth sites, three of them with mine wastes and one without, such control sample. We estimated the spores number, percentage of mycorrhizal colonization and identification of mycorrhizal arbuscular fungi, also the concentrations of HM in the soil.

After, a full experimental design trifactorial with three soils (mine tailings), two plant species (*C. dactylon* and *V. pennatula*) and three treatments (presence or absence of mycorrhizal fungi and addition of maguey bagasse compost), in order to evaluate the response of *Cynodon dactylon* and *Vachellia pennatula* grown in soils with mine tailings to inoculation with mycorrhizal arbuscular fungi and maguey bagasse compost. They were estimated the percentage of mycorrhizal colonization in the plants, plant biomass and the quantification oh the total and extractable concentration of Pb, Cu, Zn y Mn in the soils, and concentrations of this metals in the radical and aerial tissue, by atomic absorption spectrophotometry.

We found a spore number of Glomeromycota from 2 to 833 spores per 50 g of dry rhizospheric soil and that AMF strongly colonized all plant species (68.3 to 95 %). The spore number was not affected by the HM concentration, however, the percentage of mycorrhizal colonization was negatively correlated with concentration of total Pb ( $R=-0.878^{**}$ ,  $p<0.01$ ).

Trough of molecular methods the transcribed internal region (ITS) rDNA amplified and the DNA sequence described of *Entrophora infrequens*. We identified by morphological characters 15 species of AMF belonged to the genera *Acaulospora*, *Ambispora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Claroideoglomus*, *Funneliformis*, *Glomus* and *Rhizophagus*.

*Ambispora gerdemannii*, *C. claroideum* and *F. geosporum* were the most abundant and dominant species of AMF in the soils with HM, indicating their adaptation to local environmental conditions and different concentration ranges of metals. The fungal diversity of the sites (site A) was affect for the HM in the soil.

The multiple correspondence analysis (MCA) revealed that the variables more descriptive value of the relationship between HMA plants and MP were: Pb, Mn, *Septoglomus constrictum* and *Acaulospora mellea*. In addition, the canonical correspondence analysis (CCA) revealed that certain families of AMF were significantly correlated with the concentrations of Pb, Cu, Zn y Mn in the soil and indicates the tolerance of this families of fungi to the HM specific.

The experiment in pot revealed with the addition of maguey bagasse compost increase the biomass in *C. dactylon*; AMF they had the same effect in *V. pennatula*. The plant species inoculated with AMF showed high ranges of colonization (70-95%), with register of vesicles, spores and some large agglomerations of hyphae. The accumulation of Pb, Cu and Zn in the shoot and root tissues in the plant species inoculated with AMF was higher compared to the control treatment and to the maguey bagasse compost ( $p < 0.05$ ).

The contribution of the AMF and maguey bagasse compost to the translocation factor of metals was not efficient. In contrast, the AMF increases significantly the stabilization of Pb, Cu y Zn in the roots of the plants ( $p < 0.05$ ). The accumulation of HM in the roots colonized may be also resulted from a “dilution effect” in the concentration in the shoot tissue. The principal component analysis (PCA) indicates that the most of the variables of concentrations in the tissues described the accumulation of HM in *C. dactylon* y *V. pennatula*.

Our work indicates that the native plant species in mine tailings is strongly associated with a diverse community of AMF natives and *C. dactylon* and *V. pennatula* they increased the vegetal biomass and accumulation of HM in response to inoculation of AMF and maguey bagasse compost, and collectively may represent a potential system of phytostabilization for Pb, Cu and Zn in the mine wastes in San Jeronimo Taviche, Oaxaca, México.

We concluded that the native plant species in mine tailings is strongly associated with a diverse community of AMF natives and the effect that the AMF indigenous and maguey bagasse compost in *C. dactylon* and *V. pennatula* represent a potential system of phytostabilization of Pb, Cu and Zn in the mine wastes in San Jeronimo Taviche, Oaxaca, México.

## CONTENIDO

<b>Resumen</b> _____	4
<b>Abstract</b> _____	6
<b>Introducción</b> _____	12
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Hongos micorrizicos arbusculares asociados a especies vegetales nativas y su relación con las concentraciones de metales pesados</b>	13
Introducción _____	14
Materiales y Métodos _____	15
Resultados y Discusión _____	21
Conclusiones _____	32
Literatura citada _____	33
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Respuesta de plantas crecidas en suelos con residuos mineros a inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y bagazo de maguey compostado</b>	41
Introducción _____	42
Materiales y Métodos _____	43
Resultados y Discusión _____	50
Conclusiones _____	60
Literatura citada _____	61
<b>Conclusiones generales</b> _____	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Localización de los sitios de estudio en San Jerónimo Taviche, Oaxaca (adaptado de Teodoro-Tenango, 2014).

**Figura 2.** Valores promedio del número de esporas y colonización micorrízica en cada sitio de estudio.

**Figura 3.** Esporas de HMA aisladas de tres sitios de deposición de residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca: a) morfotipo acaulosporoide de *A. gerdemannii*, b) morfotipo glomoide de *A. gerdemannii*, c) *C. claroideum*, d) *F. geosporum*, e) *S. constrictum*, f) *A. mellea*, g) *F. mosseae*, h) *G. spinuliferum*, i) *G. margarita*, j) *E. infrequens*, k) esporas en las raíces colonizadas de *C. surinamense* del sitio A. l) Zona minera de Taviche, Oaxaca, m) Sitio B, n) *V. pennatula* del sitio B, o) *C. dactylon* del sitio A y p) *C. surinamense* del sitio A.

**Figura 4.** Secuencia de ADN, descrita para *E. infrequens*. Las regiones consensadas se muestran en las barras de color gris.

**Figura 5.** Análisis de correspondencias múltiples, que indica la asociación de los HMA en las especies vegetales y su relación con las concentraciones de MP.

**Figura 6.** Relación entre las variables de concentración de MP y familias de HMA, en función del primer par de variables canónicas.

**Figura 7.** Ubicación de los tres sitios con residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca (adaptado de Teodoro-Tenango, 2014).

**Figura 8.** Concentración de a) Pb, b) Cu, c) Zn y d) Mn en suelo rizosférico de *V. pennatula* y *C. dactylon* bajo tres tratamientos. Las tres primeras letras representan el género y especie vegetal, seguido del suelo (Ej. CyndacA= *Cynodon dactylon*, suelo A).

**Figura 9.** Análisis de componentes principales (ACP) que muestra la relación entre los tratamientos y las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn en las raíces y tejido aéreo de *V. pennatula* y *C. dactylon*.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos de suelos de tres sitios de deposición de residuos de minería y un sitio testigo en Taviche, Oaxaca (Teodoro-Tenango, 2014 y datos propios).

**Tabla 2.** Especies vegetales silvestres dominantes establecidas en tres sitios de deposición de residuos de minería en Taviche, Oaxaca.

**Tabla 3.** Colonización micorrízica y número de esporas registradas en las especies vegetales establecidas en tres sitios de deposición de residuos de minería y un sitio testigo en San Jerónimo Taviche, Oaxaca.

**Tabla 4.** Presencia de hongos de micorriza arbuscular (HMA), número de esporas (NE), abundancia relativa (AR) y frecuencia de aislamiento (FA) en la rizosfera de siete especies vegetales provenientes de tres sitios de deposición de residuos de minería y un sitio testigo en Taviche, Oaxaca.

**Tabla 5.** Índices ecológicos de hongos formadores de micorriza arbuscular asociados a especies vegetales nativas que colonizan residuos de minería y un sitio testigo, en Taviche, Oaxaca.

**Tabla 6.** Resultados del análisis de correlación canónica entre la concentración de Pb, Cu, Zn y Mn y familias de HMA.

**Tabla 7.** Evaluación de las correlaciones en las tres primeras funciones canónicas.

**Tabla 8.** Inóculos de HMA usados en el experimento. El nombre de las especies de HMA encontradas en cada inóculo es acorde a la más reciente nomenclatura de especies de HMA propuesta por Schüßler and Walker (2010).

**Tabla 9.** Algunas propiedades fisicoquímicas del bagazo de maguey mezcalero (*Agave* spp.) compostado.

**Tabla 10.** Parámetros fisicoquímicos de suelos de tres sitios con residuos de minería y un sitio testigo en Taviche, Oaxaca (Teodoro-Tenango, 2014 y datos propios).

**Tabla 11.** Fracción extraíble DTPA de Pb, Cu, Zn y Mn en la rizosfera de *V. pennatula* y *C. dactylon*, bajo tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado).

**Tabla 12.** Colonización micorrízica y estructuras observadas en *C. dactylon* y *V. pennatula* inoculadas con HMA.

**Tabla 13.** Análisis de varianza de los efectos de las concentraciones de MP en los sitios y los tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado), sobre la biomasa radical y aérea en *V. pennatula* y *C. dactylon*.

**Tabla 14.** Análisis de varianza sobre la acumulación de Pb, Cu, Zn y Mn en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

**Tabla 15.** Comparación de medias de los efectos principales evaluados en *C. dactylon* y *V. pennatula* bajo tres sitios (A, B y C) con diferentes niveles de contaminación por MP.

**Tabla 16.** Comparación de medias de las interacciones dobles (Sitio\*Planta, Sitio\*Tratamiento y Planta\*Tratamiento) evaluadas en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

**Tabla 17.** Comparación de medias de las interacciones triples (Sitio\*Planta\*Tratamiento) evaluadas en *C. dactylon* y *V. pennatula*; con tres suelos (A, B y C) y tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado).

**Tabla 18.** Factores de translocación (FT) en *C. dactylon* y *V. pennatula* bajo tres sitios (A, B y C) y con tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado).

**Tabla 19.** Vectores y valores del análisis de componentes principales (ACP), con base en 8 variables de concentración evaluadas en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A mi Madre por fomentar los valores que me han caracterizado y por respetar mi pensamiento. A mi Padre por formarme y enseñarme a seguir luchando a pesar de las adversidades. A mis hermanos Tania y Uziel por todo su apoyo.

A Anielka y Hanah por ser parte muy importante en este proceso y en mi vida.

A Porfirio Jiménez por su apoyo en la cuantificación de metales pesados

A los integrantes de mi comité tutorial, que me brindaron todo su apoyo y por inculcar un pensamiento reflexivo.

Especialmente al Dr. Celerino Robles Pérez, por su apoyo incondicional y dedicación a la dirección de este trabajo; además de su gran ejemplo como persona.

## INTRODUCCIÓN

La presente investigación se desarrolló como parte del programa académico de la Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales, ofrecida por el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, del Instituto Politécnico Nacional, con el objetivo de aislar e identificar a las especies de hongos de micorriza arbuscular (HMA) asociados a la rizósfera de siete especies vegetales silvestres que han colonizado espontáneamente suelos con residuos de minería en San Jerónimo Taviche y la respuesta de *Cynodon dactylon* y *Vachellia pennatula* crecidas en suelos con residuos de minería a la inoculación con consorcios de hongos de micorriza arbuscular (HMA) y bagazo de maguey compostado.

El estudio se reporta en dos capítulos y conclusiones generales. La primera parte de la investigación abordó la identificación de especies de HMA que crecen en suelos con residuos de minería; a través de caracteres morfológicos y secuencias de ADN. Se determinó la colonización micorrízica, número de esporas y estructura de la comunidad de HMA; y se evaluó su relación con las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn en el suelo rizosférico.

En el segundo capítulo el problema se centró en evaluar la respuesta de *C.dactylon* y *V.pennatula* crecidas en suelos con residuos de minería a inoculación de consorcios de HMA nativos y adición de bagazo de maguey mezcalero compostado. Estas especies vegetales fueron previamente seleccionadas con base en los niveles de colonización micorrízica y poblaciones de esporas de HMA encontrados. Se desarrolló un experimento en maceta y se analizaron químicamente las concentraciones de fracción total y extraíble de los suelos y tejido radical y aéreo en las especies vegetales evaluadas, lo cual permitió evaluar si los tratamientos aplicados incrementaron la biomasa vegetal y la acumulación de Pb, Cu, Zn y Mn en los tejidos radical y aéreo de las especies evaluadas.

Las conclusiones generales indican cuales fueron las especies de HMA más dominantes y abundantes en las especies vegetales y su relación con las concentraciones de metales. En adición, se indica el efecto de los HMA y adición de bagazo compostado sobre la biomasa vegetal y acumulación de metales en *C. dactylon* y *V. pennatula*. Finalmente se sugiere una propuesta de fitoestabilización de los MP en los suelos con residuos de minería, que podría ser utilizada potencialmente para procesos de restauración de la zona minera de San Jerónimo Taviche, Oaxaca, México.

## **CAPÍTULO 1**

---

### **HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A ESPECIES VEGETALES NATIVAS Y SU RELACIÓN CON LAS CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS**

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de los suelos por metales pesados (MP), se origina a partir de actividades antropogénicas, como la minería. Durante la extracción y obtención de minerales y metales, se generan cantidades considerables de residuos contaminantes, llamados (“jales”), en cuya composición hay metales pesados (MP), como plomo, cobre, zinc y manganeso. Los MP no se biodegradan y pueden persistir reactivamente en el ambiente (Yang et al. 2015). Las altas concentraciones de MP causan efectos adversos en diferentes ecosistemas terrestres y acuáticos, además de ocasionar riesgos potenciales para la salud humana y animal (Franco-Hernández et al. 2010). Se ha reportado que la contaminación de suelos por MP, depende de la concentración y especiación química del metal, cuyas concentraciones contaminantes pueden afectar a las poblaciones de microorganismos y al establecimiento de especies vegetales nativas.

La fitorremediación es el uso de plantas y microorganismos rizosféricos con capacidad para remover, transportar o disminuir contaminantes presentes en el suelo, como los MP (Miransari, 2011). Las especies vegetales adaptadas a sitios donde hay contaminación por MP desarrollan mecanismos para tolerarlos, como producción de exudados radicales, quelación extracelular, secuestro de iones metálicos, transporte de metales desde la raíz a la parte aérea, procesos antioxidativos y almacenamiento de metales en vacuolas (Verkleij et al. 2009). Algunos autores (Taheri and Bevor, 2010; Alford et al. 2010; Gucwa-Przepióra et al. 2014) señalan que esta tolerancia se debe a la simbiosis con diversos microorganismos del suelo, siendo los más prominentes los hongos que forman micorriza arbuscular (HMA) (Zarei et al. 2008b).

Los HMA pertenecen al phylum Glomeromycota (Schüßler et al. 2001), colonizan cerca del 80% de las raíces de las especies vegetales terrestres (Miransari, 2011). Estos hongos incrementan el flujo de nutrientes minerales como fósforo y agua al hospedero y tienen la capacidad de adaptarse a diversos sitios perturbados, incluyendo aquellos contaminados por MP. Los HMA en conjunto con las especies vegetales cuyas raíces colonizan, han desarrollado estrategias de tolerancia a estos últimos, como la quelación de metales en sus raíces, su precipitación en gránulos de polifosfatos y su almacenamiento en vesículas, hifas y esporas (Gaur and Adholeya, 2004). De acuerdo a Karimi et al. (2011) los HMA cumplen una función vital en el establecimiento y mantenimiento de las plantas en sitios contaminados por MP.

Long et al. (2010) y Ban et al. (2015) indican que la diversidad, abundancia y colonización por HMA, además de estar influenciados por parámetros del suelo como pH, conductividad eléctrica y materia orgánica, también lo están por el tipo y concentración de MP presentes en el suelo.

Diversos estudios han evaluado la diversidad y estructura de la comunidad de HMA en sitios con MP (Kumar and Uddin 2011; Singh and Jamaluddin, 2011; Kullu and Behera,

2012), sin embargo existe falta de información acerca de las relaciones entre la comunidad de HMA asociadas a su hospedero y las concentraciones de MP en el suelo, lo que permitirá identificar a las especies de HMA mas dominantes y con mayor tolerancia a las concentraciones de MP, lo que potencialmente podría aplicarse en procesos de fitorremediación.

Un análisis de la estructura de la comunidad de HMA en sitios contaminados con MP permitirá identificar a las especies de HMA que prosperan en suelos con MP. Al respecto, Daniell et al. (2001) y Yang et al. (2010) han citado que las especies del género *Glomus sensu lato* dominan en sitios contaminados con MP.

La identificación morfológica de HMA por medio de esporas constituye el primer paso para el estudio de la estructura de la comunidad de HMA, sin embargo esta técnica resulta compleja, ya que su identificación requiere un conocimiento extenso sobre estos simbiontes, lo cual limita diversos estudios ecológicos (Ortega-Larrocea et al. 2012). De acuerdo a Krüger et al. (2009) y Stockinger et al. (2010) existen especies crípticas de HMA, que muestran características morfológicas muy semejantes entre sí, lo que complica aún más su identificación. Bajo estas circunstancias las técnicas moleculares, mediante la amplificación de la región interna transcrita (ITS) ADNr podrían generar información más precisa acerca de la identidad de las especies de HMA y elucidar los grupos filogenéticos de estos hongos.

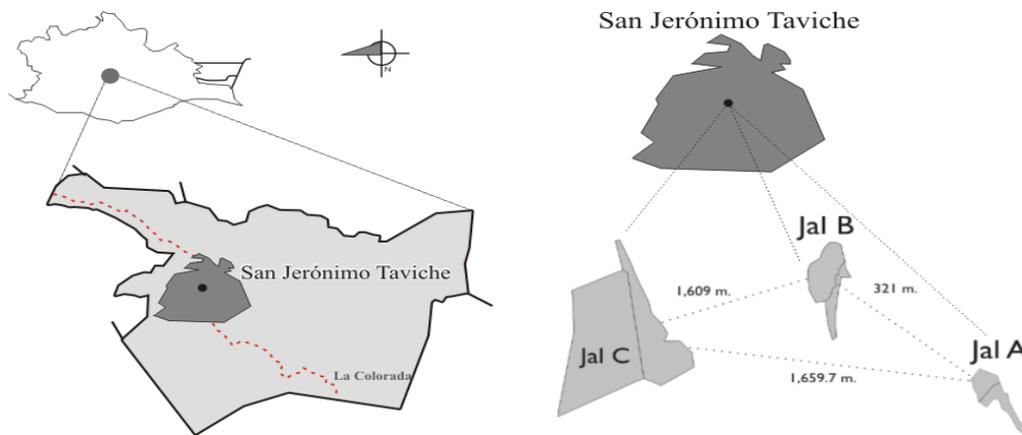
El objetivo de la presente investigación fue: 1. Aislar e identificar a las especies de HMA que crecen en suelos con residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca, México; a través de morfología y secuencias de ADN, y evaluar su relación con las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn en los suelos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Descripción del sitio de estudio y caracterización fisicoquímica del suelo**

La zona minera de Taviche, Oaxaca, se encuentra localizada en el Municipio de San Jerónimo Taviche, en el distrito de Ocotlán, Oaxaca, México. La zona cuenta con registros de extracción de plata y oro desde 1550 (Sánchez, 1993). El material parental de la zona está compuesto por una secuencia de paragneises y ortogneises ricos en biotita y sobre este basamento está expuesta una serie de rocas calizas con horizontes arcillosos, areniscas, conglomerados y limolitas (SECOFI, 1996).

Este estudio incluyo tres sitios de deposición de residuos de minería bien definidos, designados como A, B y C (Figura 1) y un sitio testigo sin residuos de minería. Los sitios se encuentran a una altitud media de 1700 msnm y la vegetación de la zona es selva baja caducifolia y matorral xerófilo (SEMARNAT, 2004a).



**Figura 1.** Localización de los sitios de estudio en San Jerónimo Taviche, Oaxaca (adaptado de Teodoro-Tenango, 2014).

El sitio A, cuenta con una superficie de 1281.21m<sup>2</sup>, el B con 3391.84 m<sup>2</sup> y el C con 13486.25 m<sup>2</sup>. Se evaluó la concentración de Pb, Cu, Zn y Mn en los suelos, analizados en sus fracciones de concentración total, por digestión en HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O 3:2:10 (Jiménez, 2010), y extraíble con DTPA (0.005 M DTPA, 0.1 M trietanolamina y 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, con pH de 7.3) (Lindsay and Norvell, 1978). Las lecturas de concentración se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer 3110). También se evaluó el pH, la conductividad eléctrica (CE) y el contenido de MO de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT, 2002).

