



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

“La micorrización modifica la respuesta de las plantas de pimiento en presencia de cobre en el suelo”



Tesista: Ing. Ftal. MSc. Marcela Ruscitti

Director: Prof. Ing. Agr. Jose Beltrano

Co-director: Prof. Ph D. Pedro Balatti

Asesor Académico: Prof. Dr. Néstor Caffini

Año: 2016

Agradecimientos

Agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), por permitirme realizar mi formación de postgrado y a las autoridades del Instituto de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (CONICET-UNLP) por facilitarme las instalaciones para el desarrollo de este trabajo de investigación.

El presente trabajo no habría sido posible sin el acompañamiento y apoyo de numerosas personas a las cuales quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

- A José, mi querido director, por haberme guiado y haber confiado en mí, dándome la libertad para crecer. Agradezco las incalculables horas puestas a mi disposición con entusiasmo y calidez, durante tantos años.
- A Pedro, mi codirector, por su predisposición, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias. Por sus consejos a nivel científico y aún más importante a nivel personal.
- A Cecilia, mi compañera y amiga, con la que he compartido tantos momentos, por haberme acompañado siempre y haberme brindado su ayuda incondicional.
- A Sebastián, por las horas de charlas y discusiones y sobre todo por el aliento y el entusiasmo transmitido.
- A Laura y Olga, por su ayuda en todas las actividades del laboratorio y los mates compartidos entre tareas.
- A todos los compañeros del INFIVE, especialmente a Alejandra, Daniel, Mario; con quienes he compartido el quehacer diario, intercambiando experiencias y haciendo amena cada jornada.
- A mis amigas por la compañía constante, apoyándome en los fracasos y alegrándose en los éxitos.
- A mis padres y mis hermanos, por estar siempre presentes alentándome con amor para que me siga formando.
- A Sofía, Rocío y Joaquín por iluminar cada día de mi vida.

Índice General

ABREVIATURAS	18
RESUMEN	19
CAPITULO I: INTRODUCCION	21
Suelo: su importancia en el medio ambiente.	22
Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP).	24
Efectos tóxicos de los metales pesados.	25
Importancia del cobre en las plantas.	27
El cobre, si bien es un elemento esencial puede ser tóxico para el hombre.	29
Importancia de las micorrizas arbusculares.	30
Los hongos micorrícicos en la contaminación por metales pesados.	34
Fitoestabilización.	37
Fitoextracción.	38
El cobre y los hongos micorrícicos.	39
Hipótesis.	40
Objetivos.	41
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	42
1. Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de pimiento.	43
Germinación en presencia de cobre.	43
Germinación en presencia de cobre y potasio.	44
2. Efecto del cobre sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de pimiento.	46
Crecimiento de la raíz en pouches, en presencia de cobre.	46
3. Efecto del cobre en la micorrización de plántulas de pimiento.	49
Inoculación en presencia de cobre.	49
4. Efecto del cobre sobre el crecimiento de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.	52
Evaluación de parámetros morfológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre.	52

5. Efecto del cobre sobre la fisiología de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.	54
Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en condiciones de hidroponía.	54
Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en suelo.	57
6- Efecto de la micorrización sobre la partición del cobre en plantas de pimiento.	60
Evaluación de la partición del cobre en plantas no inoculadas o inoculadas, determinación de índices de eficiencia.	60
7- Efecto del ácido salicílico exógeno sobre la toxicidad por cobre en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.	62
Evaluación de los tratamientos con ácido salicílico sobre plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas, para aumentar la tolerancia al cobre del suelo.	62
8- Amplificación de los genes cuya expresión ha sido modificada por la presencia de metales pesados.	65
Evaluación de la expresión de genes y proteínas en plantas no inoculadas o inoculadas, en presencia de cobre.	65
9- Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de plantas de pimiento expuestas a diferentes niveles de contaminación por cobre.	71
Germinación de semillas obtenidas de plantas cultivadas con diferentes niveles de contaminación por cobre.	71
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION	73
1. Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de pimiento.	74

Germinación en presencia de cobre.	74
Germinación en presencia de cobre y potasio.	76
2. Efecto del cobre sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de pimiento.	81
Crecimiento de la raíz en pouches, en presencia de cobre.	81
3. Efecto del cobre en la micorrización de plántulas de pimiento.	85
Inoculación en presencia de cobre.	85
4. Efecto del cobre sobre el crecimiento de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.	94
Evaluación de parámetros morfológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre.	94
5. Efecto del cobre sobre la fisiología de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.	102
Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en condiciones de hidroponía.	103
Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en suelo.	119
6- Efecto de la micorrización sobre la partición del cobre en plantas de pimiento.	129
Evaluación de la partición del cobre en plantas no inoculadas o inoculadas, determinación de índices de eficiencia.	129
7- Efecto del ácido salicílico exógeno sobre la toxicidad por cobre en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.	134
Evaluación de los tratamientos con ácido salicílico sobre plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas, para aumentar la tolerancia al cobre del suelo.	134

8- Amplificación de los genes cuya expresión ha sido modificada por la presencia de metales pesados.	153
Evaluación de la expresión de genes y proteínas en plantas no inoculadas o inoculadas, en presencia de cobre.	153
9- Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de plantas de pimiento expuestas a diferentes niveles de contaminación por cobre.	161
Germinación de semillas obtenidas de plantas cultivadas con diferentes niveles de contaminación por cobre.	161
CAPITULO IV: CONCLUSIONES	165
CAPITULO V: BIBLIOGRAFÍA	170

Índice de Figuras

Figura 1. Micorrizas arbusculares en un corte longitudinal de raíz.	32
Figura 2. Ciclo de las micorrizas arbusculares en la planta y en el suelo.	33
Figura 3. Modelo conceptual de los principales tipos de fitorremediación.	35
Figura 4. Bolsa de crecimiento o “pouch” (A). Semillas pregerminadas de pimienta, en el momento de colocarlas en los pouches (B).	47
Figura 5. Plantas de pimienta en hidroponía, al momento de iniciar los tratamientos con las distintas concentraciones de cobre.	55
Figura 6. Plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre (A), detalle de una raíz en ausencia de cobre (B) y detalle de una raíz con 200 μM de cobre (C).	76
Figura 7. Plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre (A) y de potasio (B).	81
Figura 8. Patrón proteico de raíces de plántulas de pimienta cultivadas en pouches en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0 μM , 2: 50 μM , 3: 100 μM y 4: 200 μM de CuSO_4 (A). Densitograma donde los picos representan las bandas del marcador de peso molecular y las concentraciones de cobre ensayadas (B).	84
Figura 9. Plántulas de pimienta cultivadas en pouches en presencia de distintas concentraciones de cobre: A: 0 μM , B: 50 μM , C: 100 μM y D: 200 μM .	85
Figura 10. Raíces no micorrizadas y micorrizadas con <i>Funneliformis mosseae</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i> , después de la tinción con azul de Tripán en lactofenol, donde se observan las estructuras propias del hongo.	87
Figura 11. Plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre; A: 0 mM; B: 0,25 mM; C: 0,5 mM; D: 1 mM; E: 2 mM y F: 4 mM de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.	102
Figura 12. Patrón proteico de hojas de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0 μM , 2: 10 μM , 3: 50 μM , 4: 100 μM , 5: 200 μM y 6: 1000 μM .	114
Figura 13. Patrón proteico de raíces de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0 μM , 2: 10 μM , 3: 50 μM , 4: 100 μM , 5: 200 μM y 6: 1000 μM .	114
Figura 14. Plantas de pimienta cultivadas en hidroponía en	

presencia de distintas concentraciones de cobre, (A) no inoculadas, (B) inoculadas y (C) detalle de hoja con síntomas de toxicidad por cobre, expuesta a la máxima concentración (1000 μ M).	118
Figura 15. Plantas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.	134
Figura 16. Plantas de pimiento cultivadas en condiciones de hidroponia, en presencia de diferentes concentraciones de cobre (A); detalle de raíces de plantas de pimiento en ausencia de cobre, donde se observa la formación de nuevas raíces (B); detalle de raíces de pimiento en presencia de cobre, donde se observa necrosis y ausencia de nuevas raíces (C).	152
Figura 17. Plantas de pimiento no inoculadas: A, B y C o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> : D, E y F; con 0 μ M de AS: A y D; con 200 μ M de AS: B y E; con 500 μ M de AS: C y F. En cada foto la planta de la izquierda creció con 0 mM de Cu; la del centro con 0,1 mM de Cu y la planta de la derecha con 1 mM de Cu.	153
Figura 18. Patrón proteico de hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) o inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> (RI), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: NI 0 mM, 2: NI 1 mM, 3: NI 2 mM, 4: NI 4 mM, 5: RI 0 mM, 6: RI 1 mM, 7: RI 2 mM y 8: RI 4 mM (A). Densitograma donde los picos representan las bandas del marcador de peso molecular y las concentraciones de cobre ensayadas (B).	154
Figura 19. ADN extraído con Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega (calle 2) y ADN extraído con Protocolo CTAB modificado (calle 3). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.	155
Figura 20. ADN extraído con Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega de muestras expuestas a 0 mM, 2 mM y 4 mM de cobre (calle 2, 3 y 4). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.	156
Figura 21. Amplificación de Glicerol 3 fosfato acyltransferasa (GL), Glutation reductasa (GR) y Metalotioneína (M). El producto de reacción fue sembrado en el siguiente orden: GL (calles 1, 2 y 3), GR (calles 4, 5 y 6) y M (calles 7, 8 y 9). M: marcador de peso molecular 100 - 1000 pb.	159
Figura 22. ARN extraído con AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit de muestras expuestas a 0 mM de cobre (calle 2 y 4) y a 4 mM de cobre (3 y 5). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.	159
Figura 23. cDNA obtenido a partir del ARN extraído de muestras expuestas a 0 mM de cobre (calle 2 y 4) y a 4 mM de cobre (3 y 5). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.	160
Figura 24. Plantas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre usadas en los ensayos de biología	161

molecular. A: plantas no inoculadas, B: plantas inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> .	
Figura 25. Semillas obtenidas de plantas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en la solución nutritiva. A: no inoculadas, B: inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> .	164

Índice de Tablas

Tabla 1. Contenido en metales pesados (mg/kg) en fertilizantes, fitosanitarios, lodos de depuradora y enmiendas orgánicas.	24
Tabla 2. Porcentaje de micorrización de plantas de pimiento inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i> , determinado a los 40, 60 y 90 días después de la siembra.	86
Tabla 3. Porcentaje de micorrización de plantas de trébol inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i> , determinado a los 40, 60 y 90 días después de la siembra.	87
Tabla 4. Longitud y peso seco de la raíz de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> , a los 90 días después de la siembra.	90
Tabla 5. Altura y peso seco de la parte aérea de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> , a los 90 días después de la siembra.	91
Tabla 6. Longitud y peso seco de la raíz de plantas de trébol no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> , a los 90 días después de la siembra. .	92
Tabla 7. Altura y peso seco de la parte aérea de plantas de trébol no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> , a los 90 días después de la siembra.	93
Tabla 8. Índice mitótico de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , determinado 24 horas después del agregado de cobre a la solución nutritiva.	103
Tabla 9. Porcentaje de colonización (M), porcentaje de hifas viables (SDH) y dependencia micorrícica (DM) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (FM) o <i>Rhizophagus intraradices</i> (RI), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.	119
Tabla 10. Contenido de clorofila total (Cl) y carotenoides (Cr) de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.	125
Tabla 11. Liberación de electrolitos de las membranas celulares de raíz (LE raíz) y de hoja (LE hoja) de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.	126
Tabla 12. Fotosíntesis neta (Fn), transpiración (T), conductancia estomática (Ce) y eficiencia del uso del agua (EUA) de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.	127
Tabla 13. Índice de eficiencia de absorción (UE), eficiencia de traslocación (TE), eficiencia de fitoextracción (PE) y dependencia	133

por cobre (DCu) en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> .	
Tabla 14. Clorofila a (Cl A), clorofila b (Cl B), clorofila total (Cl T) y carotenoides (Cr) en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.	146
Tabla 15. Porcentaje de germinación y longitud de la raíz de semillas y plántulas provenientes de plantas no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en la solución nutritiva.	162

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Porcentaje de germinación de semillas de pimiento tratadas con distintas concentraciones de cobre.	74
Gráfico 2. Longitud de raíz y de parte aérea de plántulas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	75
Gráfico 3. Porcentaje de germinación de semillas de pimiento tratadas con distintas concentraciones de cobre.	77
Gráfico 4. Porcentaje de germinación de semillas de pimiento tratadas con distintas concentraciones de potasio.	77
Gráfico 5. Longitud de raíz y de parte aérea de plántulas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	78
Gráfico 6. Longitud de raíz y de parte aérea de plántulas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de potasio.	79
Gráfico 7. Contenido de MDA de hoja y de raíz de plántulas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	80
Gráfico 8. Crecimiento acumulado de la raíz de plántulas de pimiento cultivadas en pouches en presencia de distintas concentraciones de cobre.	83
Gráfico 9. Altura de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	94
Gráfico 10. Número de hojas de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	95
Gráfico 11. Longitud de raíz de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	96
Gráfico 12. Área foliar de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	97
Gráfico 13. Peso seco aéreo de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	98
Gráfico 14. Peso seco de raíz de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	99
Gráfico 15. Peso seco total de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	100
Gráfico 16. Conductancia estomática de plantas de pimiento no	105

inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	
Gráfico 17. Resistencia estomáca de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	106
Gráfico 18. Temperatura de hoja de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	107
Gráfico 19. Índice de verdor de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	108
Gráfico 20. Contenido de MDA en raíz de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	109
Gráfico 21. Contenido de MDA en hoja de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	110
Gráfico 22. Conductividad relativa en raíz de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	112
Gráfico 23. Conductividad relativa en hoja de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	112
Gráfico 24. Área foliar de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	116
Gráfico 25. Peso seco de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	117
Gráfico 26. Peso seco de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	122
Gráfico 27. Área foliar de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> o <i>Rhizophagus intraradices</i> cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	122
Gráfico 28. Contenido de cobre en distintas fracciones de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	130
Gráfico 29. Contenido de cobre en raíz y parte aérea de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	131
Gráfico 30. Distribución porcentual de cobre en los distintos órganos de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> , cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	132
Gráfico 31. Conductividad relativa de hojas de plantas de pimiento	136

no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	
Gráfico 32. Conductividad relativa de raíces de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	137
Gráfico 33. Malonildialdehído de hojas de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	139
Gráfico 34. Proteínas de hojas de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	140
Gráfico 35. Proteínas de raíces de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	142
Gráfico 36. Prolina de hojas de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	143
Gráfico 37. Prolina de raíces de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	145
Gráfico 38. Actividad de enzimas peroxidadas en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	148
Gráfico 39. Actividad de la enzima catalasa en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.	150

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Análisis de Varianza para longitud de raíz por cobre.	76
Cuadro 2. Análisis de Varianza para longitud aérea por cobre.	76
Cuadro 3. Análisis de Varianza para longitud de raíz por cobre.	78
Cuadro 4. Análisis de Varianza para longitud aérea por cobre.	78
Cuadro 5. Análisis de Varianza para longitud de raíz por potasio.	79
Cuadro 6. Análisis de Varianza para longitud aérea por potasio.	79
Cuadro 7. Análisis de Varianza para MDA de raíz por cobre.	80
Cuadro 8. Análisis de Varianza para MDA de hoja por cobre.	80
Cuadro 9. Análisis de Varianza para longitud de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	90
Cuadro 10. Análisis de Varianza para PS raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	90
Cuadro 11. Análisis de Varianza para altura - Suma de Cuadrados Tipo III.	91
Cuadro 12. Análisis de Varianza para PS aéreo - Suma de Cuadrados Tipo III.	91
Cuadro 13. Análisis de Varianza para longitud raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	92
Cuadro 14. Análisis de Varianza para PS raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	92
Cuadro 15. Análisis de Varianza para altura - Suma de Cuadrados Tipo III.	93
Cuadro 16. Análisis de Varianza para PS aéreo - Suma de Cuadrados Tipo III.	93
Cuadro 17. Análisis de Varianza para altura - Suma de Cuadrados Tipo III.	95
Cuadro 18. Análisis de Varianza para número hojas - Suma de Cuadrados Tipo III.	95
Cuadro 19. Análisis de Varianza para longitud de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	96
Cuadro 20. Análisis de Varianza para AF - Suma de Cuadrados Tipo III.	97
Cuadro 21. Análisis de Varianza para PS aéreo - Suma de Cuadrados Tipo III.	98
Cuadro 22. Análisis de Varianza para PS de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	99
Cuadro 23. Análisis de Varianza para PS total - Suma de Cuadrados Tipo III.	100
Cuadro 24. Análisis de Varianza para conductancia estomática - Suma de Cuadrados Tipo III.	105
Cuadro 25. Análisis de Varianza para resistencia estomática - Suma de Cuadrados Tipo III.	106
Cuadro 26. Análisis de Varianza para temperatura de hoja - Suma	107

de Cuadrados Tipo III.	
Cuadro 27. Análisis de Varianza para SPAD - Suma de Cuadrados Tipo III.	109
Cuadro 28. Análisis de Varianza para MDA de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	109
Cuadro 29. Análisis de Varianza para MDA de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III.	110
Cuadro 30. Análisis de Varianza para CR de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	112
Cuadro 31. Análisis de Varianza para CR de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III.	113
Cuadro 32. Análisis de Varianza para AF - Suma de Cuadrados Tipo III.	116
Cuadro 33. Análisis de Varianza para PS - Suma de Cuadrados Tipo III.	117
Cuadro 34. Análisis de Varianza para PS total - Suma de Cuadrados Tipo III.	123
Cuadro 35. Análisis de Varianza para área foliar - Suma de Cuadrados Tipo III.	123
Cuadro 36. Análisis de Varianza para clorofila total - Suma de Cuadrados Tipo III.	125
Cuadro 37. Análisis de Varianza para carotenos - Suma de Cuadrados Tipo III.	125
Cuadro 38. Análisis de Varianza para CR de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	126
Cuadro 39. Análisis de Varianza para CR de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III.	126
Cuadro 40. Análisis de Varianza para fotosíntesis (Fn) - Suma de Cuadrados Tipo III.	128
Cuadro 41. Análisis de Varianza para transpiración (T) - Suma de Cuadrados Tipo III.	128
Cuadro 42. Análisis de Varianza para conductancia estomática (Ce) - Suma de Cuadrados Tipo III.	128
Cuadro 43. Análisis de Varianza para eficiencia en el uso del agua (EUA) - Suma de Cuadrados Tipo III.	128
Cuadro 44. Análisis de Varianza para CR de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III.	136
Cuadro 45. Análisis de Varianza para CR de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	138
Cuadro 46. Análisis de Varianza para MDA - Suma de Cuadrados Tipo III.	139
Cuadro 47. Análisis de Varianza para proteínas de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III.	141
Cuadro 48. Análisis de Varianza para proteínas de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	142
Cuadro 49. Análisis de Varianza para prolina de hoja - Suma de	144

Cuadrados Tipo III.	
Cuadro 50. Análisis de Varianza para prolina de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	145
Cuadro 51. Análisis de Varianza para clorofila A - Suma de Cuadrados Tipo III.	146
Cuadro 52. Análisis de Varianza para clorofila B - Suma de Cuadrados Tipo III.	146
Cuadro 53. Análisis de Varianza para clorofila total - Suma de Cuadrados Tipo III.	147
Cuadro 54. Análisis de Varianza para carotenoides - Suma de Cuadrados Tipo III.	147
Cuadro 55. Análisis de Varianza para actividad de enzimas peroxidadasas - Suma de Cuadrados Tipo III.	149
Cuadro 56. Análisis de Varianza para actividad de enzima catalasa - Suma de Cuadrados Tipo III.	150
Cuadro 57. Análisis de Varianza para germinación - Suma de Cuadrados Tipo III.	162
Cuadro 58. Análisis de Varianza para long. raíz - Suma de Cuadrados Tipo III.	162

Abreviaturas

AF	Área foliar
APS	Persulfato de amonio
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
CDS	Superóxido dismutasa
CHLP	Cinturón Hortícola de La Plata
CO ₂	Dióxido de carbono
CR	Conductividad relativa
DEPC	Diethylpirocarbonato
ETR1	Receptor de etileno
FM	<i>Funneliformis mosseae</i>
GL	Glicerol 3 fosfato acyltransferasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutation
GSH1	γ-glutamylcisteina sintetasa
GSH2	Glutation sintetasa
HFMA	Hongos formadores de micorrizas arbusculares
HMA	Hongos micorrícicos arbusculares
LC ₅₀	Dosis letal 50
MA	Micorrizas arbusculares
MDA	Malonildialdehído
MP	Metales pesados
MT	Metalotioneína
PC	Fitoquelatinas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POD	Peroxidasa
PS	Peso seco
RI	<i>Rhizophagus intraradices</i>
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa

RESUMEN

Una de las contaminaciones que más preocupan a los gobiernos y organizaciones vinculadas al monitoreo del ambiente es la relacionada con los metales pesados (MP). Entre estos elementos se encuentran el Cu, Fe, Mn, Ni y Zn, que en baja concentración son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Otros MP como el Cd, Pb, Hg y As no solo no son esenciales, sino que aún en bajas concentraciones son tóxicos para las plantas. Las plantas suelen formar asociaciones con microorganismos del suelo, con los que establecen relaciones simbióticas como es el caso de las micorrizas arbusculares. En esta asociación la planta aporta esqueletos carbonados para la nutrición del hongo, que contribuye aumentando la absorción de agua y nutrientes del suelo, además de una mayor tolerancia/resistencia frente a distintos estreses bióticos y abióticos. Aunque los metales pesados pueden ser absorbidos por las hifas del hongo y ser transportados a la planta, se han descrito casos en que las plantas micorrizadas muestran un aumento en la absorción y en el transporte raíz – tallo de MP (fitoextracción), mientras que en otros casos, el hongo contribuye a la inmovilización de los MP en el suelo (fitoestabilización). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue identificar interacciones biológicas tendientes a reducir el efecto de concentraciones tóxicas de cobre sobre la germinación y el crecimiento de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*).

Se evaluaron, distintas concentraciones de cobre sobre la germinación y el crecimiento de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con diferentes especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA): *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices*. Se realizaron mediciones morfológicas (peso seco, área foliar, altura, número de hojas, longitud de raíz), fisiológicas (fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática, conductividad relativa de membranas celulares), bioquímicas (contenido de clorofila, proteínas solubles, prolina, malondialdehído, actividad de enzimas antioxidantes). Además, se evaluó el porcentaje de micorrización y la viabilidad de las estructuras fúngicas, y el efecto de los HFMA en la partición del cobre en plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas.

La germinación no resultó afectada por las concentraciones de cobre utilizadas en este trabajo en cambio el crecimiento de las plántulas y especialmente el de la raíz fue más sensible. No obstante la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto del cobre, las plantas continuaron su crecimiento debido a que desarrollaron abundantes raíces laterales,

modificando la arquitectura de la raíz. Al analizar la expresión de proteínas se observaron modificaciones al expresarse proteínas en forma diferencial, con el aumento de la concentración del metal, que participarían en los mecanismos de toxicidad y tolerancia al cobre. Se confirmó que el pimienta es una especie micotrófica, ya que en ausencia o en bajas concentraciones del metal, presentó valores de micorrización de 50% y de 70% con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices* respectivamente, y también se observó que en presencia de 1000 μM de cobre la micorrización fue nula con ambos inóculos, lo que indica que esta concentración sería el límite de tolerancia para este proceso en las condiciones ensayadas. El crecimiento de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas mostró una disminución con el aumento de la concentración de cobre en el sustrato. Se observó que las plantas inoculadas pudieron soportar una concentración mayor de cobre que las no inoculadas y esta concentración varió según el parámetro analizado. En general, la inoculación aumentó el umbral de tolerancia al cobre. En cuanto a los parámetros fisiológicos también se observó que fueron afectados por las concentraciones elevadas del metal. Las plantas inoculadas presentaron valores mayores de fotosíntesis, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua que las no inoculadas. La presencia de cobre disminuyó la micorrización y la viabilidad de las estructuras fúngicas y se observó que los hongos *F. mosseae* y *R. intraradices* tuvieron un mejor comportamiento que los hongos nativos, favoreciendo la respuesta de las plantas de pimienta. La evaluación de la partición de cobre en las plantas de pimienta, mostró que a bajas concentraciones, el cobre se acumuló principalmente en la raíz, al aumentar la concentración del metal se modificó la respuesta de las plantas micorrizadas respecto de las no micorrizadas, en las primeras se observó mayor acumulación no sólo en la raíz sino también en el resto de las fracciones analizadas, lo que indicó mayor traslocación debido a la inoculación.

En base a lo expuesto, se ha podido demostrar el efecto perjudicial del cobre, en plantas de pimienta crecidas en condiciones controladas, desde la germinación hasta la formación del fruto, mediante el estudio de los procesos morfológicos y fisiológicos involucrados. También fue posible concluir que los hongos micorrízicos arbusculares, son afectados por la presencia de cobre en el suelo y que mediante la simbiosis que establecen con la planta, tienen una participación activa en el aumento de la tolerancia de las plantas al estrés por cobre.

CAPITULO I:

Introducción

Introducción

Suelo: su importancia en el medio ambiente.

El suelo es una colección de cuerpos naturales tridimensionales que se encuentran en la superficie de la corteza terrestre, con la capacidad de mantener seres vivos y expresar propiedades como resultado del efecto integrado del clima y la vegetación, actuando sobre un material parental, regulado por la topografía, durante largos períodos de tiempo (Reyes Jaramillo, 2014).

En el ámbito de las ciencias naturales, y de un modo genérico, el suelo es la “capa superior y/o exterior de la corteza terrestre, la cual es el resultado de los efectos combinados del clima, organismos vivos, roca madre, relieve y tiempo.” El medio edáfico puede considerarse un sistema abierto y dinámico, tanto en el tiempo como en el espacio, a través del cual se producen y regulan diferentes flujos de materias y energías. La combinación de sus propiedades físicas, químicas y biológicas permite el desarrollo de sus funciones básicas (Blum 1990).

De estas definiciones se desprende que el suelo es el resultado de la interacción de la atmósfera, hidrósfera y biósfera, constituyendo la parte más dinámica de la superficie de la Tierra. La meteorización química y mecánica de las rocas junto con los procesos microbiológicos que allí se desarrollan producen el suelo (Loaiza, 2010), que después de un largo período de tiempo de meteorización, puede alcanzar su equilibrio (Galán Huertos & Romero Baena, 2008). La modificación de cualquiera de las variables de este sistema puede conducir a la pérdida de este equilibrio y el hombre a través del uso poco sustentable es uno de los responsables. Dentro de las principales causas que provocan este desequilibrio se encuentran el sobrepastoreo, la fertilización, la deforestación y el cambio de uso del suelo, debido principalmente a actividades agropecuarias (Lal, 2001).

Esta modificación negativa del suelo se denomina normalmente degradación, la presencia en los suelos de concentraciones nocivas de algunos elementos y compuestos químicos, como hidrocarburos policíclicos aromáticos y metales pesados, es un tipo especial de degradación que se denomina contaminación, y puede ser natural o debida a actividades antropogénicas (Galán Huertos & Romero Baena, 2008). Causas naturales pueden ser la actividad volcánica, los procesos de formación de los suelos, la erosión de las rocas, los terremotos, tsunamis, entre otros, que pueden conducir al aumento de estas sustancias en los suelos. Algunos ejemplos de causas antropogénicas son

la minería, la combustión de combustibles fósiles, los vertidos, emisiones y/o residuos industriales (incineración, depósito), los pesticidas, fertilizantes, etc. (Navarro Aviñó et al., 2007).