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos de suelos de tres sitios de deposición de residuos de minería y un sitio testigo en Taviche, Oaxaca (Teodoro-Tenango, 2014 y datos propios).

Sitio	pH	CE (dS m <sup>-1</sup> )	MO (%)	Pb	Pb DTPA	Zn	Zn DTPA	Mn	Mn DTPA	Cu	Cu DTPA
A	3.6	0.8	1.0	1999.2	341.5	215.7	0.7	69.4	26.4	104.2	0.0
B	5.9	1.3	1.3	307.6	43.6	317.0	51.1	0.0	0.0	104.2	0.0
C	8.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1972.2	43.1	0.0	0.0
T	7.2	0.2	0.2	0.0	0.2	63.2	0.6	584.8	7.9	6.1	0.1

Fuente: Teodoro-Tenango, (2014) y datos propios. CE conductividad eléctrica, MO materia orgánica.

En general los sitios son altamente erosionables, arcillosos y con bajos contenidos de materia orgánica (Tabla 1). El sitio A y B presentan pH ácidos, contenidos de materia orgánica bajos y son similares en conductividad eléctrica. Los sitios C y T tienen pH alcalinos, contenidos de materia orgánica muy bajos y valores de conductividad eléctrica menores que los sitios A y B (SEMARNAT, 2002).

El sitio A y B, presentan concentraciones contaminantes por Pb, Cu y Zn (SEMARNAT, 2004b y USDA 2000) mientras que el sitio C, registra concentraciones elevadas por Mn (Alloway, 1995). El sitio T se reporta con concentraciones bajas de Cu y Zn, normales en Mn (Linzon, 1978) y ausentes de Pb. Se sugiere considerar al material parental que dio origen al suelo, composición mineralógica y formas de intemperismo, como fuentes

probables de suministro a la concentración de los metales reportados (Bautista-Cruz et al 2010).

### Muestreo en campo

Se recolectaron muestras de suelo rizosférico de individuos de cada especie vegetal seleccionada (Tabla 2). Se realizó un muestreo dirigido para ubicar los sitios de depósitos de jales de minería con las especies vegetales seleccionadas y una vez ubicadas estas, se realizó un muestreo al azar de individuos de cada especie vegetal (Volke et al. 2005).

Se tomaron muestras de suelo fuera de los sitios con residuos de minería y se asignaron como muestras testigo.

En la rizosfera de cada especie vegetal se recolectaron 500 g de suelo en cada punto, a una profundidad de 0-20 cm. Se mezclaron y se obtuvo una muestra compuesta; la que se guardó en bolsas de polietileno y se conservaron a 4°C para la determinación de índices ecológicos aplicados a las comunidades de los HMA.

De cada muestra compuesta se separaron del suelo las raíces más finas; el sistema radical se secó a 65 °C por 72 horas y se conservó a temperatura ambiente, mientras que el suelo se tamizó (2 mm de tamaño) y se conservó a 4 °C. El muestreo se realizó en agosto de 2014, en la estación de lluvias.

**Tabla 2.** Especies vegetales silvestres dominantes establecidas en tres sitios de deposición de residuos de minería en Taviche, Oaxaca.

Sitio	Especie vegetal	Familia
A, B, C, T	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Poaceae
A, C, T	<i>Clibadium surinamense</i> L.	Asteraceae
A, B, C, T	<i>Vachellia pennatula</i> (Schltdl. & Cham.) Seigler & Ebinger	Mimosaceae
A, C, T	<i>Brickellia veronicifolia</i> (Kunth) A. Gray	Asteraceae
B, T	<i>Bouteloua dimorpha</i> Columbus	Asteraceae
C, T	<i>Barkleyanthus salicifolius</i> (Kunth) H. Rob. & Brettell	Asteraceae
C, T	<i>Salix mexicana</i> Seemen	Salicaceae

Fuente: Teodoro-Tenango, (2014). A, B y C= sitios; T= sitio testigo fuera de los sitios con residuos de minería

### Aislamiento y conteo de esporas

La recuperación y el conteo de esporas se realizaron acorde al método de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann and Nicolson, 1963), seguido por centrifugación en un gradiente de sacarosa (Daniels and Skipper, 1982, modificado por Brundett et al. 1996). Se colocaron 50 g de suelo rizosférico seco en un recipiente de 1 L, se le agregó agua corriente, se agitó vigorosamente por 20 s, se dejó reposar y se decantó sobre dos tamices con diferente abertura de malla (177 µm y 63 µm). El material capturado del primer tamiz (177 µm) se colocó en una caja petri y se revisó bajo el estereoscopio. El material del segundo tamiz (63

µm) se colocó en tubos con solución de sacarosa de 20 y 60% respectivamente y se centrifugaron a 3500 rpm por 3 minutos. El material obtenido se colocó en cajas petri y bajo un estereoscopio se aislaron las morfoespecies y se conservaron en preparaciones con alcohol polivinílico-lactoglicerol (PVLG) y PVLG con reactivo de Melzer. Para el conteo de esporas, solo se consideraron aquellas con contenido citoplasmático (Hernández-Cuevas et al. 2012).

### **Identificación morfológica de las especies de HMA**

La identificación taxonómica de especies se realizó por comparación y contraste de características morfológicas observadas de las esporas, con referencia en las descripciones disponibles en las bases de datos de International Collection of Vesicular and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) (<http://invam.wvu.edu/>), del profesor J. Błaszowski (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/>), y literatura especializada. Las observaciones se realizaron con un microscopio con contraste de interferencia de Nomarski (Nikon Optiphot II Plus) con reglilla micrométrica acoplada al ocular. Fotografías de las esporas y de algunas de sus características subcelulares se obtuvieron con una cámara Toupcam UCMOS02000KPB acoplada al microscopio y el software de digitalización de imágenes ToupTek ToupView versión x64.3.7.1460 (2003-2013).

### **Descripción de secuencias de ADN de esporas de HMA**

Se aislaron esporas identificadas previamente por caracteres morfológicos y de mayor abundancia. Las esporas se desinfectaron con tween 20 (0.05%), cloramina T (2%) y una mezcla de estreptomicina-gentamicina (200 y 100 ppm, respectivamente) (Bécard and Fortin, 1988) y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Se seleccionaron de 150 a 250 esporas de cada especie de HMA y se colocaron en un tubo eppendorf de 0.5 mL de capacidad, se agregaron 100 µL de dodecilsulfato sódico (SDS, 1%), se agitaron con un vortex durante 1 min y se lavaron con 100 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Se aplicaron seis ciclos de rompimiento de pared celular mediante una punta estéril, diferentes ciclos de enfriamiento y descongelamiento. Finalmente, el lisado se resuspendió en 60 µL de buffer TE. Al lisado se le agregaron 60 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1). Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm por 3 min (Schwarzott and Schüßler, 2001).

La fase acuosa que contenía el ADN se colocó en un tubo eppendorf. Para remover el exceso de fenol en la fase acuosa se agregaron 60 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se aplicaron movimientos de inversión. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo y se agregaron 120 µL de poli-etilenglicol 4000 (30%) con NaCl (1.6 M) y se incubó a -4 °C durante 12 horas. La muestra se centrifugó a 12000 rpm por 10 min para recuperar la pastilla del fondo. Se lavó con 100 µL de etanol al 70%. Finalmente la pastilla se secó en la campana de flujo laminar a temperatura ambiente y se diluyó en 100 µL de buffer TE (Kwong Ma, 2004). Para la amplificación vía PCR de la región interna transcrita (ITS) del

ADNr, se utilizaron los primers SSUmCf-LSUmBr (1500 pb) reportados por Stockinger et al. (2010).

La PCR fue representada en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ : 10X buffer, 10  $\mu\text{M}$  de dNTP, 10  $\mu\text{M}$  de cada primer y 1 U de taq polimerasa. Se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de ADN como templado. La reacción fue realizada en el termociclador T100, con los siguientes pasos: 95 °C por 1 min para la fase inicial de desnaturalización, 35 ciclos de 95 °C por 15 s de desnaturalización, 53 °C por 15 s de alineamiento y 72 °C por 45 s de extensión, y 72 °C por 7 min de extensión final. Se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  del primer producto de PCR para realizar una PCR anidada con los primers universales ITS1F-KYO2 (TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) pertenecientes a la región ITS (500-650 pb) (Toju et al. 2012), bajo las mismas condiciones de la primer PCR.

El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados de la región ITS (SSU parcial-ITS1-5.8S-ITS2-LSU parcial) fueron ligados con el vector pJET 1.2 y transformados con células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

Las diluciones se colocaron en cajas de agar con LB y ampicilina (100 mg L<sup>-1</sup>) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se seleccionaron aleatoriamente cinco colonias de cada reacción de clonación, se hicieron crecer en medio líquido LB con ampicilina (100 mg L<sup>-1</sup>) y se incubaron a 37 °C. Se realizó la extracción de ADN plasmídico para verificar la ligación de los fragmentos ITS y LSU-SSU. Se obtuvieron 4 clones por cada HMA. Los clones seleccionados se digestaron con la enzima BGL-II (Invitrogen), acorde al protocolo del fabricante. El ADN plasmídico de los clones positivos se envió al secuenciador Sanger. Las secuencias se consensaron y se asignaron a cada especie de HMA. Se utilizó el programa Geneious (<http://www.geneious.com/>) para alinear y editar las secuencias de ADN de las esporas de HMA (Lee et al. 2006; Desgarenes et al. 2014).

### **Porcentaje de colonización de HMA en la raíz**

Se usaron los métodos de Giovanetti and Mosse (1980) y Brundrett et al. (1996) para evidenciar las estructuras fúngicas en las raíces. Las raíces frescas de las especies vegetales fueron lavadas con agua corriente para eliminar el exceso de detritos y fueron aclaradas con KOH al 10% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2%, seguidas de lavado y acidificación en HCl al 10%.

Las raíces fueron cortadas en segmentos de 1.0 cm de longitud y se tiñeron con azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol al 50%, con base en la metodología de Phillips and Hayman (1970). El porcentaje de colonización se estimó de acuerdo con la propuesta de McGonigle (1990); se montaron 25 segmentos de raíces en un portaobjetos y se observaron bajo un microscopio compuesto (Leica DME).

### **Análisis estadísticos y ecológicos**

Previo al análisis los datos porcentuales fueron transformados mediante la función Arcoseno. Los datos de número de esporas se transformaron por la función log, para así ajustarlos a una distribución normal.

Se efectuó la prueba de t-student ( $p < 0.05$ ) para comparar los valores promedios de colonización micorrízica y número de esporas en los sitios con MP contra el sitio testigo. Para analizar la relación lineal entre el contenido de MP en los suelos rizosféricos (Cu, Zn, Pb y Mn) con respecto al porcentaje de colonización y número de esporas, se realizó un análisis de Pearson ( $r$ ) y un análisis de regresión simple ( $p < 0.01$ ). Por sitio se determinó la riqueza de especies, la diversidad máxima, la abundancia relativa, la frecuencia de aislamiento, los índices de diversidad, de equitatividad y de dominancia (Magurran, 1988), que se utilizaron como indicadores de la estructura de la comunidad de HMA. La diversidad ( $H'$ ) de las comunidades de HMA en cada sitio (Hill, 1973) fue cuantificada mediante a la fórmula:

$$H' = \sum_{i=1}^s p_i \ln(p_i)$$

Donde  $p_i$  es la abundancia relativa de cada especie identificada y fue calculada mediante la siguiente formula:  $p_i = n_i/N$ , donde  $n_i$  es el número de esporas de una especie y  $N$  es el número total de esporas de todas las especies.

El índice de equitatividad  $E$ , mide la equidad de la presencia de cada especie en todas las muestras y está representado por:  $E = H/H_{\max}$ , donde  $H_{\max}$  es la diversidad máxima de  $H$  y está estimado por:  $H_{\max} = \ln S$ , donde  $S$  es el número total de especies identificadas. El índice de dominancia de Simpson fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $D = R [n_i(n_i - 1)/N(N - 1)]$ . La abundancia relativa indica la capacidad de esporulación de cada especie de HMA y la frecuencia de aislamiento refleja la distribución de una especie particular de HMA en un ecosistema (Dandan and Zhiwei, 2007).

La comparación los índices de diversidad entre los sitios, se realizó mediante la prueba t-student modificada por Hutchenson ( $p < 0.05$ ).

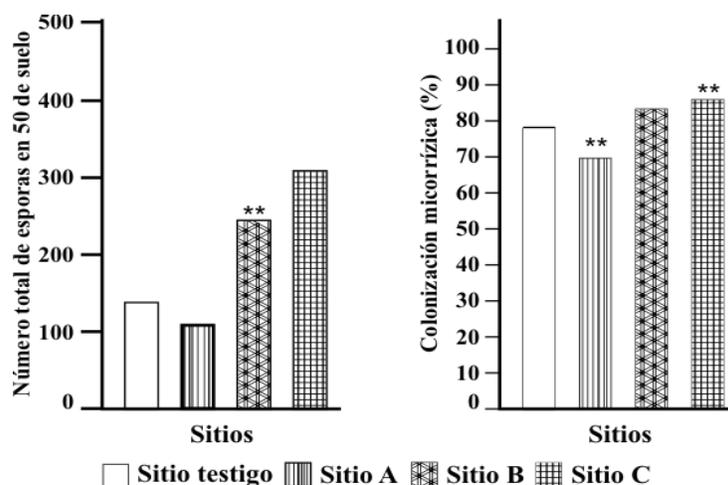
Para describir la relación entre los HMA en las especies vegetales y su relación con las concentraciones de MP en el suelo, se realizó un análisis de correspondencias múltiple (ACM).

La relación entre el número de esporas de cada especie de HMA y su asociación con las concentraciones de MP se representó mediante un análisis de correlación canónico (ACoC). Los datos se transformaron previamente mediante la función  $\sqrt{x}$ . Todos estos análisis fueron realizados con el paquete estadístico R (R Core Team, 2013), mediante las librerías CANDISC (Friendly and Fox, 2016) y VEGAN (Oksanen et al. 2016).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Número de esporas, colonización micorrízica y estructura de la comunidad de HMA

El número promedio de esporas varió entre los sitios de estudio (Figura 2). El sitio A registro 106 esporas en 50 g de suelo, el sitio B; 239 esporas en 50 g de suelo y el sitio C; 304 esporas en 50 g de suelo. El sitio testigo registró; 136 esporas en 50 g de suelo. El número de esporas del sitio B presentó diferencias significativas conforme al sitio testigo ( $p < 0.05$ ) y el análisis de correlación indicó que las concentraciones de Pb ( $r = -0.393$ ,  $p < 0.05$ ), Cu ( $r = -0.081$ ,  $p < 0.05$ ), Zn ( $r = -0.019$ ,  $p < 0.05$ ) y Mn ( $r = -0.254$ ,  $p < 0.05$ ) en el suelo, no tuvieron un efecto significativo sobre el número de esporas de HMA. Estos valores contrastan con los de Zarei et al. (2008a), donde las concentraciones de Pb (5203.1 mg/kg) y Zn en los suelos (6472.5 mg/kg) afectaron negativamente el número de esporas de HMA en un estudio en Irán.



**Figura 2.** Valores promedio de cada sitio del de número de esporas y colonización micorrízica. \*\*Presentan diferencias significativas en comparación al sitio testigo ( $p < 0.05$ ).

El mayor número de esporas registrado en el sitio B y C, se puede vincular con la estación de muestreo (lluvias). Burrows and Pflieger, (2002), indican que en la estación de lluvias, se presentan las mejores condiciones para el crecimiento de la especie vegetal y, como resultado, un mayor flujo de fotosintatos y de energía para la esporulación del hongo. Estos resultados coinciden con de Gattai et al. (2011), quienes registraron un mayor número de esporas en la estación de lluvias en la rizósfera de *Erythrina velutina* establecida en suelos contaminados con Pb. No obstante, Alves da Silva et al. (2001), registraron en suelos con residuos de Cu en Brasil, un mayor número de esporas en la estación de secas y lo relacionaron con las concentraciones de Cu y al pH alcalino del suelo.

Las elevadas concentraciones de MP pueden promover la esporulación del hongo; y se puede considerar un mecanismo de respuesta adaptativa por parte del hongo hacia las concentraciones de MP. De acuerdo a del Val et al. (1999) y Wei et al. (2014), un alto

número de esporas de HMA indica una respuesta del hongo hacia el estrés ocasionado por los metales, haciendo al hongo más competitivo y con mayor capacidad de colonizar las raíces de su hospedero y así poder completar su ciclo de vida. Rivera-Becerril et al. (2002), Vallino et al. (2006) y Helgason et al. (2007), consideran a las esporas como estructuras de resistencia y como un sistema de adsorción al quelar iones metálicos en su pared celular.

En adición, Krishnamoorthy et al. (2015) sugieren que un alto número de esporas se vincula con las tasas de micorrización, ya que el micelio extrarradical en el suelo, el que, al estar expuesto a las concentraciones de los metales, incrementa la esporulación del hongo, como una estrategia de supervivencia.

Los valores de colonización micorrízica, indicaron la colonización más alta en el sitio C y la menor fue registrada en el sitio A ( $p < 0.05$ ) (Figura 2). Estos valores son mayores a los reportados por Wei et al. (2014) en China y Straker et al. (2007) en Sudáfrica para suelos con MP.

Al respecto, las concentraciones de Cu ( $r = -0.293$ ,  $p < 0.05$ ), Zn ( $r = -0.504$ ,  $p < 0.05$ ) y Mn ( $r = -0.048$ ,  $p < 0.05$ ) no tienen un efecto significativo en la colonización micorrízica. Sin embargo, ésta correlacionó negativa y significativamente con el Pb del suelo rizosférico ( $r = -0.878^{**}$ ,  $p < 0.01$ ). Estos resultados concuerdan con Al-Ghamdi and Jais (2011) y Yang et al. (2008), quienes reportaron que las concentraciones de Pb causaron un efecto significativo y negativo en la colonización micorrízica (59-79%) de *Juniperus procera* y *Solidago canadensis*, respectivamente.

En este estudio; se observaron mayormente vesículas, esporas e hifas intraradicales. Las vesículas son estructuras que almacenan lípidos (Mosse, 1973), pero su relación con los MP ha sido poco estudiada (Whitfield et al. 2004), mientras que las esporas mediante su pared celular pueden ligar MP (Joner et al. 2000). Ambas estructuras podrían estar participando en la tolerancia a la toxicidad de MP en las especies vegetales. Sánchez-Viveros et al. (2004) reportaron que esporas inmaduras de *Funneliformis mosseae* (especie citada como *Glomus mosseae*) secuestraron entre 470 y 680 mg g<sup>-1</sup> de Cu y sugieren que su quitina puede contribuir al secuestro de iones Cu.

Las especies vegetales en los sitios con MP presentaron una alta colonización por HMA, que osciló de 68.3 a 95.0% (Tabla 3). Khade and Adholeya (2009), registraron similares niveles de colonización micorrízica (27.50 a 100%) en especies vegetales establecidas en suelos contaminados por diferentes metales en la India, estos valores lo atribuyen a la época de muestreo (monzones) y a las propiedades fisicoquímicas del suelo. Los altos valores de colonización en las especies vegetales sugieren la gran necesidad de micorrización del hospedero para su mantenimiento y hacer frente a las concentraciones de los MP (Patra et al. 2004).

**Tabla 3.** Colonización micorrízica y número de esporas registradas en las especies vegetales establecidas en tres sitios de deposición de residuos de minería y un sitio testigo en San Jerónimo Taviche, Oaxaca.

Especie vegetal	Colonización micorrízica (%)				Número de esporas (50 g de suelo)			
	Sitio				Sitio			
	A	B	C	T	A	B	C	T
<i>C. dactylon</i>	71.33	81.66	95.00	81.66	2	174	833	68
<i>C. surinamense</i>	68.33		81.66	75.00	81		571	178
<i>V. pennatula</i>	75.00	88.33	81.33	81.66	330	311	24	64
<i>B. veronicifolia</i>	68.33		86.66	81.66	12		183	82
<i>B. dimorpha</i>		81.66		81.66		233		147
<i>B. salicifolius</i>			85.00	71.66			174	366
<i>S. mexicana</i>			88.33	71.66			40	46

En general, *C. dactylon* del sitio C fue la especie más colonizada por HMA y con el mayor número de esporas (Tabla 3). Los valores de colonización coinciden con los de Leung et al. (2007), quienes reportaron a esta especie vegetal con una colonización del 85% en sitios contaminados con Pb, Zn, Cu y Cd, en el sureste de China. Respecto al número de esporas, estos valores son mayores a los reportados por Wu et al. (2010) en la rizosfera de *C. dactylon* en sitios contaminados por As, Pb, Zn, Cd y Cu, en China. Estos resultados indican la adaptación de esta especie a las concentraciones de MP. *Cynodon dactylon* ha sido reportada por su capacidad de establecerse en diferentes sitios con MP (Archer et al. 2004) y su presencia se puede vincular con su plasticidad fenotípica y genotípica propia de la especie y sus asociaciones con microorganismos rizosféricos como los HMA (Wang and Qiu, 2006; Falik et al. 2012; Meharg, 2003).

La Figura 3, muestra a las especies vegetales que han colonizado espontáneamente los residuos de minería, y las estructuras de HMA observadas en sus raíces. Se muestran a las especies de HMA identificadas por morfología y utilizadas para la descripción de sus secuencias de ADN mediante métodos moleculares.



**Figura 3.** Esporas de HMA aisladas de tres sitios de deposición de residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca: a) morfotipo acaulosporoide de *A. gerdemannii*, b) morfotipo glomoide de *A. gerdemannii*, c) *C. claroideum*, d) *F. geosporum*, e) *S. constrictum*, f) *A. mellea*, g) *F. mosseae*, h) *G. spinuliferum*, i) *G. margarita*, j) *E. infrequens*, k) esporas en las raíces colonizadas de *C. surinamense* del sitio A. l) Zona minera de Taviche, Oaxaca, m) Sitio B, n) *V. pennatula* del sitio B, o) *C. dactylon* del sitio A y p) *C. surinamense* del sitio A.

Bajo este contexto, se describió la secuencia de ADN de *Entrophospora infrequens*, con una secuencia de 445 pb; *Entrophospora infrequens* U94713.1 clone (XX) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene and ITS2, complete sequence and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence (Figura 4).

10	20	30	40	50	61
<b>TTAAGTTCAGCGGGTATCCCCGCCTGATCCGAGGTCAACTTGAAAGAAGGGTTTCCGGCG</b>					
71	81	91	100	110	120
<b>AATTAAC TCGGAGT GAGTCGTCACAGATGGTCAATTGCCAACGATATTGGAATCCTGCCA</b>					
132	142	152	160	170	180
<b>CGGCAGTGATTCAAATCCAAGCAGCGCTTGAGAGTGTAAATGACGCTCGAGCAGGCGTACT</b>					
193	203	213	220	230	240
<b>CCTCGGAATACCAAGGAGTGCAATGTGCGTTCAAAAAC TCGATGATTCACGGAATTCTGC</b>					
254	264	274	280	290	300

**AATTCACATTATTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCTGGAACCAAGAGATCC**  
 315            325            335            340            350            360  
**GTTGTTGAAAGTTTTAATCATTTCGATTGCACTCGGACAGTATCGCATTCCCAGAGTTAAA**  
 376            386            396            406            416            427  
**GTTTGACGAGTCCATGACATCGCCAAAGAAACCAGAGGTTCCACAAGGGGTGTGAATGAG**  
 437            448  
**GCCGAAGCCTAACACTGTAAT**

**Figura 4.** Secuencia de ADN, descrita para *E. infrequens*. Las regiones consensadas se muestran en las barras de color gris.

Maki et al. (2008) registró la secuencia 18S ADNr de una especie de HMA perteneciente al género *Entrophospora*, en suelos con sulfato ácidos en Japón. *Entrophospora infrequens*, de acuerdo a Redecker et al. (2003) contiene genes ribosomales del género *Glomus* y la familia *Gigasporaceae*, e indica su alta variabilidad genética, razón que ha dificultado definir sus relaciones taxonómicas (Schüßler y Walker 2010).

Con base en los resultados de este trabajo, es deseable, para obtener mejores y mayores resultados positivos, el diseño de primers específicos para cada familia de HMA, y utilizar esporas provenientes de cultivos monoesporicos (especies axénicas y de una sola especie de HMA) que generen inóculos de calidad y permitan reevaluar las características morfológicas de las esporas y así elucidar relaciones filogenéticas entre estos grupo de hongos (Ortega-Larrocea et al. 2012).

Mediante caracteres morfológicos, se identificaron 15 especies de HMA en los sitios con MP; en el sitio testigo fueron nueve (Tabla 4). *Ambispora gerdemannii* (Ambisporaceae) fue la especie más abundante, y representó el 55% (1608 esporas) de la población total en los sitios con MP y fue la especie más abundante en el sitio A.

*Claroideoglomus claroideum* registró el 15% (438 esporas) y *F. geosporum* represento el 10.88% (319 esporas). Las esporas del género *Glomus*, *Acaulospora* y *Gigaspora* fueron las menos abundantes y frecuentes. *F. geosporum* fue la especie dominante en el sitio testigo y representó el 59.20% (573 esporas). Los géneros citados aquí como *Claroideoglomus* y *Funneliformis* se disgregaron del género *Glomus* recientemente (Schüßler and Walker, 2010).

En base a la alta frecuencia de aislamiento; *C. claroideum* (95%), *F. geosporum* (95%) y *A. gerdemannii* (85%), se deben considerar especies generalistas y las más adaptadas a las concentraciones de MP. La abundancia y dominancia de *A. gerdemannii*, sugiere su adaptación a las condiciones ambientales locales. Su abundancia se puede deber a su facilidad de propagación vía micelio extrarradical, colonización en fragmentos de raíces y alta tasa de esporulación (Daniel et al. (2001); Hassan et al. (2010)). El género *Ambispora* generalmente produce esporas pequeñas y colonizan abundantemente las raíces de su hospedero, en comparación con las especies pertenecientes al género *Gigaspora*, que producen esporas con mayor tamaño pero en menor número y menor colonización (Borges

et al. 2014). Turnau et al. (2001) mediante métodos moleculares identificaron a esta especie en las raíces de *Fragaria vesca*, en sitios con residuos de Zn en Polonia.

**Tabla 4.** Presencia de hongos de micorriza arbuscular (HMA), número de esporas (NE), abundancia relativa (AR) y frecuencia de aislamiento (FA) en la rizosfera de siete especies vegetales provenientes de tres sitios de deposición de residuos de minería y un sitio testigo en Taviche, Oaxaca.

Especies de hongos de micorriza arbuscular	Sitio de muestreo				NE	AR	FA
	A	B	C	T			
Diversisporales							
Acaulosporaceae					186	4.74	40.0
<i>Acaulospora mellea</i> Spain & Schenck	X	X	X	X	163	4.15	20.0
<i>Acaulospora kentinensis</i> Wu & Liu				X	7	0.17	10.0
<i>Acaulospora spinosa</i> Walker & Trappe				X	7	0.17	15.0
<i>Acaulospora</i> sp 1.			X		4	0.10	5.0
<i>Acaulospora</i> sp 2.			X		5	0.12	5.0
Entrophosporaceae					9	0.22	10.0
<i>Entrophospora infrequens</i> Hall	X	X			9	0.22	10.0
Gigasporaceae					61	1.55	10.0
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall		X	X		61	1.55	10.0
Ambisporaceae					1653	42.17	85.0
<i>Ambispora gerdemannii</i> Ross, Daniels & Trappe	X	X	X	X	1653	42.17	85.0
Glomerales							
Glomeraceae					1267	32.32	95.0
<i>Glomus spinuliferum</i> Sieverd et Oehl		X		X	21	0.53	15.0
<i>Funneliformis mosseae</i> (Nicolson et Gerd.) Walker		X	X		32	0.81	10.0
<i>Septoglomus constrictum</i> Trappe	X	X	X	X	314	8.01	70.0
<i>Funneliformis geosporum</i> (Nicolson et Gerd.) Walker	X	X	X	X	882	22.50	95.0
<i>Rhizophagus fasciculatus</i> Thaxt.	X	X	X		8	0.20	20.0
<i>Glomus</i> sp 1.		X			8	0.20	15.0
<i>Glomus</i> sp 2.		X			1	0.02	5.0
<i>Glomus</i> sp 3.		X			1	0.02	5.0
Claroideoglomeraceae					743	18.95	95.0
<i>Claroideoglomus claroideum</i> Schenck et Smith	X	X	X	X	740	18.88	95.0
<i>Claroideoglomus etunicatum</i> Becker and Gerd.				X	3	0.07	15.0

A, B y C= sitios; T= sitio testigo fuera de los sitios con residuos de minería

*Claroideoglomus claroideum* fue la segunda especie más abundante en los sitios con MP y la más común en el sitio B. Cornejo et al. (2012), indicaron que esta especie es capaz de adaptarse a sitios con concentraciones de Cu en el suelo. *F. geosporum* fue la especie más abundante en el sitio testigo. Utomo et al. (2014) identificaron a esta especie en la rizosfera de *Erythrina orientalis* L., establecida en suelos contaminados por Hg, Cu, Zn, Pb, Fe, Mn y Cd en Indonesia. Las especies pertenecientes a los géneros *Funneliformis* y

*Claroideoglosum*, generalmente producen esporas pequeñas en un periodo de tiempo relativamente corto (Belay et al. 2015).

*Acaulospora kentinensis*, *A. spinosa* y *C. etunicatum* no se registraron en los sitios contaminados con MP, lo que puede indicar su sensibilidad a las concentraciones de MP. En adición, las especies pertenecientes a los géneros *Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Glomus*, se registraron únicamente en los sitios con MP e indica una probable adaptación y se sugiere evaluar su tolerancia hacia los MP.

El análisis ecológico, para todos los datos en conjunto indicó una diversidad (1.57) y equitatividad baja (0.27) y valores altos de dominancia (0.72) (Tabla 5). El sitio B registró el mayor número de especies de HMA (13), seguido del sitio C (11) y finalmente el sitio A (7). Por su parte el sitio testigo registró 9 especies de HMA. De acuerdo con Johnson et al. (2004), la composición de las especies vegetales presentes en un sitio influye en la riqueza de especies de HMA. Un número similar de morfoespecies fue encontrado en las raíces de *Robinia pseudoacacia* establecida en suelos contaminados con Zn, Cu, Cd y Pb en China (15 especies, Yang et al. 2015). Contrariamente Gucwa-Przepióra et al. (2013) detectaron únicamente 4 especies de HMA en la rizosfera de *Deschampsia cespitosa* en suelos contaminados con Cd, Zn y Pb en Polonia.

Así mismo, la familia *Glomeraceae* registró la mayor riqueza de especies (8 de 15) en los sitios con MP (Tabla 4) y soporta reportes previos que indican que esta familia de hongos, constituye un componente común en sitios con MP (Wu et al. 2009; Bedini et al. 2010).

Se ha reportado que una alta riqueza de especies puede indicar una alta diversidad y complementación de funciones (Dandan and Zhiwei, 2007; Carballar-Hernández et al. 2013). Los valores de diversidad de HMA en los sitios con MP se consideran bajos (Tabla 8). Estos valores son menores a los reportes de Aguilera et al. (2014) en sitios contaminados con Aluminio en España y a los de Wei et al. (2014), en sitios con altas concentraciones de Mn en China.

El sitio A registró valores bajos de equitatividad, dominancia alta y la diversidad más baja. La diversidad de especies de HMA de este sitio fue significativamente menor con respecto al sitio testigo; esta disminución de diversidad de HMA, probablemente se relacione al pH ácido (3.5) y a la biodisponibilidad de Pb y Cu en el suelo.

En adición, el sitio B, registró una distribución uniforme de especies y valores bajos de dominancia. La diversidad de HMA fue significativamente mayor al reportado en el sitio testigo ( $p < 0.05$ ) y se puede relacionar al contenido de materia orgánica y al pH medianamente alcalino en el sitio. Finalmente el sitio C registró bajos valores de diversidad y equitatividad y dominancia alta.

Estudios de Schneider et al. (2013) indicaron una disminución en la diversidad de las comunidades de HMA en sitios con MP en Brasil. Así mismo, Zarei et al. (2010)

documentaron una disminución de la diversidad de HMA en sitios contaminados con Pb y Zn en Irán. Se ha reportado que el efecto negativo de los MP sobre la diversidad de HMA, puede afectar el aprovechamiento de los nutrientes minerales del suelo y así limitar el mantenimiento y establecimiento del hospedero en estos suelos (Dandan and Zhiwei, 2007).

Se sugiere que los cambios en la diversidad de HMA en los sitios no sólo deben atribuirse a los MP, el pH, MO y el tipo de carga de los coloides en el suelo pueden influir en la composición de la comunidad de HMA (Renker et al. 2005).

**Tabla 5.** Índices ecológicos de hongos formadores de micorriza arbuscular asociados a especies vegetales nativas que colonizan residuos de minería y un sitio testigo, en Taviche, Oaxaca.

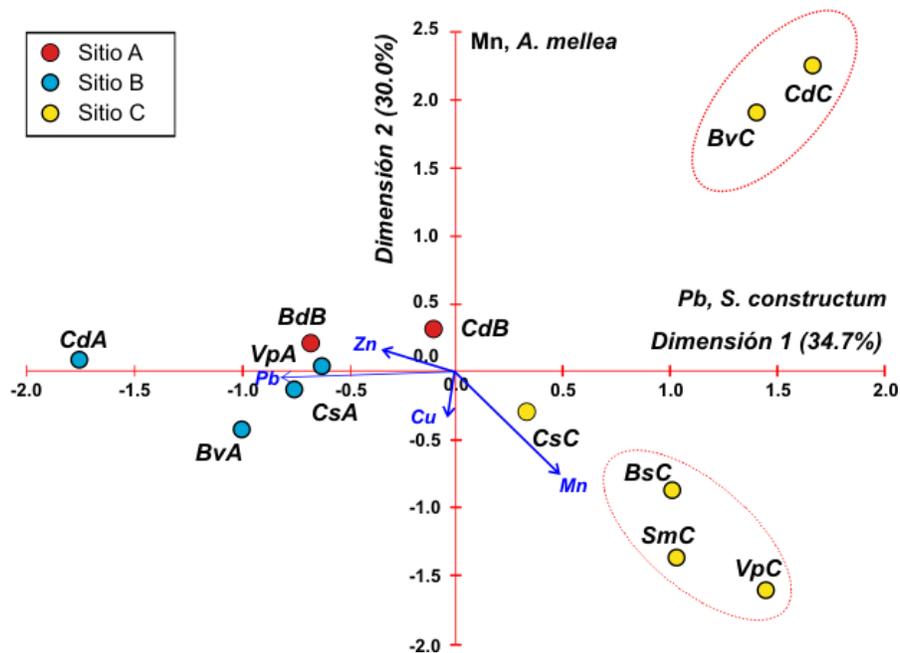
<b>Parámetros ecológicos</b>	<b>General</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
Riqueza	18	7	13	11	9
Diversidad Máxima	1.60	0.86	1.90	1.12	1.09
Índice de Shannon-Wiener	1.57	0.77**	1.80**	1.08	1.03
Índice de Dominancia	0.72	0.41**	0.80**	0.52	0.55
Equitatividad	0.27	0.31	0.47	0.27	0.31

\*\*Significativamente diferentes con respecto al sitio testigo (t-student modificada por Hutchinson,  $p < 0.05$ ).

### **Relaciones entre hongos de micorriza arbuscular en especies vegetales y concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn en el suelo.**

Se realizó un análisis de correspondencias múltiples (ACM), para acceder a la relación entre los HMA en las especies vegetales y las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn (Figura 5). Las cuatro primeras dimensiones explicaron el 93.25% de la variabilidad.

A la cuarta dimensión se cuantificó un valor propio de 0.287 y  $X^2=107.72$ . En la primera dimensión se observó que las variables con mayor contribución de la variación fueron de mayor a menor: Pb (0.517) y *Septoglomus constrictum* (0.104). Las demás características descriptivas no fueron relevantes. La segunda dimensión se observó que la variante Mn (0.494) y *Acaulospora mellea* (0.108), fueron las de mayor valor descriptivo. Las demás variables contribuyeron con valores menores a 0.102.



**Figura 5.** Análisis de correspondencias múltiples, que indica la asociación de los HMA en las especies vegetales y su relación con las concentraciones de MP.

En la Figura 5, se presenta la distribución de las especies vegetales en relación a la concentración de Pb, Cu, Zn y Mn en el suelo, en el plano formado por las dos primeras dimensiones principales. En el sitio C, en la parte superior del primer cuadrante en dirección a las manecillas del reloj, se agruparon; *Brickellia veronicifolia* (BvC) y *Cynodon dactylon* (CdC). En el segundo cuadrante; *Barkleyanthus salicifolius* (BsC), *Salix mexicana* (SmC), *Vachellia pennatula* (VpC) y *Clibadium surinamense* (CsC), se asociaron preferentemente con las concentraciones de Mn. En este sitio se observó la formación de dos grupos, lo cual denota un sitio dinámico con diferentes zonas rizosféricas.

En el sitio A y B no se observó el patrón anterior. *Clibadium surinamense*, A (CsA) y en menor vínculo *B. veronicifolia*, A (BvA), se asociaron con las concentraciones de Pb y en menor relación con el Cu. Finalmente *V. pennatula*, A (VpA) se asoció con las concentraciones de Pb y en menor relación con las de Zn.

*Bouteloua dimorpha* (BdB) y *C. dactylon* (CdB), del sitio B, se asociaron preferentemente con las concentraciones de Zn.

El análisis de correlación canónica (ACoC), indicó que las concentraciones de MP evaluados presentó una correlación significativa con las familias de HMA, solamente en la primer función canónica. En las dos primeras funciones canónicas se explica 99.02% de la varianza total acumulada y la correlación canónica ajustada de mayor a 0.99 y el  $R^2$  fue superior a 0.99 ( $p < 0.05$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Resultados del análisis de correlación canónica entre la concentración de Pb, Cu, Zn y Mn y familias de HMA.