El vertido de residuos urbanos e industriales y el uso abusivo de fertilizantes y agroquímicos son tamponados por la función amortiguadora (de regulación) del suelo. Sin embargo, dicha capacidad no es ilimitada, sino que depende de las propiedades físico-químicas de las sustancias introducidas y almacenadas, de las propiedades y características edáficas y de las condiciones ambientales imperantes en el medio (Felipó & Garau, 1987; Ritchie & Sposito 1995, Ge et al., 2000).

Entre las sustancias que se acumulan en el suelo, y que se encuentran tanto en vertidos urbanos como industriales, los metales pesados merecen una mención especial debido a su persistencia y toxicidad, y constituyen una de las contaminaciones que más preocupan a los gobiernos y organizaciones vinculadas al monitoreo del ambiente (Zacchini et al., 2009; Yadav, 2010). Se considera metales pesados (MP) a un grupo de 53 elementos con peso específico mayor de 5 g/cm³ (Holleman & Wiberg, 1985). Entre estos elementos se encuentran el Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn, que en baja concentración son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos elementos actúan como cofactores de enzimas de gran importancia biológica, participan de funciones catalíticas en reacciones redox (Cu, Fe, Mo), en reacciones ácido-base (Zn y Mn), transferencia de electrones (Fe II y Fe III; Cu I y Cu II; Mo IV, Mo V y Mo VI) y en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Zenk, 1996; Barán, 1994). Otros MP como el Cd, Pb, Hg y As no solo no son esenciales, sino que aún en bajas concentraciones son tóxicos para las plantas (Mertz, 1981). Se debe enfatizar que el funcionamiento de los organismos vivos requiere un equilibrio entre los diferentes elementos esenciales para realizar sus funciones vitales. Esto significa que aun un elemento esencial puede transformarse en tóxico, cuando se superan ciertos límites de concentración (Barán, 1994).

Si bien la contaminación con MP se asocia principalmente a la actividad industrial, la actividad agropecuaria a través del uso de fertilizantes y plaguicidas, introduce en el ambiente cantidades importantes de MP como Zn, Mn, Cu y Pb. Los suelos agrícolas en muchas partes del mundo están ligera a moderadamente contaminados por metales pesados como Cd, Cu, Zn, Ni, Co, Cr, Pb y As (Singh & Agrawal, 2007). Esto se debe al uso continuado de fertilizantes, fungicidas, lodos de aguas residuales, residuos industriales y prácticas de riego inapropiadas (Tabla 1) (Bell et al., 2001; Schwartz et al., 2001; Passariello et al., 2002).

Tabla 1. Contenido en metales pesados (mg/kg) en fertilizantes, fitosanitarios, lodos de depuradora y enmiendas orgánicas (Colomer & Sánchez, 2001; Kabata-Pendias, 2011).

Metal pesado	Fertilizantes fosfatados	Fitosanitarios	Lodos de depuradoras	Enmiendas orgánicas
Cd	0.1	1.38 - 1.94	2 - 1500	0.25
Pb	9.1	60	33 - 3000	2
Cu	109	12-50	50 - 3300	113
Zn	54	1.3 - 25	550 - 4900	680
Ni	11	0.8 - 14	16 - 5300	6.1
Co	5	0.2 - 1.9	2 - 260	1.1
Cr	12	13	20 - 40600	11

Diferentes autores han establecido aumentos de los metales pesados en suelos agrícolas debido a la utilización de estos productos. Así pues, por ejemplo, Giuffréde López Carnelo et al. (1997) y Nicholson et al. (2003) determinaron elevados contenidos de metales pesados en suelos agrícolas derivados del uso de fertilizantes fosfatados en Argentina e Inglaterra y Gales, respectivamente.

Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP)

El Cinturón Hortícola de La Plata está localizado en la periferia de la ciudad de La Plata, constituye el área productiva más importante del Cinturón Verde Bonaerense con el 46,15% de la superficie total y el 25,15% de la superficie hortícola total de la Provincia de Buenos Aires. El 100% de la producción hortícola en el Partido de la Plata tiene como destino el consumo en fresco, abasteciendo al área metropolitana comprendida por más de 13 millones de habitantes (INDEC, 2010).

La lechuga es el cultivo que ocupa la mayor superficie cultivada, seguido por el tomate, el pimiento o ají morrón, alcaucil, acelga y espinaca. La variedad de hortalizas cultivadas en este Partido es muy amplia, superando las 30 especies diferentes, incluyendo entre éstas: apio, berenjena, choclo, chaucha, remolacha, zapallito, zapallo, sandía, cebolla, brócoli, hinojo, alcaucil y otras verduras de hoja (Garat et al., 2009).

La región presenta condiciones edafoclimáticas adecuadas para la producción de hortalizas, una precipitación media anual de 1009,2 mm en un régimen considerado "isohigro", una temperatura media anual de aproximadamente 15,8° C con una estación más fría de 9,8° C y una más cálida

de 21,8° C (García, 2012). En el CHLP casi 5.000 hectáreas son destinadas a la producción de hortalizas, el 40% o 2.000 hectáreas corresponden a cultivos en ambientes protegidos (invernaderos) y el resto está ocupado por cultivos a campo. En general, las unidades de producción tienen una superficie media de 5,1 ha y se llaman "Quintas" (Stavisky, 2010; García, 2012).

La horticultura, en las últimas décadas, ha modificado radicalmente los sistemas de producción a raíz de la incorporación de invernaderos para cultivo bajo cubierta, lo que fue acompañado por el riego por goteo, el uso de cultivares mejorados e híbridos, fertilizantes y agroquímicos, siendo estos últimos los principales responsables de los problemas socio-ambientales de la horticultura bonaerense, tal como lo muestra la presencia de residuos químicos en los productos cosechados y la contaminación de los suelos y las aguas subterráneas (Bocer, 2002; Souza Casadinho & Bocero, 2008).

Efectos tóxicos de los metales pesados.

La absorción de iones de metales pesados por las raíces de las plantas representa una potencial amenaza para la salud humana. La acumulación de metales pesados en las plantas que se cultivan para el consumo de la población es la principal vía de entrada de los metales pesados en la cadena alimentaria humana (McLaughlin et al., 1999). Puschenreiter et al. (1999) después de considerar las diversas vías disponibles para reducir la transferencia de MP a la cadena alimentaria, concluyen que los suelos urbanos con bajos niveles de contaminación de MP pueden ser usados sin riesgos para la horticultura y la agricultura, si se toman las debidas precauciones. Sin embargo, Birley y Lock (1998) argumentaron que se sabe muy poco sobre el efecto que tiene en la salud la ingesta de pequeñas cantidades de MP durante largos períodos de tiempo, por lo que es necesario investigar más en el tema.

La toxicidad de los MP depende de la concentración, el estado de oxidación y la persistencia en el suelo (Barán, 1994). Un elemento que en concentraciones muy bajas es indispensable para un ser vivo, en altas concentraciones puede resultar tóxico. Sin embargo, la concentración de un elemento en el suelo está directamente relacionada con la persistencia del mismo, definiéndose a la misma como el tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica (Barán, 1994). Una de las características más relevantes de los MP es su tendencia a bioacumularse, lo que los transforma en peligrosos debido a su efecto sobre los organismos (Navarro Aviñó et al., 2007). Sobre la base de lo dicho es evidente que los MP, pueden resultar inocuos, subletales (no matan al individuo pero producen daños a nivel

genético o fisiológico) o letales. La causa primaria del elevado nivel de toxicidad química es que los MP tienen afinidad con moléculas orgánicas a las que se unen estrechamente, a través de grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo (Clemens, 2001). A través de estas uniones ligando-metal alteran las funciones biológicas, sobre todo cuando los ligandos cumplen funciones biológicas esenciales. Entre los principales daños que pueden causar los MP se pueden mencionar:

- 1) Inhibición de la actividad de las proteínas por alteración de la estructura de las mismas,
- 2) Desplazamiento de elementos esenciales para el metabolismo generando deficiencias,
- 3) Acción catalítica sobre los sistemas enzimáticos que generan moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) e inducen el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo provoca:

- Inactivación de proteínas y enzimas, fundamentalmente por la oxidación de los grupos sulfidrilo, y la formación de puentes disulfuro que provocan cambios conformacionales en las proteínas (Yadav, 2010).
- Peroxidación de lípidos de membranas, conduciendo esto a la ruptura y con ello a la aparición de subproductos de las cadenas hidrocarbonadas. El malondialdehído (MDA), uno de los productos de la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares es utilizado habitualmente como indicador de estrés oxidativo (Demiral & Türkan, 2005).
- Oxidación de las cadenas de ADN, que pueden resultar en alteraciones como mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos y transformaciones celulares (Yadav, 2010).

Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos para morigerar los efectos adversos de los metales pesados, usando diferentes estrategias. Algunas especies vegetales adoptan estrategias de exclusión para evitar la absorción excesiva y el posterior transporte de los iones metálicos. Estas plantas usualmente acumulan concentraciones relativamente bajas de metales en sus tejidos aunque crezcan en suelos altamente contaminados (Wei et al., 2008). Las raíces de algunas especies secretan compuestos orgánicos que pueden ligar los metales pesados y reducir la absorción de las células radicales (Hall, 2002). Otras plantas pueden retener los metales en las paredes celulares (Neumann et

al., 1995; Lou et al., 2004; Konno et al., 2005), reduciendo así su traslocación a la parte aérea. Por el contrario, algunas raíces pueden absorber cantidades elevadas de metales y transportarlos a los tallos, los iones metálicos son detoxificados por compartimentalización vacuolar o acomplejados con ligandos orgánicos, como ácidos orgánicos, aminoácidos y péptidos, los cuales pueden reducir la toxicidad (Clemens 2001; Hall, 2002). Existe abundante bibliografía que describe la producción de tioles de bajo peso molecular, ante situaciones de estrés por MP, que muestran gran afinidad por estos metales tóxicos (Bricker et al., 2001; Freeman et al., 2004; Yadav, 2010). Los más importantes tioles son glutatión (GSH) y cisteína, la síntesis de GSH es catalizada por dos enzimas dependientes de ATP, γ -glutamylcisteina sintetasa (GSH1) y glutatión sintetasa (GSH2). La glutatión reductasa (GR) tiene un rol central en el mantenimiento del pool de glutatión reducido durante el estrés (Pastori et al., 2000). El aumento en la actividad de la GR y de su expresión génica no se requiere únicamente para la eliminación de las moléculas ROS, sino que también está implicado en el mantenimiento de altas concentraciones de GSH para el ajuste en las reacciones redox celulares (Pastori et al., 2000).

El GSH es un sustrato para la síntesis de fitoquelatinas (PC) que son fundamentales para la detoxificación de MP, especialmente cadmio y níquel (Freeman et al., 2004). Las fitoquelatinas son moléculas pequeñas ricas en cisteína, que están presentes no solamente en plantas sino también en hongos y otros organismos (Grill et al., 1985; Gekeler et al., 1988; Piechalak et al., 2002). Forman complejos con los iones metálicos tóxicos y así los transportan a las vacuolas, protegiendo de esta forma a las plantas de los efectos deletéreos de los metales pesados (Salt & Rauser, 1995). Las metalotioneinas (MT) son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína que estarían involucradas en la homeostasis y tolerancia al cobre (Van Hoof et al., 2001; Roosens et al., 2004; Jack et al., 2007). El análisis de la expresión de genes activados en presencia de MP, como los que codifican la glutatión reductasa, metalotioneinas o fitoquelatinas, permiten explicar la función de estos compuestos en la tolerancia de las plantas a MP; la actividad diferencial de las enzimas involucradas en el estrés por metales pesados pueden ser claves para generar resistencia o tolerancia en las plantas (Yannarelli et al., 2007).

Importancia del cobre en las plantas.

El cobre es absorbido como catión divalente (Cu^{2+}) en suelos aireados o como ion cuproso (Cu^+) en suelos pobres en oxígeno o inundados. La forma divalente forma quelatos fácilmente con varios componentes del suelo y lo

mismo sucede en soluciones nutritivas, lo que se debe controlar para evitar toxicidad (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

El cobre es considerado un micronutriente esencial para las plantas y juega un rol importante en la asimilación de CO₂ y la síntesis de ATP. Es un componente esencial de varias proteínas como la plastocianina que interviene en el sistema fotosintético y enzimas como la citocromo oxidasa involucrada en la cadena transportadora de electrones en las crestas mitocondriales, en la respiración (Yadav, 2010). El cobre está asociado con enzimas involucradas en reacciones redox (Cu⁺¹ / Cu⁺²), como es el caso de la plastocianina, una proteína cloroplástica involucrada en el transporte electrónico de la fotosíntesis entre el fotosistema II y el fotosistema I. Por otra parte, es el componente del complejo enzimático fenolasa, que oxida fenoles y se relaciona con la biosíntesis de lignina, ya que forma algunos de sus precursores (Azcón-Bieto & Talón, 2000). El receptor de etileno ETR1, una proteína transmembranal, requiere la unión de cobre para su funcionamiento (Rodríguez et al., 1999). Junto con el zinc es un cofactor de dos de las siete superóxido dismutasas (CDS1, CDS2) descritas en *Arabidopsis*; mientras que CDS1 es activa en el citosol, CDS2 lo es en el estroma del cloroplasto (Bowler et al., 1992).

Rara vez las plantas presentan deficiencias de cobre, principalmente debido a que éste se encuentra disponible en baja concentración en la mayoría de los suelos. En consecuencia, sólo a través de experimentos con soluciones nutritivas y en condiciones controladas, podemos conocer los resultados de la deficiencia (Azcón-Bieto & Talón, 2000). El síntoma inicial de una deficiencia de cobre es la producción de hojas de color verde oscuro, las cuales pueden presentar manchas necróticas. Estas manchas aparecen primero en la punta de las hojas jóvenes y luego se extienden hacia la base y los márgenes. Las hojas pueden enroscarse o presentar malformaciones y en caso de deficiencias extremas pueden abscisionar prematuramente (Taiz & Zeiger, 2006).

Por el contrario, el exceso de cobre puede producir efectos tóxicos sobre las plantas, inhibir el crecimiento de la parte aérea y de la raíz, causar clorosis de hojas e incrementar la liberación de electrolitos de las células por daño a las membranas celulares (De Vos et al., 1989; Lidon & Henriques, 1992; Murphy & Taiz 1997; Shen et al., 1998; Murphy et al., 1999).

La sensibilidad de las plantas a los metales no depende solamente de la concentración del elemento, sino también del estado de desarrollo de la planta al ser expuesta al mismo (Liu et al., 2005). La germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas son procesos fisiológicos complejos, altamente sensibles a la contaminación por metales pesados que están regulados por la

interacción de varias hormonas y factores ambientales (Iglesias & Babiano, 1996). Se han identificado cerca de 25 proteínas expresadas diferencialmente en respuesta al estrés por exceso de cobre en el medio, durante la germinación. La mayoría de estas proteínas están involucradas en sistemas antioxidantes o de regulación del estrés y podrían participar juntas para establecer una nueva homeostasis en respuesta al cobre y a otros metales pesados (Ahsam et al., 2007).

El crecimiento de las plántulas también es afectado por concentraciones elevadas de cobre, el crecimiento de la raíz es más afectado que el de la parte aérea e incluso puede inhibirse (Chen et al., 2000). Esto no significa necesariamente que la raíz sea más sensible a las altas concentraciones de cobre sino que es el sitio preferencial de acumulación. En ambientes contaminados, las raíces son la zona primaria de contacto con los contaminantes del suelo. La capacidad de la raíz para acumular iones Cu en lugar de traslocarlo a la parte aérea se observó en condiciones de baja y alta concentración del elemento (Kabata-Pendias, 2001; Fuentes et al., 2007).

El efecto de la toxicidad del cobre es en gran parte sobre el crecimiento y la morfología de la raíz, porque tiende a acumularse en la raíz con baja traslocación a la parte aérea (Marschner, 1995). El crecimiento de la raíz primaria se inhibe gradualmente conforme se aumenta la concentración del metal. Según Martínez Trujillo et al. (2009) en *Arabidopsis*, a pesar de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto del cobre, las plantas continúan su crecimiento debido a que desarrollan abundantes raíces laterales, modificando la arquitectura de la raíz. Esta estrategia posiblemente le permite a la planta aumentar la superficie del sistema radical y sobrellevar la presencia de los metales. En *Arabidopsis* se correlacionó la inhibición del crecimiento de la raíz primaria con la disminución de la actividad mitótica, esto implica que las células se empiezan a expandir en una zona más cercana al ápice y pierden su capacidad mitótica (Martínez Trujillo et al., 2009).

El cobre, si bien es un elemento esencial puede ser tóxico para el hombre.

El cobre es un elemento esencial para el hombre, el organismo humano contiene aproximadamente 70 a 80 mg de cobre (Gibson, 2005), aunque este contenido depende del género y la edad (Lockitch et al., 1988; Kouremenou-Dona et al., 2006). Con la edad se observaron diferencias significativas en la concentración de ceruloplasmina, principal enzima transportadora de cobre en la sangre (Ghayour-Mobarhan et al., 2005). Según algunos autores, las diferencias demográficas en el contenido de cobre son debidas a variaciones en

el contenido del metal en el suelo y /o en los hábitos alimentarios de la población (Angelova et al., 2011). El cobre interviene en el desarrollo de los huesos y del tejido elástico, en el funcionamiento del sistema nervioso central y en la síntesis de hemoglobina. Dada la gran distribución de este elemento, es prácticamente imposible disponer de dietas con contenidos menores a esta cantidad. Entre los alimentos más ricos en cobre se encuentran las ostras, hígado, setas, nueces y chocolate (OMS, 1986). El agua potable contiene generalmente 0,1 mg/L, considerando esta concentración como típica, podría contribuir con el 6 al 10% de las necesidades diarias de cobre.

En general, la mayor concentración de cobre se encuentra en el hígado, el cerebro, pulmón, riñón y ovarios. El hígado es el centro del metabolismo del cobre, así como lo es también de otros elementos. Allí se genera la ceruloplasmina, la cupoproteína que abunda en el plasma. Un efecto específico de la deficiencia de cobre son las anomalías óseas, causadas por deficiencias en la biomineralización las que responden satisfactoriamente a la suplementación de cobre. Por otro lado el exceso o acumulación de cobre en el organismo produce una enfermedad denominada “enfermedad de Wilson”, un trastorno hereditario que provoca la acumulación del metal en los tejidos y en consecuencia daño y muerte tisular, lo cual hace que los órganos afectados funcionen en forma defectuosa. Actualmente esta enfermedad es tratada por quelatoterapia (Barán, 1994).

El Comité Mixto FAO/OMS establece la cantidad de 0,5 mg/Kg como ingestión máxima diaria admisible, de aquí se desprende la importancia de evitar la ingesta de alimentos contaminados con este metal y lograr una dieta equilibrada.

Importancia de las micorrizas arbusculares.

La actividad microbiana del suelo influye sobre las características físicas, químicas y biológicas, las cuales determinan la fertilidad de los agroecosistemas (Guerra Sierra, 2008). Los microorganismos benéficos entre los que se destacan los hongos formadores de micorrizas, los microorganismos fijadores de nitrógeno y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) ejercen un papel fundamental sobre el crecimiento vegetal y la calidad del suelo (Azcón, 2000).

Las micorrizas arbusculares constituyen una asociación simbiótica entre las raíces de la mayoría de las plantas terrestres y hongos del Phylum Glomeromycota (Smith & Read, 1997). La importancia ecológica de las

micorrizas arbusculares está avalada por su presencia en más del 95% de las especies vegetales. Entre las plantas que forman este tipo de asociaciones se encuentran la mayoría de las leguminosas herbáceas y muchas leñosas, los cereales, los frutales y la gran mayoría de los cultivos hortícolas (Quilambo, 2003, Ruscitti et al., 2011; Beltrano et al., 2013a; Beltrano et al., 2013b). En esta asociación la planta aporta esqueletos carbonados para la nutrición del hongo, y el hongo contribuye aumentando la absorción de agua y nutrientes del suelo (Gange et al., 1999), jugando un papel clave en el reciclaje de nutrientes en el ecosistema (Smith & Read, 1997). Si bien se han demostrado efectos positivos en la absorción de nutrientes, el elemento más estudiado es el fósforo, para el cual las micorrizas disponen de sistemas específicos (Yao et al., 2003). Esta simbiosis ha sido muy exitosa a lo largo de la evolución para la supervivencia de las plantas terrestres, y a pesar que se conoce desde hace más de un siglo, solo durante las últimas décadas el hombre ha comenzado a utilizarla como bioinsumo en las producciones forestales, hortícolas y frutícolas, donde existen evidencias de su impacto sobre el desarrollo competitivo y sostenible de los sistemas de producción (Ryan & Graham, 2002).

La colonización micorrícica se inicia cuando germina una espora y la hifa germinativa alcanza la superficie de la raíz para formar una estructura llamada apresorio, producto de la ramificación y engrosamiento de la pared celular de la hifa. Durante la invasión, el hongo penetra las células de la corteza radical y forma estructuras llamadas arbuscúlos que interactúan con el citoplasma de las células del hospedante (Smith & Read, 1997). Estas estructuras fúngicas, dicotómicamente ramificadas, incrementan la superficie de contacto entre la planta y el hongo y son las encargadas del intercambio bidireccional de nutrientes y carbono entre el hongo y la planta (figura 1). Aunque localizado físicamente dentro de la célula cortical, el arbuscúlo permanece separado del citoplasma de la planta por una extensión de membrana plasmática llamada membrana periarbuscular. Esta envoltura del arbuscúlo también resulta en la formación de un nuevo espacio apoplástico entre la membrana periarbuscular y el arbuscúlo llamado espacio periarbuscular (Harrison et al., 2002).

La localización espacial y temporal de los arbuscúlos se produce en respuesta a la estructura o morfología de la raíz y a los procesos fisiológicos comunes de las plantas (Bonfante-Fasolo, 1984). Recientemente, se encontró en cinco especies diferentes de plantas hospedantes que *Glomus intraradices* sólo forma arbuscúlos en las células corticales que están inmediatamente adyacentes a la endodermis. La senescencia de la corteza y la formación de una exodermis con suberina pueden limitar la colonización en raíces maduras. La maduración de la estructura radical y la pérdida de continuidad del tejido joven podrían

explicar que los arbuscúlos solo tengan una existencia de aproximadamente 14 días (Blee & Anderson, 1998).

Algunos hongos micorrícicos también producen vesículas, estructuras que tienen como función el almacenamiento de sustancias especialmente lípidos (figura 1). Se forman en los extremos de las hifas inter o intracelularmente a medida que progresa la infección (Becard & Pfeffer, 1993). Algunas vesículas pueden transformarse en esporas para asegurar la propagación del hongo (Nasim, 2010).

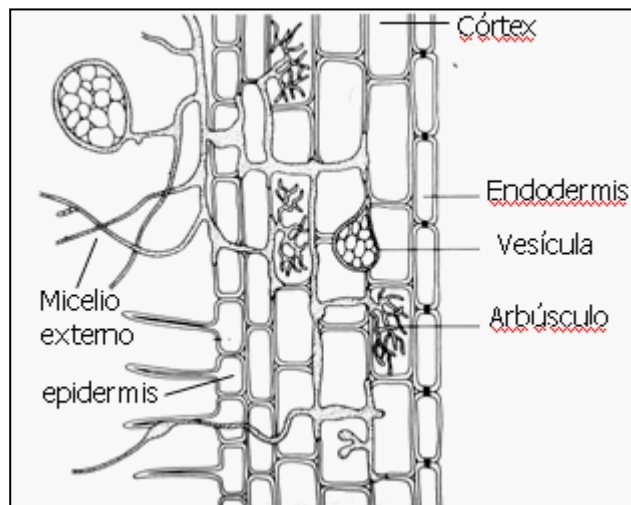
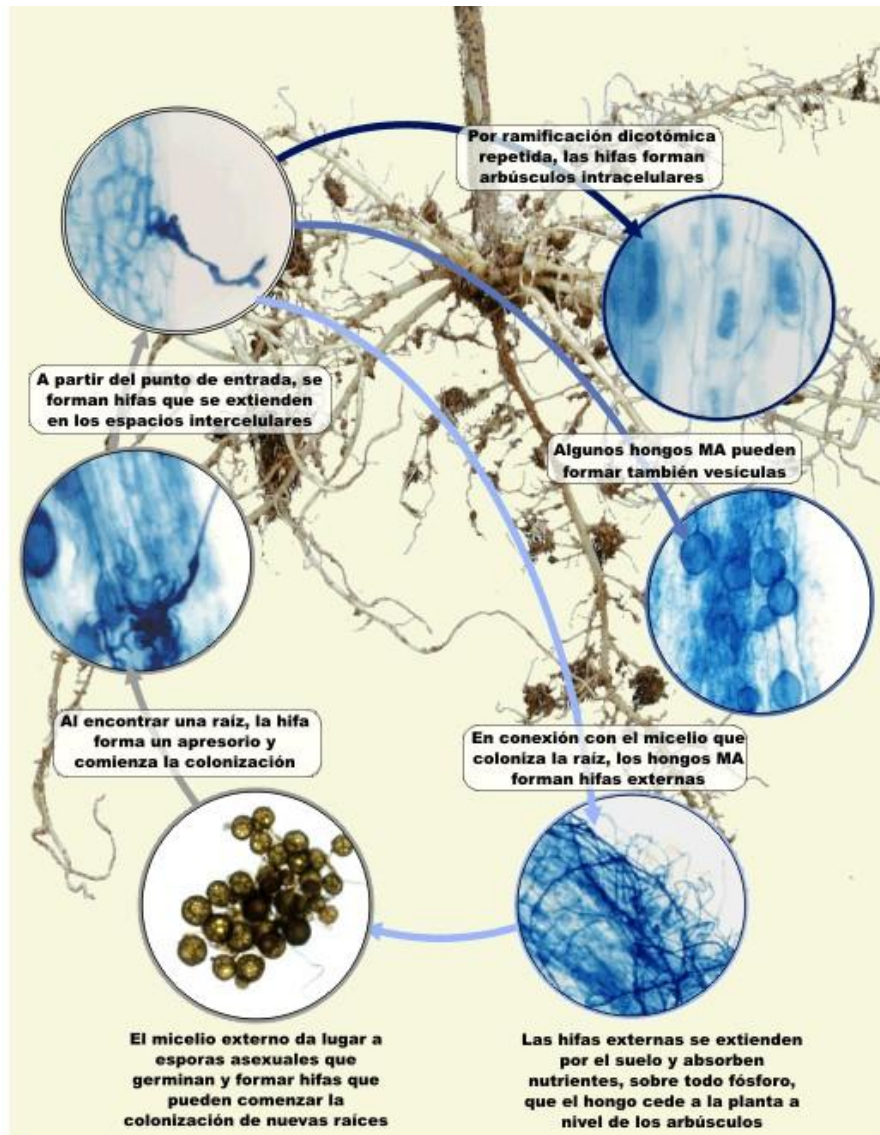


Figura 1. Micorrizas arbusculares en un corte longitudinal de raíz.