Función canónica	Correlación canónica	Correlación canónica ajustada	R <sup>2</sup>	F de estadístico	Probabilidad
1	0.995	0.992	0.990	3.43	0.0016**
2	0.909	0.864	0.826	1.19	0.391
3	0.689	0.573	0.474	0.65	0.724
4	0.417	0.325	0.173	3	

\*\*Función canónica significativa

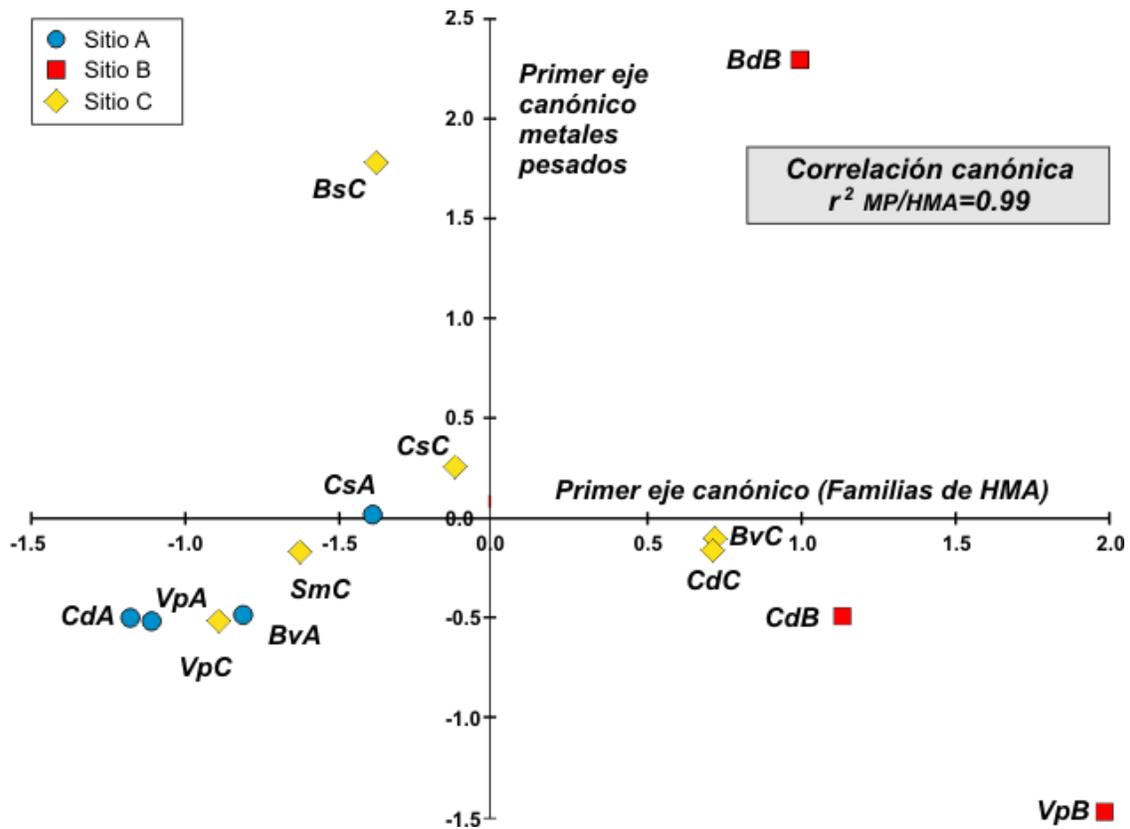
**Tabla 7.** Evaluación de las correlaciones en las tres primeras funciones canónicas.

Variables	Función canónica 1	Función canónica 2	Función canónica 3
Correlación entre las variables de concentración (independientes) y sus valores canónicos			
Pb	-0.596	-0.223	0.039
Cu	-0.011	0.898	0.424
Zn	0.335	0.235	0.685
Mn	-0.473	0.149	0.419
Correlación entre las variables de HMA (dependientes) y sus valores canónicos			
<i>Ambisporaceae</i>	0.013	-0.255	-0.578
<i>Glomeraceae</i>	0.572	-0.020	-0.638
<i>Gigasporaceae</i>	0.597	-0.431	0.490
<i>Acaulosporaceae</i>	0.619	-0.415	0.413
<i>Entrophosporaceae</i>	0.493	-0.476	0.377
<i>Claroideoglomeraceae</i>	0.232	0.774	-0.111

El aporte de las variables de concentración de las tres primeras funciones canónicas se indica en la Tabla 7.

En la primera función canónica respecto a las variables de concentración; las concentraciones de Zn ( $r=0.335$ ), Pb ( $r=-0.596$ ) y Mn ( $r=-0.473$ ) fueron las de mayor aporte. En referencia a las variables de HMA, la familia *Acaulosporaceae* (0.619), *Gigasporaceae* ( $r=0.597$ ), *Glomeraceae* ( $r=0.572$ ), *Entrophosporaceae* ( $r=0.493$ ) y *Claroideoglomeraceae* ( $r=0.232$ ), influyeron en la determinación de las tres primeras funciones canónicas.

Los resultados obtenidos, confirmaron que mediante la primer función canónica ( $p<0.05$ ), la correlación entre las concentraciones de MP y las familias de HMA fue altamente significativa (0.99). Existió una relación directa entre las concentraciones de Zn, Pb y Mn con las familias *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae*, *Glomeraceae*, *Entrophosporaceae* y *Claroideoglomeraceae* (Figura 6). Es decir, existen familias de HMA que presentan tolerancia a las concentraciones de los MP específicos.



**Figura 6.** Relación entre las variables de concentración de MP y familias de HMA, en función del primer par de variables canónicas.

## CONCLUSIONES

Se registró de bajo a alto número de esporas en la rizosfera de los hospederos establecidos en los sitios con MP y se sugiere que las esporas en la rizosfera pueden actuar como estructuras de resistencia. Todas las especies vegetales en los sitios con MP presentaron altos intervalos de colonización e indica la necesidad de micorrización del hospedero, para su mantenimiento y hacer frente a las concentraciones de MP.

*Cynodon dactylon* registró el mayor número de esporas y colonización micorrízica e indica su adaptación a estas condiciones ambientales.

Mediante métodos moleculares se amplificó la región interna transcrita (ITS) ADNr y se describió la secuencia de ADN de *Entrophora infrequens*. Se identificaron por caracteres morfológicos un total de 15 especies de HMA en los sitios con MP.

*Ambispora gerdemanni*, *C. claroideum* y *F. geosporum* fueron las especies más abundantes y dominantes en los sitios con MP, lo que indica su adaptación a las condiciones ambientales locales y a los diversos rangos de concentración de los metales.

El estudio ecológico indicó al sitio B con la mayor riqueza y diversidad de especies de HMA, con una distribución uniforme y dominancia baja, en contraste al sitio A, que registró la menor riqueza, equitatividad y dominancia alta, así mismo, la diversidad de HMA fue afectada negativamente por los contenidos de MP del sitio.

El análisis de correspondencias múltiple (ACM) reveló que las variables de mayor valor descriptivo en relación a las asociaciones entre HMA-planta y concentraciones de MP fueron: Pb, Mn, *Septogloium constrictum* y *Acaulospora mellea*. Las especies vegetales nativas presentaron diferentes patrones de asociación con los MP e indica que cada sitio presenta una dinámica particular.

El análisis de correlación canónico (ACoC) revela ciertas familias de HMA se correlacionaron significativamente con las concentraciones de MP en el suelo e indica su tolerancia a ciertos MP específicos.

Finalmente los resultados de este trabajo sugieren que las comunidades de HMA representan un factor esencial para el establecimiento y mantenimiento de las especies vegetales nativas estudiadas en los sitios con residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca.

## LITERATURA CONSULTADA

Aguilera P, Cornejo P, Borie F, Barea JM, von Baer E, Oehl F (2014) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Triticum aestivum* L. plants growing in an andosol with high aluminum level. *Agriculture Ecosystems and Environment* 186: 178–184

Alford ER, Pilon-Smits E, Paschke M (2010) Metallophytes: a view from the rhizosphere. *Plant Soil* 337: 33-50

Al-Ghamdi A, Jais HM (2011) Interaction between arbuscular mycorrhiza and heavy metals in the rhizosphere and roots of *Juniperus procera*. *Int J Agric Biol* 14: 69–74

Alloway BJ (1995) *Heavy Metals in Soils*. 2nd edn. Blackie and Professional, London UK, pp 224-240

Alves da Silva G, Costa-Maia L, Barbosa da Silva FS, Fernandes-Lima PC (2001) Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil. *Rev bras Bot* 24: 135-143

Archer, MJG, Caldwell, RA (2004) Response of six Australian plant species to heavy metal contamination at an abandoned mine site. *Water Air Soil Pollut* 157: 257–267

Ban Y, Xu Z, Zhang H, Chen H, Tang M (2015) Soil chemistry properties, translocation of heavy metals, and mycorrhizal fungi associated with six plant species growing on lead-zinc mine tailings. *Ann Microbiol* 65: 503-515

Bautista-Cruz A, Arnaud-Viñas MR, Carrillo-González R (2010) Elementos traza en dos áreas agrícolas. *Terra Latinoamericana* 29: 123-131

Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation on Ri-T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211-218

Belay Z, Vestberg M, Assefa F (2015) Diversity and abundance de arbuscular mycorrhizal fungi across different land use types in a humid low land area of Ethiopia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 18: pp 47-69

Bedini S, Turrini A, Rigo C, Argese E, Giovannetti M (2010) Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 758-765

Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangarajan R, Kumpiene J, Park J, Makino T, Kirkham MB, Scheckel K, Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize?. *Journal of Hazardous Materials* 266: 141– 166

- Borges WL, de Novais CB, Júnior OJ, Prin Y, Le Roux C, Decouso M, de Faria SM (2014) Arbuscular mycorrhizal fungi diversity in revegetated áreas after bauxite mining. *African Journal of Microbiology Research* 8: 2733-2738
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp 13–37
- Burrows RL, Pflieger FL (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Can J Bot* 80:120-130
- Carballar-Hernández S, Palma-Cruz FJ, Hernández-Cuevas L, Robles C (2013) Arbuscular mycorrhizal potential and mycorrhizal fungi diversity associated with *Agave potatorum* Zucc. in Oaxaca, Mexico. *Ecol Res* 28: 217-226
- Cornejo P, Pérez-Tienda J, Meier S, Valderas A, Borie F, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2012) Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 925–928
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JP (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203–209
- Dandan Z, Zhiwei Z (2007) Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha River, southwest China. *Appl Soil Ecol* 37: 118-128
- Daniels BA, Skipper HD (1982) Methods for recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Schenck NC (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St Paul, pp 29-36
- del Val C, Barea JM, Azcón-Aguilar C (1999) Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl Soil Ecol* 11: 261-269
- Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabrales JJ, Partida-Martinez LP (2014) Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *Microbiol Ecol* 1–14
- Falik O, Mordoch Y, Ben-Natan D, Vanunu M, Goldstein O, Novoplansky A (2012) Plant responsiveness to root–root communication of stress cues. *Annals of Botany* 1-10
- Franco-Hernández MO, Vasquez-Murrieta MS, Patiño-Siciliano A, Dendooven L (2010) Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central, Mexico. *Bioresource Technol* 101: 3864-3869

Friendly M, Fox J (2016) Package candisc: Visualizing Generalized Canonical Discriminant and Canonical Correlation Analysis. R package, version 0.7-0, pp 3-8 <https://cran.r-project.org/web/packages/candisc/candisc.pdf>

Gaur A, Adholeya A (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Curr Sci* 86: 528-534

Gattai GS, Pereira SV, Costa CMC, Lima CEP, Maia LC (2011) Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of woody plants in lead contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 859-867

Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235- 244

Giovanetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489–500

Gucwa-Przepióra E, Błaszowski J, Kurtyka R, Małkowski L, Małkowski E (2014) Arbuscular mycorrhiza of *Deschampsia cespitosa* (Poaceae) at different soil depths in highly metal-contaminated site in southern Poland. *Acta Soc Bot Pol* 82: 251–258

Hassan S, Boon E, St-Arnaud M, Hijri M (2011) Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Molecular Ecology* 20: 3469-3483

Helgason T, Merryweather JW, Young JP, Fitter AH (2007) Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *Journal of Ecology* 95: 623-630

Hernández-Cuevas LV, Guadarrama-Chávez P, Sánchez-Guillén I, Ramos-Zapata J (2012) Micorriza arbuscular: colonización intrarradical y extracción de esporas. In Álvarez Sánchez J, Monroy-Ata (eds) *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Las prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias-UNAM, México, DF, pp 1-15

Hill MO (1973) Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54: 427-432

Jiménez EM (2010) Plant-based methods for remediating arsenic-polluted mine soils in Spain. Ph D Dissertation UAM, Madrid

Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth RE, Grime JP, Young JPW, Read DJ (2004) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist* 161: 503-515

Joner EJ, Briones R, Leyval C (2000) Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226: 227-234

Khade HW, Adholeya A (2009) Arbuscular mycorrhizal association in plants growing on metal contaminated and non-contaminated soils adjoining Kanpur tanneries, Uttar Pradesh, India. *Water Air Soil Poll* 202: 45–56

Karimi A, Khodaverdiloo H, Sepehri M, Sadaghiani MR (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal contaminated soils. *African Journal of Microbiology Research* 13: 1571-1576

Krishnamoorthy R, Kim C, Subramanian P, Kim K, Selvakumar G, Sa T (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi community structure, abundance and species richness changes in soil by different levels of heavy metal and metalloid concentration. *Plos One* 1-15

Kullu B, Behera N (2012), Status and diversity of vesicular arbuscular mycorrhiza indifferent age series sponge iron solid waste dumps with respecto to reclamation. *The Bioscan* 3: 539-542

Kumar A, Uddin J (2011) Status and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and its role in natural regeneration on limestone mined spoils. *Biodiversitas* 12: 107-111

Long LK, Yao Q, Guo J, Heng Yang R, Heng Huang Y, Hui Zhu H (2010) Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. *European Journal of Soil Biology* 46: 288-294

Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A (2009) DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 183: 212-223

Kwong Ma W (2004) A polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis procedure for analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. M Sc Dissertation University of Saskatchewan, Saskatoon

Lee J, Park SH, Eom AH (2006) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungal spores collected in Korea. *Mycobiology* 34: 7-13

Leung HM, Ye ZH, Wong MH (2007) Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere* 66: 905–915

Lindsay W, Norvell W (1978) Development of a DTPA soil zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci Soc Am J* 42: 421-428

Linzon (1978) Phytotoxicology excessive levels for contaminants in soil and vegetation. Ministry of the environment. Ontario, Canada, pp 1-3

Long LK, Yao Q, Guo J, Yang RH, Huang YH, Zhu HH (2010) Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. *European Journal of Soil Biology* 46: 288-294

Magurran AE (1988) *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, Princeton

Meharg AA (2003) The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol Res* 107: 1253–1265

Maki T, Nomachi M, Yoshida S, Ezawa T (2008) Plant symbiotic microorganisms in acid sulfate soil: significance in the growth of pioneer plants. *Plant Soil* 310:55–65

Mcgonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan J (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501

Miransari M (2011) Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnol Adv* 29: 645–653

Mosse B (1973) Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annu Rev Phytopathol* 11: 171-196

Oksanen J, Guillaume-Blanchet F, Kindt F, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H, Wagner H (2016) Package *vegan*: Community Ecology Package. R package, version 2.3-5, pp 44 <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>

Ortega-Larrocea MP, Morales-Vásquez JA, García-Sánchez R, Ramos-Zapata J (2012) Cultivo monoesporico de hongos micorrízicos arbusculares. In Álvarez Sánchez J, Monroy-Ata (eds) *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Las prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias-UNAM, México, DF, pp 69

Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* 52: 199–223

Phillips DA, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158–161

Redecker D, Hijri I, Wiemken A (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica* 38: 113–124

Renker C, Blanke V, Buscot F (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution* 135: 255-266

Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belimov A, Gianinazzi S, Strasser RJ, Gianinazzi-Pearson V (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J Exp Bot* 53: 1177–1185

R Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical, pp 3 <http://www.R-project.org/>

Sánchez CA (1993) Territorio y minería en Oaxaca: la explotación de minerales metálicos al inicio de los noventa. *Investigaciones geográficas*, Instituto de Geografía, UNAM, México DF, pp 65-90

Sánchez Viveros G, Carrillo González R, Martínez Garza A, González Chávez MC (2004) Tolerancia adaptativa de hongos micorrízicos arbusculares al crecer en sustratos contaminados con As y Cu. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 20: 147-158

SECOFI (1996) Monografía geológico-minera del estado de Oaxaca. Consejo de Recursos Minerales, Centro Minero Secretaria de Comercio y Fomento Industrial, Coordinación general de minería., México DF, pp 186-187.

Schüßler A, Walker C (2010) The *Glomeromycota*. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden, England [www.amf-phylogeny.com](http://www.amf-phylogeny.com)

Schneider J, Stürmer SL, Guimarães-Guilherme LM, de Souza-Moreira FM, Fonsêca de Sousa-Soares CR (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. *Journal of Hazardous Materials* 262: 1105– 1115

Schwarzott D, Schüßler A (2001) A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203-207

SEMARNAT (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT-2004 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México DF

SEMARNAT (2004a) Informe preventivo, sector industrial, referente al proyecto de exploración minera “Taviche”. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México DF

SEMARNAT (2004b) Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México DF

Stockinger H, Krüger M, Schüßler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 187: 461-474

Straker CJ, Weiersbye IM, Witkowski EF (2007) Arbuscular mycorrhiza status of gold and uranium tailings and surrounding soils of South Africa's deep level gold mines: I. Root colonization and spore levels. *South African Journal of Botany* 73: 218–225

Taheri WI, Bevor JD (2010) Adaptation of plants and arbuscular mycorrhizal fungi to coal tailings in Indiana. *Applied Soil Ecol* 45: 138-143

Teodoro-Tenango M (2014) Estudio de la comunidad vegetal presente en sitios contaminados con residuos de mina de plata y su capacidad fitorremediadora. M Sc Dissertation CIIDIR-Oaxaca-IPN, Oaxaca

Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Hirotoishi S (2012) High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *Plos One* 7: 1-11

Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2001) Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10: 169–174

USDA (2000) Heavy metal soil contamination. Soil quality institute. Urban Technical Note 3, United States Department of Agriculture, pp 7

Utomo WH, Suntari R, Arfarita N, Suhartini, Handayanto E (2014) Rehabilitation of artisanal small-scale gold mining land in West Lombok, Indonesia: 3. Exploration of indigenous plant species and the associated mycorrhiza for phytomycoremediation of mercury contaminated soils. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 8: 34-41

Vallino M, Massa N, Lumini E, Bianciotto V, Berta G, Bonfante P (2006) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in northern Italy. *Environmental Microbiology* (2006) 971–983

Verkleij J, Golan-Goldhirsh A, Antosiewicz D, Schwitzguebel JP, Schroder P (2009) Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environ Exp Bot* 67: 10-22

Volke-Sepúlveda T, Velasco-Trejo JA, De la Pérez D (2005) Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. INE-SEMARNAT, México, DF, pp. 29

Wang B, Qiu YL (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363

Wei Y, Hou H, Li J, ShangGuan Y, Xu Y, Zhang J, Zhao L, Wang W (2014) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with an Mn hyperaccumulator *Phytolacca americana*, in Mn mining area. *Applied Soil Ecology* 82: 11-17

Whitfield L, Richards AJ, Rimmer DL (2004) Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonization in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza* 14: 55-62

Wu FY, Ye ZH, Wong MH (2009) Intraspecific differences of arbuscular mycorrhizal fungi in their impacts on arsenic accumulation by *Pteris vittata* L. *Chemosphere* 76: 1258–1264

Wu FY, Bi YL, Leung HM, Ye ZH, Lin XG, Wong MH (2010) Accumulation of As, Pb, Zn, Cd and Cu and arbuscular mycorrhizal status in populations of *Cynodon dactylon* grown on metal-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 44: 213–218

Yang R, Zan S, Tang J, Chen X, Zhang Q (2010) Variation in community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with a Cu tolerant plant-*Elsholtzia splendens*. *Applied Soil Ecology* 44: 191–197

Yang Y, Song Y, Scheller HV, Ghosh A, Ban Y, Chen H, Tang M (2015) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 86: 146-158

Yang R, Yu G, Tang J, Chen X (2008) Effects of metal lead on growth and mycorrhizae of an invasive plant species (*Solidago canadensis* L.). *Journal of Environmental Sciences* 20: 739–744

Zarei M, Saleh-Rastin N, Jouzani GS, Savaghebi G, Buscot F (2008a) Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. *Eur J Soil Biol* 44: 381-391

Zarei M, König S, Hempel S, Khayam-Nekouei M, Savaghebi Gh, Buscot F (2008b) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environmental Pollution* 156: 1277-1283

Zarei M, Hempel S, Wubet T, Schäfer T, Savaghebi G, Jouzani GS, Nekouei M, Buscot F (2010) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environ Pollut* 158: 2757-2765

## **CAPÍTULO 2**

---

### **RESPUESTA DE PLANTAS CRECIDAS EN SUELOS CON RESIDUOS MINEROS A INOCULACIÓN CON HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES Y BAGAZO DE MAGUEY COMPOSTADO**

## INTRODUCCION

La fitoestabilización de metales pesados (MP) provenientes de residuos de minería (“jales”); representa una estrategia biológica sustentable y de bajo costo, en comparación con las técnicas físicas y químicas tradicionales (Bolan et al. 2014). Esta técnica incluye el uso de especies vegetales y microorganismos rizosféricos nativos, que en conjunto, promueven la acumulación de metales en la rizosférica y la precipitación dentro de las raíces vegetales, evitando el transporte desde la raíz al tejido aéreo (Kohler et al. 2015). El establecimiento de una cobertura vegetal en estos sitios perturbados, puede contribuir a una estabilización temporal a largo plazo de los metales contaminantes y evitar así su dispersión a través del agua y aire (Anjum et al. 2014).

Las especies vegetales han desarrollado algunos mecanismos propios que les permiten tolerar estas condiciones de estrés, dentro de los cuales destacan: producción de exudados radicales, fitoquelatinas y metalotioninas, sin embargo se ha reportado que estas plantas son de lento crecimiento y baja producción de biomasa (Göhre and Paszkowski, 2006). De acuerdo con Shu et al. (2002); Guo et al. (2013) y Yang et al. (2015), el uso de especies vegetales nativas adaptadas a tales condiciones ambientales y asociadas con microorganismos rizosféricos nativos, como bacterias y hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA), pueden representar una estrategia efectiva de fitoestabilización.

Los HMA son un grupo importante de hongos presentes en el suelo que colonizan más del 80% de las raíces de las plantas terrestres. Éstos, tienen la habilidad de suministrar a la especie vegetal nutrientes minerales y agua y protección contra estrés biótico y abiótico, incluidos los MP (Khade and Adholeya, 2013).

Gaur and Adholeya (2004), afirman que los HMA colonizan la mayoría de las raíces de las especies vegetales establecidas en suelos contaminados por MP y son capaces de mejorar la tolerancia y acumulación de MP en su hospedero. Para ello, los HMA utilizan estrategias para adaptarse a las concentraciones de MP, como la adsorción y quelación de metales en vesículas, esporas y micelio extraradical y la precipitación en gránulos de polifosfatos, como resultado, los HMA reducen la biodisponibilidad de metales en el suelo y mejoran la producción de biomasa en la planta (Alarcón and Ferrera-Cerrato, 2013). No obstante, las concentraciones elevadas de MP afectan los niveles de diversidad, número de esporas y colonización de los HMA (Khan et al. 2000).

Christie et al. (2004), Göhre and Paszkowski, (2006) y Schneider et al. (2013), indican que la disponibilidad y acumulación de MP, depende de la especie vegetal, especie de HMA y especiación química del metal, pH y contenido de materia orgánica del suelo.

Generalmente, los suelos contaminados por MP, presentan pH ácidos y contenidos bajos de materia orgánica, fósforo y nitrógeno y una alternativa para mejorar la estructura del suelo y la disponibilidad de nutrientes para la planta, es la adición de enmiendas orgánicas

(Medina and Azcón, 2010), las cuales constituyen una importante fuente de carbono y energía para las especies vegetales y microbiota del suelo. Watts-Williams and Cavagnaro, (2012) documentaron que la aplicación de enmiendas orgánicas a suelos con MP, puede reducir la biodisponibilidad de metales, el incremento del pH, la formación de ligandos orgánicos y la capacidad de intercambio catiónico del suelo.

Al respecto, diversos estudios han evaluado la aplicación de HMA y enmiendas orgánicas en plantas crecidas en suelos con MP, con resultados contradictorios. Wang et al. (2005), reportaron que los HMA incrementaron las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Cd en las raíces de *Elsholtzia splendens*, en un estudio en China. En un experimento en maceta con maíz, los consorcios nativos de HMA incrementaron significativamente la acumulación de Pb, Cu, Zn y Cd en el tejido aéreo, pero no lograron aumentar la biomasa radical y aérea (Wang et al. 2007). En adición, Marques et al. (2008), en un estudio en maceta con *Solanum nigrum*, reportaron que la adición de compost proveniente de biosólidos incremento la biomasa vegetal; *Glomus intraradices* incremento la fitoestabilización de Zn.

Aun cuando se ha determinado la respuesta de plantas crecidas en suelos con MP, es necesario aplicar inóculos de HMA nativos y usar enmiendas orgánicas provenientes de productos de desecho, como un sustrato alternativo, que permita evaluar la respuesta de plantas nativas a estas variables, crecidas en suelos naturales de residuos de minería; con aplicación potencial para procesos de fitoestabilización.

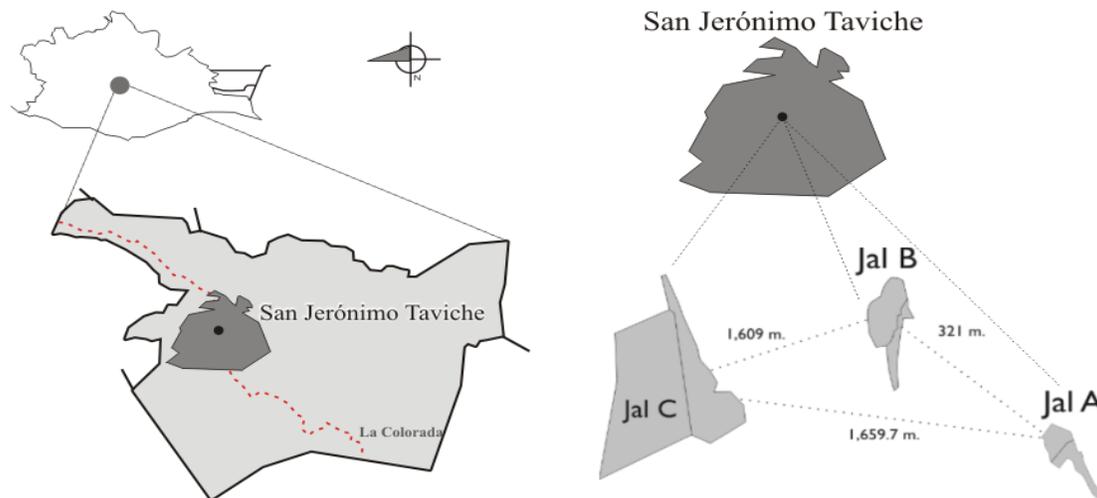
Este trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta de *Cynodon dactylon* y *Vachellia pennatula* crecidas en suelos con Pb, Cu, Zn y Mn a inoculación con consorcios de HMA nativos y adición de bagazo de maguey mezcalero compostado. *Cynodon dactylon* es considerada por varios autores una excelente candidata para procesos de fitorremediación y acumuladora de diversos MP, mientras que *V. pennatula*, de acuerdo con Teodoro-Tenango (2014), se considera una especie que presenta mecanismos de exclusión para Cu. Por otra parte, se ha documentado que los HMA nativos asociados a su rizosfera presentan altos niveles de colonización y número de esporas (García-Velasco, datos no publicados) y se podría considerar un sistema potencial de fitoestabilización de los MP en los sitios de deposición de residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca, México.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colecta de suelo con residuos de minería y material vegetal**

Se seleccionaron tres sitios con residuos de minería en San Jerónimo, Taviche, Oaxaca, México, designados como A, B y C (Figura 7). Dentro de cada sitio se obtuvieron seis submuestras, cada una con 2 kg de suelo. Se mezclaron y se obtuvo una muestra compuesta; misma que se guardó en bolsas de polietileno y se conservó a 4°C, hasta su posterior uso en el laboratorio. La recolección de semillas de *Vachellia pennatula* y

esquejes de *Cynodon dactylon* se realizó en un sitio fuera de los sitios con residuos de minería. Las muestras vegetales se guardaron en bolsas de polietileno y se conservaron a 4 °C, hasta su posterior propagación.



**Figura 7.** Ubicación de los tres sitios con residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca (adaptado de Teodoro-Tenango, 2014).

### **Propagación de especies vegetales**

Para la propagación se utilizó como sustrato arena estéril (pH=7.2), la cual fue inmersa en HNO<sub>3</sub> por 12 horas y lavada con agua desionizada, se esterilizó a 120 °C por 45 min durante 2 ciclos y se secó a temperatura ambiente por dos días. Las semillas de *V. pennatula* se desinfectaron con NaClO al 0.5% por 10 min y se lavaron con agua estéril. Los esquejes de *C. dactylon* fueron desinfectados con etanol al 70% por 2 min y NaClO al 0.5% por 10 min y lavados con agua estéril (Ruiz-Huerta and Armienta, 2012; Desgarenes et al. 2014). Las semillas y esquejes se colocaron en arena estéril; después de cuatro semanas las plántulas fueron trasplantadas a contenedores plásticos con 350 g de sustrato previamente preparado.

### **Cultivo trampa y preparación de los tratamientos**

Para el cultivo trampa, se seleccionó al suelo rizosférico con mayor número de esporas (también contenía hifas y raíces colonizadas por HMA) de cada sitio con MP. Se colocaron 350 g de suelo rizosférico nativo de *V. pennatula* del sitio A y B y *Clibadium surinamense* del sitio C en un recipiente plástico de 500 mL de capacidad con semillas de sorgo (*Sorghum vulgare* L.), que fue seleccionada como planta trampa, debido a su temprana colonización micorrízica y alta resistencia (Guadarrama-Chávez et al. 2007). El cultivo trampa tuvo una duración de 14 semanas y, una vez finalizado, los inóculos de HMA se secaron a temperatura ambiente y el suelo se tamizó a 2 mm.

Se tomaron 10 g de cada maceta y se realizó la recuperación y el conteo de esporas acorde al método de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann and Nicolson, 1963), seguido

por centrifugación en un gradiente de sacarosa (Daniels and Skipper, 1982, modificado por Brundett et al. 1996). El material obtenido se colocó en cajas petri y bajo un estereoscopio se aislaron las morfoespecies y se conservaron en preparaciones con alcohol polivinilico-lactoglicerol (PVLG) y PVLG con reactivo de Melzer. Para el conteo de esporas, solo se consideraron aquellas con contenido citoplasmático (Hernández-Cuevas et al. 2012).

La identificación taxonómica de las especies de cada inóculo se realizó por comparación y contraste de características morfológicas observadas de las esporas, con referencia en las descripciones disponibles en las bases de datos de International Collection of Vesicular and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) (<http://invam.wvu.edu/>), del profesor J. Błazkowski (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/>), y literatura especializada. Las observaciones se realizaron con un microscopio compuesto (Leica DME).

Cabe señalar que sólo se propagaron las esporas del suelo rizosférico de *V. pennatula* del sitio B y como alternativa, se utilizó el suelo rizosférico nativo que registró el mayor número de esporas de cada sitio (*V. pennatula*, sitio A y *C. surinamense* del sitio C).

El inóculo I, registro 2310 esporas en 350 g de suelo nativo, inóculo II, 2010 esporas en 10 g de suelo de cultivo trampa e inóculo III, 2100 esporas en 350 g de suelo nativo. En la Tabla 8 se muestra la composición de especies de HMA de cada inóculo. El tratamiento control consistió en 350 g de suelo estéril y 50 g de arena. Para el tratamiento con bagazo de maguey compostado se añadieron 290 g de suelo estéril (sin propágulos de HMA), 50 g de arena y 60 g de bagazo de maguey.

**Tabla 8.** Inóculos de HMA usados en el experimento. El nombre de las especies de HMA encontradas en cada inóculo es acorde a la más reciente nomenclatura de especies de HMA propuesta por Schüßler and Walker (2010).

Cultivo	Composición de especies de HMA	Origen de los HMA
Inóculo I	<i>Ambispora gerdemanii</i> , <i>Acaulospora mellea</i> , <i>Entrophora infrequens</i> , <i>Claroideoglossum claroideum</i> , <i>Funneliformis geosporum</i> y <i>Septoglossum constrictum</i>	<i>V. pennatula</i> , Sitio A.
Inóculo II	<i>C. claroideum</i> , <i>F. geosporum</i> y <i>F. mosseae</i>	<i>V. pennatula</i> , Sitio B
Inóculo III	<i>A. gerdemanii</i> , <i>C. claroideum</i> , <i>F. geosporum</i> , <i>F. mosseae</i> y <i>S. constrictum</i> .	<i>C. surinamense</i> , Sitio C

El bagazo de maguey es un subproducto de desecho, que se genera durante la producción del mezcal. La finalidad fue utilizarlo como un sustrato alternativo. El compostaje y caracterización fisicoquímica del bagazo de maguey mezcalero fue realizado por Flores y Robles, (2014) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Algunas propiedades fisicoquímicas del bagazo de maguey mezcalero (*Agave spp.*) compostado.

Propiedad	Valor
Humedad (%)	54.90
Materia seca (%)	45.10
pH	8.20
Conductividad eléctrica (dS.m <sup>-1</sup> )	2.14
Cenizas (%)	36.90
Materia orgánica (%)	63.10
Carbono orgánico total (%)	35.10
Nitrógeno total (%)	1.95
Relación C/N	18.00
Densidad de Campo (Kg.m <sup>-3</sup> )	145.14

### **Diseño del experimento y análisis químico de las muestras**

El experimento consistió en un diseño trifactorial completo, con los siguientes factores: tres sitios (suelo A, B y C), dos especies vegetales (*V. pennatula* y *C. dactylon*) y tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado), cada tratamiento se replicó 3 veces, para un total de 18 tratamientos y 54 unidades experimentales. Las especies vegetales fueron mantenidas bajo condiciones controladas (18-28 °C de temperatura y 16-71% de humedad relativa) en invernadero y las macetas fueron aleatorizadas. El experimento tuvo una duración de 14 semanas.

Al término del experimento, se separó el tejido radical, aéreo y suelo rizosférico de 54 muestras. El tejido vegetal se lavó con agua corriente y jabón neutro y agua desionizada. Cada muestra se secó a 60 °C hasta alcanzar peso constante y se molió. Para cuantificar la concentración total de MP, se utilizaron 0.5 g de material vegetal (raíces y tejido aéreo) y suelo rizosférico (tamizado a 2 mm) y se realizó la digestión en 3 mL de HNO<sub>3</sub>, 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10 mL de H<sub>2</sub>O desionizada, durante 30 min en autoclave a 15 PSI.

EL filtrado se enrazó a 25 y 50 mL, para cada especie vegetal y suelo respectivamente (Jiménez, 2010; Teodoro-Tenango, 2014). Para la fracción extraíble con DTPA en el suelo se utilizaron 10 g de muestra por 20 mL de DTPA 1M (1.976 g de DTPA, 14.29 g de trietanolamina y 1.47 g de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, disuelto en 1 L, con pH=7.3), se agitó durante 2 h a 180 rpm y se filtró con papel cuantitativo Sartorius 393® (equivalente a Whatman No. 40®) y se enrazó a 100 mL (Lindsay and Norvell, 1978). Para control se duplicó una muestra de cada tratamiento así como los blancos. Se utilizaron estándares de referencia (SIGMA, AA/ICP) y las lecturas se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (Thermo Scientific 3000). Se cuantificaron Zn, Mn, Cu y Pb con lámparas de cátodo hueco

### **Caracterización fisicoquímica de los suelos**

La cuantificación inicial de las concentraciones en su fracción total y extraíble de Pb, Cu, Zn, y Mn, determinación de pH, conductividad eléctrica y contenido de materia orgánica en

los suelos de los sitios (SEMARNAT, 2002), fue realizada previamente por Teodoro-Tenango (2014).

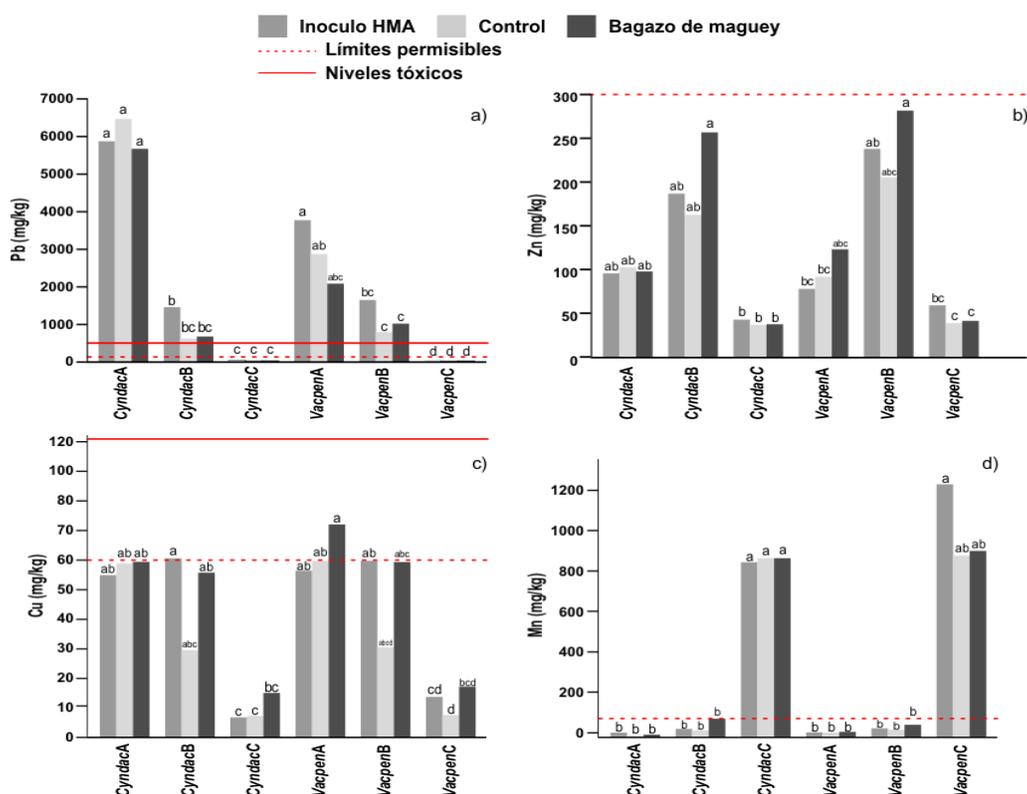
Los sitios son altamente erosionables, arcillosos y con bajos contenidos de materia orgánica (Tabla 10). Los sitios A y B presentan pH ácidos, contenidos de materia orgánica baja y similar en conductividad eléctrica. El sitio C presento pH alcalinos, contenidos de materia orgánica muy bajos y valores de conductividad eléctrica menores que los sitios A y B. Los sitios A y B, presentan concentraciones contaminantes por Pb, Cu y Zn (SEMARNAT, 2004; USDA 2000) mientras que el sitio C, registra concentraciones elevadas por Mn (Alloway, 1995).

**Tabla 10.** Parámetros fisicoquímicos de suelos de tres sitios con residuos de minería y un sitio testigo en Taviche, Oaxaca (Teodoro-Tenango, 2014 y datos propios).

Sitio	pH	CE (dS m <sup>-1</sup> )	MO (%)	Pb	Pb DTPA	Zn	Zn DTPA	Mn	Mn DTPA	Cu	Cu DTPA
A	3.56	0.84	0.99	1999.16	341.48	215.66	0.66	69.44	26.39	104.17	0.00
B	5.90	1.28	1.28	307.55	43.55	316.94	51.14	0.00	0.00	104.17	0.00
C	8.00	0.49	0.49	0.00	0.00	0.00	0.00	1972.22	43.06	0.00	0.00

CE conductividad eléctrica, MO materia orgánica.

Las concentraciones de los MP en el suelo rizosférico de los tratamientos se representan en la Figura 8. *Cynodon dactylon* inoculado con HMA y *V. pennatula* con adición de bagazo, ambas del sitio A, presentaron la mayor concentración de Pb rizosférico ( $p < 0.05$ ) (Figura 8a), mientras que la fracción extraíble varió entre tratamientos (Tabla 11).