Los hongos micorrícicos arbusculares también interactúan directamente con el suelo produciendo hifas extraradicales que pueden extenderse varios centímetros en el suelo (Rhodes & Gerdemann, 1975). Las hifas extraradicales pueden tener una superficie total de varios órdenes de magnitud mayor que las raíces, lo cual incrementa la capacidad de absorción de agua y nutrientes (especialmente P y otros nutrientes de baja movilidad en el suelo) (Augé, 2001). Las hifas extraradicales juegan un rol importante en la estabilización del suelo a través de la formación de agregados. A través del micelio intrarradical el hongo recibe los esqueletos carbonados de la planta hospedadora, aportándole a ésta nutrientes inorgánicos (figura 2). Este micelio se desarrolla en un ambiente que es controlado por la homeostasis de la planta. El micelio extrarradical que se desarrolla en el suelo, cumple con la función de absorber agua y nutrientes inorgánicos y está expuesto a las variaciones en las condiciones ambientales del suelo tales como pH, disponibilidad de nutrientes, humedad, etc. (Marschner & Dell, 1994).



Sainz, M.J. (Universidad Santiago de Compostela, Dpto. Producción Vegetal)
Estación Fitopatológica do Areeiro. Servicio Agrario. Diputación Provincial de Pontevedra

Figura 2. Ciclo de las micorrizas arbusculares en la planta y en el suelo.

Entre otras ventajas de esta asociación en los sistemas suelo-planta se ha estudiado la inducción de una mayor tolerancia/resistencia frente a distintos estreses bióticos y abióticos (Snijders, 1994; Dassi et al., 1998; Ruscitti et al., 2011; Beltrano et al., 2013b). En general, las plantas micorrizadas son menos sensibles a las situaciones de estrés que las no micorrizadas (Beltrano et al., 2003), la micorrización disminuyó significativamente el efecto detrimental de la salinidad (Ruscitti et al., 2007). Las micorrizas pueden conferir tolerancia a patógenos del suelo, ya sea por competencia por los sitios de colonización (Linderman, 1992) o por activar mecanismos de defensa en la planta huésped

(Cordier et al., 1996). También se ha investigado el incremento de la tolerancia de las plantas al estrés hídrico, salino, por deficiencia de nutrientes, exceso de metales pesados y sustancias fitotóxicas (Barea et al., 2005; Beltrano & Ronco, 2008; Kohler et al., 2008; Kaya et al., 2009; Manoharan et al., 2010; Ruscitti et al., 2011; Beltrano et al., 2013b). Se ha descrito además que las micorrizas confieren tolerancia a pesticidas (Ocampo, 1993), herbicidas (Ocampo & Barea., 1982; Beltrano et al., 2013a), o residuos de la industria petrolera (Cabello, 1997).

La simbiosis con hongos micorrícicos puede afectar la estructura y las características químicas y biológicas de los suelos (Tisdall, 1991; Miller & Jastrow, 1999). Otros autores sugieren que la modificación que los hongos micorrícicos generan al suelo es más importante que la modificación directa que hacen sobre las plantas, en términos de los mecanismos involucrados en ecosistemas naturales o agrícolas (Bethlenfalvay & Linderman, 1992). En particular, como la estructura del suelo afecta sus propiedades de retención de humedad parece probable que la simbiosis con micorrizas pueda influir en estas propiedades y en consecuencia sobre las relaciones hídricas de las plantas creciendo en estos suelos (Augé et al., 2001; Bearden, 2001).

Los hongos micorrícicos en la contaminación por metales pesados.

La fitorremediación se puede definir como el uso de plantas y microorganismos asociados para eliminar los contaminantes del medio ambiente (Alvarado et al., 2011). Esta técnica se aplica para la eliminación de contaminantes inorgánicos y orgánicos, y en sustratos tanto sólidos como líquidos. Las principales ventajas de esta técnica son: se realiza in situ, utilizando la planta como bomba extractora o estabilizadora, es decir que es de bajo costo y además no depende energéticamente de la planta; es una tecnología que se puede utilizar en grandes extensiones; y además cuenta con una gran aceptación social (Kabata-Pendias, 2011). Sin embargo, esta técnica tiene también ciertas limitaciones, la remediación queda limitada a la profundidad de penetración de las raíces y está condicionada por las condiciones climáticas y por las propiedades del suelo.

De acuerdo con Favas et al. (2014), se pueden distinguir diferentes estrategias de fitorremediación (figura 3):

- Fitoestabilización: los contaminantes son retenidos por procesos de adsorción a nivel radicular (alrededor de las raíces), de manera que se reduce su biodisponibilidad.

- Fitoextracción: las plantas absorben el contaminante o metal y lo acumulan en sus tejidos. La acumulación suele producirse en las raíces o partes aéreas de las plantas.
- Fitoestimulación: los exudados radiculares se utilizan para promover el desarrollo de microorganismos degradadores.
- Fitodegradación: las plantas captan, almacenan y degradan los contaminantes a formas menos tóxicas o no tóxicas. Esta estrategia sólo se aplica con compuestos orgánicos.
- Fitovolatilización: las plantas captan los metales pesados y contaminantes y los modifican a formas inocuas o compuestos volátiles, los cuales son posteriormente liberados a la atmósfera a través de la transpiración.
- Rizofiltración: los contaminantes son absorbidos o adsorbidos por las raíces de las plantas, donde se acumulan.

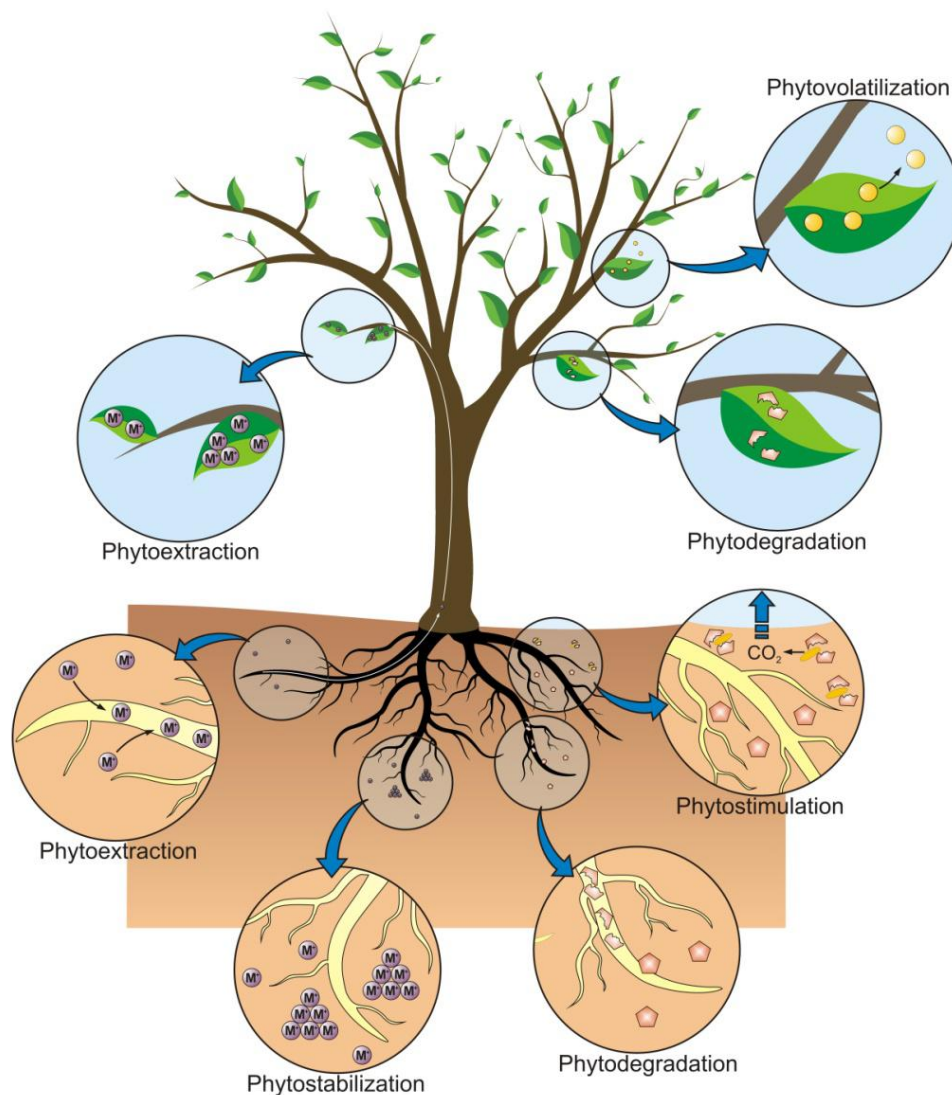


Figura 3. Modelo conceptual de los principales tipos de fitorremediación (Favas et al., 2014)

Gaur & Adholeya (2004) y Khan (2005), resaltaron el rol de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en la remediación de los suelos. Aunque los metales pesados pueden ser absorbidos por las hifas del hongo y ser transportados a la planta, se han descrito casos en que las plantas micorrizadas muestran un aumento en la absorción y en el transporte raíz - tallo de MP (fitoextracción), mientras que en otros casos, el hongo contribuye a la inmovilización de los MP en el suelo (fitoestabilización). El resultado de la colonización micorrícica sobre la detoxificación de los suelos contaminados depende de la combinación planta - hongo - MP y está influenciado por las condiciones del suelo (Orlowska et al., 2005).

El uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares en la fitorremediación de los suelos demanda una comprensión previa de cómo el hongo y/o la simbiosis responde en los suelos contaminados. Las esporas y las hifas presimbióticas del hongo, que se desarrollan antes de producirse la simbiosis, son sensibles a los MP (Ruscitti et al., 2011). Los valores de EC₅₀ (concentración efectiva que reduce al 50% la germinación de las esporas o el crecimiento de las hifas) son distintos para cada especie y para cada metal, sin embargo sólo se observan síntomas en altas concentraciones de MP (Shalaby, 2003). La germinación de esporas y el crecimiento de hifas son inhibidos por los MP, excepto cuando las esporas provienen de suelos contaminados, debido a que han desarrollado cierta resistencia (Del Val et al., 1999). Esta resistencia resulta de la plasticidad fenotípica y se pierde cuando una generación se desarrolla en ausencia de MP (Shalaby, 2003). Según Gaur & Adholeya (2004), una cepa de *Glomus clarodium*, que se desarrolló en un sitio regado con aguas servidas durante un largo período de tiempo toleró altos niveles de MP. Otros autores informan que las esporas de hongos tolerantes a MP, colonizaron las raíces de las plantas hospedantes a pesar que la cantidad de esporas producidas fue baja (Del Val et al., 1999; Jacquot-Plumey et al., 2001). El estudio de los efectos del Zn, Pb o Cd sobre la germinación de las esporas y el crecimiento de las hifas de los hongos; de dos especies de *Glomus*, mostraron que *G. intraradices* es más tolerante a estos metales que *G. etunicatum* (Pawlowska & Charvat, 2004). Por otro lado, la combinación de distintos MP llevan a interacciones sinérgicas o antagónicas, que incrementan o disminuyen la toxicidad del metal. Por ejemplo, el Zn se comporta como antagonista del Pb y/o del Cd, mientras que el Pb y el Cd actúan sinérgicamente (Shalaby, 2003).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares participan principalmente en los siguientes tipos de fitorremediación:

Fitoestabilización.

La fitoestabilización previene la difusión de los MP en el suelo, por la inmovilización que ejercen las raíces y los microorganismos. La inmovilización de los MP dentro de la rizófora es el resultado de la precipitación del elemento en el suelo, la adsorción a las micelas y/o la absorción y acumulación de los metales en las raíces de las plantas o por acción de los microorganismos. Las especies vegetales tolerantes a MP con extensos sistemas radicales previenen la difusión y además contribuyen a la fitoestabilización (Gaur & Adholeya, 2004).

Los HFMA también contribuyen a la inmovilización de los MP en el suelo, empleando estrategias similares a las de su hospedante, es decir, inmovilizan los MP excretando compuestos como la glomalina, los adsorben a las paredes celulares fúngicas o los ligan a quelantes dentro del hongo (Gaur & Adholeya, 2004). La glomalina es una glicoproteína producida y liberada por el hongo que inmoviliza los MP en el suelo (Gonzalez-Chavez et al., 2004). Al existir una correlación entre la cantidad de glomalina en el suelo y la cantidad de MP inmovilizados, las especies de hongos que excretan al suelo mas glomalina podrían ser las más apropiadas a los fines de la bioestabilización.

Por otro lado, la fijación de los MP a la quitina de la pared celular de los hongos reduce la concentración de los MP en el suelo. En especies de plantas altamente colonizadas por hongos formadores de micorrizas, se encontró que la inmovilización del Pb está correlacionada con un incremento en el número de vesículas. En forma similar a lo que ocurre en las vacuolas de las plantas, las vesículas podrían actuar como grandes depósitos de compuestos tóxicos colaborando así con los mecanismos de detoxificación (Alvarado et al., 2011).

Frecuentemente se ha observado un aumento en la tolerancia a MP de las plantas micorrizadas (Gaur & Adholeya, 2004, Ronco et al., 2007). Plantas de maíz, alfalfa y centeno micorrizadas con *Glomus* sp. completaron su ciclo de vida en suelos con alta concentración de MP, mientras que las plantas no micorrizadas no lo hicieron (Hildebrandt et al., 1999). Plantas de pimiento micorrizadas con *Glomus mosseae* o *Glomus intraradices* crecieron más, tuvieron más clorofila y proteínas en las hojas que las no micorrizadas, al aumentar en el suelo la concentración de Cr (Ruscitti et al., 2011).

Las hifas de los hongos tolerantes a MP tienen más afinidad a los metales que las células vegetales, debido a la distinta composición química de las paredes celulares (Joner et al., 2000), por eso es probable que los metales queden inmovilizados dentro del hongo. Rivera-Becerril et al. (2002) y Medina et al. (2005), encontraron que plantas de poroto y trébol micorrizadas inmovilizaron el Cd en las paredes celulares del hongo que micorrizaban el sistema radical.

Fitoextracción.

La fitoextracción es una tecnología reciente y representa la más eficiente y atractiva estrategia para “limpiar” suelos contaminados (Kramer, 2005), consiste en transferir los MP del suelo a las raíces o partes aéreas de las plantas con alta capacidad de almacenamiento. En general, estas plantas se caracterizan por la gran producción de biomasa, consecuentemente, la remoción de esas grandes cantidades de biomasa conlleva la remoción de MP con la cosecha, que se puede utilizar para producir energía o almacenarse como materia seca reduciendo así su volumen (Kramer, 2005; Peuke & Rennenberg, 2005).

Existen plantas hiperacumuladoras de MP, que almacenan 100 a 1000 veces más MP que una planta no hiperacumuladora y no presentan síntomas de toxicidad (Peuke & Rennenberg, 2005). Un ejemplo es *Pteris vittata* que aumenta la absorción y acumulación de As si previamente fue micorrizada con HFMA (Leung et al., 2006). En presencia de altas concentraciones de As (100 mg/Kg suelo), las plantas no micorrizadas acumularon 60,4 mg As/Kg, mientras que las plantas micorrizadas acumularon 88,1 mg As/Kg, lo que además fue acompañado por un aumento en la acumulación de biomasa. *Berkheya coddii* es conocida por su capacidad para extraer Ni del suelo (Salt et al., 1998). Se ha encontrado que su biomasa se duplica cuando la misma está colonizada por HFMA adaptados a esta situación.

Actualmente se hacen grandes esfuerzos para implementar estas nuevas tecnologías o combinarlas con las usadas actualmente, de modo de minimizar los costos y maximizar la remoción de MP. Pero aún las plantas que no son hiperacumuladoras, pero que son tolerantes a MP pueden utilizarse en la fitoextracción. Por ejemplo, plantas de tomate micorrizadas aumentaron 30% la biomasa de raíz y tallo respecto de los controles no micorrizados, cuando las concentraciones de As fueron superiores a 75 mg/Kg suelo (Liu et al., 2005).

Los MP ingresan a las células vegetales por medio de transportadores específicos e inespecíficos que se encuentran en la membrana plasmática. En la mayoría de los casos, el aumento en la absorción de MP por las plantas micorrizadas estuvo asociado a un aumento en la nutrición fosforada. Los HFMA poseen transportadores de P de alta afinidad, como las plantas absorben As como AsO_3^- a través de estos transportadores, es probable que los hongos contribuyan a remover el As de los suelos utilizando estos mecanismos (Ouziad et al., 2005).

El cobre y los hongos micorrícicos.

Elevada concentración de cobre y otros metales pesados en el suelo provocan efectos adversos sobre los microorganismos y los procesos microbiológicos (Wu et al., 2010). Entre los microorganismos del suelo, los hongos micorrícicos son los únicos que generan una relación directa entre el suelo y las raíces y por lo tanto pueden ser de gran importancia en la biodisponibilidad de los metales pesados y la toxicidad para las plantas (Leyval et al., 1997). La colonización con micorrizas puede incrementar la concentración de cobre en los tallos (Gildon & Tinker, 1983; Li et al., 1991), en raíces (Gnekow & Marschner, 1989; Kothari et al., 1991) o en ambos (Manjunath & Habte, 1988).

Según Liao et al. (2003) la capacidad de colonización de distintas especies de hongos micorrícicos es afectada por la presencia de cobre en el sustrato, pero no eliminada por completo; la producción de esporas varía en función de la especie, en *Glomus manihotis* no se modificó significativamente al aumentar la concentración de cobre en el medio hasta 3 mg/l; pero en *Acaulospora laevis* la esporulación fue muy sensible al metal, disminuyendo significativamente a 0,05 mg/l de cobre. De acuerdo con la importancia de las hifas externas en la absorción y transporte de Cu, en las plantas micorrizadas la concentración de cobre en los tallos y raíces es comúnmente mayor que en las plantas no micorrizadas (Marschner & Dell, 1994). La interacción entre los HFMA y la absorción de metales no está muy claro, a mayor concentración algunos estudios muestran mayor absorción en las plantas micorrizadas (Gildon & Tinker 1983; Killham & Firestone, 1983; Weissenhorn & Leyval, 1995), mientras que otros autores encontraron menor concentración en las plantas o en los tallos debido a la colonización micorrícica (Schüepp et al., 1987; El-Kherbawy et al., 1989; Leyval et al., 1991; Weissenhorn et al., 1995).

La influencia de los HFMA sobre la biodisponibilidad del cobre y otros metales podría no ser generalizada (Weissenhorn et al., 1995), sin embargo, la colonización podría incrementar la absorción en suelos contaminados, limpiando estos sitios al remover los metales a la superficie. Esto sugiere que los inoculantes micorrícicos que sean tolerantes a altas concentraciones de metales pueden ser considerados en la restauración de suelos contaminados, como es el caso de *Glomus caledonium* quien podría ser un hongo promisorio para la remediación de suelos contaminados con cobre (Liao et al., 2003).

A pesar de las propiedades fungicidas atribuidas al cobre, la colonización de las raíces por hongos formadores de micorrizas arbusculares no fue afectada significativamente por el agregado de bajas concentraciones de cobre al suelo (1,5 mM), lo que sugiere que las raíces proveen un adecuado ambiente que

protege al hongo del efecto tóxico del cobre (Malekzadeh et al., 2007). Mientras que, con altas concentraciones de cobre (7,5 mM), disminuyó o incluso se inhibió la colonización (Malekzadeh et al., 2007, Marques et al., 2007; Andrade et al., 2008). Sin embargo otros autores no encontraron una reducción significativa en la colonización por efecto de los metales e incluso en algunos casos se observó mayor colonización (Hildebrandt et al., 1999). Estas variaciones probablemente dependen del hongo micorrízico utilizado, de la planta involucrada y de las propiedades del suelo.

En base a todo lo expuesto, es claro que las plantas micorrizadas presentan mayor crecimiento y tolerancia a situaciones de estrés que las plantas no micorrizadas, el cobre como otros MP pueden ser traslocados en la planta y en caso de tratarse de plantas comestibles como el pimiento, es necesario estudiar cómo es el movimiento de los MP y dónde se acumulan finalmente en la planta, considerando que los HFMA podrían modificar la partición de los MP.

En el contexto desarrollado, el presente trabajo se llevó a cabo para validar las siguientes hipótesis:

Hipótesis:

- El exceso de cobre en los suelos afecta la germinación y el crecimiento de plantas de pimiento cultivadas.
- El cobre modifica la actividad de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA).
- El establecimiento de la simbiosis con HFMA reduce el efecto perjudicial del exceso de cobre en plantas de pimiento.
- Los HFMA modifican la partición del cobre en plantas de pimiento.
- Los HFMA contribuyen a remover el exceso de cobre del suelo.
- La presencia de altas concentraciones de cobre en el suelo altera el patrón proteico en plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas.
- El estrés provocado por la presencia de cobre en exceso en el suelo modifica la expresión génica de plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas.

Para poner a prueba las hipótesis planteadas, se proponen los siguientes objetivos, general y particulares:

Objetivo general:

Identificar interacciones biológicas tendientes a reducir el efecto de concentraciones tóxicas de cobre sobre la germinación y el crecimiento de plantas de pimiento.

Objetivos particulares:

- Evaluar la germinación y el crecimiento de plantas de pimiento en presencia de distintas concentraciones de cobre y determinar las respuestas morfológicas (biomasa de raíz y de parte aérea), fisiológicas (eficiencia en el uso del agua, transpiración, fotosíntesis), bioquímicas (contenido de clorofila, proteínas solubles, prolina, malondialdehído, actividad de enzimas antioxidantes) y moleculares (expresión de proteínas y genes diferenciales).
- Evaluar la presencia, viabilidad y actividad de los hongos formadores de micorrizas arbusculares sobre plantas de pimiento, en suelos con elevadas concentraciones de cobre.
- Cuantificar el efecto de los HFMA en plantas de pimiento cultivadas en presencia de elevadas concentraciones de cobre, en base a parámetros morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares.
- Evaluar el efecto de los HFMA en la partición del cobre en plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas.
- Determinar el patrón proteico de plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas en presencia de elevadas concentraciones de cobre.
- Evaluar la expresión génica en plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas en presencia de elevadas concentraciones de cobre.

CAPITULO II: Materiales y métodos

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET), entre los años 2009 y 2016.

A continuación se presentan los ensayos realizados en este trabajo donde se intenta dilucidar, el efecto del cobre sobre la germinación de las semillas de pimiento y la dinámica del crecimiento de la raíz en pouches. Luego se estudió el efecto del cobre sobre el proceso de micorrización con hongos formadores de micorrizas arbusculares y la evaluación de parámetros morfológicos de plantas inoculadas y no inoculadas. Luego se evaluaron parámetros fisiológicos en condiciones de hidroponía y en suelo. Por otro lado, se estudió la distribución del cobre en las plantas de pimiento, tanto no inoculadas o inoculadas. Se estudió la aplicación exógena de ácido salicílico en plantas de pimiento y la tolerancia al agregado de cobre al suelo. También se analizó la modificación de la expresión de genes y proteínas en presencia del metal. Por último, se cosecharon semillas de plantas de pimiento que crecieron en presencia de distintas concentraciones de cobre y se estudió la germinación y el crecimiento de las plántulas. En todos los casos, las concentraciones de cobre ensayadas fueron adaptadas según las condiciones del sustrato.

1. Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de pimiento.

Germinación en presencia de cobre.

El objetivo fue determinar el efecto de distintas concentraciones de cobre sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de pimiento.

- Material vegetal

Los ensayos se realizaron con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y colocadas en cajas de Petri (14 cm de diámetro), sobre papel de filtro humedecido con agua o las diferentes

soluciones de cobre, en estufa de germinación a 28°C y oscuridad. Se utilizaron 100 semillas por caja y 4 repeticiones (cajas) por tratamiento.

- Tratamientos realizados

Los discos de papel de filtro dentro de las cajas de Petri fueron humedecidos con 2 ml de agua destilada o de soluciones de distinta concentración de cobre en forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, quedando determinados los siguientes tratamientos:

- 1-Control (agua destilada)
- 2-Solución 50 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 3-Solución 100 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 4-Solución 200 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

- Parámetros medidos

Se determinó periódicamente el porcentaje de germinación y al finalizar el ensayo (14 días después), la longitud de la parte aérea y de la raíz.

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de germinación se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 100 semillas por repetición.

Germinación en presencia de cobre y potasio.

El objetivo fue determinar el efecto de distintas concentraciones de cobre y potasio sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de pimiento y demostrar que el efecto inhibitorio del crecimiento producido por el cobre, no se debe a un efecto osmótico sino de toxicidad.

- Material vegetal

Los ensayos se realizaron con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y colocadas en cajas de Petri (14

cm de diámetro), sobre papel de filtro humedecido con agua o las diferentes soluciones de cobre o potasio, en estufa de germinación a 28°C y oscuridad. Se utilizaron 100 semillas por caja y 4 repeticiones (cajas) por tratamiento.

- Tratamientos realizados

Para descartar el efecto que puede producir el aumento del potencial osmótico de la solución sobre la germinación y la elongación de la raíz, y evaluar sólo el efecto tóxico del cobre, se sometieron las semillas a soluciones de igual concentración de cobre y de potasio. Los discos de papel de filtro dentro de las cajas de Petri fueron humedecidos con 2 ml de agua destilada o de soluciones de distinta concentración de cobre en forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y de potasio en forma de K_2SO_4 , quedando determinados los siguientes tratamientos:

- 1-Control (agua destilada)
- 2-Solución 50 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 3-Solución 100 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 4-Solución 200 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 5-Solución 50 μM de K_2SO_4
- 6-Solución 100 μM de K_2SO_4
- 7-Solución 200 μM de K_2SO_4

- Parámetros medidos

Se determinó periódicamente el porcentaje de germinación y al finalizar el ensayo (19 días después), la longitud de la parte aérea y de la raíz y el contenido de malondialdehído (MDA) de hoja y de raíz de las plántulas.

Determinación de MDA:

La cantidad de MDA en tejidos frescos, se determinó por la reacción con el ácido thiobarbitúrico (TBA) descrita por Heath & Packer (1968). Se muelen 0,25 g de tejido fresco, se agregan 5 ml de TBA 0,5% en 20% de ácido tricloroacético (TCA). La mezcla se calienta a 95°C durante 30 minutos y luego se enfría rápidamente en un baño frío. Se centrifuga a 10000 g por 10 minutos, se separa el sobrenadante y se lee la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 UV/V. La concentración de MDA se calcula usando un coeficiente de extinción molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$:

$$\text{Equivalentes de MDA (n.mol.ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000] 10^6$$

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD

al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de germinación se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 100 semillas por repetición.

2. Efecto del cobre sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de pimiento.

Crecimiento de la raíz en pouches, en presencia de cobre.

Con el objetivo de profundizar el estudio de la inhibición de la elongación de la raíz de las plántulas de pimiento se realizó el siguiente ensayo en pouches o bolsas de crecimiento.

- Material vegetal

Se utilizaron semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y colocadas en cajas de Petri (14 cm de diámetro), sobre papel de filtro humedecido con agua, en estufa de germinación a 28°C y oscuridad. Se utilizaron 100 semillas por caja con 4 repeticiones.

- Tratamientos realizados

Cuando las semillas germinaron, se seleccionaron las más homogéneas y se pasaron a las bolsas de crecimiento o pouches (figura 4). En cada pouch se colocaron tres semillas germinadas en la parte superior de la bolsa y 20 ml de solución nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) con el agregado de cobre según corresponda, quedando determinados los siguientes tratamientos:

- 1-Control (agua destilada)
- 2-Solución 50 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- 3-Solución 100 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- 4-Solución 200 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

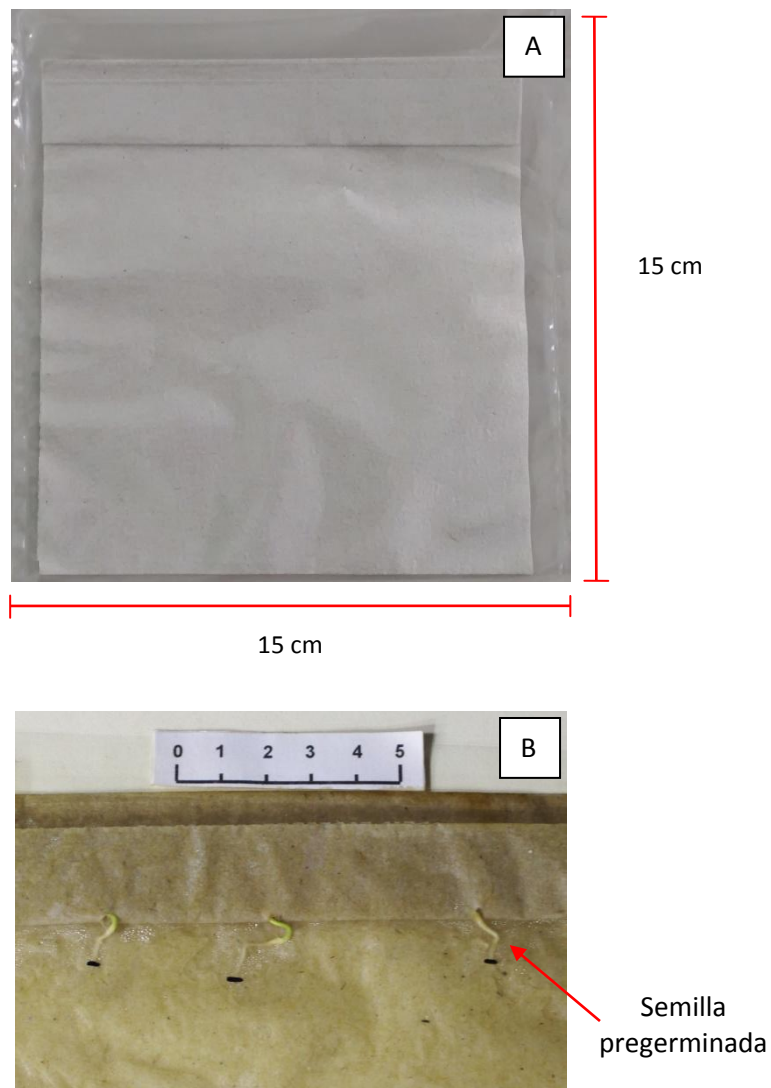


Figura 4. Bolsa de crecimiento o “pouch” (A). Semillas pregerminadas de pimiento, en el momento de colocarlas en los pouches (B).

- Parámetros medidos

A intervalos de 24 hs se realizaron determinaciones de la longitud de la raíz de las plántulas crecidas en los distintos tratamientos.

Una vez finalizado el ensayo se separaron las raíces de la parte aérea, se realizó la extracción de proteínas totales de las raíces y la electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida (PAGE-SDS), según el método de Laemmli (1970).

La extracción de proteínas se realizó con 1 g de peso fresco de raíz en 2 ml de la siguiente solución de extracción:

Solución de extracción

- Glicerol (10 ml)
- Buffer Tris 1 M pH 6,8 (12,5 ml)
- Agua destilada (34,1 ml)
- SDS (4 g)
- Azul de bromofenol (20 mg)

Al momento de la extracción se agregó 2- β -mercaptoetanol e inhibidores de proteasas (PMSF) (1mM). Las proteínas se sembraron en diferentes volúmenes (30 μ l, 35 μ l y 40 μ l) en un gel de poliacrilamida al 12,5%, con la siguiente composición:

	Gel separador (30 ml)	Gel espaciador (10 ml)
Acrilamida/bisacrilamida	12,49 ml	1,33
Buffer Tris 1 M pH 8,8	11,25 ml	---
Buffer Tris 1 M pH 6,8	---	1,25 ml
Agua destilada	5,80 ml	7,25 ml
SDS (10%)	0,3 ml	0,1 ml
APS (10%)	0,15 ml	0,1 ml
TEMED	9,97 μ l	5 μ

Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel se reveló con una solución colorante en agitación, luego se descartó dicha solución y se añadió la solución decolorante, cambiándola periódicamente hasta que el gel no presentó fondo azul. Estas soluciones estaban compuestas por:

	Solución colorante	Solución decolorante
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g	---
metanol	500 ml	200 ml
Ácido acético	100 ml	70 ml
Agua destilada	400 ml	730 ml

Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba vertical HOEFLER SE 600 con una fuente de poder EPS 1001. Los geles obtenidos se analizaron y cuantificaron por densitometría utilizando programas de análisis de imágenes (Syngene Analyzer e Image J).

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). El número de repeticiones (n) fue ocho por tratamiento y 3 semillas por repetición.

3. Efecto del cobre en la micorrización de plántulas de pimiento.

Inoculación en presencia de cobre.

El objetivo fue determinar la concentración umbral de tolerancia al cobre durante el proceso de inoculación, en plantas de pimiento y de trébol (planta trampa), con diferentes hongos micorrícicos, considerando que el cobre actúa como fungicida.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300' y trébol blanco *Trifolium repens* L. Se decidió trabajar con trébol blanco porque es una de las especies trampa que utilizamos habitualmente para multiplicar el inóculo de los diferentes hongos micorrícicos arbusculares.

- Condiciones experimentales

Las semillas de pimiento y trébol fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en terrinas de 40 cm x 15 cm, sobre una mezcla tinalizada de perlita-vermiculita (1:1). Se incorporó a un tercio del sustrato 20% de inóculo de *Funneliformis mosseae* (FM), a otro tercio, 20% de *Rhizophagus intraradices cepa B1* (RI) y a otro tercio 20% de inóculo inactivado (NI), para generar las mismas condiciones experimentales. Las terrinas fueron regadas con solución nutritiva de Hoagland

(Hoagland & Arnon, 1950) y distintas concentraciones de cobre: 0, 5, 25, 50, 100, 500 y 1000 μM , en forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Las terrinas se mantuvieron en cámaras de crecimiento ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas y $350 \mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) durante todo el ensayo.

Preparación del inóculo: los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) que componen los diferentes inóculos utilizados en los ensayos, fueron las siguientes especies identificadas taxonómicamente como *Glomus intraradices*, actualmente denominado *Rhizophagus intraradices* ((Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.; Stockinger *et al.*, 2009), proveniente del Banco in vitro de Glomeromycota, BRI, Bs. As., Argentina y *Glomus mosseae* aislado SB1, de la Colección del Instituto Spegazzini, UNLP, actualmente denominado *Funneliformis mosseae* ((T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schuessler 2010). Dicho inóculo se multiplicó en terrinas, utilizando como sustrato una mezcla estéril de arena:perlita:vermiculita (1:1:1 v/v) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) como planta trampa. Las plantas de trébol crecieron en condiciones controladas en cámaras de cultivo. Al cabo de tres meses posteriores a la inoculación, se suspendió el riego, dejando secar las plantas para luego eliminar la parte aérea. Las raíces se cortaron en fragmentos pequeños mezclándolas en forma homogénea con el sustrato y constituyendo el inóculo a utilizar en los siguientes experimentos. Este inóculo estaba constituido por una mezcla de sustrato, hifas, fragmentos de raíces de trébol (*Trifolium repens* L.) micorrizadas en un 90% y una densidad de esporas de 60 esporas g^{-1} de sustrato seco.

- Tratamientos realizados

La combinación de las dos especies vegetales, los tres tratamientos de micorrización y las distintas concentraciones de cobre, determinó los siguientes tratamientos:

- Plantas no inoculadas (NI),

Pimiento	Trébol
1 -Cu0: 0 μM Cu	1-Cu0: 0 μM Cu
2- Cu5: 5 μM Cu	2- Cu5: 5 μM Cu
3- Cu10: 10 μM Cu	3- Cu10: 10 μM Cu
4- Cu25: 25 μM Cu	4- Cu25: 25 μM Cu
5- Cu50: 50 μM Cu	5- Cu50: 50 μM Cu
6- Cu100: 100 μM Cu	6- Cu100: 100 μM Cu

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 7- Cu500: 500 μ M Cu | 7- Cu500: 500 μ M Cu |
| 8- Cu1000: 1000 μ M Cu | 8- Cu1000: 1000 μ M Cu |

- Plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae* (FM)

- | Pimiento | Trébol |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 -Cu0: 0 μ M Cu | 1-Cu0: 0 μ M Cu |
| 2- Cu5: 5 μ M Cu | 2- Cu5: 5 μ M Cu |
| 3- Cu10: 10 μ M Cu | 3- Cu10: 10 μ M Cu |
| 4- Cu25: 25 μ M Cu | 4- Cu25: 25 μ M Cu |
| 5- Cu50: 50 μ M Cu | 5- Cu50: 50 μ M Cu |
| 6- Cu100: 100 μ M Cu | 6- Cu100: 100 μ M Cu |
| 7- Cu500: 500 μ M Cu | 7- Cu500: 500 μ M Cu |
| 8- Cu1000: 1000 μ M Cu | 8- Cu1000: 1000 μ M Cu |

- Plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (RI)

- | Pimiento | Trébol |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 -Cu0: 0 μ M Cu | 1-Cu0: 0 μ M Cu |
| 2- Cu5: 5 μ M Cu | 2- Cu5: 5 μ M Cu |
| 3- Cu10: 10 μ M Cu | 3- Cu10: 10 μ M Cu |
| 4- Cu25: 25 μ M Cu | 4- Cu25: 25 μ M Cu |
| 5- Cu50: 50 μ M Cu | 5- Cu50: 50 μ M Cu |
| 6- Cu100: 100 μ M Cu | 6- Cu100: 100 μ M Cu |
| 7- Cu500: 500 μ M Cu | 7- Cu500: 500 μ M Cu |
| 8- Cu1000: 1000 μ M Cu | 8- Cu1000: 1000 μ M Cu |

- Parámetros medidos

A los 40, 60 y 90 días después de la siembra se determinó el porcentaje de micorrización o colonización micorrícica. La cuantificación del grado de micorrización y la abundancia relativa de arbusculos y vesículas, en los distintos tratamientos se estimó por observaciones microscópicas, luego de clarificar las raíces en KOH al 10% y teñirlas con azul de tripan al 5% (Phillips & Hayman, 1970). El porcentaje de raíces colonizadas se determinó utilizando el método de Trouvelot et al. (1986). A los 90 días después de la siembra se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento: peso seco de la raíz, peso seco aéreo, altura de la plántula y longitud de la raíz.

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de $8 \times 3 \times 2$, con ocho concentraciones de cobre (0; 5; 10; 25; 50; 100; 500 y 1000 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), tres niveles de micorrización (NI; RI; FM) y dos especies vegetales (pimiento y trébol). Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de micorrización se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 50 plántulas por repetición.

4. Efecto del cobre sobre el crecimiento de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.

Evaluación de parámetros morfológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre.

El objetivo fue determinar el efecto de las distintas concentraciones de cobre sobre el crecimiento de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'

- Condiciones experimentales

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en bandejas sembradoras o speedlings de 128 celdas, con una mezcla tinalizada de perlita-vermiculita (1:1). A una bandeja se le incorporó 20% de inóculo de *Funneliformis mosseae* (FM) y a otra 20% de inóculo inactivado (NI), para generar las mismas condiciones experimentales. El inóculo se preparó de la forma que se explicó en el ensayo anterior. Las plantas inoculadas y no inoculadas se regaron semanalmente con solución completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) y se cultivaron en el invernáculo durante el tiempo que duró el ensayo en condiciones controladas de crecimiento.

- Tratamientos realizados

Cuando las plantas inoculadas alcanzaron el 50% de micorrización se iniciaron los tratamientos con el agregado de cobre en forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, determinándose los siguientes tratamientos:

A- Plantas no inoculadas (NI)

Cultivadas con 0; 0,25; 0, 50; 1; 2 y 4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

B- Plantas inoculadas con *F. mosseae* (FM)

Cultivadas con 0; 0,25; 0, 50; 1; 2 y 4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

- Parámetros medidos

A los 50 días de la adición de la solución de cobre, se midieron los siguientes parámetros de crecimiento:

- Altura, expresada en cm desde el cuello de la planta hasta el ápice
- Número de hojas
- Longitud de raíz, expresada en cm
- Área foliar, expresada en cm^2 , con un medidor de área foliar Licor Li-3000.
- Peso seco aéreo, expresado en g después de secado en estufa a 80°C 48 hs hasta peso constante
- Peso seco de raíz, expresado en g después de secado en estufa a 80°C 48 hs hasta peso constante
- Peso seco total, expresado en g después de secado en estufa a 80°C 48 hs hasta peso constante

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de 6 x 2, con seis concentraciones de cobre (0; 0,25; 0, 50; 1; 2 y 4 mM de CuSO₄. 5H₂O) y dos niveles de micorrización (NI; FM). Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de micorrización se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 10 plántulas por repetición.

5. Efecto del cobre sobre la fisiología de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.

Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en condiciones de hidroponía.

El objetivo fue determinar el efecto de distintas concentraciones de cobre sobre parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas, crecidas en hidroponía.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en terrinas de 30 cm de diámetro, sobre una mezcla tinalizada de tierra-arena (1:1). A una terrina se le incorporó 20% de inóculo de *Funneliformis mosseae* (FM) y a otra la misma cantidad de inóculo inactivado (NI), para generar las mismas condiciones experimentales. El inóculo se preparó de la misma forma que se explicó en el ensayo anterior.

Cuando las plantas inoculadas alcanzaron 50% de micorrización se extrajeron de las terrinas, se lavaron las raíces y se pasaron a condiciones de hidroponía en potes de plásticos de 5 litros de capacidad con solución nutritiva

de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) (figura 5), una semana después se agregaron las distintas soluciones de cobre, según se detalla a continuación. Las plantas se cultivaron en el invernáculo durante el tiempo que duró el ensayo en condiciones controladas de crecimiento.

- Tratamientos realizados

La solución nutritiva de Hoagland se suplementó con distintas concentraciones de cobre en forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, quedando definidos los siguientes tratamientos:

A- *Plantas no inoculadas (NI)*

Cultivadas con 0, 10, 50, 100, 200 y 1000 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

B- *Plantas inoculadas con F. mosseae (FM)*

Cultivadas con 0, 10, 50, 100, 200 y 1000 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.



Figura 5. Plantas de pimiento en hidroponia, al momento de iniciar los tratamientos con las distintas concentraciones de cobre.

- Parámetros medidos

A las 24 horas de agregar las distintas concentraciones de cobre, se determinó el índice mitótico mediante el recuento de células en mitosis de ápices radicales.

Determinación del Índice Mitótico:

Los ápices de raíces laterales de diez plantas de pimiento por tratamiento se colocaron en una caja de Petri sobre papel de filtro embebido en 8-hidroxiquilonia (0,02% v/v) durante 3 horas. Posteriormente, las raíces se

pasaron por tres lavados de agua destilada durante cinco minutos cada uno. Luego, el material se fijó colocándolo en tubos con solución de Carnoy (etanol : acetato, 3:1), cada dos horas, se realizó el recambio de la solución, en tres oportunidades. Finalmente, el material se conservó a 4°C hasta la realización de los preparados. En ese momento, las raicillas se llevaron a baños secuenciales de agua destilada durante cinco minutos en cada uno, en tres oportunidades, a fin de extraer el fijador. A continuación se procedió a realizar la digestión de las paredes celulares con HCl (1N) en estufa a 45°C durante 30 minutos. Finalmente, los ápices radicales se tiñeron con aceto-orceína durante cinco minutos y se montaron en el portaobjeto realizando la técnica de "squash" (Sass, 1958). El índice mitótico (IM), expresado como porcentaje, se determinó contando el número de células en mitosis sobre el número total de células por ápice. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico Carl Zeiss Photomicroscope II (Oberkochen, Germany).

Catorce días después del agregado de cobre a la solución de Hoagland, se determinó la conductancia estomática, la resistencia estomática y la temperatura de hoja, mediante la utilización de un Porómetro Decagon SC-1. Las mediciones se realizaron entre las 16 y las 18 horas, en el sector medio de la planta, en la porción media de hojas completamente expandidas y no senescentes. También se determinó el Índice de verdor con un medidor SPAD-502 Minolta, en el tercio medio de la última hoja expandida.

A los 30 días, se realizó la determinación de malonildialdehído (MDA), conductividad relativa (CR) de hojas y raíces y el patrón proteico de hojas y raíces mediante electroforesis desnaturalizante.

Determinación de conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces:

La determinación de la conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces se realizó a partir de 200 mg de material fresco de hojas y raíces, de los distintos tratamientos, según el método de Lutts et al. (1996). Inmediatamente después del muestreo, los tejidos se lavaron tres veces con agua bidestilada durante 15 segundos, para eliminar los electrolitos adheridos a la superficie y aquellos liberados por las heridas producidas por el corte. Posteriormente, cada muestra se sumergió en un tubo con 10 ml de agua bidestilada donde permanecieron durante cuatro horas a temperatura ambiente. Seguido a esto, se determinó la conductividad eléctrica (dS m^{-1}) empleando un conductímetro Jenco modelo 3173. Luego, los tubos se taparon y se llevaron a autoclave donde se mantuvieron por 20 minutos a una presión de una atmósfera y 120 °C, con el objetivo de afectar totalmente la integridad de las membranas. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y

se volvió a medir la conductividad eléctrica del medio. En base a los datos obtenidos, se estimó la conductividad relativa de las membranas celulares a partir de la siguiente fórmula:

$$CR (\%) = (L_1 / L_2) \times 100$$

Donde, L_1 y L_2 son las lecturas de conductividad eléctrica antes y después del autoclavado respectivamente.

Se determinó el área foliar con un medidor de área foliar Li 3000, LICOR, Lincoln, NE, USA y el peso seco de las plantas, luego de secar el material en estufa a 80°C, hasta peso constante.

Extracción de proteínas totales de hojas y raíces y electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida (PAGE-SDS).

Para la extracción de proteínas se tomaron 250 mg de muestras de hoja o de raíz, para analizar la composición proteica mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS - PAGE), de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970), como ya fue explicado anteriormente. Esta técnica permite separar en forma simultánea distintas fracciones proteicas. El peso molecular de las distintas bandas se estimó utilizando un patrón de Peso Molecular que contenía bandas de 94 a 20 KDa. Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba vertical HOEFLER SE 600 con una fuente de poder EPS 1001. Los geles obtenidos se analizaron y cuantificaron por densitometría utilizando programas de análisis de imágenes (Syngene Analyzer e Image J).

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de 6 x 2, con seis concentraciones de cobre (0; 10; 50; 100; 200 y 1000 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y dos niveles de micorrización (NI; FM). Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de micorrización se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 8 plántulas por repetición.

Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en suelo.

El objetivo fue determinar el efecto de distintas concentraciones de cobre sobre parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas, crecidas en suelo.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en terrinas de 30 cm de diámetro, sobre una mezcla tinalizada de tierra-arena (1:1). A una terrina se le incorporó 20% de inóculo de *Funneliformis mosseae* (FM), a otra 20% inóculo de *Rhizophagus intraradices* (RI) y a otra igual cantidad de inóculo inactivado (NI), para generar las mismas condiciones experimentales. El inóculo se preparó de la misma forma que se explicó en el ensayo anterior.

Cuando las plantas inoculadas alcanzaron 50% de micorrización se trasplantaron a macetas de 1,5 Kg de capacidad con una mezcla de suelo arena 1:1, sin tinalizar; una semana después se agregaron las distintas soluciones de cobre, según se detalla abajo. Las plantas se cultivaron en el invernáculo durante el tiempo que duró el ensayo en condiciones controladas de crecimiento.

- Tratamientos realizados

Después del trasplante se agregó el cobre en forma de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, determinando los siguientes tratamientos:

A- Plantas no inoculadas (NI)

Cultivadas con 0, 2, 4 y 8 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

B- Plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae* (FM)

Cultivadas con 0, 2, 4 y 8 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

C- Plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (RI)

Cultivadas con 0, 2, 4 y 8 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

- Parámetros medidos

Cincuenta días después del trasplante, se determinó la colonización micorrícica de acuerdo al método de Trouvelot et al. (1986), luego de teñir las raíces con azul de Tripán en lactofenol (Phillips & Hayman, 1970). La viabilidad de las hifas fue determinada mediante la medición de la actividad de la enzima

succinato deshidrogenasa (SDH) (Schaffer & Peterson, 1993). La dependencia micorrícica (DM) fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DM = \frac{PS \text{ plantas inoculadas} - PS \text{ plantas no inoculadas}}{PS \text{ plantas inoculadas}} \times 100$$

PS: peso seco

Parámetros de crecimiento: el peso seco se determinó luego de secar el material en estufa a 80°C hasta peso constante y el área foliar mediante un medidor de área foliar Li 3000 LICOR, Lincoln, NE, USA.

El contenido de clorofila y carotenoides se determinó sobre un disco de hoja de 1 cm de diámetro por planta, fue medido de acuerdo al método de Welburn (1994) en un espectrofotómetro Shimadzu UV - 160 (Kyoto, Japón). Los resultados fueron expresados como μg de carotenoides ml^{-1} o μg de clorofila ml^{-1} .

La liberación de electrolitos se determinó de acuerdo al método de Lutts et al. (1996).

Entre los parámetros de intercambio gaseoso se midió fotosíntesis neta (Fn), conductancia estomática (Ce) y transpiración (T); en la segunda hoja completamente expandida de cada planta usando un analizador de gases infrarrojos portátil IRGA (modelo CIRAS-2®, PP Systems). Las mediciones fueron hechas con una cubeta estándar (LI 6400-02), entre las 09:00 horas y las 13:00 horas a través de una secuencia mixta de los tratamientos para reducir el sesgo debido a la sincronización. Al momento de la medición, la temperatura promedio de la hoja fue de 25°C, la concentración de CO₂ de 360 mol mol⁻¹ y la densidad de flujo de fotones 1500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La eficiencia en el uso del agua (EUA) se expresó como la relación entre la fotosíntesis neta y la transpiración.

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de 4 x 3, con cuatro concentraciones de cobre (0; 2; 4 y 8 mM de CuSO₄. 5H₂O) y tres niveles de micorrización (NI; FM; RI). Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de micorrización se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 8 plántulas por repetición.

6- Efecto de la micorrización sobre la partición del cobre en plantas de pimiento.

Evaluación de la partición del cobre en plantas no inoculadas o inoculadas, determinación de índices de eficiencia

El objetivo fue evaluar la traslocación de cobre en plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas y determinar si los hongos micorrícicos arbusculares modifican la partición.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en terrinas de 30 cm de diámetro, sobre una mezcla tinalizada de tierra-arena (1:1). A una terrina se le incorporó 20% de inóculo de *Rhizophagus intraradices* (RI) y a otra igual cantidad de inóculo inactivado (NI), para generar las mismas condiciones experimentales. El inóculo se preparó de la misma forma que se explicó anteriormente.

Cuando las plantas inoculadas alcanzaron 50% de micorrización se trasplantaron a macetas de 10 Kg con una mezcla de tierra : arena (1:1), una semana después se agregaron las distintas soluciones de cobre, según se detalla abajo. Las plantas se cultivaron en el invernáculo durante el tiempo que duró el ensayo en condiciones controladas de crecimiento.

- Tratamientos realizados

Las macetas con las plantas micorrizadas y no micorrizadas fueron sumergidas durante 24 horas en una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en distintas concentraciones, quedando determinados los siguientes tratamientos:

A- Plantas no inoculadas (NI)

Cultivadas con 0, 1, 2 y 4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

B- Plantas inoculadas con *R. intraradices* (RI)

Cultivadas con 0, 1, 2 y 4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

- Parámetros medidos

A los 15 días de la aplicación de las soluciones de cobre se recolectó material de raíz, tallo, hojas basales, hojas apicales y frutos para determinar el contenido de cobre. Las muestras fueron secadas en estufa a 80°C hasta peso constante y luego se molieron. La digestión se realizó con una mezcla de HNO₃: HClO₄ (4:1, v/v). La determinación analítica de cobre se realizó por Espectrofotometría de Absorción Atómica por aspiración directa en llama de acetileno en un equipo Varian Spectr AA 300.

Con los datos obtenidos de contenido de cobre en los diferentes tejidos se determinaron los siguientes índices:

- a- Índice de eficiencia de absorción (UE): fue determinado como la relación entre el cobre absorbido por la planta y el peso seco de la raíz ($\mu\text{g g}^{-1}$).
- b- Índice de eficiencia de traslocación (TE): fue determinado como la relación entre el cobre en parte aérea y el cobre en raíces ($\mu\text{g g}^{-1}$).
- c- Índice de eficiencia de fitoextracción (PE): fue determinado como la relación entre el cobre en parte aérea y el peso seco de las raíces ($\mu\text{g g}^{-1}$).
- d- Índice de dependencia de cobre (DCu): fue determinado como la relación entre el peso seco sin cobre - peso seco con cobre, referido al peso seco sin cobre, expresado en porcentaje.

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de 4 x 2, con cuatro concentraciones de cobre (0; 1; 2 y 4 mM de CuSO₄. 5H₂O) y dos niveles de micorrización (NI; RI). Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de micorrización se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 8 plantas por repetición.

7- Efecto del ácido salicílico exógeno sobre la toxicidad por cobre en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.

Evaluación de los tratamientos con ácido salicílico sobre plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas, para aumentar la tolerancia al cobre del suelo.

El objetivo fue evaluar el efecto de distintas concentraciones de ácido salicílico sobre la tolerancia de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas, crecidas en presencia de cobre en el suelo.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en terrinas de 30 cm de diámetro, con una mezcla tinalizada de tierra-arena (1:1). A una terrina se le incorporó 20% de inóculo de *Rhizophagus intraradices* (RI) y a otra igual cantidad de inóculo inactivado (NI), para generar las mismas condiciones experimentales. El inóculo se preparó de la misma forma que se explicó anteriormente.

Cuando las plantas inoculadas alcanzaron el 50% de micorrización se extrajeron de las terrinas, se lavaron las raíces y se pasaron a condiciones de hidroponía en bandejas plásticas de 60 x 40 cm x 15 cm de profundidad con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), una semana después se agregaron las distintas soluciones de cobre, según se detalla abajo. Las plantas se cultivaron en el invernáculo durante el tiempo que duró el ensayo en condiciones controladas de crecimiento.

- Tratamientos realizados

Se agregó el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en una concentración 0,1 mM. Cinco días después se asperjó el ácido salicílico (AS) en las siguientes concentraciones: 0 μM (agua destilada), 200 μM y 500 μM . Quince días después se repitió la aplicación de AS en las mismas concentraciones y al día siguiente se agregó el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de modo de llegar a las concentraciones definitivas: 0 mM; 0,1 mM y 1 mM. Al día

siguiente, se repitió la aplicación de AS en las mismas condiciones ya descritas. De esta forma quedaron definidos los siguientes tratamientos:

A- Plantas no inoculadas (NI)

- 1- Cultivadas con 0 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y asperjadas con 0 μM , 200 μM o 500 μM de ácido salicílico.
- 2- Cultivadas con 0,1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y asperjadas con 0 μM , 200 μM o 500 μM de ácido salicílico.
- 3- Cultivadas con 1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y asperjadas con 0 μM , 200 μM o 500 μM de ácido salicílico.