**Figura 8.** Concentración de a) Pb, b) Cu, c) Zn y d) Mn en suelo rizosferico de *V. pennatula* y *C. dactylon* bajo tres tratamientos. Las tres primeras letras representan el género y especie vegetal, seguido del suelo (Ej. CyndacA= *Cynodon dactylon*, suelo A) (USDA, 2000; Visser, 1993).

Las concentraciones de Pb total son tóxicas. Las mayores concentraciones total y extraíble de Zn, se presentaron en *C. dactylon* inoculado con HMA y *V. pennatula* con bagazo, ambas del sitio B ( $p<0.05$ ) (Figura 8b). Las concentraciones de Zn total se ubican como elevadas y ciertas fracciones DTPA presentan toxicidad (7-11 mg kg<sup>-1</sup>, Lepp, 1981). Las concentraciones más altas de Cu rizosferico se registraron en *C. dactylon* inoculado con HMA del sitio B y *V. pennatula* con bagazo del sitio A ( $p<0.05$ ).

El bagazo en *V. pennatula* en el suelo del sitio A produjo las concentraciones más elevadas de Cu (72.39 mg kg<sup>-1</sup>) entre todas las muestras evaluadas ( $p<0.05$ ) (Figura 8c). Por su parte, la fracción extraíble de Cu fue inapreciable en todos los casos.

Finalmente, la mayor concentración total y extraíble de Mn se registró en *C. dactylon* y *V. pennatula* sin inoculación, ambas del sitio C ( $p<0.05$ ). Las concentraciones de la fracción total de Mn se consideran elevadas (Alloway, 1995) para *C. dactylon* y *V. pennatula* en el sitio C con los tres tratamientos (Figura 8d).

**Tabla 11.** Fracción extraíble DTPA de Pb, Cu, Zn y Mn en la rizosfera de *V. pennatula* y *C. dactylon*, bajo tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado).

Especie vegetal	Tratamiento	Contenido de DTPA (mg/kg)			
		Pb	Cu	Zn	Mn
<i>V. pennatula</i> Sitio A	Inóculo	676.9 a	0.66 cbc	3.66 abcd	1.53 de
	Control	618.33 a	0.72 cbc	3.39 bcd	1.14 eb
	Bagazo	330.13 b	2.92 abc	8.80 bcd	2.37 cd
<i>V. pennatula</i> Sitio B	Inóculo	55.00 c	2.93 abc	32.77 a	3.94 cb
	Control	48.88 c	1.04 abc	19.53 ab	3.83 cb
	Bagazo	36.35 c	4.89 abc	32.15 abc	4.62 bc
<i>V. pennatula</i> Sitio C	Inóculo	9.00 c	0.79 bcc	1.92 cd	15.52 ab
	Control	1.36 c	0.69 cbc	0.83 d	15.62 ab
	Bagazo	0.34 c	2.08 abc	1.59 d	8.69 ab
<i>C. dactylon</i> Sitio A	Inóculo	709.63 a	0.70 bbc	3.44 b	1.91 de
	Control	413.83 b	0.56 bbb	3.21 b	0.98 ee
	Bagazo	420.25 b	1.96 abc	4.19 b	2.25 cd
<i>C. dactylon</i> Sitio B	Inóculo	65.12 c	2.59 abc	27.37 a	4.46 cd
	Control	52.67 cd	1.04 bbb	17.61 ab	4.29 cd
	Bagazo	29.15 cd	4.90 abb	30.73 a	4.85 bc
<i>C. dactylon</i> Sitio C	Inóculo	11.98 cd	0.80 bbb	2.05 b	15.80 ad
	Control	2.156 d	0.78 bbb	0.98 b	16.93 ad
	Bagazo	1.90 d	1.62 abc	1.82 b	10.64 ab

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, \* $p<0.05$ ).

### **Colonización micorrízica en la raíz**

Mediante los métodos de Giovanetti and Mosse (1980) y Brundrett et al. (1996), se evidenciaron las estructuras fúngicas en las raíces de los tratamientos. Las raíces más finas fueron lavadas con agua, aclaradas con KOH al 10% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2%, y acidificación en HCl al 10%. Posteriormente las raíces fueron cortadas en segmentos de 1 cm de longitud y se tiñeron con azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol al 50%, con base en la metodología de Phillips and Hayman (1970). El porcentaje de colonización se estimó de acuerdo con la propuesta de McGonigle (1990), para lo cual se montaron 20 segmentos de raíces en un portaobjetos y se observaron bajo un microscopio compuesto (Leica DME).

### **Procesamiento y análisis de datos**

Previo al análisis estadístico, los datos de biomasa radical y aérea se transformaron con la función  $\log_{10}(X*1000)$  para ajustarlos a una distribución normal. Los datos de concentración de metales se transformaron con la función  $\ln$ . Para los datos de cada variable evaluada se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño experimental trifactorial; tres sitios (suelo A, B y C), dos especies vegetales (*V. pennatula* y *C. dactylon*) y tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado), incluyendo las interacciones sitio-planta, sitio-tratamiento, planta-tratamiento y sitio-planta-tratamiento.

De forma similar se efectuó un ANOVA bifactorial con las variables biomasa radical y aérea, con los factores sitio y tratamiento y la interacción sitio-tratamiento. Para determinar si existían diferencias significativas entre los valores medios de los tratamientos de los efectos principales y sus interacciones de cada ANOVA se realizó una comparación múltiple de medias, mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Se cuantificó el factor de translocación (FT) de cada variable evaluada, el cual indica la eficiencia de una especie vegetal para transportar metales desde la raíz al tejido aéreo y el coeficiente debe ser invariablemente mayor a 1 (McGrath and Zhao 2003; Vogel-Mikuš et al. 2005) con la siguiente formula:

$$FT = \frac{\text{Concentración tejido aéreo}}{\text{Concentración tejido radical}}$$

Los valores promedios del FT de cada tratamiento, fueron sometidos a una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Para los promedios estandarizados de cada variable se aplicó un análisis de componentes principales (ACP). El ACP fue realizado para identificar las relaciones múltiples entre las concentraciones de MP en el tejido radical y aéreo de las especies vegetales y los tratamientos aplicados (Pielou, 1984; Borcard et al. 2011; Rivera-Becerril et al. 2013). Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico R (R Core Team, 2013), mediante las librerías AGRICOLAE (de Mendiburu, 2015) y HSAUR (Everitt and Hothorn, 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Respuesta de *Cynodon dactylon* y *Vachellia pennatula* a la inoculación micorrízica y adición de bagazo de maguey

Previo al análisis de biomasa vegetal y acumulación de MP en las plantas evaluadas en respuesta a la inoculación con HMA y bagazo de maguey, se registró la colonización micorrízica en las plantas evaluadas (Tabla 12). No se observó colonización en los tratamientos control y adición de bagazo de maguey compostado. Las plantas inoculadas presentaron valores de colonización de 45 a 75% y en general, se observaron vesículas y esporas intraradicales y algunas aglomeraciones.

**Tabla 12.** Colonización micorrízica y estructuras observadas en *C. dactylon* y *V. pennatula* inoculadas con HMA.

Especie vegetal	Colonización (%)	Estructuras fúngicas observadas
<i>V. pennatula</i> , sitio A	71.00	V, E, H
<i>V. pennatula</i> , sitio B	70.00	V
<i>V. pennatula</i> , sitio C	75.00	E, H
<i>C. dactylon</i> , sitio A	70.00	V, E
<i>C. dactylon</i> , sitio B	45.00	V, E, H
<i>C. dactylon</i> , sitio C	45.00	V, E

V, vesículas, E, esporas, H, hifas

Los resultados de biomasa vegetal indican que los tratamientos con inoculación con HMA y adición de bagazo de maguey compostado incrementaron significativamente la biomasa vegetal en *V. pennatula* y *C. dactylon*, respectivamente. El análisis ANOVA (Tabla 13) indicó que los factores sitio y tratamiento también tuvieron un efecto significativo sobre la biomasa radical y aérea de ambas especies vegetales.

Las concentraciones de metales del sitio C favorecieron la biomasa radical y aérea de *C. dactylon* ( $p < 0.001$ ). Por su parte las concentraciones de MP del sitio B tuvieron el mismo efecto en *V. pennatula*. En adición, el bagazo de maguey tuvo un efecto altamente significativo en los tejidos vegetales de *C. dactylon*, mientras que los HMA tuvieron el mismo efecto en *V. pennatula* ( $p < 0.001$ ).

Estos resultados indican que los sitios y los tratamientos influyeron independientemente en la producción de biomasa en ambas plantas, y el factor tratamiento registró un mayor efecto significativo en referencia al sitio e interacción sitio-tratamiento. Las concentraciones MP del sitio B y el inóculo II (*C. claroideum*, *F. geosporum* y *F. mosseae*), incrementaron significativamente la biomasa radical y aérea en *V. pennatula* ( $p < 0.05$ ). En adición, las concentraciones de MP del sitio C y el bagazo de maguey incrementaron significativamente la biomasa aérea en *C. dactylon*.

**Tabla 13.** Análisis de varianza de los efectos de las concentraciones de MP en los sitios y los tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey), sobre la biomasa radical y aérea en *V. pennatula* y *C. dactylon*.

Efectos principales	<i>C. dactylon</i>		<i>V. pennatula</i>	
	Raíz	Aérea	Raíz	Aérea
Suelo (S)	(F=4.38*)	(F=34.05***)	(F=285.19***)	(F=75.84***)
T (Tratamiento)	(F=9.39**)	(F=111.341***)	(F=1450.61***)	(F=136.33***)
S*T	(F=0.95)NS	(F=26.15***)	(F=388.49***)	(F=28.717***)
<b>S</b>				
A	0.38 b	1.66 b	0.13 b	0.16 b
B	0.44 b	2.68 a	0.17 a	0.28 a
C	0.61 a	2.54 ab	0.14 b	0.20 ab
<b>T</b>				
Inóculo	0.31 b	0.99 b	0.20 a	0.31 a
Control	0.45 ab	2.18 ab	0.09 b	0.14 b
Bagazo	0.67 a	3.70 a	0.14 ab	0.20 ab
<b>S x T</b>				
SueloA*Inóculo	0.19 a	0.26 b	0.15 ab	0.18 ab
SueloA*Control	0.33 a	1.45 ab	0.06 b	0.08 b
SueloA*Bagazo	0.64 a	3.26 a	0.18 ab	0.23 ab
SueloB*Inóculo	0.35 a	1.64 ab	0.24 a	0.42 a
SueloB*Control	0.35 a	2.80 a	0.12 ab	0.21 ab
SueloB*Bagazo	0.63 a	3.61 a	0.15 ab	0.22 ab
SueloC*Inóculo	0.41 a	1.07 ab	0.21 a	0.32 a
SueloC*Control	0.66 a	2.30 a	0.11 ab	0.14 ab
SueloC*Bagazo	0.75 a	4.12 a	0.09 ab	0.15 ab
C.V. %	6.25	3.05	0.60	1.92

**NOTAS:** Los sitios y tratamientos fueron los efectos principales. La interacción Sitio\*Tratamiento, determinó si los tratamientos y las concentraciones de los MP de cada sitio influyeron en la biomasa vegetal. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , + $p < 0.1$ , NS= No significativo.

Estos resultados concuerdan con los de Chen et al. (2007), quienes reportaron el incremento de la biomasa en *Coreopsis drummondii*, *Pteris vittata*, *Lolium perenne* y *Trifolium repens* inoculadas con *F. mosseae* (citada como *Glomus mosseae*), en sitios con residuos de minería con Cu, y con los de Kohler et al. (2015), quienes reportaron que la combinación de residuos orgánicos compostados y HMA, incrementaron significativamente la biomasa aérea en *Anthyllis cytisoides* bajo suelos multimetálicos.

El efecto positivo del bagazo de maguey en *C. dactylon*, puede estar relacionado con la capacidad de esta planta para adquirir nutrientes de este sustrato orgánico (Cavagnaro, 2014). El bagazo de maguey compostado, al contener bacterias y constituir una fuente de nutrientes y energía para la planta y microbiota del suelo, probablemente incrementaron la disponibilidad de agua y formación de ligandos orgánicos, promoviendo el crecimiento vegetal de *C. dactylon* (Wang et al. 2013; Curaqueo et al. 2014).

La acumulación de MP en los tejidos de *C. dactylon* y *V. pennatula*, se relacionó con los factores sitio, planta y tratamiento. El análisis ANOVA (Tabla 14) indicó diferencias significativas en la acumulación de MP de las variables Mn raíz y Pb, Cu y Zn aéreo, respectivamente, para las fuentes de variación sitio, planta, tratamiento y las interacciones sitio-planta, sitio-tratamiento, planta-tratamiento y sitio-planta-tratamiento. La excepción fue la variable Zn radical, que únicamente presentó diferencias significativas en sitio, planta, tratamiento y la interacción sitio-planta.

**Tabla 14.** Análisis de varianza sobre la acumulación de Pb, Cu, Zn y Mn en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

Variable	Sitio (S)	Planta (P)	Tratam. (T)	S*P	S*T	P*T	S*P*T	CV %
Pb raíz	1269.87***	42.84***	81.81***	7.56**	3.51***	1.05 NS	2.38 <sup>+</sup>	4.20
Pb aéreo	320.14***	6.99*	23.74***	33.40***	9.47***	39.43***	3.36*	6.99
Cu raíz	61.66***	58.30***	22.61***	3.84**	18.51***	0.90NS	3.17*	6.58
Cu aéreo	80.45***	27.20***	16.79***	5.39**	4.05**	2.90 <sup>+</sup>	10.21***	9.82
Zn raíz	122.26***	15.17***	2.24NS	0.54NS	2.13 <sup>+</sup>	1.93NS	0.56NS	5.81
Zn aéreo	53.97***	11.21**	18.15***	30.08***	111.22***	24.82***	69.72***	3.16
Mn raíz	58.53***	14.70**	228.98***	10.27***	5.91***	7.98**	4.54**	5.03
Mn aéreo	18.29***	49.38***	79.06***	1.95NS	5.45**	12.70***	3.53*	8.31

**NOTAS:** El sitio, planta y tratamiento fueron los efectos principales. La interacción Sitio\*Tratamiento, fue incluida para determinar si el efecto de los tratamientos en la acumulación de Pb, Cu, Zn y Mn depende del sitio. La interacción sitio-planta y planta-tratamiento, fueron incluidos para determinar si el efecto del sitio y los tratamientos fueron consistentes a través de ambas especies vegetales. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , <sup>+</sup> $p < 0.1$ , NS= No significativo.

Para los efectos principales (Tabla 15), la acumulación de MP en los tejidos vegetales indica que en el sitio A se registran las mayores concentraciones de Pb, Cu y Zn radical y aéreo, pero las variables Mn radical y aéreo fueron significativamente mayores en el sitio C ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 15.** Comparación de medias de los efectos principales evaluados en *C. dactylon* y *V. pennatula* bajo tres sitios (A, B y C) con diferentes niveles de contaminación por MP.

Efecto Principal	Pb raíz	Pb aéreo	Cu raíz	Cu aéreo	Zn raíz	Zn aéreo	Mn raíz	Mn aéreo
Sitio								
A	3247.62 a	233.18 a	44.10 a	18.55 a	160.11 a	64.53 a	111.12 b	72.03 ab
B	335.35 b	34.04 b	40.23 a	8.47 b	188.68 a	52.32 ab	98.36 b	50.49 b
C	56.49 c	27.41 b	21.12 b	8.92 b	50.52 b	45.51 b	223.87 a	76.77 a
Planta								
<i>C. dactylon</i>	990.50 b	136.49 a	28.14 b	10.86 b	156.45 a	61.65 a	170.07 a	94.37 a
<i>V. pennatula</i>	1435.81 a	59.93 b	42.15 a	13.10 a	109.75 b	46.59 b	118.83 b	38.48 b
Tratamiento								
Inóculo	1761.29 a	144.32 a	43.01 a	13.77 a	147.59 a	52.33 b	69.00 b	37.89 b
Control	1274.75 b	90.07 b	26.94 b	9.99 b	135.10 a	57.70 a	301.82 a	115.72 a
Bagazo	603.42 c	60.25 c	35.49 ab	12.18 ab	116.62 a	52.33 b	62.53 b	45.68 b

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, \* $p < 0.05$ ).

Un patrón similar se observó entre *C. dactylon* y *V. pennatula*. Las concentraciones de Zn y Mn radical y Pb y Mn aéreo fueron mayores en *C. dactylon*, mientras que el Pb y Cu radical y Cu aéreo lo fueron para *V. pennatula*. Khan et al. (2000), señalan que la capacidad de una planta para adquirir elementos traza depende de la especie y el genotipo de la planta.

Al respecto, Zenk, (1996), indica que las familias Poacea y Fabacea sintetizan una serie de fitoquelatinas en presencia de los metales de transición y grupos principales (incluidos Pb, Cu y Zn). La biosíntesis de las fitoquelatinas, se inicia por la activación de enzimas constitutivas que utilizan al glutatión como sustrato, que cataliza una serie de reacciones químicas. Las vacuolas vegetales constituyen un almacenamiento transitorio para estos péptidos, los cuales se disocian y el péptido libre metálico se degrada. El secuestro de MP por las fitoquelatinas le confiere protección a las enzimas, las cuales son sensibles a los MP y estos péptidos están involucrados en la detoxificación de metales de estos grupos botánicos.

El tratamiento con los HMA incrementó significativamente las concentraciones de Pb y Cu en raíces y tejido aéreo y Zn en raíces, mientras que las concentraciones de Mn en raíces y Zn y Mn en tejido aéreo fueron mayores en el tratamiento sin inoculación.

Para la interacción sitio-planta (Tabla 16); los resultados revelaron que la mayor acumulación de MP fue en *C. dactylon*. En el sitio A, *C. dactylon* acumuló mayores contenidos de Pb y Zn en su tejido aéreo, en tanto que en el sitio B lo hizo con Pb radical y Cu aéreo. Así mismo, *V. pennatula* en los sitios A y B acumuló Cu y Mn en sus raíces, respectivamente ( $p < 0.05$ ).

La combinación de los efectos sitio-tratamiento indicó que los HMA promovieron significativamente la acumulación de MP en comparación con el tratamiento control y la adición de bagazo de maguey ( $p < 0.05$ ). Los HMA, en el sitio A, incrementaron la acumulación de Pb y Zn radical, y Pb y Cu aéreo, mientras que en el sitio B lo hicieron para Cu radical. Por su parte, en el sitio B el tratamiento control incrementó las concentraciones de Zn en tejido aéreo. El mismo patrón fue observado en el sitio C para Mn radical y aéreo ( $p < 0.05$ ).

La interacción planta-tratamiento, presentó variaciones (Tabla 16). En *C. dactylon* asociada con los HMA, incrementó las concentraciones de Pb en el tejido aéreo, en tanto que sin inoculación acumuló mayormente Mn en sus raíces y Mn y Zn en su tejido aéreo. La adición de bagazo de maguey en *V. pennatula* incremento las concentraciones de Cu en su tejido aéreo ( $p < 0.05$ ) y se puede relacionar por el efecto de las bacterias en la biodisponibilidad del Cu.