*B- Plantas inoculadas con *F. mosseae* (FM)*

- 1-Cultivadas con 0 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y asperjadas con 0 μM , 200 μM o 500 μM de ácido salicílico.
- 2- Cultivadas con 0,1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y asperjadas con 0 μM , 200 μM o 500 μM de ácido salicílico.
- 3- Cultivadas con 1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y asperjadas con 0 μM , 200 μM o 500 μM de ácido salicílico.

- Parámetros medidos

Tres días después de concluir con las aplicaciones se muestrearon hojas y raíces para determinar:

- la conductividad relativa de las membranas celulares, a partir de 4 discos de hoja de 1 cm de diámetro y peso equivalente de raíz, como se explicó anteriormente.
- el contenido de malonildialdehído (MDA) a partir de 200 mg de hoja o de raíz, como se explicó anteriormente.
- el contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976) a partir de 200 mg de hoja o de raíz, según se explica a continuación.

El contenido de proteínas solubles se determinó a partir de 200 mg de la última hoja expandida o igual peso de raíz, de acuerdo al método de Bradford (1976). Los tejidos se homogeneizaron en un mortero con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1% a pH 7,5)

a 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se le agregó 5 ml del reactivo Azul Brillante de Coomassie, se agitó en vortex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectuó empleando una curva patrón preparada con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, SiFMa Chemical Co).

- el contenido de prolina mediante el método de Bates et al. (1973) a partir de 100 mg de hoja o de raíz, según se explica a continuación.

Para la determinación de prolina se homogeneizaron 100 mg de material fresco de hoja y de raíz con 2 ml de una solución en agua al 3% de ácido sulfosalicílico. El homogeneizado se centrifugó a 12000 g por 15 minutos y se tomó 1 ml del extracto obtenido. Se lo hizo reaccionar con 1 ml del reactivo Ninhydrina ácida y 1 ml de ácido acético glacial en un tubo de 15 ml, en baño maría a 100 °C durante una hora. Al cabo de ese lapso la reacción se interrumpió enfriando el tubo rápidamente. A la mezcla reaccionante anterior se le agregó 2 ml de tolueno y se agitó durante 15 a 20 segundos en vórtex. Se dejaron separar las fases y se tomó la fase acuosa conteniendo el cromóforo tolueno-prolina y se leyó la absorbancia a 520 nm usando tolueno como blanco.

Se calculó el contenido de prolina por unidad de peso fresco según:
$$\mu\text{mol prolina.g}^{-1} \text{ PF} = [(\mu\text{g prolina/ml} \times \text{ml tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{moles}]/[(\text{g PF})/5]$$

- el contenido de clorofila y carotenos se realizó a partir de discos de hojas de 1 cm de diámetro según el método de Moran & Porath (1980), como se explicó anteriormente.

- el contenido de enzimas peroxidasas por el método de Maehly & Chance (1954).

Para medir la actividad de peroxidasas inespecíficas se homogeneizaron 300 mg de hoja en 1 ml de solución buffer de 50 mM de fosfato de potasio (pH 7,4), 1 mM de EDTA 0,5% (v/v) y 1% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP) para remover interferencias de compuestos fenólicos a 4°C (Loomis, 1969). Los homogenatos se centrifugaron a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La actividad de la enzima se determinó por el aumento de la absorbancia a 470 nm debido a la formación de tetraguayacol (coeficiente de extinción 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹). La actividad se expresa como µmol tetraguayacol. g⁻¹ PF. min⁻¹ (Maehly & Chance, 1954).

- el contenido de enzimas catalasas por el método de Aebi (1984).

Se siguió el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm debida a la descomposición del H₂O₂ por efecto de la catalasa. En una cubeta de cuarzo se añadieron la muestra, preparada de igual forma que se describió para las enzimas peroxidadas, y la mezcla de reacción, protegida de la luz y formada por tampón fosfato K 50 mM pH 7 y H₂O₂ 10,6 mM hasta completar un volumen final de 1 ml en la cubeta. La reacción se registró durante 2 minutos a 25°C en un espectrofotómetro, frente a un blanco que fue la solución buffer. La actividad enzimática expresada en $\mu\text{M de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso fresco se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de 39,57 M⁻¹ · cm⁻¹.

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de 3 x 2 x 3, con tres concentraciones de cobre (0; 0,1; y 1 mM de CuSO₄ · 5H₂O), dos niveles de micorrización (NI; FM) y tres concentraciones de ácido salicílico (0, 200 y 500 μM). Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de micorrización se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 8 plántulas por repetición.

8- Amplificación de los genes cuya expresión ha sido modificada por la presencia de metales pesados.

Evaluación de la expresión de genes y proteínas en plantas no inoculadas o inoculadas, en presencia de cobre.

El objetivo fue estudiar el efecto del cobre en el suelo sobre la expresión de genes y el modelo proteico, de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300'.

- Condiciones experimentales

Las semillas de pimiento fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en terrinas de 30 cm de diámetro, sobre una mezcla tinalizada de tierra-arena (1:1). A una terrina se le incorporó 20% de inóculo de *Rhizophagus intraradices* (RI) y a otra igual cantidad de inóculo inactivado (NI), para generar las mismas condiciones experimentales. El inóculo se preparó de la misma forma que se explicó anteriormente.

Cuando las plantas inoculadas alcanzaron 50% de micorrización se trasplantaron a macetas de 1,5 Kg con una mezcla tinalizada de tierra : arena (1:1), una semana después se agregaron las distintas soluciones de cobre, según se detalla abajo. Las plantas se cultivaron en el invernáculo durante el tiempo que duró el ensayo en condiciones controladas de crecimiento.

- Tratamientos realizados

Las macetas con las plantas micorrizadas y no micorrizadas fueron sumergidas durante 24 horas en una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en distintas concentraciones, quedando determinados los siguientes tratamientos:

A- *Plantas no inoculadas (NI)*

Cultivadas con 0, 1, 2 y 4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

B- *Plantas inoculadas con R. intraradices (RI)*

Cultivadas con 0, 1, 2 y 4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

- Parámetros medidos

A los 3 días de la aplicación de las soluciones de cobre se recolectaron hojas completamente expandidas para analizar la expresión de genes y proteínas. Las muestras fueron colocadas inmediatamente después de la recolección en Nitrógeno líquido y llevadas a freezer de -80°C , hasta el momento de realizar las determinaciones.

A. Extracción, purificación y cuantificación de ADN.

- Protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega.

Se congelaron 100 mg de tejido de hoja en Nitrógeno líquido, y se molieron en un mortero estéril hasta obtener un polvo homogéneo. Se pasaron 40 mg del mismo a un tubo eppendorf estéril, se le adicionó 600 μl de solución de lisis nuclear, y se mezcló en vortex durante 1-3 segundos que luego se incubó 15 minutos a 65°C . Posteriormente se adicionó 3 μl RNasa ($10\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Después, se adicionó 200 μl de Solución de

Precipitación de Proteínas y se mezcló 20 segundos en vortex. Luego de centrifugar 3 minutos a 13.000 g, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml. Con el fin de precipitar el ADN se adicionó isopropanol al 10%; se mezcló y luego se centrifugó a 13.000 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 600 µl de etanol 70% y se secó durante 15 minutos. El ADN se disolvió en un volumen de 100 µl de Solución de Rehidratación a 65°C durante 1 hora.

- Protocolo de extracción de ADN vegetal CTAB de Doyle & Doyle (1990) modificado por Bornet & Branchard (2001).

Se congelaron en nitrógeno líquido 300 mg de tejido de hoja y se molieron en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. A este se le adicionó 800 µl de buffer CTAB suplementado con 200 µl de CTAB 10%, 1 µl de β-mercaptoetanol y 1% PVPP, se homogeneizó la mezcla y se pasó a un tubo eppendorf de 2 ml que se incubó a 60°C durante 30 minutos. Luego, se lavó con un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (12:1), se mezcló y se centrifugó 5 min a 10.000 g. El sobrenadante se pasó a un eppendorf de 2 ml en donde se procedió a precipitar el ADN. Para esto se agregó un volumen de isopropanol y 10% del volumen de acetato de sodio 3M. La mezcla se mantuvo a -18°C durante 12 horas. La suspensión se centrifugó a 10.000 g para generar un pellet de ADN que se lavó tres veces con etanol 70%, y se secó. El ADN se resuspendió en 150 µl de TE y se le agregó 1-2 µl de RNasa (10 µg.µl⁻¹), luego de lo cual se incubó a 37°C por espacio de 2 horas. El ADN nuevamente se trató con fenol cloroformo y se precipitó como se describió anteriormente. La solución de ADN final se mantuvo en freezer a -20°C.

- Visualización y cuantificación del ADN extraído.

El ADN se cuantificó en base a la comparación de la intensidad de la banda del ADN genómico con las del marcador molecular control (Genoma del fago Lamba digerido con Hind III - Promega Biotech). Las mismas se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa 0.7% p/v suplementado con bromuro de etidio, y fueron visualizadas en un transiluminador de UV (Sambrook et al., 1989). Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes SYNGENE y el software GENETOOLS.

B. Extracción, purificación y cuantificación de ARN. Protocolo AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit

Se seleccionaron 150 mg de tejido de hoja e inmediatamente se congelaron por inmersión en Nitrógeno líquido, y se molieron en un mortero hasta obtener

un polvo homogéneo. Se añadió 400 µl de buffer R-I y se molió para formar una mezcla homogénea. Se homogeneizó rápidamente la muestra pasándola a través de una jeringa de 1 ml provista de una aguja de 18 a 23 de calibre. Se transfirió el lisado a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadió 150 µl de buffer R-II y se agitó durante 15-30 segundos. Se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos a 4 ° C para sedimentar el ADN y proteínas. Luego se transfirió el sobrenadante clarificado a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadió 250 µl de isopropanol y se mezcló por agitación.

Se colocó una columna de centrifugado en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se transfirió la solución anterior en la columna de centrifugación. Se centrifugó a 6000 g durante 1 minuto a 4 ° C. Se desechó el filtrado desde el tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se colocó la columna de centrifugado de nuevo en el tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se añadió 500 µl de buffer de W1A a la columna de centrifugado y se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto. Se descartó el filtrado y se colocó la columna de centrifugación de nuevo en el mismo tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se añadió 700 µl de buffer W2 y se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto. Se desechó el filtrado del tubo de microcentrífuga y se repitió este lavado con una segunda alícuota de 700 µl de buffer W2. Se desechó el filtrado y se colocó la columna de centrifugado de nuevo en los tubos de microcentrífuga. Se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto para eliminar la solución de lavado residual y se transfirió la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. Para diluir el total de RNA, se añadió 70 a 100 µl de buffer de TE con el centro de la membrana. Se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto.

C. Pasaje a cDNA

Para obtener cDNA a partir del RNA se tomaron 2,5 µg de RNA y se colocaron en un eppendorf de 0,5 ml. Se agregaron 16 µl de oligo dT y 1 µl de dntps. Se llevó a 40 µl de volumen final con agua DEPC. Se incubó 5 minutos a 65°C y se llevó a frío. Se agregó 8 µl de buffer y 1 µl de enzima Taq polimerasa. Se incubó 30 minutos a 50°C y se llevó a frío.

D. Amplificación de genes de interés

La amplificación de los genes de interés se realizó utilizando los siguientes primers, cuyas secuencias se generaron a partir de las secuencias inscriptas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) correspondientes a *Capsicum annuum*:

Glicerol 3 fosfato acyltransferasa (GL)	FP: 5' - GACCACTGTTGGGAATCGGA - 3' RP: 5' - TGTCTGTTCGCAGAAGCATCA - 3'
Glutation reductasa (GR)	FP: 5' - CCGGAGTTGGAGGATGCAAG - 3' RP: 5' - ACTGTTCACACCCATTCTCG - 3'
Metalotioneína (MT)	FP: 5' - AAGCTGTGGCTGTGGATCTG - 3' RP: 5' - ACATCCCAATTCAACTTCCTTCA - 3'

Todos los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis a 90 V, en geles de agarosa del 1% p/v suplementados con bromuro de etidio 10 % (10 µg.ml⁻¹). Las bandas de la amplificación se observaron en un analizador de imágenes Syngene con el software Genetools que permitió, con una cámara digital, fotodocumentar los resultados.

E. Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales y la electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada PAGE-SDS, se realizó según el método de Laemmli (1970). La extracción de proteínas se realizó a partir de 200 mg de peso fresco de hoja en 1,5 ml de la siguiente solución de extracción:

Solución de extracción

Glicerol (6 ml)

Buffer Tris 0,5 M pH 6,8 (15 ml)

Agua destilada (12 ml)

SDS 10% (24 ml)

Azul de bromofenol 0,1% (3 ml)

Urea 4 M (14,4 g)

Al momento de la extracción se agregó 2-β-mercaptoetanol (1,2 ml) e inhibidores de proteasas (PMSF) 1mM (6ml). Las proteínas (35 µl) se sembraron en un gel de poliacrilamida al 15%, con la siguiente composición:

	Gel separador (30 ml)	Gel espaciador (10 ml)
Acrilamida/bisacrilamida	15 ml	1,33
Buffer Tris 1,5 M pH 8,8	7,5 ml	---
Buffer Tris 0,5 M pH 6,8	---	2,5 ml
Agua destilada	7,2 ml	6,1 ml
SDS (10%)	0,3 ml	0,1 ml
APS (10%)	150 μ l	50 μ l
TEMED	15 μ l	10 μ

Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se revelaron con una solución colorante en agitación, luego se descartó dicha solución y se añadió la solución decolorante, cambiándola periódicamente hasta que los geles no presentaran fondo azul. Estas soluciones estaban compuestas por:

	Solución colorante	Solución decolorante
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g	---
metanol	500 ml	200 ml
Ácido acético	100 ml	70 ml
Agua destilada	400 ml	730 ml

Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba vertical HOEFLER SE 600 con una fuente de poder EPS 1001. Los geles obtenidos se analizaron y cuantificaron por densitometría utilizando programas de análisis de imágenes (Syngene Analyzer e Image J).

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial de 4 x 2, con cuatro concentraciones de cobre (0; 1; 2 y 4 μ M de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y dos niveles de micorrización (NI; RI). Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de micorrización se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 8 plántulas por repetición.

9- Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de plantas de pimiento expuestas a diferentes niveles de contaminación por cobre.

Germinación de semillas obtenidas de plantas cultivadas con diferentes niveles de contaminación por cobre.

El objetivo fue determinar si las semillas cosechadas de plantas expuestas a diferentes concentraciones de cobre fueron afectadas por el metal.

- Material vegetal

El ensayo se realizó con semillas cosechadas del ensayo en el que se evaluaron parámetros morfológicos y fisiológicos en presencia de cobre, en condiciones de hidroponía (ensayo 5).

- Condiciones experimentales

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y colocadas en cajas de Petri (14 cm de diámetro), sobre papel de filtro humedecido con agua, en estufa de germinación a 28°C y oscuridad.

- Tratamientos realizados

Los tratamientos fueron aquellos a los que estuvieron sometidas las plantas madres de pimiento en condiciones de hidroponía en el ensayo 5.

A-Plantas no inoculadas (control)

Cultivadas con 0, 10, 50, 100, 200 y 1000 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

*B- Plantas inoculadas con *F. mosseae**

Cultivadas con 0, 10, 50, 100, 200 y 1000 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

- Parámetros medidos

Se determinó el porcentaje de germinación y la longitud de la raíz.

- Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD

La micorrización modifica la respuesta de las plantas de pimiento en presencia de cobre en el suelo

al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de germinación se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico. El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 25 semillas por repetición.

CAPITULO III: Resultados y discusión

1. Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de pimienta.

Germinación en presencia de cobre.

El cobre en las concentraciones ensayadas no afectó el porcentaje de germinación que fue superior al 90% en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre ellos (gráfico 1). En arroz mostraron que la germinación disminuyó con el incremento de las concentraciones de cobre, a partir de 1mM, en concentraciones más bajas del metal no se afectó significativamente la germinación (Ahsam et al., 2007), en coincidencia con nuestros ensayos donde la mayor concentración utilizada fue 200 μ M.

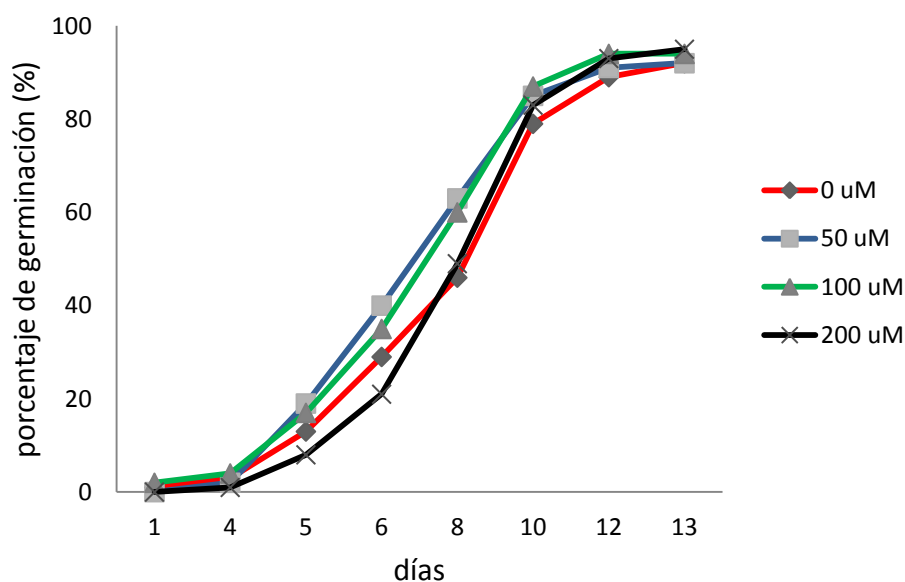


Gráfico 1. Porcentaje de germinación de semillas de pimienta tratadas con distintas concentraciones de cobre.

Sólo la mayor concentración de cobre afectó el crecimiento de las plántulas ya que la longitud de la parte aérea solo presentó diferencias significativas en la mayor concentración de cobre. Mientras que, la longitud de la raíz disminuyó significativamente en todas las concentraciones de cobre ensayadas (gráfico 2 y cuadro 1 y 2). Según Ahsam et al. (2007) el crecimiento del tallo de plántulas de arroz creciendo en un medio con cobre fue inhibido a 0,2 mM y siguió disminuyendo hasta 2 mM. Estudiando la formación de las raíces de arroz los autores determinaron que 0,25 mM de cobre es la dosis letal 50 (LC₅₀) para esta especie y además no se observó formación de raíces en

concentraciones mayores a 0,5 mM. En trigo, Wang & Zhou (2005) demostraron que la toxicidad de cobre y de cadmio en las plántulas presentó el siguiente orden, elongación de las raíces > elongación de tallos > porcentaje de germinación. Según Singh et al. (2007) la baja tasa de germinación y de crecimiento de las plántulas de trigo por efecto del cobre pueden ser debidas a una menor degradación del almidón por efecto de una baja actividad amilasa. Cheng & Zhou (2002) y Song et al. (2002) identificaron en sus estudios sobre la toxicidad de metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) que en trigo la inhibición de la elongación de las raíces fue mayor que la inhibición de la germinación para igual concentración del contaminante. Los resultados de este trabajo coinciden con los de estos autores, la longitud de la raíz fue el parámetro más afectado por la presencia de cobre en el medio, con 50 μM se redujo significativamente el crecimiento de la raíz comparado con el control sin cobre y de igual forma se observó con 100 y 200 μM , mientras que la parte aérea se vio menos afectada. Estos resultados sugieren que la raíz es más sensible a la toxicidad por metales pesados y esto puede deberse a que es el órgano que primero se pone en contacto con el metal y el que frecuentemente acumula más. En la figura 6 puede observarse como se necrosan los ápices radicales al estar en contacto con el cobre. Luego de ingresar a la planta por la raíz, el cobre puede ser retenido en vacuolas o acompañado por sustancias quelantes (fitoquelatinas) de modo de disminuir su efecto tóxico (Lee et al., 2003) y esto explicaría el menor efecto en la parte aérea.

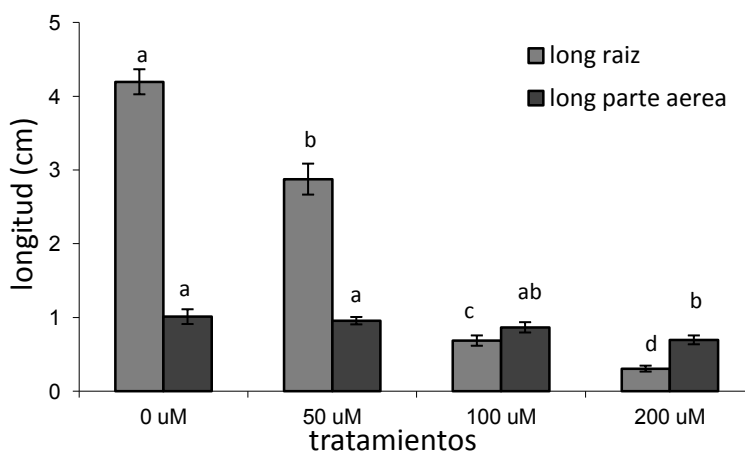


Gráfico 2. Longitud de raíz y de parte aérea de plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 1. Análisis de Varianza para longitud de raíz por cobre

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	213,885	3	71,295	190,87	0,0000
Intra grupos	29,882	80	0,373525		
Total (Corr.)	243,767	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 2. Análisis de Varianza para longitud aérea por cobre

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,19634	3	0,398781	4,16	0,0086
Intra grupos	7,6625	80	0,0957812		
Total (Corr.)	8,85884	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

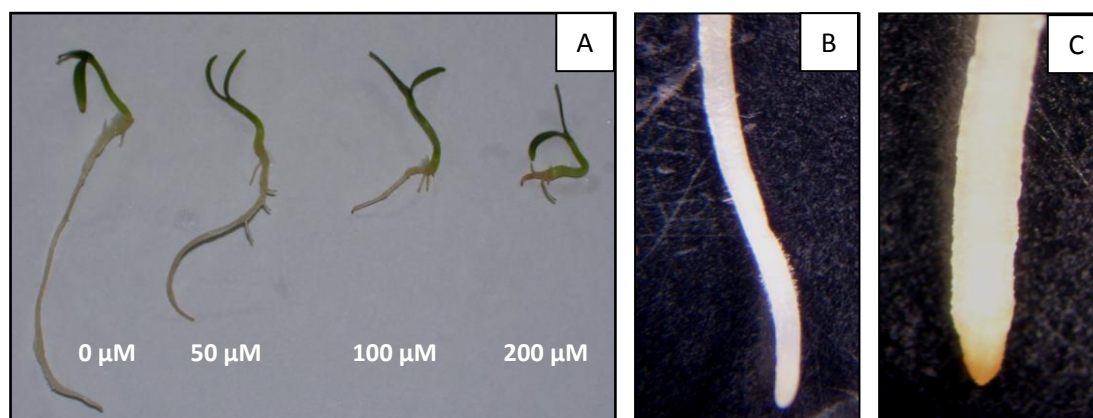


Figura 6. Plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre (A), detalle de una raíz en ausencia de cobre (B) y detalle de una raíz con 200 µM de cobre (C).

Germinación en presencia de cobre y potasio.

Este ensayo tuvo como objetivo demostrar que el efecto inhibitor del crecimiento producido por el cobre, no se debe a un efecto osmótico sino tóxico. Para ello se repitió el ensayo anterior incorporando K_2SO_4 y comparando los resultados. El porcentaje de germinación se mantuvo alto, alrededor de 80% y sin diferencias significativas entre los tratamientos de cobre y de potasio, de igual manera que se observó en el ensayo anterior en el que se concluyó que la germinación no fue afectada por el cobre a las concentraciones ensayadas (gráfico 3 y 4).

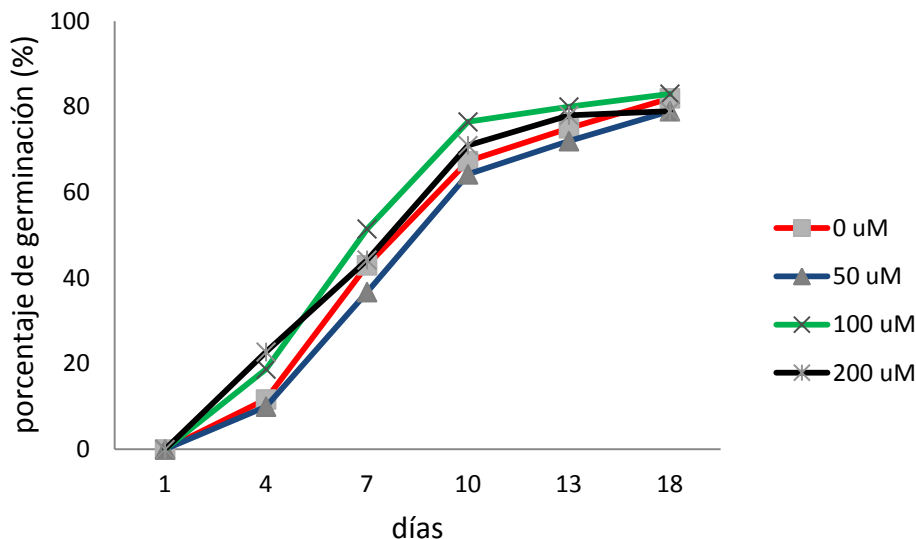


Gráfico 3. Porcentaje de germinación de semillas de pimiento tratadas con distintas concentraciones de cobre.

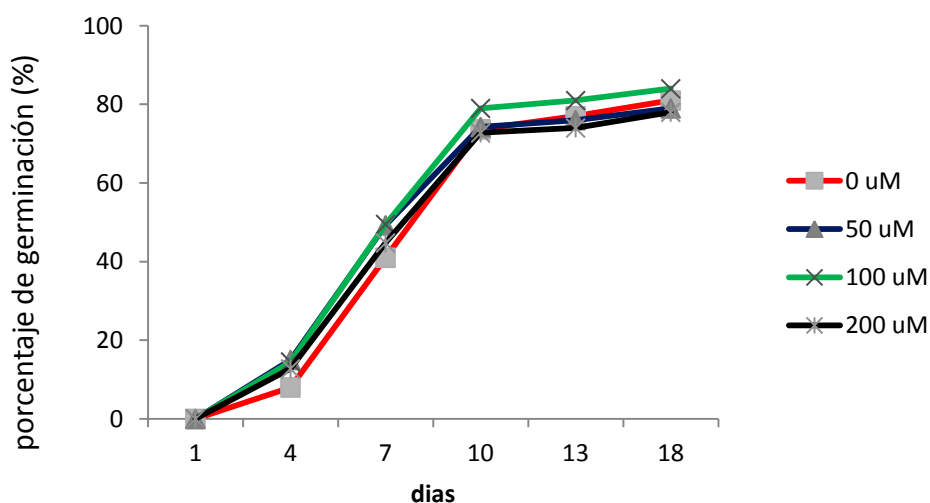


Gráfico 4. Porcentaje de germinación de semillas de pimiento tratadas con distintas concentraciones de potasio.

De la misma manera que se observó en el ensayo anterior, la longitud de la parte aérea se vio afectada sólo por las altas concentraciones de cobre. En cambio, la longitud de la raíz disminuyó significativamente en todas las concentraciones (gráfico 5, cuadro 3 y 4). Por otro lado, las plántulas que fueron expuestas a la solución de potasio no presentaron alteraciones de crecimiento, no se observaron diferencias significativas en la longitud de la raíz ni de la parte aérea en ninguna de las concentraciones de potasio ensayadas (gráfico 6, cuadro 5 y 6). De acuerdo a los resultados observados en este ensayo, podemos

descartar que la inhibición en la elongación de la raíz y en menor medida de la parte aérea se deba a un efecto osmótico, sino que responde al efecto tóxico del cobre (figura 7).

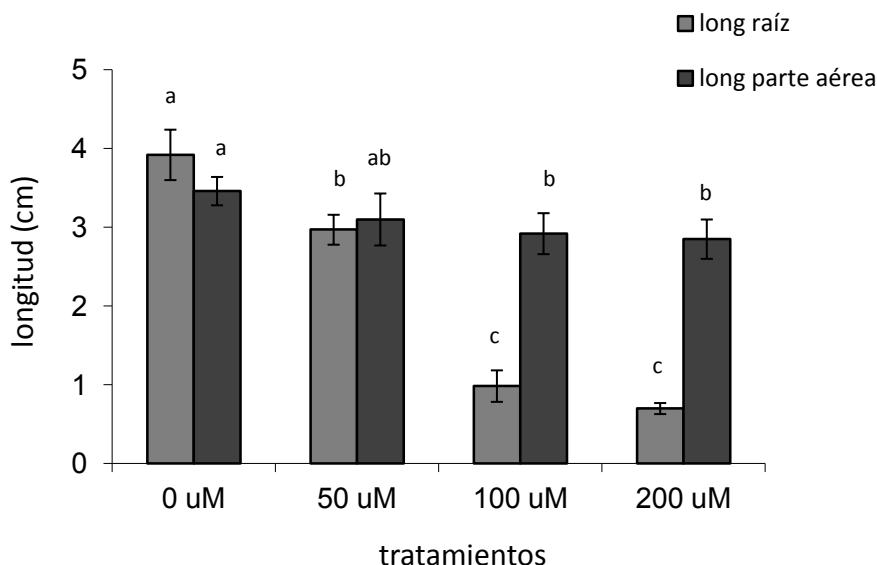


Gráfico 5. Longitud de raíz y de parte aérea de plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 3. Análisis de Varianza para longitud de raíz por cobre

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	143,999	3	47,9998	83,75	0,0000
Intra grupos	43,5595	76	0,573151		
Total (Corr.)	187,559	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 4. Análisis de Varianza para longitud aérea por cobre

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17,258	3	5,75267	11,77	0,0000
Intra grupos	37,14	76	0,488684		
Total (Corr.)	54,398	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

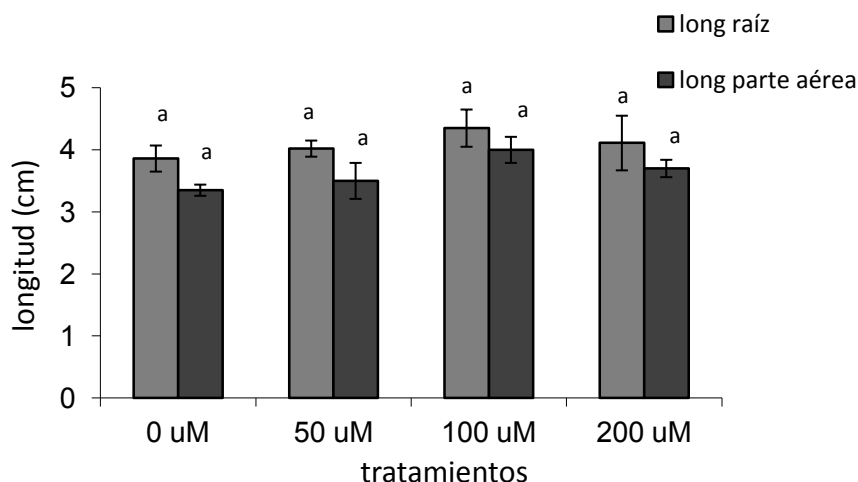


Gráfico 6. Longitud de raíz y de parte aérea de plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de potasio. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 5. Análisis de Varianza para longitud de raíz por potasio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0605	3	0,0201667	0,22	0,8789
Intra grupos	6,819	76	0,0897237		
Total (Corr.)	6,8795	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 6. Análisis de Varianza para longitud aérea por potasio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,017375	3	0,00579167	0,02	0,9970
Intra grupos	26,1615	76	0,34423		
Total (Corr.)	26,1789	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La exposición de las plantas a concentraciones tóxicas de cobre induce estrés oxidativo y activa distintos mecanismos antioxidantes. La peroxidación de los lípidos de las membranas celulares producida por el exceso de radicales libres es un indicio de la presencia de sustancias tóxicas en el medio. El último producto de esta peroxidación es el malondialdehído o malonildialdehído (MDA), el incremento de MDA es un indicador de estrés fisiológico (Demiral & Türkan, 2005). Según nuestros resultados, el contenido de MDA presentó diferencias significativas en las hojas, aumentando en las concentraciones más altas de cobre, pero no se modificó en la raíz (gráfico 7 y cuadro 7 y 8). Mientras que con potasio no se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones, en hoja ni en raíz (datos no mostrados).

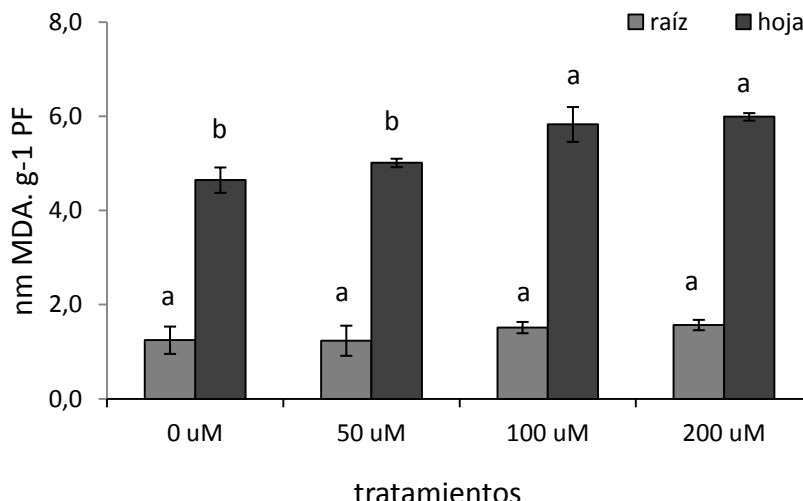


Gráfico 7. Contenido de MDA de hoja y de raíz de plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 7. Análisis de Varianza para MDA de raíz por cobre

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,586442	3	0,195481	0,91	0,4630
Intra grupos	2,56465	12	0,213721		
Total (Corr.)	3,1511	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 8. Análisis de Varianza para MDA de hoja por cobre

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,98892	3	1,66297	7,51	0,0043
Intra grupos	2,6558	12	0,221316		
Total (Corr.)	7,64471	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Algunos autores como Li y colaboradores (2010) observaron en ricino un aumento gradual del contenido de MDA al aumentar la salinidad de la solución. Koca et al. (2006) también observaron un incremento del contenido de MDA en hojas de tomate, variable según la variedad de tomate ensayada. Maksymiec et al. (2007) trabajando con hojas de *Arabidopsis thaliana* observaron un incremento significativo del contenido de MDA al tratar las plantas con 100 μM CuSO_4 o CdSO_4 , aunque el Cd indujo menor acumulación de MDA que el Cu. En coincidencia con los resultados de este trabajo donde se encontraron valores crecientes de MDA en las hojas a medida que aumentaba la concentración de cobre en la solución, es de destacar que no se observaron diferencias, en las raíces. Los resultados de este trabajo no coinciden con Yurekli

& Porgali (2006) quienes trabajando con poroto encontraron que el MDA se incrementó más en raíz, luego en tallo y por último en hojas, al someter las plantas a 100 μM de cobre, siendo significativa la diferencia solo en raíz. Estos autores también determinaron el contenido de cobre en los tejidos y la mayor concentración del metal se observó en la raíz. En este trabajo no se determinó la concentración de cobre en los tejidos por eso no podemos asegurar que el mayor contenido de MDA se deba a una mayor traslocación del metal a las hojas, pero podría ser una respuesta a este comportamiento.

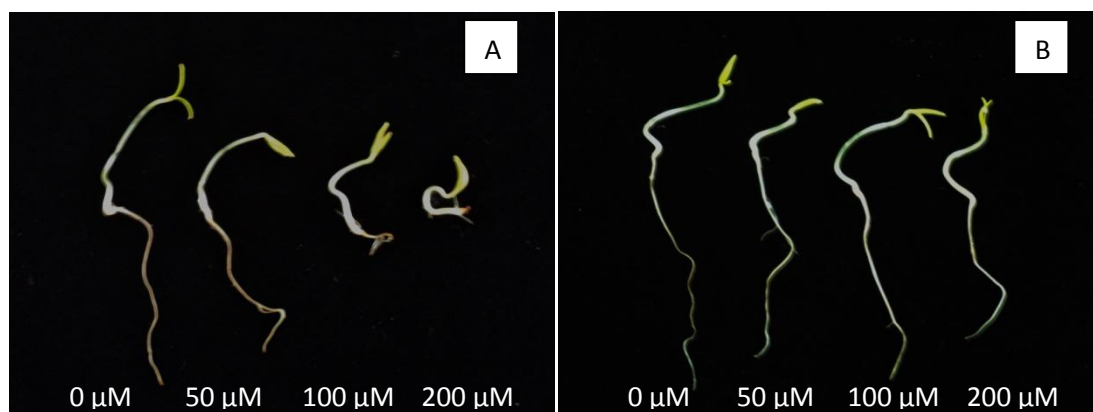


Figura 7. Plántulas de pimienta cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre (A) y de potasio (B).

2. Efecto del cobre sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de pimienta.

Crecimiento de la raíz en pouches, en presencia de cobre.

Las mediciones periódicas de la longitud de las raíces realizadas con intervalos de 24 horas, mostraron que en los primeros 5 días las distintas concentraciones de cobre no afectaron el crecimiento de la raíz. A partir de este momento se comenzó a observar una inhibición en el crecimiento de la raíz a medida que aumentó la concentración de cobre, por este motivo si analizamos el crecimiento acumulado en cada concentración no se observan diferencias significativas (figura 9, gráfico 8). Sin embargo, el análisis del último intervalo

de crecimiento muestra que las dos concentraciones más altas de Cu redujeron significativamente el crecimiento de la raíz (gráfico 8).

Según Martínez-Trujillo et al. (2013), las respuestas del crecimiento de las raíces de *Arabidopsis thaliana* al estrés generado por Cr(VI) demostraron que: (a) la tolerancia al estrés cuando éste se presenta de manera repentina, fue mayor en plantas con más días de desarrollo, (b) la mayor tolerancia se observó cuando el estrés se presentó de manera gradual en un medio con Cr(VI), y (c) las raíces laterales nuevas, formadas in situ en el medio con el metal, siempre son más tolerantes al estrés en relación a la raíz primaria y raíces laterales preexistentes. Si bien las respuestas morfogénicas de las plantas al efecto de los metales son similares en diferentes especies vegetales, la vía particular por la que se llega al cambio de la arquitectura de la raíz puede tener variaciones según la especie (Liu et al., 2005). Por ejemplo, en plantas de tabaco (*Nicotiana tabaco*) de 5 días de edad, con raíces laterales, en medios suplementados con Cr(VI), la raíz primaria continuó creciendo, las raíces laterales previamente formadas detuvieron su crecimiento y se indujo la formación de raíces laterales nuevas (Cervantes-García et al., 2011). De manera que, mientras la raíz primaria del tabaco es más tolerante al estrés con relación a la de *A. thaliana*, las raíces laterales previamente formadas son más sensibles en el tabaco y en ambos casos las raíces laterales nuevas son más tolerantes al crecimiento en Cr(VI). En nuestro ensayo, a medida que pasaba el tiempo de exposición al metal se observó también una disminución en la formación de raíces laterales en la mayor concentración de cobre (200 μM), en coincidencia con Sheldon & Menzies (2005) quienes trabajaron con *Chloris gayana* y observaron que a medida que aumentaba la concentración de cobre aumentaba el daño en el cutícula radical mientras que disminuía el número y la longitud de los pelos radicales, así como las raíces laterales. Estas modificaciones se apreciaron ya en concentraciones de 0,22 μM , dosis bastante más bajas de las aquí ensayadas. La reducción en el número y la longitud de los pelos radicales y el daño a la cutícula radical (engrosamiento y agrietamiento) serían las primeras evidencias de toxicidad por cobre, seguida del daño a los meristemas. Estas alteraciones llevan indirectamente a una modificación de la arquitectura de la raíz, que influye en la capacidad de la planta para absorber el agua y los nutrientes del suelo (Chen et al., 2000; Zhang et al., 2009). En un suelo con bajo contenido hídrico, la superficie de raíces, la longitud de las mismas y la proliferación de pelos radicales es crítica para la exploración del suelo y la absorción de agua y nutrientes y en definitiva para el crecimiento de las plantas.

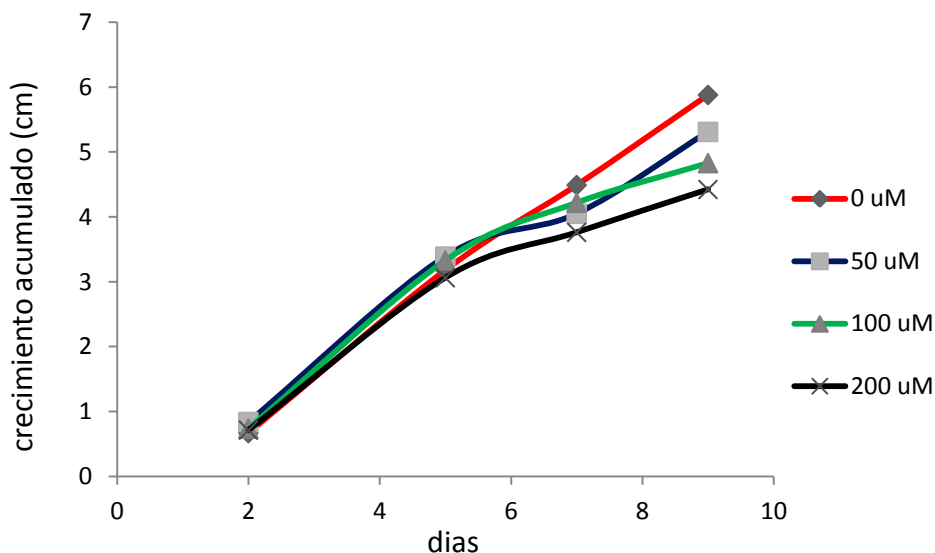


Gráfico 8. Crecimiento acumulado de la raíz de plántulas de pimiento cultivadas en pouches en presencia de distintas concentraciones de cobre.

Al analizar el patrón proteico de las raíces de las plántulas de pimiento que crecieron en pouches con diferentes concentraciones de cobre, se observó arriba de la banda de 94 kDa de peso molecular una banda en el tratamiento control, sin cobre, y en el tratamiento de 50 μM . Esta banda no se observó en los materiales de raíces provenientes de las plantas cultivadas en las concentraciones más altas del metal (100 y 200 μM). También se observó debajo de 94 kDa una banda que va degradándose a medida que aumenta la concentración de cobre (figura 8).

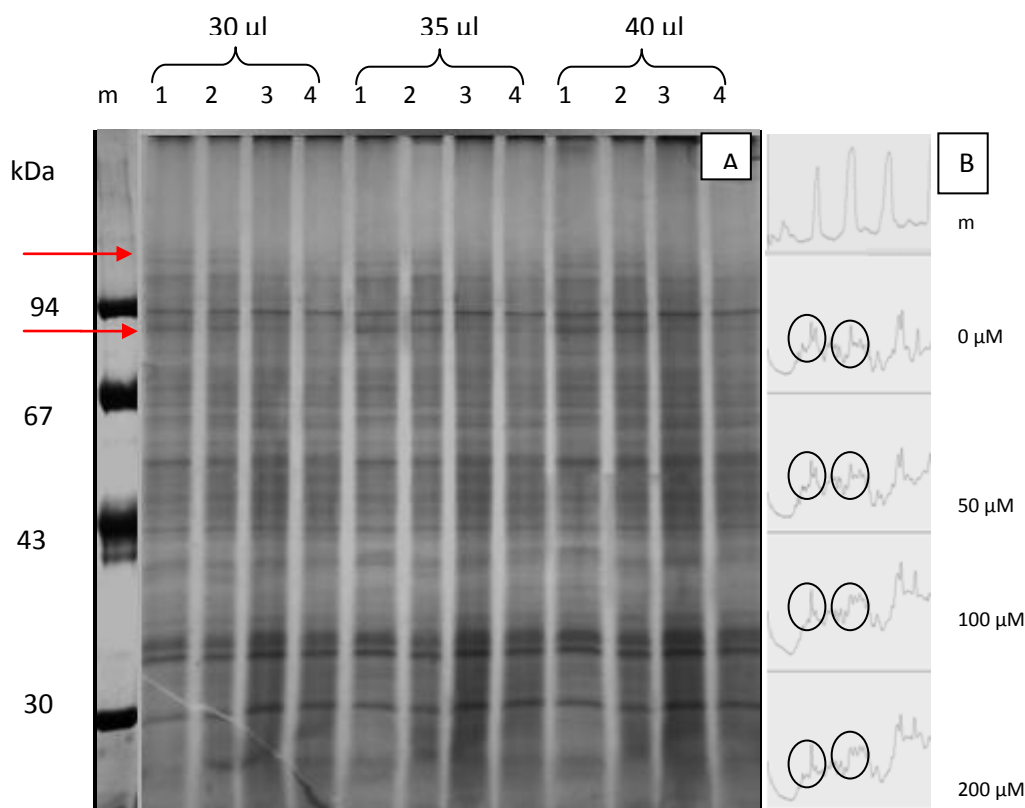


Figura 8. Patrón proteico de raíces de plántulas de pimienta cultivadas en pouches en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0 μ M, 2: 50 μ M, 3: 100 μ M y 4: 200 μ M de CuSO_4 (A). Densitograma donde los picos representan las bandas del marcador de peso molecular y las concentraciones de cobre ensayadas (B).

Según diversos trabajos, a altas concentraciones, el cobre no sólo inhibe la germinación de las semillas y reduce el crecimiento de las plántulas sino que también modifica el patrón proteico en ciertas plantas (Rauser & Curvetto, 1980; Nagalakshmi & Prasad, 2001; Hall, 2002; Lou et al., 2004). Yang et al. (2007) encontraron que la expresión de proteínas de defensa se incrementó gradualmente durante la germinación de semillas de arroz en presencia de cobre. En los estudios realizados por Zhang et al. (2009), los cambios producidos en los patrones SDS-PAGE de embriones tratados con cobre sugieren que, en los mecanismos de tolerancia, están involucradas proteínas de bajo peso molecular (12 a 20 kDa), estos autores identificaron 16 proteínas en respuesta al cobre que participarían en los mecanismos de toxicidad y tolerancia a este metal. Se requieren estudios bioquímicos y genéticos para investigar la relación entre el estrés producido por el cobre y la expresión de estas proteínas en respuesta a la toxicidad por metales pesados.

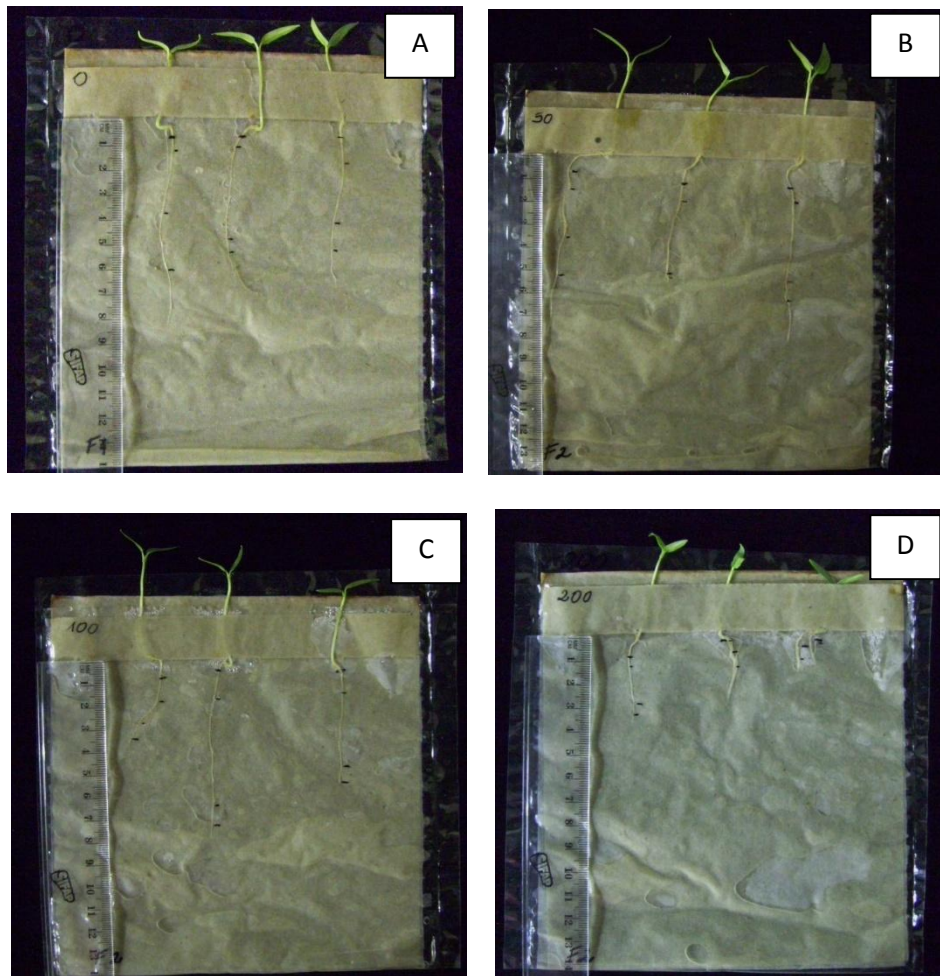


Figura 9. Plántulas de pimiento cultivadas en pouches en presencia de distintas concentraciones de cobre: A: 0 μM , B: 50 μM , C: 100 μM y D: 200 μM .

3. Efecto del cobre en la micorrización de plántulas de pimiento.

Inoculación en presencia de cobre.

En pimiento, la micorrización aumentó con el tiempo y fue mayor con *Rhizophagus intraradices* que con *Funneliformis mosseae*. A los 40 días después de la siembra, la micorrización fue muy baja, alcanzando valores de 10% en FM y 30% en RI y disminuyó al aumentar la concentración de cobre. A los 60 días después de la siembra se alcanzó valores de 25% en FM y 50% en RI, siendo estos los valores que corresponden al control sin cobre o a bajas concentraciones

del metal. A los 90 días, los máximos valores observados alcanzaron el 50% en FM y 70% en RI, disminuyendo con el aumento de la concentración de cobre. En la máxima concentración ensayada, no se observó micorrización con ninguno de los inóculos demostrando el efecto negativo del cobre sobre este proceso (tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de micorrización de plantas de pimienta inoculadas con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices*, determinado a los 40, 60 y 90 días después de la siembra.

Cu (µM)	<i>Funneliformis mosseae</i>			<i>Rhizophagus intraradices</i>		
	40 días	60 días	90 días	40 días	60 días	90 días
0	10a	25a	40b	20b	50a	60ab
5	5b	20a	40b	30a	50a	70a
25	0b	20a	50a	20b	50a	55b
50	0b	20a	40b	10c	40b	50b
100	0b	0b	30bc	10c	40b	45b
500	0b	0b	30bc	0d	0c	40bc
1000	0b	0b	0c	0d	0c	0c

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

En trébol, también se observó un mejor comportamiento del hongo *R. intraradices*. A los 40 días se cuantificó 45% de micorrización en 50 µM de cobre, mientras que el máximo porcentaje de micorrización con *Funneliformis mosseae* fue de 20% en 25 µM. A los 60 días después de la siembra, la micorrización aumentó con los dos inóculos, alcanzando valores de 60% y 40% con *Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae* respectivamente. A los 90 días se determinó 65% y 60% con *Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae* respectivamente en 5 µM de cobre, al aumentar la concentración del metal, la micorrización disminuyó y del mismo modo que en pimienta, se observó que en 1000 µM la micorrización fue nula con ambos inóculos (tabla 3). En la figura 10, se observan las distintas estructuras del hongo, hifas, vesículas y esporas, luego de teñir las raíces de pimienta con azul de Tripán en lactofenol.

Tabla 3. Porcentaje de micorrización de plantas de trébol inoculadas con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices*, determinado a los 40, 60 y 90 días después de la siembra.

Cu (μM)	<i>Funneliformis mosseae</i>			<i>Rhizophagus intraradices</i>		
	40 días	60 días	90 días	40 días	60 días	90 días
0	10ab	40a	50ab	30ab	50b	65a
5	10ab	35ab	60a	20b	60a	65a
25	20a	40a	45ab	40a	50b	55a
50	10ab	30b	30b	45a	50b	60a
100	10ab	25b	30b	20b	30c	40b
500	0b	0c	30b	0c	0d	40b
1000	0b	0c	0c	0c	0d	0c

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

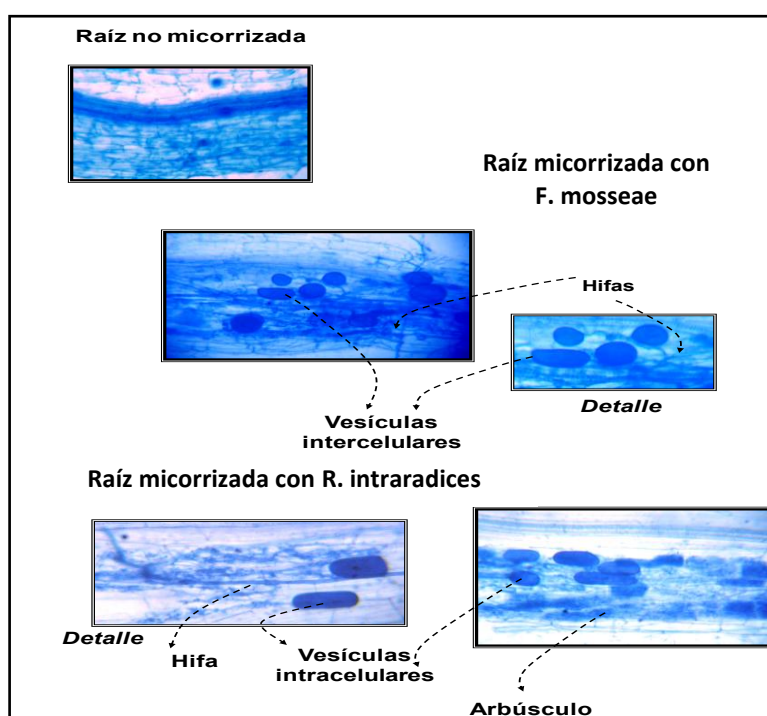


Figura 10. Raíces no micorrizadas y micorrizadas con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices*, después de la tinción con azul de Tripán en lactofenol, donde se observan las estructuras propias del hongo.