**Tabla 16.** Comparación de medias de las interacciones dobles (Sitio\*Planta, Sitio\*Tratamiento y Planta\*Tratamiento) evaluadas en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

Interacción	Pb raíz	Pb aéreo	Cu raíz	Cu aéreo	Zn raíz	Zn aéreo	Mn raíz	Mn aéreo
Sitio * Planta								
<i>C. dactylon</i> * Sitio A	2612.56 ab	349.68 a	39.62 ab	18.22 a	193.49 a	79.82 a	112.85 bc	104.47 a
<i>C. dactylon</i> * Sitio B	3882.68 a	116.69 b	48.57 ab	18.88 a	126.73 a	49.25 b	83.87 c	39.59 a
<i>C. dactylon</i> * Sitio C	319.74 b	29.66 c	29.09 ab	6.98 b	219.46 a	60.15 ab	161.81 bc	69.89 a
<i>V. pennatula</i> * Sitio A	350.96 b	38.43 c	51.37 a	9.96 b	157.91 a	44.51 b	62.59 c	31.10 a
<i>V. pennatula</i> *Sitio B	39.19 c	30.15 c	15.72 b	7.38 b	56.42 a	44.99 b	266.81 a	130.34 a
<i>V. pennatula</i> *Sitio C	73.79 c	24.67 c	26.52 ab	10.45 b	44.62 a	46.03 b	214.05 ab	44.77 a
Sitio * Tratamiento								
Sitio A*Inoculo	4630.90 a	346.58 a	42.16 abc	20.73 a	208.55 a	69.21 a	64.30 bc	54.84 abc
Sitio A*Control	3543.62 ab	224.58 ab	46.47 ab	16.70 abc	152.82 ab	67.98 a	171.51 abc	127.59 a
Sitio A*Bagazo	1568.35 b	128.39 ab	43.66 abc	18.23 ab	118.96 ab	56.41 ab	59.27 bc	33.64 abc
Sitio B*Inoculo	567.61 c	49.45 bc	66.18 a	10.72 bcd	177.78 ab	24.52 b	42.55 c	21.69 bc
Sitio B*Control	230.53 d	30.76 c	17.70 cd	5.81 d	205.77 a	72.05 a	244.60 ab	112.22 ab
Sitio B*Bagazo	207.91 d	21.92 c	36.81 abcd	8.88 cd	182.50 ab	60.42 ab	49.45 bc	17.57 c
Sitio C*Inoculo	85.37 e	36.91 c	20.70 bcd	9.85 bcd	56.45 bc	63.28 ab	106.17 bc	37.13 abc
Sitio C*Control	50.10 ef	14.88 c	16.67 d	7.45 d	46.70 c	33.08 ab	536.25 a	139.70 a
Sitio C*Bagazo	34.00 f	30.43 c	25.99 bcd	9.45 cd	48.40 c	40.17 ab	78.86 bc	85.83 abc
Planta*Tratamiento								
<i>C. dactylon</i> * Inoculo	1435.58 a	236.29 a	33.18 a	13.57 ab	184.23 a	56.34 ab	68.80 bc	43.58 b
<i>C. dactylon</i> * Control	964.65 a	106.78 ab	21.80 a	8.71 b	152.61 a	68.88 a	408.18 a	196.33 a
<i>C. dactylon</i> * Bagazo	571.26 a	66.41 bc	29.32 a	10.31 b	132.53 a	59.74 ab	64.49 bc	64.78 b
<i>V. pennatula</i> *Inoculo	2087.00 a	52.34 c	52.72 a	13.96 ab	110.95 a	48.33 b	73.21 bc	32.19 b
<i>V. pennatula</i> *Control	1584.85 a	73.37 bc	32.09 a	11.27 b	117.59 a	46.53 b	226.73 ab	56.69 b
<i>V. pennatula</i> *Bagazo	635.58 a	54.08 bc	41.66 a	14.06 a	100.71 a	44.93 b	60.56 c	26.57 b

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, \* $p<0.05$ ).

**Tabla 17.** Comparación de medias de las interacciones triples (Sitio\*Planta\*Tratamiento) evaluadas en *C. dactylon* y *V. pennatula*; con tres suelos (A, B y C) y tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado).

Interacción	Tratam.	Pb raíz	Pb aéreo	Cu raíz	Cu aéreo	Zn raíz	Zn aéreo	Mn raíz	Mn aéreo
<i>C. dactylon</i> Sitio A	Inoculo	3678.25 ab	596.60 a	40.00 ab	22.69 a	275.59 a	99.28 a	83.01 ab	78.50 abc
	Control	2626.69 ab	282.30 ab	41.55 ab	15.75 ab	179.53 a	80.09 ab	190.72 ab	193.10 ab
	Bagazo	1532.75 abc	170.10 abc	37.30 ab	16.23 ab	125.35 a	60.07 abc	64.84 ab	41.81 abc
<i>C. dactylon</i> Sitio B	Inoculo	558.44 abc	53.26 abc	47.83 ab	10.41 ab	206.30 a	8.86 c	44.01 b	22.62 abc
	Control	237.03 abc	25.43 bc	13.94 b	2.30 b	228.10 a	95.01 ab	380.08 ab	168.94 abc
	Bagazo	163.75 abc	10.30 c	25.51 ab	8.62 ab	224.00 a	76.55 ab	61.34 ab	18.11 c
<i>C. dactylon</i> Sitio C	Inoculo	70.05 abc	59.02 abc	12.11 b	7.61 ab	70.85 a	60.87 abc	79.41 ab	29.64 abc
	Control	30.24 bc	12.61 c	9.90 b	8.07 ab	50.17 a	31.52 bc	653.70 a	227.00 a
	Bagazo	17.30 c	18.82 bc	25.15 ab	6.47 ab	48.24 a	42.58 abc	67.30 ab	134.40 abc
<i>V. pennatula</i> Sitio A	Inoculo	5583.54 a	96.55 abc	44.32 ab	18.76 a	141.59 a	39.13 abc	45.60 b	31.19 abc
	Control	4460.54 ab	166.86 abc	51.39 ab	17.65 a	126.11 a	55.86 abc	152.30 ab	62.09 abc
	Bagazo	1603.96 abc	86.67 abc	50.02 ab	20.23 a	112.57 a	52.74 abc	53.71 ab	25.48 abc
<i>V. pennatula</i> Sitio B	Inoculo	576.77 abc	45.65 abc	84.53 a	11.03 ab	149.30 a	40.16 abc	41.10 b	20.75 bc
	Control	224.03 abc	36.09 abc	21.45 ab	9.32 ab	183.42 a	49.07 abc	109.12 ab	55.51 abc
	Bagazo	252.08 abc	33.55 abc	48.12 ab	9.52 ab	141.00 a	44.27 abc	37.55 b	17.02 c
<i>V. pennatula</i> Sitio C	Inoculo	100.70 abc	14.82 bc	29.30 ab	12.10 ab	48.58 a	65.70 abc	132.90 ab	44.63 abc
	Control	69.97 abc	17.16 bc	23.44 ab	6.83 ab	43.24 a	34.64 bc	418.80 ab	52.47 abc
	Bagazo	50.71 abc	42.05 abc	26.83 ab	12.43 ab	48.58 a	37.76 abc	90.43 ab	37.22 abc

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, \* $p<0.05$ ).

La combinación de todos los factores principales (Tabla 17), indica que los HMA incrementan significativamente las concentraciones MP en los tejidos de las plantas evaluadas. Se registra, para *C. dactylon* inoculada con el consorcio I en el sitio A, mayor

translocación de Pb, Cu y Zn, en comparación con los tratamientos control y bagazo de maguey ( $p < 0.05$ ). En adición, *V. pennatula* inoculada con el consorcio I promovió mayor estabilización de Pb, e inoculada con el consorcio II estabilizó mayores cantidades de Cu.

Estos resultados coinciden con los de Marques et al. (2006) quienes reportaron un incremento en la concentración de Zn en todos los tejidos de *Solanum nigrum* inoculada con *Claroideoglomus claroideum* y *Rhizophagus intraradices* (citados como *Glomus claroideum* y *G. intraradices*, respectivamente). En otro estudio, Chen et al. (2007) reportaron que *F. mosseae* (citada como *G. mosseae*) disminuyó significativamente las concentraciones de Cu y Cd en los tejidos aéreos de *Pteris vittata*, *Coreopsis drummondii* y *Trifolium repens*.

*Cynodon dactylon* en el sitio C, con el tratamiento control, estabiliza y transloca mayores cantidades de Mn. Estos resultados apuntan a que *C. dactylon* por mecanismos propios acumula Mn. De acuerdo con Pittman, (2005), las especies vegetales desarrollan mecanismos para transportar y acumular Mn en sus tejidos, como la quelación de  $Mn^{2+}$  en los espacios apoplásticos de la raíz, transporte vía simplasto (cuya eficiencia depende del metabolismo de cada planta) y unión de iones en las proteínas. Acorde con Millaleo et al. (2010), la distribución de Mn en las plantas incluye el transporte vía xilema, transferencia del xilema al floema y redistribución en el floema. En nuestro estudio, las concentraciones de Mn en el tejido aéreo se consideran normales (30-500 mg/kg, Clarkson, 1988) y acorde con Herren and Feller, (1994), la movilidad del Mn en el floema es bajo.

El transporte de metales desde la raíz a la parte aérea puede ocurrir a través del simplasto o del apoplasto; se considera a este último la vía más efectiva. Para ingresar al xilema, los solutos metálicos deben atravesar la banda de Caspary o las células de la endodermis y son transportados mediante poros y transportadores moleculares específicos y no específicos. En el citosol los ácidos orgánicos, metalotioneínas, fitoquelatinas y chaperones específicos quelan los metales y los complejos formados son transportados al citoplasma vía tonoplasto y finalmente son almacenados en las vacuolas vegetales (Hall, 2002; Göhre and Paszkowski, 2006; Castillo et al. 2011).

El factor de translocación (FT) en la mayoría de los casos fue  $< 1$  y se considera no eficiente (Tabla 18). Las concentraciones translocadas de Cu, Zn y Mn se ubican como normales y para Pb se consideran tóxicos (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Levy et al. 1999). Para Pb y Mn, el mayor FT fue registrado en *C. dactylon* en el sitio C con adición de bagazo de maguey. *Cynodon dactylon* en el sitio C sin inoculación registró el mayor valor del FT para Cu, mientras que con la inoculación, *V. pennatula* en el sitio C presentó el mayor FT para Zn ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 18.** Factores de translocación (FT) en *C. dactylon* y *V. pennatula* bajo tres sitios (A, B y C) y con tres tratamientos (ausencia-presencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado).

Especie vegetal	Tratamiento	Factor de translocación (FT)			
		Pb	Cu	Zn	Mn
<i>C. dactylon</i> Sitio A	Inoculo	0.16ab	0.60abc	0.39b	0.99ab
	Control	0.11ab	0.39abc	0.47ab	1.02ab
	Bagazo	0.12ab	0.48abc	0.49ab	0.65ab
<i>C. dactylon</i> Sitio B	Inoculo	0.09ab	0.23abc	0.05b	0.56ab
	Control	0.12ab	0.18bc	0.43ab	0.48ab
	Bagazo	0.07ab	0.33abc	0.41b	0.32ab
<i>C. dactylon</i> Sitio C	Inoculo	1.12a	0.63ab	0.95ab	0.38ab
	Control	0.42ab	0.80a	0.68ab	0.37ab
	Bagazo	1.04a	0.24abc	1.02ab	2.36a
<i>V. pennatula</i> Sitio A	Inoculo	0.02b	0.43abc	0.28b	0.69ab
	Control	0.04ab	0.35abc	0.44ab	0.41ab
	Bagazo	0.06ab	0.41abc	0.48ab	0.48ab
<i>V. pennatula</i> Sitio B	Inoculo	0.08ab	0.13c	0.33b	0.51ab
	Control	0.16ab	0.44abc	0.27b	0.51ab
	Bagazo	0.13ab	0.20abc	0.31b	0.45ab
<i>V. pennatula</i> Sitio C	Inoculo	0.15ab	0.42abc	1.57a	0.34ab
	Control	0.25ab	0.30abc	0.80ab	0.13b
	Bagazo	0.89a	0.50abc	0.79ab	0.42ab

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, \* $p < 0.05$ ).

Diversos autores han reportado el efecto de los HMA en la fitorremediación de MP en su hospedero, con resultados contradictorios. Wu et al. (2010), reportaron la fitoestabilización de Pb, Cu y Zn en *C. dactylon* colonizada con diferentes HMA. Por su parte Baodong et al. (2005), indicaron que *C. dactylon* colonizada por HMA incrementó la fitoextracción de Pb y Zn. En otro estudio, Yang et al. (2016), registraron que en *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae) inoculada con *Rhizophagus intraradices* acumuló preferentemente Pb en sus raíces.

Los resultados indican que las plantas inoculadas con HMA están inmovilizando Pb, Cu y Zn en sus raíces, evitando la toxicidad del metal en el tejido aéreo, lo cual puede estar relacionado con un “efecto de dilución” de los metales, que disminuye el transporte y acumulación de metales en el tejido aéreo (Wang et al. 2005; Castillo et al. 2011).

El Pb fue el metal más estabilizado. La biodisponibilidad de este metal fue alta y probablemente se relacione con el pH ácido del sitio A (3.5), que coincidió con las mayores concentraciones de Pb. Su disponibilidad se relaciona con la especiación química y particularmente por la concentración de sus iones libres. Se ha documentado que la mayoría de las plantas acumulan Pb en sus raíces (Jiang and Liu, 2010; Shahid et al. 2011).

De acuerdo con Arias et al. (2010), el transporte de Pb desde la raíz al tejido aéreo es limitado, debido a su inmovilización por las pectinas de la raíz, acumulación en membranas

plasmáticas y endodermis y quelación en el micelio extrarradical, así como en hifas, esporas intrarradicales y vesículas de los HMA.

Al respecto, Chen et al. (2005), reportaron la acumulación de Pb en las raíces de *Kummerowia striata*, *Ixeris denticulate*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens* y *Echinochloa crusgalli*. Se ha reportado que los HMA tolerantes a MP tienen de dos a cuatro veces más afinidad por los MP que las raíces vegetales. Asimismo, que los HMA incrementan la fitoestabilización de MP en su hospedero (Joner et al. 2000; Gonzalez-Chavez et al. 2002; Castillo et al. 2011). Chen et al. (2007), consideran al micelio extrarradical de las micorrizas como un sistema de biofiltración que puede aumentar la disolución de los metales y, consecuentemente, su absorción por las raíces de las plantas micorrizadas.

Gaur and Adholeya (2004) han documentado los mecanismos involucrados en la asociación especie vegetal-HMA en sitios contaminados con MP, mencionan mecanismos propios del hongo, como la secreción de compuestos como glomalina, precipitación en gránulos de polifosfatos y quelación de metales en sus hifas y en la pared celular de las esporas. Las esporas de HMA, de acuerdo con Cruz (2004) y Pagano et al. (2010) están conformadas por lípidos, cuerpos proteicos dentro de vacuolas y partículas de glucógeno y se consideran estructuras de resistencia o barreras frente a los metales (Rivera-Becerril et al. 2002).

Por su parte, Joner et al. (2000) y Castillo et al. (2011) sugieren que los HMA utilizan estrategias de transporte y desintoxicación para iones metálicos similares a las utilizadas por las plantas: secuestro de MP en las vacuolas del micelio intrarradical, transporte de metales en el micelio extrarradical mediante transportadores específicos o no específicos, e incremento de vesículas.

Los resultados obtenidos en biomasa vegetal, indican una respuesta favorable de *C. dactylon* a la adición de bagazo de maguey mezcalero; los HMA tuvieron el mismo efecto en *V. pennatula*. Así mismo, los HMA incrementaron significativamente la estabilización de Pb, Cu y Mn en las raíces de las plantas evaluadas.

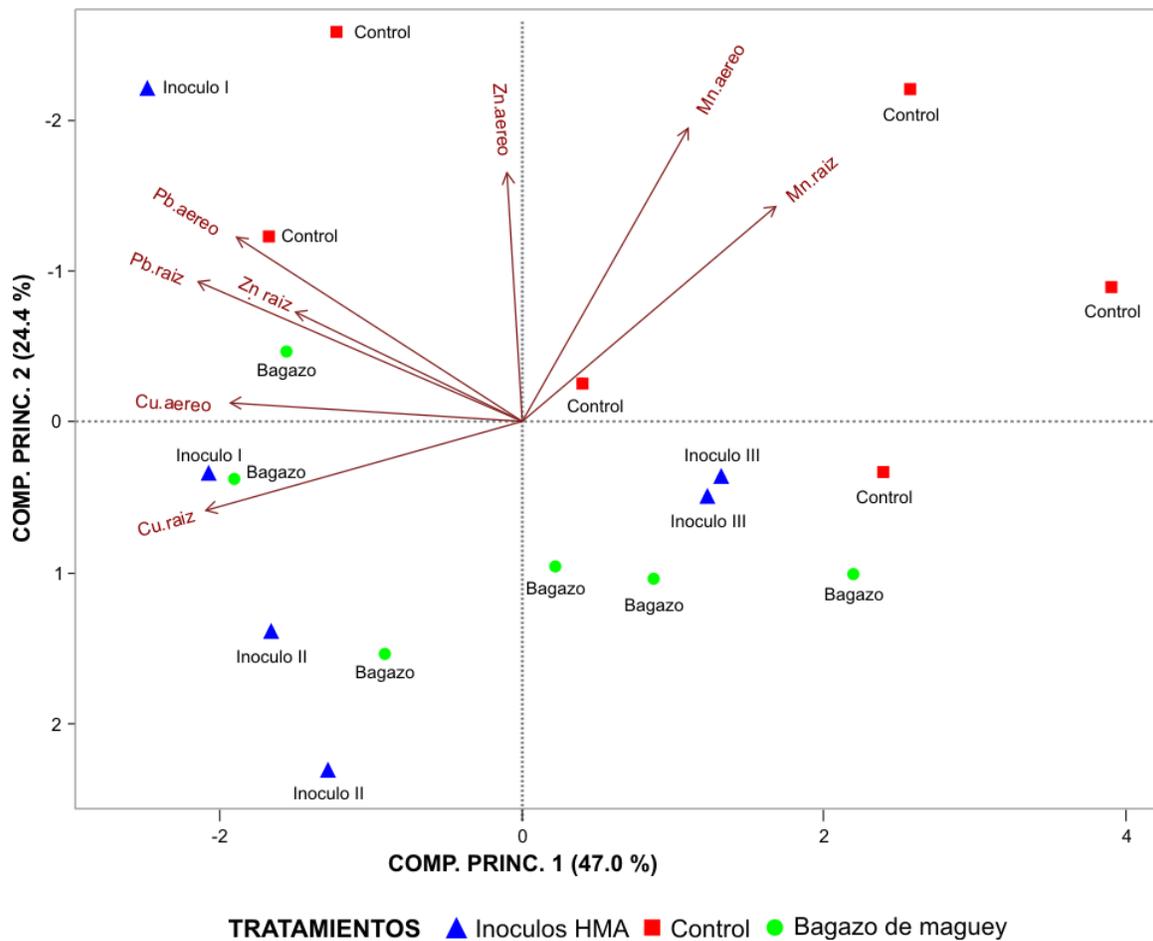
Finalmente se analizó al efecto de los tratamientos (presencia-ausencia de HMA y adición de bagazo de maguey compostado) sobre la acumulación de Pb, Cu, Zn y Mn en los tejidos vegetales de *C. dactylon* y *V. pennatula*, mediante un análisis de componentes principales (ACP). Para la concentración de MP en las plantas de estudio, el 71.4% de la varianza total se explica con los dos primeros componentes. Las variables de mayor valor descriptivo fueron: Mn raíz y aéreo, Pb raíz y aéreo y Zn aéreo (Tabla 19). Estos resultados indican que las plantas evaluadas prefieren ciertos tratamientos para la acumulación de MP en sus tejidos.