Shalaby (2003) demostró que las esporas y las hifas presimbóticas de los hongos micorrícicos son sensibles a los metales pesados, y bajo ciertas condiciones, los metales inhiben la germinación de las esporas y el crecimiento

de las hifas. En estudios previos se demostró que las plantas de pimiento toleran la presencia de cromo en el suelo y que en los tratamientos sin cromo la micorrización fue elevada, confirmando que el pimiento es una especie micotrófica (Ronco et al., 2008). El incremento en la concentración de cromo afectó la colonización y la formación de arbusculos y vesículas de *Glomus mosseae* y *G. intraradices*, este último mostró mayor porcentaje de micorrización aunque se redujo con el incremento del metal en el suelo (Ruscitti et al., 2011). La sensibilidad a la toxicidad por cromo fue revelada por la reducción en la formación de arbusculos, seguida por la reducción en la formación de vesículas, la formación de hifas fue la menos afectada. Además altos niveles de Cr afectaron la viabilidad de las hifas, expresada por la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa y fue mayor en *G. intraradices* que en *G. mosseae* (Ruscitti et al., 2011). Resultados similares fueron obtenidos por Pawlowska & Charvat (2004) quienes demostraron que *G. intraradices* fue más tolerante a la presencia de otros metales pesados. Efectos similares, aunque con distintos metales pesados fueron reportados por Rivera-Becerril et al. (2002) quienes observaron que en ausencia de Cd la colonización de *Pisum sativum* fue del 45% mientras que en presencia del metal fue de sólo el 28%. Shalaby (2003) propuso que la resistencia a los metales fue debida a la plasticidad fenotípica más que a cambios genéticos ya que esa tolerancia se pierde después de una generación en ausencia del metal.

Sin embargo Wu et al. (2010) reportaron que la colonización de las raíces de *Cynodon dactylon* creciendo en sitios contaminados con metales fue mayor que en un suelo no contaminado, lo cual reflejaría que los hongos micorrícicos juegan un rol importante en la tolerancia a As, Pb, Zn, Cd y Cu, lo que contrasta con lo encontrado en este trabajo. Del mismo modo, Repetto et al. (2003) indicaron que *Glomus mosseae* aumentó la tolerancia de un genotipo sensible de arveja al Cd a través de la modulación de algunas proteínas de las raíces. En condiciones de invernáculo, los HMA podrían conferir tolerancia a As en *C. dactylon* a través de un incremento en la adquisición de P y la reducción de la traslocación de As hacia los tallos (Leung et al. 2006). Wu et al. (2010) también informaron que un sitio sin contaminación por metales pesados contiene un número significativamente mayor de esporas respecto a uno contaminado con As, Pb, Zn, Cd o Cu, lo que indica que los metales afectarían la producción de esporas de los hongos micorrícicos. Del Val et al. (1999) mostró que el número total de esporas de estos hongos disminuye con el incremento de MP en el suelo. La diversidad de hongos MA también es significativamente menor en presencia de metales en el suelo. Según los estudios de Wu et al. (2010), *Glomus* es el género predominante entre las especies identificadas en sitios contaminados con AS, Pb, Zn, Cd o Cu. Resultados similares se obtuvieron en

aéreas contaminadas con Cu en Brasil (da Silva et al., 2005), norte de Italia (Vallino et al., 2006) y sur de China (Wu et al., 2007).

En este trabajo se observó que en pimiento la longitud de raíz fue afectada a partir de 100 μM en las NM, mientras que en las M, independientemente del inóculo empleado, la longitud máxima de raíz se observó en 50 μM . En general, se observó mayor crecimiento en las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices*. El peso seco de la raíz disminuyó independientemente de la inoculación (tabla 4, cuadro 9 y 10). La altura de las plantas se vio afectada a partir de 100 μM en las NM y a partir de 500 μM y 1000 μM en las micorrizadas con *R. intraradices* y *F. mosseae*, respectivamente. El peso seco de la parte aérea siguió la misma tendencia que la altura (tabla 5, cuadro 11 y 12).

En la mayor concentración de cobre, no se observan diferencias entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas, esto se puede correlacionar con los datos de micorrización, donde se puede observar que el porcentaje de micorrización es cero.

El análisis multivariado mostró que en todos los parámetros analizados las diferencias para el cobre, la micorrización y la interacción de ambos, fueron significativas, lo que indica que la micorrización atenuó el efecto detrimental del cobre en los parámetros analizados.

En coincidencia con este trabajo, en ensayos previos se observó que en ausencia de cromo las plantas que crecieron más fueron las inoculadas con *G. intraradices*. El efecto deletéreo que produjo la presencia de cromo fue menor en las plantas inoculadas comparada con las no inoculadas y en aquellas inoculadas con *G. intraradices* comparadas con las inoculadas con *G. mosseae* (Ruscitti et al., 2011). En coincidencia, Jamal et al. (2006) demostró que el efecto perjudicial del cromo fue más pronunciado sobre el crecimiento de la raíz respecto a los tallos, esto podría deberse a la acumulación del metal en la raíz.

Tabla 4. Longitud y peso seco de la raíz de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices*, a los 90 días después de la siembra.

Cu (µM)	No inoculadas		<i>Funneliformis mosseae</i>		<i>Rhizophagus intraradices</i>	
	Long. raíz (cm)	PS raíz (g/pl)	Long. raíz (cm)	PS raíz (g/pl)	Long. raíz (cm)	PS raíz (g/pl)
0	14,1ab	0,180b	16,5b	0,211a	15,5bc	0,200ab
5	20,7a	0,290a	15,0b	0,200a	15,2bc	0,211ab
25	21,0a	0,271a	15,5b	0,202a	17,9b	0,241a
50	14,3ab	0,110b	18,4a	0,150ab	22,3a	0,142b
100	10,7b	0,020c	13bc	0,062b	14,3bc	0,081bc
500	10,8b	0,011c	11c	0,023b	9,8c	0,082bc
1000	8,4c	0,012c	8,7c	0,022b	8,9c	0,012c

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 9. Análisis de Varianza para longitud de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	10,0979	2	5,04893	8,83	0,0004
B:cobre	1069,6	6	178,267	311,71	0,0000
INTERACCIONES					
AB	295,134	12	24,5945	43,00	0,0000
RESIDUOS	36,03	63	0,571905		
TOTAL (CORREGIDO)	1410,86	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 10. Análisis de Varianza para PS raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,00270966	2	0,00135483	9,96	0,0002
B:cobre	0,661196	6	0,110199	809,74	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0464293	12	0,00386911	28,43	0,0000
RESIDUOS	0,00857384	63	0,000136093		
TOTAL (CORREGIDO)	0,718909	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 5. Altura y peso seco de la parte aérea de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices*, a los 90 días después de la siembra.

Cu (μM)	No inoculadas		<i>Funneliformis mosseae</i>		<i>Rhizophagus intraradices</i>	
	altura (cm)	PS aéreo (g/pl)	altura (cm)	PS aéreo (g/pl)	altura (cm)	PS aéreo (g/pl)
0	22,5a	0,351b	20,5a	0,512a	22,6a	0,488a
5	24,1a	0,498a	22,3a	0,500a	25,1a	0,443a
25	26,8a	0,484a	21,5a	0,414b	23,7a	0,429a
50	25,6a	0,360b	24,5a	0,420b	25,0a	0,430a
100	16,5b	0,112c	23,3a	0,280bc	24,3a	0,258b
500	11,9bc	0,069c	19,4a	0,076c	20,1b	0,224b
1000	9,4c	0,043c	8,7b	0,074c	9,7c	0,047c

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 11. Análisis de Varianza para altura - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	1810,61	2	905,307	34,02	0,0000
B:cobre	3836,13	6	639,355	24,03	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1355,23	12	112,936	4,24	0,0000
RESIDUOS	2794,14	105	26,6109		
TOTAL (CORREGIDO)	9796,12	125			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 12. Análisis de Varianza para PS aéreo - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,46501	2	0,232505	6,89	0,0015
B:cobre	2,08305	6	0,347175	10,28	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,31101	12	0,192584	5,70	0,0000
RESIDUOS	3,54536	105	0,0337653		
TOTAL (CORREGIDO)	8,40443	125			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En trébol, en las plantas no inoculadas, tanto la longitud como el peso seco de la raíz, se afectaron con el agregado de Cu, lo que además fue evidente aún con la concentración más baja. Mientras que en las plantas inoculadas con *F. mosseae*, la concentración más elevada, 1000 μM fue la única que evidenció un efecto sobre los parámetros de crecimiento estudiados. Con *R. intraradices*, la longitud de la raíz comenzó a disminuir en 100 μM , mientras que el peso seco en 1000 μM (tabla 6, cuadro 13 y 14).

La altura de las plantas NM y con FM, disminuyó significativamente a partir de 500 μM ; mientras que las inoculadas con RI no fueron afectadas por el agregado de cobre. El peso seco aéreo de las plantas no inoculadas, se vio afectado a partir de 5 μM , las inoculadas con FM redujeron su peso a partir de 500 μM y las inoculadas con RI no fueron afectadas por el agregado de cobre (tabla 7, cuadro 15 y 16). El ANOVA multifactorial mostró diferencias significativas para el cobre y la micorrización en los parámetros de raíz y también en la interacción del cobre con la micorrización en los parámetros aéreos, ya que las plantas micorrizadas mostraron mejor comportamiento al aumentar la concentración de cobre en el medio.

Tabla 6. Longitud y peso seco de la raíz de plantas de trébol no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices*, a los 90 días después de la siembra.

Cu (μM)	No inoculadas		<i>Funneliformis mosseae</i>		<i>Rhizophagus intraradices</i>	
	Long. raíz (cm)	PS raíz (g/pl)	Long. raíz (cm)	PS raíz (g/pl)	Long. raíz (cm)	PS raíz (g/pl)
0	14,2a	0,010a	13,1a	0,012a	13,0a	0,012a
5	9,0b	0,005b	13,9a	0,010a	14,2a	0,009a
25	9,3b	0,004b	13,4a	0,011a	14,0a	0,008a
50	10,0b	0,005b	12,8a	0,011a	14,1a	0,008a
100	10,6b	0,005b	11,5a	0,010a	10,0b	0,007a
500	10,3b	0,004b	11,3a	0,009a	10,3b	0,007a
1000	9,1b	0,002b	8,8b	0,005b	9,8b	0,004b

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 13. Análisis de Varianza para longitud raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	181,436	2	90,718	17,85	0,0000
B:cobre	126,575	6	21,0959	4,15	0,0009
INTERACCIONES					
AB	62,1455	12	5,17879	1,02	0,4372
RESIDUOS	533,671	105	5,08258		
TOTAL (CORREGIDO)	903,828	125			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 14. Análisis de Varianza para PS raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,000403479	2	0,000201739	16,05	0,0000
B:cobre	0,000179781	6	0,0000299635	2,38	0,0337
INTERACCIONES					
AB	0,000149699	12	0,0000124749	0,99	0,4614
RESIDUOS	0,00132003	105	0,0000125717		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00205299	125			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 7. Altura y peso seco de la parte aérea de plantas de trébol no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices*, a los 90 días después de la siembra.

Cu (µM)	No inoculadas		<i>Funneliformis mosseae</i>		<i>Rhizophagus intraradices</i>	
	altura (cm)	PS aéreo (g/pl)	altura (cm)	PS aéreo (g/pl)	altura (cm)	PS aéreo (g/pl)
0	12,9a	0,031a	15,0a	0,044a	15,0a	0,030a
5	11,6a	0,022b	14,5a	0,045a	14,7a	0,029a
25	11,4a	0,020b	14,9a	0,038ab	15,0a	0,026a
50	10,0ab	0,020b	15,8a	0,035ab	16,1a	0,029a
100	9,7ab	0,022b	15,5a	0,038ab	15,7a	0,030a
500	8,3b	0,016c	12,8b	0,022b	14,9a	0,032a
1000	8,7b	0,013c	11,4b	0,018b	15,2a	0,029a

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 15. Análisis de Varianza para altura - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	660,323	2	330,162	54,91	0,0000
B:cobre	162,866	6	27,1444	4,51	0,0004
INTERACCIONES					
AB	424,525	12	35,3771	5,88	0,0000
RESIDUOS	631,31	105	6,01248		
TOTAL (CORREGIDO)	1879,03	125			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 16. Análisis de Varianza para PS aéreo - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,0080726	2	0,0040363	24,39	0,0000
B:cobre	0,00299985	6	0,000499976	3,02	0,0091
INTERACCIONES					
AB	0,0055723	12	0,000464358	2,81	0,0023
RESIDUOS	0,0173735	105	0,000165462		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0340183	125			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tolerancia a metales pesados por las plantas micorrizadas podría estar relacionada con la acumulación de metales en zonas metabólicamente menos activas como es el tallo (Arriagada et al., 2005). Esto muestra que el resultado de la micorrización de plantas en suelos contaminados con MP depende de la combinación planta-hongo-metal y está influenciado por las condiciones del suelo.

4. Efecto del cobre sobre el crecimiento de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas.

Evaluación de parámetros morfológicos de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas en presencia de cobre.

En las plantas no inoculadas e inoculadas, la altura fue significativamente mayor en la concentración 0,25 mM de cobre. Esto indica que como el nutriente es esencial en presencia de bajas concentraciones el crecimiento es estimulado. Las plantas sin cobre o con 0,5 y 1 mM mostraron menor altura si bien las diferencias no fueron significativas entre ellas; con 2 mM la altura fue menor que el resto de los tratamientos. Las plantas no inoculadas que crecieron en presencia de una concentración de cobre de 4 mM abscisionaron sus hojas 24 hs después del agregado del cobre y murieron a los pocos días, mientras que las plantas inoculadas expuestas a la misma concentración sobrevivieron (figura 11). Si bien las plantas inoculadas se comportaron de la misma manera que las no inoculadas en su respuesta al aumento de la concentración de cobre, estas sobrevivieron aún en presencia de la mayor concentración del elemento (gráfico 9). El análisis multivariado mostró diferencias significativas para el cobre y la micorrización y para la interacción de ambos factores, lo que indica que en las plantas inoculadas la disminución de la altura al aumentar la concentración del metal fue menor (cuadro 17).

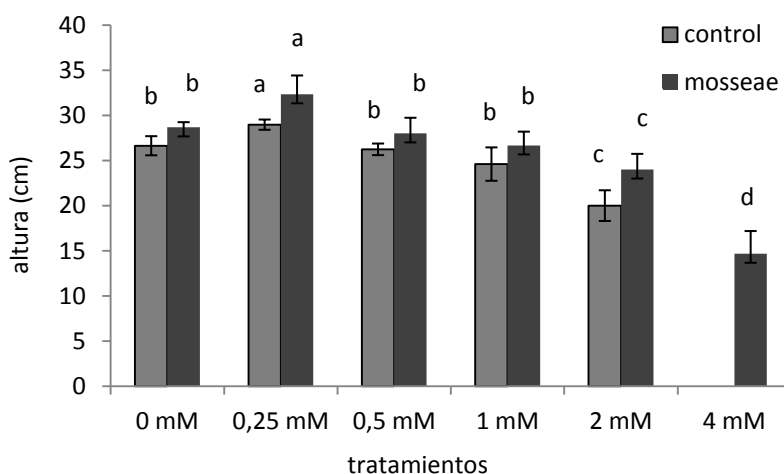


Gráfico 9. Altura de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 17. Análisis de Varianza para altura - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	260,276	2	130,138	89,25	0,0000
B:cobre	3015,78	5	603,156	413,63	0,0000
INTERACCIONES					
AB	252,438	10	25,2438	17,31	0,0000
RESIDUOS	43,7459	30	1,4582		
TOTAL (CORREGIDO)	3353,84	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El número de hojas fue el mismo en las plantas no inoculadas aún en presencia de 1 mM de cobre y en las inoculadas con *F. mosseae* en presencia de 2 mM. En las plantas inoculadas la presencia de cobre en una concentración de 4 mM, produjo la abscisión de un número importante de hojas. Las plantas no inoculadas no sobrevivieron a esta concentración de cobre (gráfico 10). Adicionalmente el análisis multivariado también indicó que la concentración de cobre cumple un rol clave en este proceso, de la misma manera que la micorrización es evidente que cambia la respuesta de las plantas a la presencia del elemento (cuadro 18).

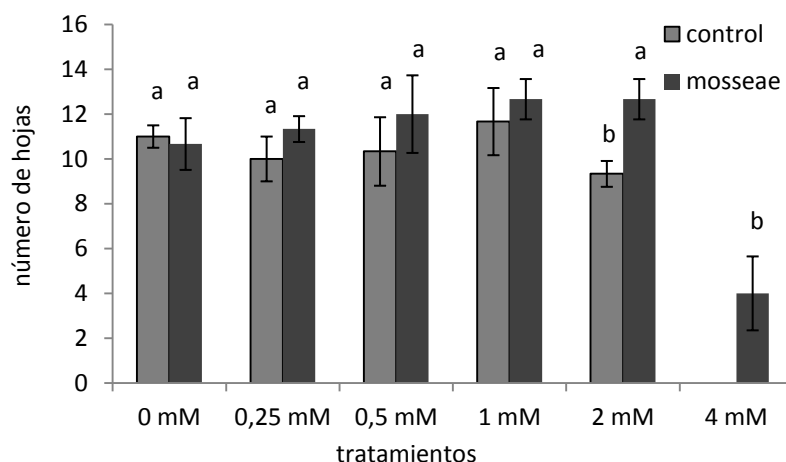


Gráfico 10. Número de hojas de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 18. Análisis de Varianza para número hojas - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	43,465	2	21,7325	15,90	0,0000
B:cobre	564,624	5	112,925	82,63	0,0000
INTERACCIONES					
AB	27,7594	10	2,77594	2,03	0,0654
RESIDUOS	41,0	30	1,36667		
TOTAL (CORREGIDO)	683,523	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

También la longitud de la raíz fue afectada por la presencia de cobre y por la inoculación con micorrizas. La longitud de la raíz de las plantas no inoculadas fue mayor que de las plantas inoculadas, en concentraciones de cobre de hasta 1 mM, sin embargo vale la pena destacar que las diferencias no fueron significativas.

En las plantas inoculadas con *F. mosseae* la longitud de la raíz fue menor en presencia 4 mM de cobre (gráfico 11). Según el análisis multivariado las diferencias significativas se observaron en el cobre y en la interacción entre el cobre y la micorrización (cuadro 19).

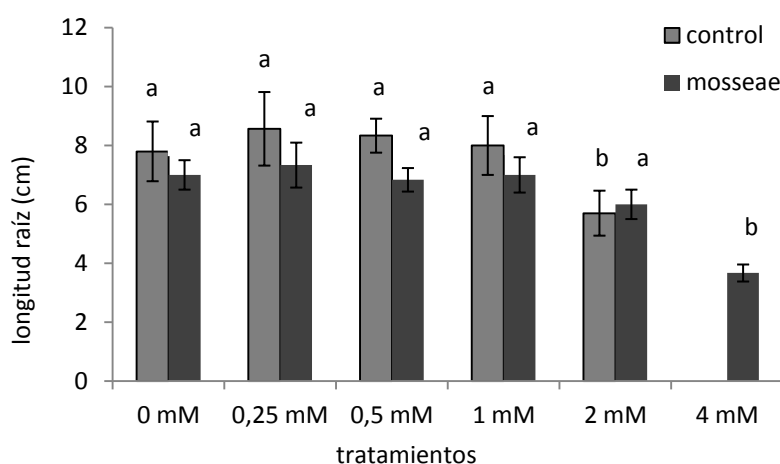


Gráfico 11. Longitud de raíz de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 19. Análisis de Varianza para longitud de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,133735	2	0,0668676	0,23	0,7924
B:cobre	251,252	5	50,2504	176,20	0,0000
INTERACCIONES					
AB	37,8152	10	3,78152	13,26	0,0000
RESIDUOS	8,55558	30	0,285186		
TOTAL (CORREGIDO)	262,169	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El área foliar fue mayor en las plantas micorrizadas que en las plantas no inoculadas en todas las concentraciones. En las plantas no inoculadas, el área foliar no mostró diferencias significativas hasta 1 mM de cobre, mientras que en las plantas micorrizadas las diferencias significativas se dan a partir de 4 mM.

Al igual que en otros parámetros analizados, se observó que en las plantas micorrizadas existe un umbral de tolerancia al cobre más alto que en las plantas no inoculadas (gráfico 12). El análisis multivariado del área foliar presentó diferencias significativas en el cobre, la micorrización y la interacción de ambos factores, dado que al aumentar la concentración del metal el efecto negativo es menor en las plantas inoculadas (cuadro 20).

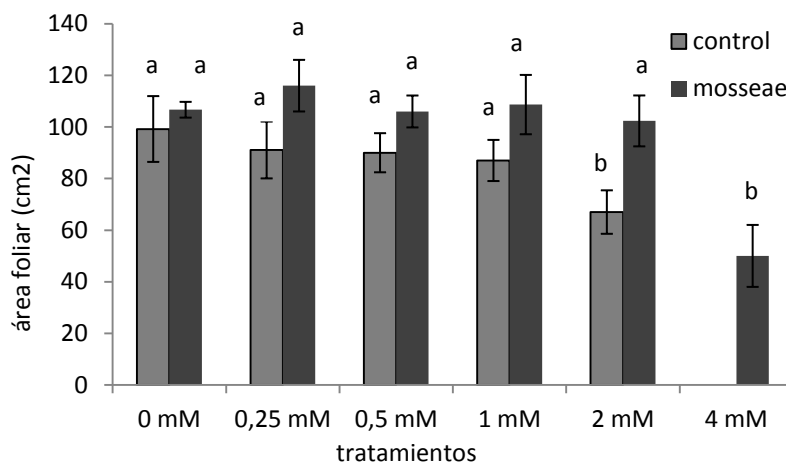


Gráfico 12. Área foliar de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 20. Análisis de Varianza para AF - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	8074,83	2	4037,42	30,59	0,0000
B:cobre	37940,9	5	7588,18	57,49	0,0000
INTERACCIONES					
AB	3224,63	10	322,463	2,44	0,0286
RESIDUOS	3959,96	30	131,999		
TOTAL (CORREGIDO)	51747,2	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El peso seco aéreo de las plantas micorrizadas fue mayor que el de las no inoculadas. El efecto del cobre en las plantas no inoculadas e inoculadas se observó a partir de 2 mM, aunque las micorrizadas con *F. mosseae* se comportaron como más tolerantes en 2 y 4 mM de cobre (gráfico 13). Según el análisis multivariado este parámetro se comportó igual al área foliar (cuadro 21).

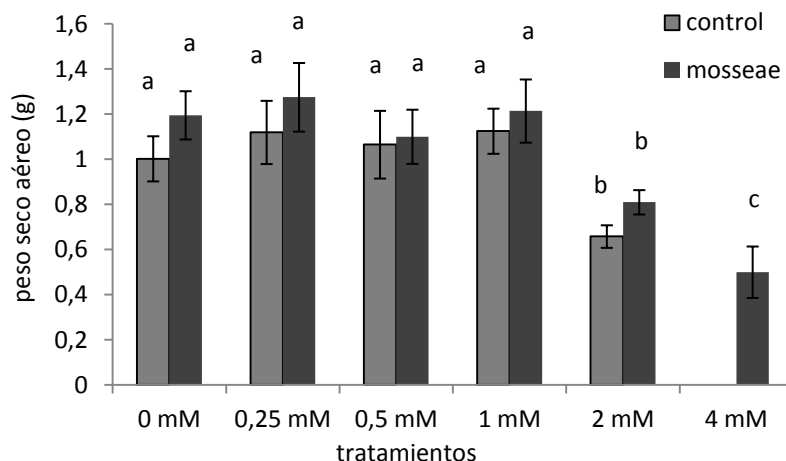


Gráfico 13. Peso seco aéreo de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 21. Análisis de Varianza para PS aéreo - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	6036,2	2	3018,1	5,49	0,0093
B:cobre	67097,1	5	13419,4	24,41	0,0000
INTERACCIONES					
AB	12338,3	10	1233,83	2,24	0,0426
RESIDUOS	16492,0	30	549,733		
TOTAL (CORREGIDO)	98470,2	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El peso seco de la raíz fue distinto en las plantas micorrizadas y no micorrizadas solamente cuando las mismas crecieron en presencia de 2 mM de cobre. En las plantas no inoculadas se observó que a partir de una concentración de cobre de 1 mM se produjo una significativa caída del peso seco de la raíz. En cambio en las plantas inoculadas con *F. mosseae* la caída del peso seco de la raíz sólo ocurrió en concentraciones de cobre superiores a 2 mM, ya que sólo se vio afectado con la máxima concentración de cobre (gráfico 14). El análisis multivariado mostró diferencias significativas en la micorrización y el agregado de cobre y en la interacción de ambos, demostrando el efecto moderador de la inoculación sobre este parámetro (cuadro 22).

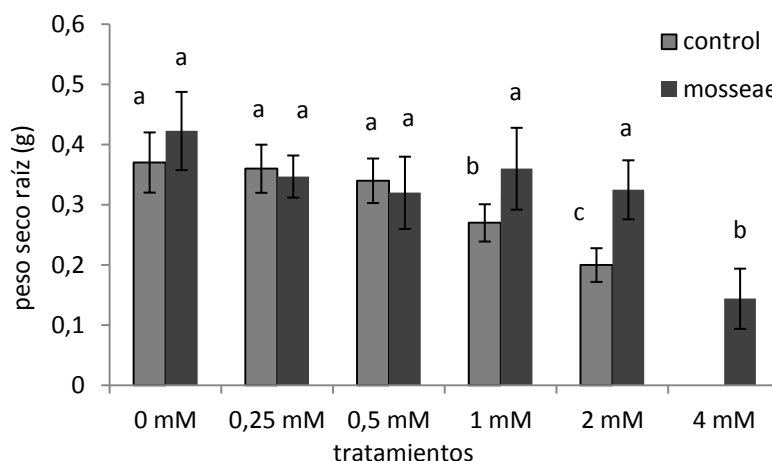


Gráfico 14. Peso seco de raíz de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 22. Análisis de Varianza para PS de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,0431343	2	0,0215671	12,56	0,0001
B:cobre	0,548642	5	0,109728	63,90	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0655672	10	0,00655672	3,82	0,0021
RESIDUOS	0,0515136	30	0,00171712		
TOTAL (CORREGIDO)	0,688703	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El peso seco total en realidad fue un reflejo de los valores observados en el peso seco de la parte aérea, es decir, no se observaron diferencias de peso significativas entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas cuando estas se cultivaron en presencia de bajas concentraciones de cobre. Sólo se observaron diferencias significativas cuando la concentración de cobre en el medio fue 2 mM. En cuanto a la mayor concentración de cobre (4 mM) se observó que las plantas inoculadas sobrevivieron a esta cantidad del elemento en el suelo (gráfico 15). Según el análisis multivariado el peso seco presentó diferencias significativas en el cobre, la micorrización y la interacción de ambos, lo que evidencia el efecto moderador de la micorrización en este parámetro (cuadro 23).