**Tabla 19.** Vectores y valores del análisis de componentes principales (ACP), con base en 8 variables de concentración evaluadas en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

Variables evaluadas	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8
Pb raíz	-0.451	0.271	-0.029	0.183	-0.160	0.295	0.302	0.695
Pb aéreo	-0.397	0.356	-0.189	0.023	0.452	-0.403	0.448	-0.331
Cu raíz	-0.439	-0.171	-0.116	0.053	-0.759	-0.348	-0.035	-0.249
Cu aéreo	-0.405	0.036	-0.532	-0.254	0.169	0.423	-0.504	-0.154
Zn raíz	-0.318	0.206	0.640	0.438	0.086	0.220	-0.317	-0.311
Zn aéreo	-0.019	0.480	0.371	-0.768	-0.198	0.005	-0.019	-0.016
Mn raíz	0.353	0.416	0.259	0.210	-0.335	0.460	0.312	-0.408
Mn aéreo	0.232	0.566	-0.224	0.267	-0.064	-0.435	-0.502	0.237
<b>Desviación estandar</b>	1.939	1.397	0.953	0.833	0.549	0.457	0.340	0.238
<b>Varianza explicada (%)</b>	47.0	24.4	11.3	8.6	3.7	2.6	1.7	0.7
<b>Varianza explicada acumulada (%)</b>	47.0	71.4	82.7	91.3	96	97.6	99.3	100.0

En la porción derecha de la Figura 9, (cuadrantes I y II en el sentido de las manecillas del reloj), se distribuyeron la mayoría de los tratamientos control, adición de bagazo de maguey e inoculo III de HMA. En el cuadrante III y IV se distribuyeron la mayoría de los tratamientos inoculo I y II de HMA, adición de bagazo de maguey y control.

En el componente principal 1 (CP1), en sentido positivo, influyen de manera importante las variables Mn raíz y aéreo. En sentido negativo influye Pb raíz y Cu raíz. En el plano del componente principal 2 (CP2) en sentido positivo, fueron determinantes las variables Pb aéreo y Zn raíz y aéreo.



**Figura 9.** Análisis de componentes principales (ACP) que muestra la relación entre los tratamientos y las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn en las raíces y tejido aéreo de *V. pennatula* y *C. dactylon*.

Los resultados muestran que las variables de concentración: Mn raíz, Pb raíz y aéreo, Cu raíz y Zn aéreo, son las más importantes para describir la acumulación de MP en los tejidos de *C. dactylon* y *V. pennatula*. No obstante se sugiere analizar los contenidos de pH, contenido de materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico en el suelo y su efecto en la acumulación de MP en las especies evaluadas.

## CONCLUSIONES

En esta investigación se evaluó experimentalmente la respuesta de *Cynodon dactylon* y *Vachellia pennatula* crecidas en suelos con residuos de minería a inoculación con consorcios de hongos de micorriza arbuscular (HMA) nativos y adición de bagazo de maguey compostado. Las raíces de las plantas inoculadas presentaron rangos de colonización micorrízica de 45 a 75% y se pueden vincular por la gran necesidad de micorrización en las plantas para lograr su mantenimiento y contrarrestar el efecto de las concentraciones de MP.

Los consorcios de HMA tuvieron el mismo efecto en *V. pennatula*; la adición de bagazo de maguey incrementó la biomasa vegetal en *C. dactylon*, sin embargo es probable la contribución de las bacterias del bagazo en este resultado.

La contribución de los HMA y bagazo de maguey, a la translocación de MP no fue eficiente. En contraste, los HMA incrementaron significativamente la estabilización de Pb, Cu y Zn en las raíces de las plantas ( $p < 0.05$ ). La acumulación de MP en las raíces micorrizadas sugiere un “efecto de dilución” de la concentración en el tejido aéreo.

Para el sitio A, *C. dactylon* asociada al inóculo I presentó la mayor estabilización de Zn, mientras que *V. pennatula* tuvo el mismo efecto para Pb y Cu en este sitio. Para el sitio B, *V. pennatula* asociada al inóculo II registró la mayor estabilización de Pb y Cu.

El análisis de componentes principales (ACP) indica que la mayoría de las variables de concentración en los tejidos describieron la acumulación de MP en *C. dactylon* y *V. pennatula*.

Finalmente se sugiere la aplicación de bagazo de maguey mezcalero compostado (producto de reuso) y los consorcios de HMA nativos en *C. dactylon* y *V. pennatula*, como una estrategia potencial temporal y de bajo costo, para la fitoestabilización de Pb, Cu y Zn en particular de los sitios A y B de la zona minera de San Jerónimo Taviche, Oaxaca, México.

## LITERATURA CONSULTADA

Alarcón A, Ferrera-Cerrato R (2013) Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos. Trillas, México DF, pp 180-181

Alloway BJ (1995) Heavy metals in soils. 2nd edn. Blackie and Professional, London UK, pp 224-240

Anjum NA, Umar S, Iqbal M (2014) Assessment of cadmium accumulation, toxicity, and tolerance in Brassicaceae and Fabaceae plants-implications for phytoremediation. Environ. Sci Pollut Res 21, 10286–10293

Arias JA, Peralta-Videa JR, Ellzey JT, Ren M, Viveros MN, Gardea-Torresdey JL (2010) Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. Environ Exp Bot 68: 139–148

Baodong C, Xiangyu T, Yongguan Z, Peter C (2005) Metal concentrations and mycorrhizal status of plants colonizing copper mine tailings: potential for revegetation. Science in China Ser C Life Sciences 48: 156-164

Bolan N, Kunhikrishnan A, Thangarajan R, Kumpiene J, Park J, Makino T, Kirkham MB, Scheckel K, Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize?. Journal of Hazardous Materials 266: 141– 166

Borcard D, Gillet F, Legendre P (2011) Numerical ecology with R, Springer, Nueva York, pp 118-131

Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp 13–37

Castillo OS, Dasgupta-Schubert N, Alvarado CJ, Zaragoza EM, Villegas HJ (2011) The effect of the symbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of copper (II) and its implications for phytoremediation. New Biotechnology 29: 156-164

Cavagnaro TR (2014) Impacts of compost application on the formation and functioning of arbuscular mycorrhizas. Soil Biol Biochem 78: 38–44

Chen X, Wu C, Tang J, Hu S (2005) Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. Chemosphere 60: 665–671

Chen BD, Zhu YG, Duan J, Xiao XY, Smith SE (2007) Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. Environmental Pollution 147: 374-380

- Christie P, Li X, Chen B (2004) Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant Soil* 261: 209–217
- Clarkson DT (1988) The uptake and translocation of manganese by plant roots. In: Graham RD, Hannam RJ, Uren NJ. (eds) *Manganese in soil and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 101-111
- Cruz AF (2004) Element storage in spores of *Gigaspora margarita* Becker and Hall measured by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Acta Bot Bras* 18: 473-480
- Curaqueo G, Schoebitz M, Borie F, Caravaca F, Roldán A (2014) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and addition of composted olive-mill waste enhance plant establishment and soil properties in the regeneration of a heavy metal-polluted environment. *Environ Sci Pollut Res Int* 21: 7403–7412
- Daniels BA, Skipper HD (1982) Methods for recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Schenck NC (ed) *methods and principles of mycorrhizal research*. The American Phytopathological Society, St Paul, pp 29-36
- de Mendiburu F (2015) AGRICOLAE: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package, version 3.2.2, pp 4-69 <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>
- Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabriaes JJ, Partida-Martinez LP (2014) Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *Microbiol Ecol* 1–14
- Everitt BS, Hothorn T (2006) HSAUR: A Handbook of Statistical Analyses Using R. R package, version 3.2.2, pp 3-9  
[https://cran.r-project.org/web/packages/HSAUR/vignettes/Ch\\_principal\\_components\\_analysis.pdf](https://cran.r-project.org/web/packages/HSAUR/vignettes/Ch_principal_components_analysis.pdf)
- Flores-Ríos PA, Robles-Pérez C (2014) Dinámica de parámetros físicos y químicos en la biodegradación de bagazo de agave mezcalero. Memoria del II Congreso Internacional y XVI Congreso de Ciencias Agronómicas. Universidad Autónoma de Chapingo, México
- Gaur A, Adholeya A (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Curr Sci* 86: 528-534
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235- 244
- Giovanetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489–500
- Göhre V, Paszkowski U (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223: 1115–1122

Gonzalez-Chavez C, Harris PJ, Dodd J, Meharg A (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. *New Phytol* 155: 163-171

Guadarrama-Chávez P, Camargo-Ricalde SL, Hernández-Cuevas L, Castillo Argüero S (2007) Los hongos micorrizógenos arbusculares de la región de Nizanda, Oaxaca, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 131-137

Guo W, Zhao R, Yang H, Zhao J, Zhang J (2013) Using native plants to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on revegetation of iron tailings in grasslands. *Biol Fertil Soils* 49: 617–626

Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11

Hernández-Cuevas LV, Guadarrama-Chávez P, Sánchez-Guillén I, Ramos-Zapata J (2012) Micorriza arbuscular: colonización intrarradical y extracción de esporas. In Álvarez Sánchez J, Monroy-Ata (eds) *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Las prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias-UNAM, México, DF, pp 1-15

Herren T, Feller U (1994) Transfer of zinc from xylem to phloem in the peduncle of wheat. *J Plant Nutr* 17: 1587-1598

Jiang W, Liu D (2010) Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biol* 10: 1-8

Jiménez EM (2010) Plant-based methods for remediating arsenic-polluted mine soils in Spain. Ph D Dissertation UAM, Madrid

Joner EJ, Briones R, Leyval C (2000) Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226: 227-234

Kabata-Pendias A, Pendias H (1992) Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 365

Khade HW, Adholeya A (2009) Feasible bioremediation through arbuscular mycorrhizal fungi imparting heavy metal tolerance: A retrospective. *Bioremediation Journal* 11: 33-43

Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41: 197-207

Kohler J, Caravaca F, Azcón R, Diaz G, Roldán A (2015) The combination of compost addition and arbuscular mycorrhizal inoculation produced positive and synergistic effects on the phytomanagement of a semiarid mine tailing. *Science of the Total Environment* 514: 42–48

Lepp, NW (1981) Effect of Heavy Metal Pollution on Plant. In: Lepp NW (ed) *Effects of Trace Metals on Plant Function*. Applied Science Publishers, London, pp 145

- Levy BD, Redente EF., Uphoff GD (1999) Evaluating the phytotoxicity of Pb-Zn tailings to big bluestem (*Andropogon gerardii* vitman) and Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Soil Science* 164: 364-375
- Lindsay W, Norvell W (1978) Development of a DTPA soil zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci Soc Am J* 42: 421-428
- Marques A, Oliveira RS, Rangel A, Castro P (2006) Zinc accumulation in *Solanum nigrum* is enhanced by different arbuscular mycorrhizal fungi. *Chemosphere* 65: 1256-1263
- Marques A, Oliveira RS, Rangel A, Castro P (2008) Application of manure and compost to contaminated soils and its effect on zinc accumulation by *Solanum nigrum* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Environmental Pollution* 151: 608-620
- Mcgonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan J (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501
- McGrath SP, Zhao FJ (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* 14: 277-282
- Medina A, Azcón R (2010) Effectiveness of the application of arbuscular mycorrhizal fungi and organic amendments to improve soil quality and plant performance under stress conditions. *J soil sci plant nutr* 10: 354-372
- Millaleo R, Reyes-Díaz M, Ivanov AG, Mora ML, Alberdi M (2010) Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J Soil Sci Plant Nutr* 10: 476 - 494
- Pagano MC, Persiano AIC, Cabello MN, Scotti MR (2010) Elements sequestered by arbuscular mycorrhizal spores in riverine soils: A preliminary assessment. *Journal of Biophysics and Structural Biology* 2: pp 16-21
- Phillips DA, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br MycolSoc* 55:158-161
- Pielou EC (1984) *The interpretation of ecological data: a primer on classification and ordination.* Wiley, New York, pp 160
- Pittman J (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol* 167: 733-742
- R Core Team (2013) *R: A Language and Environment for Statistical Computing.*R Foundation for Statistical, pp 3 <http://www.R-project.org/>

Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel JP, Belimov A, Gianinazzi S, Strasser RJ, Gianinazzi-Pearson V (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J Exp Bot* 53: 1177–1185

Rivera-Becerril F, Juárez-Vázquez LV, Hernández-Cervantes SC, Acevedo-Sandoval OH, Vela-Correa G, Cruz-Chávez E, Moreno-Espíndola IP, Esquivel-Herrera A, León-González F (2013) Impacts of manganese mining activity on the environment: Interactions among soil, plants, and arbuscular Mycorrhiza. *Arch Environ Contam Toxicol* 64: 219–227

Ruiz-Huerta EH, Armienta-Hernández MA (2012) Acumulación de Arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Rev Int Contam Ambie* 28: 103-117

Schneider J, Stürmer SL, Guimarães-Guilherme LM, de Souza-Moreira FM, Fonsêca de Sousa-Soares CR (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. *Journal of Hazardous Materials* 262: 1105– 1115

Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden, England, [www.amf-phylogeny.com](http://www.amf-phylogeny.com)

SEMARNAT (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT-2004 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México DF

SEMARNAT (2004b) Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México DF

Shahid M, Pinelli E, Pourrut B, Silvestre J, Dumat C (2011) Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 78–84

Shu WS, Ye ZH, Lan CY, Zhang ZQ, Wong MH (2002) Lead, zinc and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon*. *Environmental Pollution* 120: 445–453

Teodoro-Tenango M (2014) Estudio de la comunidad vegetal presente en sitios contaminados con residuos de mina de plata y su capacidad fitorremediadora. M Sc Disertación CIIDIR-Oaxaca-IPN, Oaxaca

USDA (2000) Heavy metal soil contamination. Soil Quality Institute. Urban Technical Note 3, United States Department of Agriculture, pp 7

Visser JF (1994) Contaminated land policies in some industrialized countries. *Technique Commissie Bodembescherming*, The Hague, The Netherlands, pp 11-109

- Vogel-Mikuš K, Drobne D, Regvar M (2005) Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution* 133: 233–242
- Wang F, Lin X, Yin R (2005) Heavy metal uptake by arbuscular mycorrhizas of *Elsholtzia splendens* and the potential for phytoremediation of contaminated soil. *Plant and Soil* 269: 225-232
- Wang FY, Lin XG, Yin R (2007) Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on heavy metal accumulation of maize grown in a naturally contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 9: 345-353
- Wang FY, Shi ZY, Xu, XF, Wang XG, Li, YJ (2013) Contribution of AM inoculation and cattle manure to lead and cadmium phytoremediation by tobacco plants. *Environ Sci Process Impacts* 15: 794–801
- Watts-Williams SJ, Cavagnaro TR (2012) Arbuscular mycorrhizas modify tomato responses to soil zinc and phosphorus addition. *Biol Fertil Soils* 48: 285–294
- Wu FY, Bi YL, Leung HM, Ye ZH, Lin XG, Wong MH (2010) Accumulation of As, Pb, Zn, Cd and Cu and arbuscular mycorrhizal status in populations of *Cynodon dactylon* grown on metal-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 44: 213–218
- Yang Y, Song Y, Scheller HV, Ghosh A, Ban Y, Chen H, Tang M (2015) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 86: 146-158
- Yang Y, Liang Y, Han X, Chiu TS, Ghosh A, Chen H, Tang M (2016) The role of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil. *Nature* 6: 1-14
- Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene* 179: 21-30

## CONCLUSIONES GENERALES

Se registró de bajo a alto número de esporas de HMA en la rizosfera de los hospederos que han colonizado espontáneamente suelos de tres diferentes sitios con residuos de minería; se sugiere que las esporas presentes en la rizosfera de los hospederos pueden actuar como barreras biológicas o estructuras de resistencia frente a las concentraciones de MP.

Todas las especies vegetales en los sitios con MP presentaron altos intervalos de colonización e indica la necesidad de micorrización del hospedero, para su mantenimiento y hacer frente a las concentraciones de MP.

Con base en los valores de número de esporas y colonización micorrízica, se deben considerar a *Cynodon dactylon* y *Vachellia pennatula* para futuros estudios de fitorremediación en el área.

Mediante métodos moleculares se amplificó la región interna transcrita (ITS) ADNr y se describió la secuencia de ADN de *Entrophora infrequens*. Se sugiere el diseño de primers específicos para cada familia de HMA y utilizar esporas provenientes de cultivos monoespóricos, para elucidar las relaciones filogenéticas entre las especies de HMA encontradas en éste y otros estudios y las registradas a nivel mundial, además de abordar el estudio de las comunidades de HMA dentro de las raíces colonizadas del hospedero.

Se identificaron por caracteres morfológicos un total de 15 especies de HMA en los sitios con MP; pertenecientes a los géneros *Acaulospora*, *Ambispora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Claroideoglosum*, *Funneliformis*, *Glomus* y *Rhizophagus*.

*Ambispora gerdemannii*, *C. claroideum* y *F. geosporum* fueron las especies más abundantes y dominantes en los sitios con MP, lo que indica su adaptación a las condiciones ambientales locales y a los diversos rangos de concentración de los metales.

El estudio ecológico indicó que cada sitio presentó diferentes índices de diversidad y composición de especies de HMA y la diversidad de HMA del sitio A fue afectada negativamente por las concentraciones de MP del suelo.

El análisis de correspondencias múltiple (ACM) reveló que las variables de mayor valor descriptivo en relación a las asociaciones entre HMA-planta y concentraciones de MP fueron: Pb, Mn, *Septoglosum constrictum* y *Acaulospora mellea*. En adición, las especies vegetales nativas presentaron diferentes patrones de asociación con los MP e indica que cada sitio presenta una dinámica particular. El análisis de correlación canónico (ACoC) reveló que revela que ciertas familias de HMA se correlacionaron significativamente con las concentraciones de Pb, Cu, Zn y Mn en el suelo e indica su tolerancia a MP específicos.

El análisis de la estructura de la comunidad de HMA y sus relaciones con las concentraciones de MP, indican que las comunidades de HMA representan un factor esencial para el establecimiento y mantenimiento de las especies vegetales nativas estudiadas en los sitios con residuos de minería en San Jerónimo Taviche, Oaxaca, México y se comprobó que las familias de HMA presentan cierta tolerancia a los MP del suelo.

Se sugiere el análisis de otras propiedades fisicoquímicas del suelo como; capacidad de intercambio catiónico, contenido de N, P y mineralogía de las arcillas y evaluar su relación con la estructura de la comunidad de HMA.

El experimento en maceta indicó una respuesta favorable de *C. dactylon* y *V. pennatula* crecidas en suelos con residuos de minería a inoculación con HMA y adición de bagazo de maguey compostado. Las raíces de las plantas inoculadas presentaron rangos de colonización micorrízica de 45 a 75% y se pueden vincular por la gran necesidad de micorrización en las plantas para lograr su mantenimiento y contrarrestar el efecto de las concentraciones de MP.

Los HMA incrementaron la biomasa vegetal en *V. pennatula*; el bagazo de maguey tuvo el mismo efecto en *C. dactylon*. Se sugiere considerar la contribución de las bacterias del bagazo de maguey a este resultado.

El efecto de los HMA y bagazo de maguey compostado a la translocación no fue eficiente. En contraste los HMA incrementaron significativamente la estabilización de Pb, Cu y Zn en las raíces de las plantas evaluadas.

Para el sitio A, se sugiere el uso de; *C. dactylon* en asociación con el inóculo I para la estabilización de Zn y *V. pennatula* en asociación con el inóculo I para la estabilización de Pb. Para el sitio B, *V. pennatula* asociada con el inóculo II, se puede aplicar para la estabilización de Pb y Cu. Se propone la adición de bagazo de maguey mezcalero compostado (producto de reuso) y los HMA nativos, ambos en *C. dactylon* y *V. pennatula*, como una estrategia potencial a largo plazo y de bajo costo, para la fitoestabilización de Pb, Cu y Zn en los sitios A y B de la zona minera de San Jerónimo Taviche, Oaxaca.

No obstante, es necesario considerar la evaluación de otras propiedades fisicoquímicas del suelo (pH, MO, concentración de P en la biomasa vegetal) y el papel de otros microorganismos rizosféricos como bacterias y hongos filamentosos y su aplicación experimental en el resto de las especies vegetales nativas de la zona, para así poder ofrecer un sistema integral de restauración que involucre el restablecimiento de la cubierta vegetal, el mejoramiento de la estructura del suelo y el desarrollo óptimo del ecosistema.