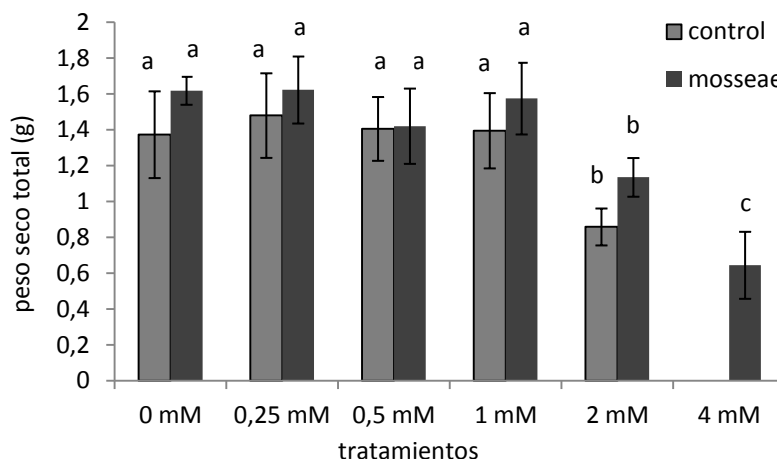


Gráfico 15. Peso seco total de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 23. Análisis de Varianza para PS total - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	5984,92	2	2992,46	5,44	0,0096
B:cobre	75354,9	5	15071,0	27,42	0,0000
INTERACCIONES					
AB	13451,0	10	1345,1	2,45	0,0284
RESIDUOS	16488,1	30	549,603		
TOTAL (CORREGIDO)	106804,	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Malekzadeh et al. (2012) reportaron resultados similares a los encontrados en este trabajo ya que encontraron que el peso seco de raíces y tallos de plantas de tomate se incrementó en presencia de hongos micorrícicos creciendo en solución nutritiva con elevadas concentraciones de cobre. Estos autores atribuyen el beneficio de la simbiosis al aumento en la absorción de P por los hongos micorrícicos. Ott et al. (2002) destacaron que la inhibición del crecimiento en plantas con altos niveles de cobre fue debida a la interferencia que hace el cobre sobre la absorción del P. Ellos también encontraron que en sitios contaminados con MP la inoculación con HMA incrementó la biomasa de las plantas aún en presencia de elevados niveles de cobre en el suelo. Según Rabie (2005), el peso seco de plantas de poroto rojo y de trigo fueron significativamente afectados por la contaminación y negativamente correlacionados con la presencia de MP en el suelo. Sin embargo, la inoculación con HMA influyó significativamente sobre el crecimiento de las raíces y de los tallos, a vista de los valores de pesos secos de ambas especies, en donde la presencia del hongo morigeró los efectos inhibitorios de los MP, resultados

similares a los encontrados en este trabajo (figura 11). Diversos autores reportaron el efecto benéfico de la inoculación con micorrizas sobre el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con MP (Gaur & Adholeya, 2004; Ruscitti et al., 2011). Este efecto protector podría estar relacionado con la capacidad de adsorción o unión de los metales a la biomasa fúngica asociada a las raíces de las plantas hospedantes, lo cual podría minimizar o excluir la entrada de los metales a la planta (Cairney & Meharg, 1999). Si bien el porcentaje de micorrización se redujo ligeramente en presencia de metales pesados, los resultados muestran que los HMA siguen activos en presencia de metales pesados. Estos resultados coinciden con los descritos por Leyval et al. (1995); Hildebrandt et al. (1999); Vogel-Mikus et al. (2005) quienes encontraron que la sensibilidad de los HMA a los MP se manifiesta con una reducción en la germinación de esporas, el crecimiento de las hifas o la colonización de las raíces.

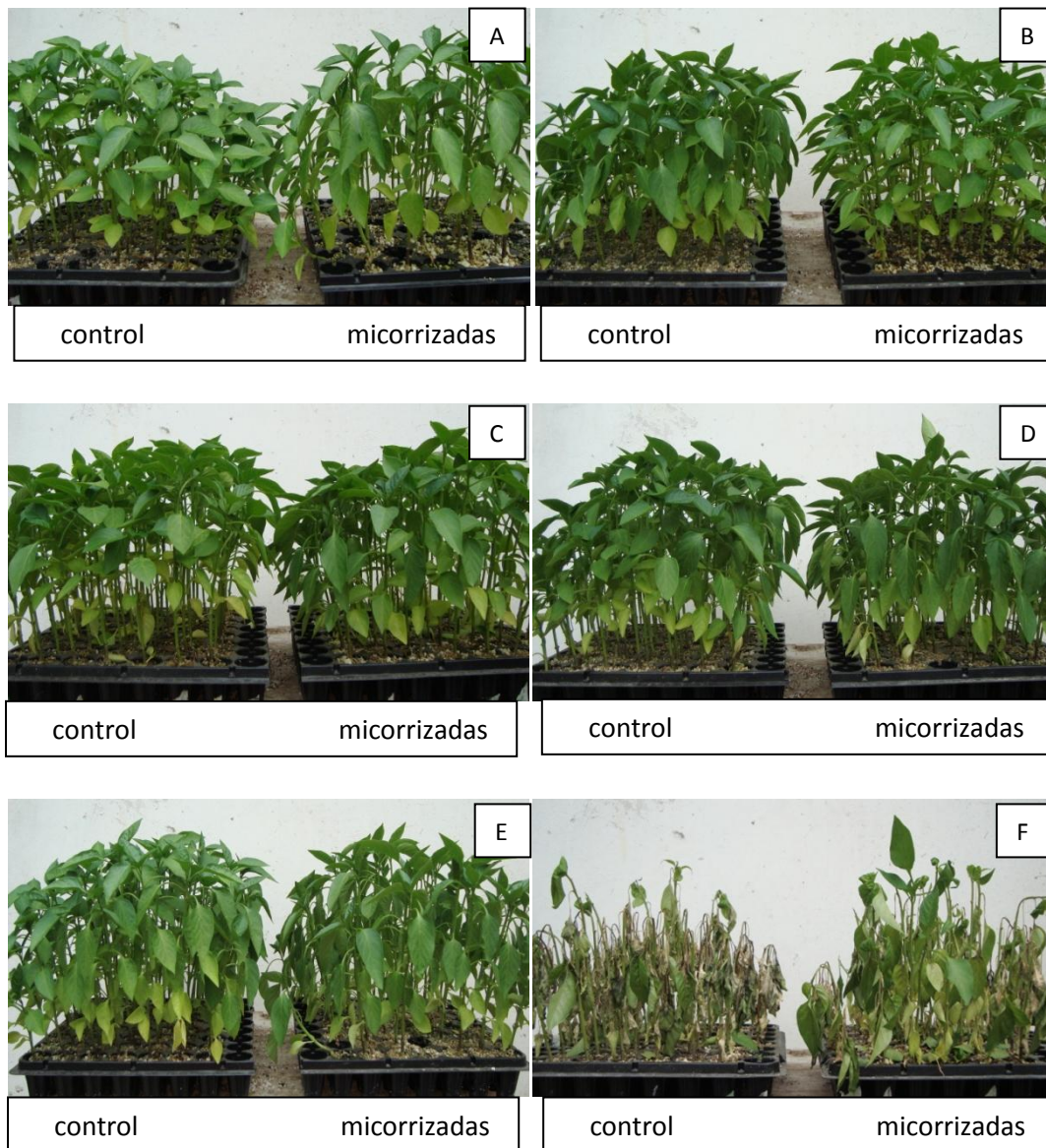


Figura 11. Plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre; A: 0 mM; B: 0,25 mM; C: 0,5 mM; D: 1 mM; E: 2 mM y F: 4 mM de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

5. Efecto del cobre sobre la fisiología de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas.

Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en condiciones de hidroponía.

El índice mitótico, expresado como el porcentaje de células en mitosis sobre el total de células observadas, disminuyó al aumentar la concentración de cobre en la solución. También se observó que las plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae* presentaron, en general, valores de índice mitótico más bajos que las plantas sin inocular (tabla 8). Los bajos valores de índice mitótico en las concentraciones más altas de cobre, explican la baja tasa de crecimiento de las raíces como se pudo observar en los anteriores experimentos.

Tabla 8. Índice mitótico de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae*, determinado 24 horas después del agregado de cobre a la solución nutritiva.

Cu (µM)	Índice mitótico (%)	
	No inoculado	<i>Funneliformis mosseae</i>
0	5,0aA	3,4aB
10	3,7bA	1,9bB
50	1,8bcA	2,1bA
100	1,3cA	1,3cA
200	1,1cA	0,7dA
1000	0,2dA	0,4dA

Se presentan los valores promedio, letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en la columna, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas en la fila ($p < 0,05$).

Los resultados de este trabajo concuerdan con los reportados por Ronco et al. (2008) quienes observaron en plantas de pimiento que la inoculación con *G. mosseae* disminuyó el índice mitótico en todos los tratamientos, en este caso, con diferentes concentraciones del herbicida glifosato. A mayor concentración del herbicida, correspondió un menor índice mitótico, de la misma manera en este trabajo se encontró que el índice mitótico disminuyó al aumentar el estrés por cobre. Estos resultados coinciden con los descritos por Fusconi et al. (1999) que encontraron que la micorrización con *G. mosseae* afectó la actividad mitótica de las células meristemáticas. Según los estudios realizados por Martínez Trujillo et al. (2009) la actividad mitótica de la raíz primaria de *Arabidopsis* no fue afectada por concentraciones de cobre en el orden de 0 hasta 65 µM, mientras que la actividad se perdió en presencia de 80 y 90 µM. En las raíces laterales la actividad mitótica fue normal con 65 µM de cobre y disminuyó con

80 y 90 μM del elemento, lo que sugiere que si bien el crecimiento es afectado por la presencia del cobre, éste continúa y no se pierde por completo. El mismo autor describe que el crecimiento de la raíz primaria se inhibe gradualmente conforme se aumenta la concentración de cobre y en las condiciones experimentales utilizadas a 90 μM se inhibió por completo.

En este trabajo, a pesar que el cobre inhibió el crecimiento de la raíz primaria, las plantas compensaron esto desarrollando abundantes raíces laterales, lo que resultó en una alteración de la arquitectura de la raíz. Del mismo modo, Elizarrarás (2005) y Ortiz-Castro et al. (2007) demostraron que el aluminio y el cromo, en concentraciones mínimas actúan inhibiendo el crecimiento de la raíz principal de las plantas, las que desarrollaron raíces laterales en una respuesta similar a la observada en estos ensayos en que se adicionó cobre al medio. Esta estrategia posiblemente le permite a las plantas aumentar la superficie del sistema radical para contrarrestar el efecto que tiene la presencia de los metales sobre la raíz principal y de esta manera se mantiene la tasa de absorción de nutrientes. En las condiciones experimentales utilizadas la inhibición del crecimiento de la raíz primaria se correlacionó con la disminución de la actividad mitótica. Alteraciones celulares similares han sido reportadas en plántulas de maíz sumergidas en una solución suplementada con 50 μM de aluminio (Doncheva et al., 2005).

La conductancia estomática disminuyó al aumentar la concentración de cobre en la solución, a partir de 100 μM de cobre (gráfico 16), esta respuesta puede relacionarse con el daño que produce el metal en las raíces y la consecuente menor absorción de agua y nutrientes de la solución. Ante un balance hídrico desfavorable, una de las primeras respuestas de las plantas es el cierre estomático, o disminución de la conductancia estomática, con el objetivo de reducir la transpiración. En todas las concentraciones ensayadas, las plantas micorrizadas presentaron valores mayores que las plantas no micorrizadas, lo que indicaría que la micorrización atenúa el efecto provocado por el metal pesado. De esta manera las plantas mantienen abiertos los estomas y la producción de biomasa no es afectada (Yano-Melo et al., 1999; Vinit-Dunand et al., 2002; Wu & Xia, 2006). Todo esto fue confirmado por la resistencia estomática, que es la inversa de la conductancia, y mostró el mismo comportamiento (gráfico 17). La temperatura de la hoja aumentó gradualmente acompañando el aumento de la concentración de cobre, aumento que además fue mayor en las plantas no inoculadas. En éstas últimas se observó un aumento significativo de la temperatura a partir de la presencia de cobre en concentraciones de 50 μM y con concentraciones similares o superiores a 200 μM . En las plantas micorrizadas el aumento de temperatura de las hojas se

observó a partir de concentraciones de cobre de 100 μM . El aumento de la temperatura está directamente relacionado con el aumento de la resistencia estomática y esto se debe al efecto refrigerante de la transpiración en las plantas (gráfico 18).

Según el análisis multivariado la conductancia estomática presentó diferencias significativas con la micorrización, las concentraciones de cobre y la interacción de ambos factores (cuadro 24). Mientras que para la resistencia estomática presentó diferencias sólo para la micorrización y el cobre (cuadro 25), y la temperatura para las concentraciones de cobre (cuadro 26).

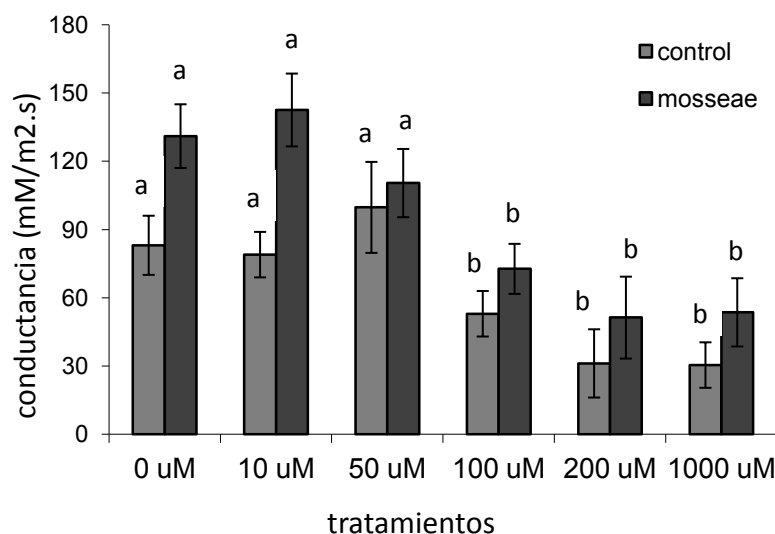


Gráfico 16. Conductancia estomática de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 24. Análisis de Varianza para conductancia estomática - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	15466,0	1	15466,0	22,83	0,0000
B:cobre	57388,0	5	11477,6	16,94	0,0000
INTERACCIONES					
AB	9112,73	5	1822,55	2,69	0,0320
RESIDUOS	32523,4	48	677,571		
TOTAL (CORREGIDO)	114490,	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

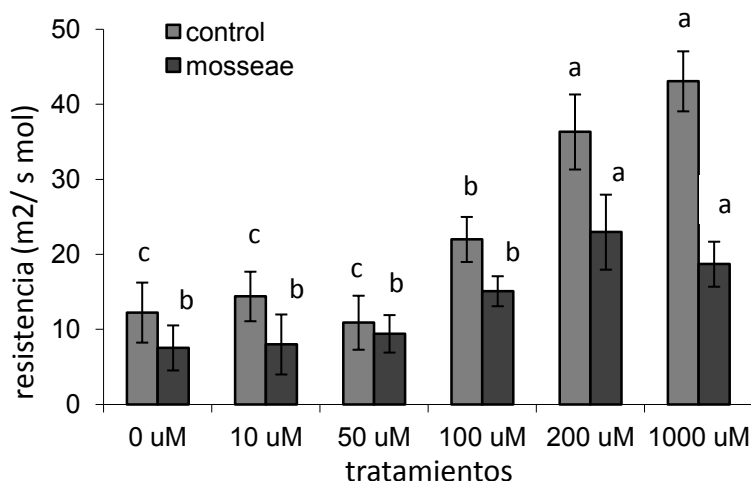


Gráfico 17. Resistencia estomática de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 25. Análisis de Varianza para resistencia estomática - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	1142,21	1	1142,21	13,99	0,0005
B:cobre	5018,54	5	1003,71	12,30	0,0000
INTERACCIONES					
AB	879,884	5	175,977	2,16	0,0747
RESIDUOS	3917,82	48	81,6212		
TOTAL (CORREGIDO)	10958,5	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

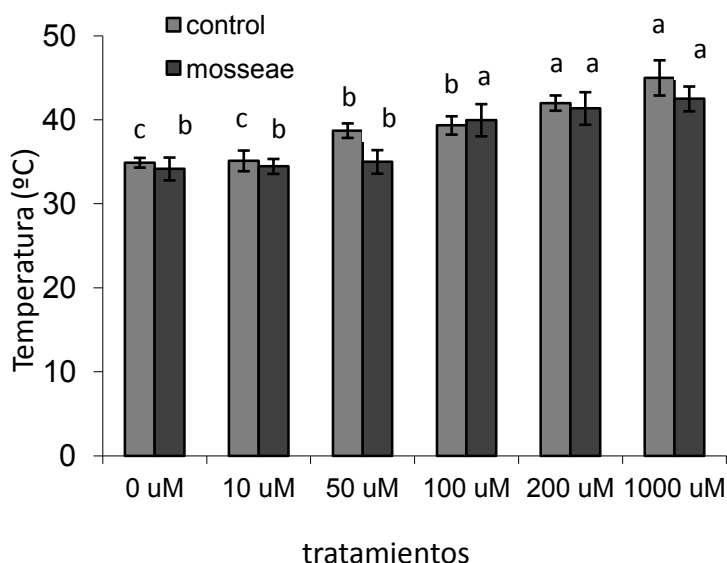


Gráfico 18. Temperatura de hoja de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 26. Análisis de Varianza para temperatura de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,72	1	0,72	0,43	0,5125
B:cobre	622,092	5	124,418	75,03	0,0000
INTERACCIONES					
AB	14,6544	5	2,93088	1,77	0,1333
RESIDUOS	99,492	60	1,6582		
TOTAL (CORREGIDO)	736,958	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Birhane et al. (2012) encontraron que las plantas que conservaron más agua en situación de estrés mantuvieron los estomas abiertos durante un período de tiempo más largo, lo que condujo a un incremento de la asimilación neta. La simbiosis con HFMA genera condiciones que conducen a un mejor estado hídrico de la planta que resulta en una mayor conductancia estomática respecto de las plantas no micorrizadas, lo que coincide con los resultados encontrados en este trabajo, en el que la conductancia estomática fue afectada por la micorrización. Querejeta et al. (2003) encontraron que el uso de hongos micorrícicos provocó un aumento en la conductancia estomática en una especie de crecimiento lento como *Olea europaea ssp. sylvestris* pero no así en una especie de crecimiento rápido como *Rhamnus lycioides*. Por otro lado, Davies et al. (2002) trabajando con girasol observaron que el cromo afectó negativamente la conductancia estomática, resultado similar al encontrado en las plantas de

pimiento cuando se expusieron al cobre en este trabajo. Kastori et al. (1992), describieron en plantas de girasol cultivadas en presencia de Zn, Cu, Pb y Cd resultados similares a los encontrados en este trabajo en lo que hace a la conductancia estomática, más aún estos autores afirmaron que en presencia de estos metales el número de estomas por unidad de área aumentó y el tamaño de los mismos disminuyó concluyendo que el exceso de MP afectó significativamente el status hídrico de las plantas causando un déficit hídrico y subsecuentemente cambios morfológicos y fisiológicos en las mismas.

Cuando se aumentó el cobre en el medio, el índice de verdor disminuyó tanto en las plantas micorrizadas como no micorrizadas. En las no inoculadas se observó una disminución significativa a partir de 50 μM , mientras que en las inoculadas esa reducción se observó a partir de una concentración de 100 μM . En todas las concentraciones de cobre ensayadas las plantas inoculadas con *F. mosseae* que se cultivaron en esos medios presentaron mayores índices de verdor que las plantas no inoculadas, aunque las diferencias no fueron significativas (gráfico 19). Sin embargo, el análisis multivariado mostró diferencias significativas al modificarse las concentraciones de cobre y con la interacción micorrización : cobre (cuadro 27). Estos resultados son similares a los reportados por Yurekli & Porgali (2006) quienes observaron que el contenido de clorofila disminuyó con la presencia de 100 μM de cobre en el medio.

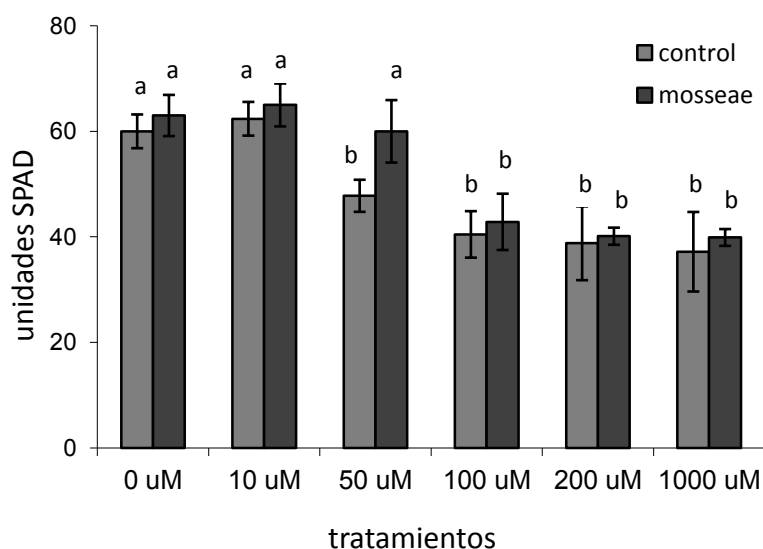


Gráfico 19. Índice de verdor de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 27. Análisis de Varianza para SPAD - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	8,82	1	8,82	0,46	0,5010
B:cobre	3786,35	5	757,27	39,35	0,0000
INTERACCIONES					
AB	339,559	5	67,9118	3,53	0,0073
RESIDUOS	1154,78	60	19,2463		
TOTAL (CORREGIDO)	5289,5	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La determinación de malonildialdehído en tejidos de la raíz presentó valores bajos y no mostró diferencias significativas con las distintas concentraciones de cobre ni con la inoculación (gráfico 20). No se observaron diferencias significativas en el análisis multivariado (cuadro 28).

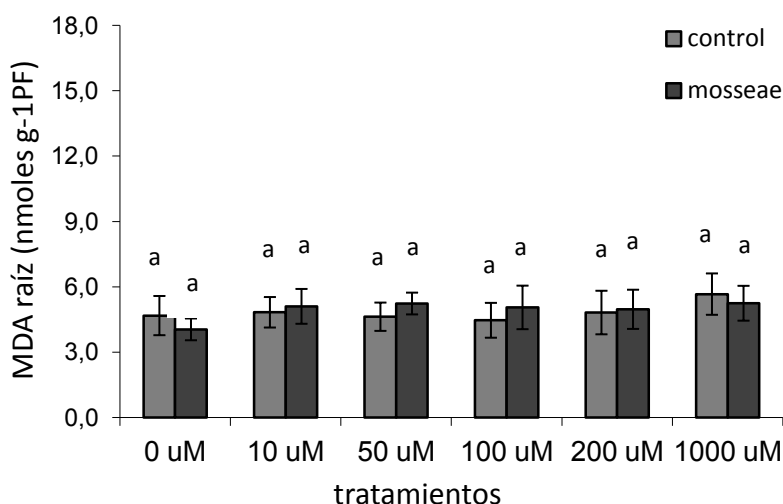


Gráfico 20. Contenido de MDA en raíz de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 28. Análisis de Varianza para MDA de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,743016	1	0,743016	0,76	0,3878
B:cobre	12,545	5	2,509	2,58	0,0529
INTERACCIONES					
AB	9,50248	5	1,9005	1,95	0,1093
RESIDUOS	35,0054	36	0,972373		
TOTAL (CORREGIDO)	57,7959	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El MDA determinado en las hojas presentó valores superiores a los encontrados en la raíz y además se encontraron efectos significativos de la

presencia de cobre y la inoculación. Junto con el aumento de cobre en el medio aumentó el MDA. Más aún, en las plantas no inoculadas se observaron diferencias significativas entre los tratamientos cuando la concentración de cobre fue de 1000 μM , mientras que en las plantas inoculadas esa diferencia significativa se observó a partir de 50 μM . En las plantas cultivadas en presencia de 100, 200 y 1000 μM de cobre, el contenido de MDA de las plantas micorrizadas fue mayor que los controles (gráfico 21). El análisis multivariado indicó diferencias significativas en la interacción micorrización : cobre (cuadro 29).

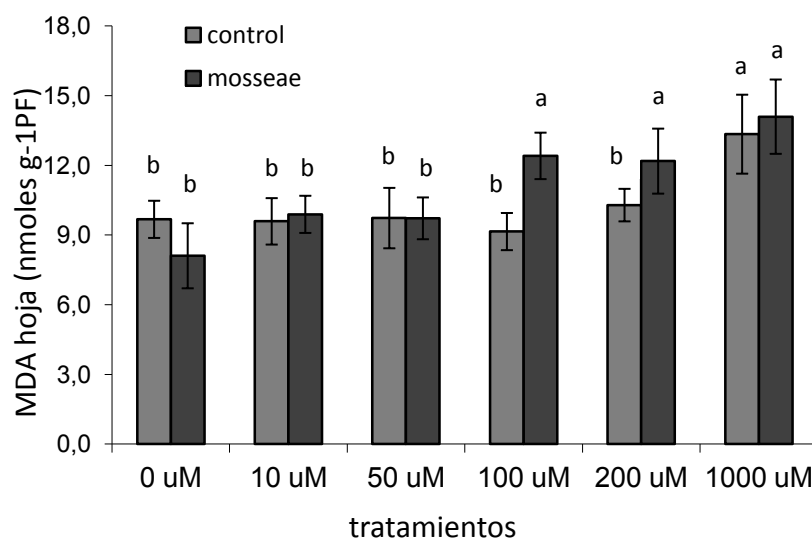


Gráfico 21. Contenido de MDA en hoja de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 29. Análisis de Varianza para MDA de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	6,32273	1	6,32273	1,35	0,2531
B:cobre	47,951	5	9,5902	2,05	0,0953
INTERACCIONES					
AB	92,5021	5	18,5004	3,95	0,0059
RESIDUOS	168,727	36	4,68687		
TOTAL (CORREGIDO)	315,503	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los resultados de este trabajo son similares a los reportados por Muradoglu et al. (2015), que encontró en frutilla que la concentración de MDA en las hojas fue mayor que en la raíz cuando las plantas se cultivaron en

presencia de Cd. Es decir que en pimiento y en frutilla, en las raíces de estas plantas los metales pesados no provocan alteraciones en la membrana de las células de la raíz. En contraposición, Yurekli & Porgali (2006) determinaron en poroto que el incremento en la peroxidación de los lípidos después del tratamiento con 100 μM de cobre fue significativo en raíz, pero no en tallos y hojas.

La conductividad relativa de la raíz, como indicador de daño de las membranas celulares, aumentó al aumentar las concentraciones de cobre y en todos los casos fue mayor en las plantas no inoculadas. En éstas últimas se produjo un aumento significativo a partir de 50 μM , mientras que en las inoculadas con *Funneliformis mosseae* ese aumento se produjo a partir de 100 μM . Las plantas no inoculadas alcanzaron valores mayores al 50%, mientras que las inoculadas no alcanzaron 40%, en la máxima concentración de cobre, lo que indicaría que la micorrización atenuó el daño en las membranas de la raíz (gráfico 22). Lo que estaría confirmando los resultados encontrados en lo que hace a la peroxidación de lípidos de membrana.

La conductividad relativa de las hojas de las plantas de pimiento fue baja y no se modificó con la concentración de cobre ni con la micorrización, alcanzando valores inferiores al 15% (gráfico 23). El análisis multivariado para la conductividad relativa, mostró que en raíz, las diferencias significativas están dadas por la micorrización, el cobre y la interacción de ambos, en hoja no se observaron diferencias significativas y, según los valores alcanzados, no se puede aseverar que las membranas celulares hayan sido dañadas por acción del cobre (cuadros 30 y 31 respectivamente).

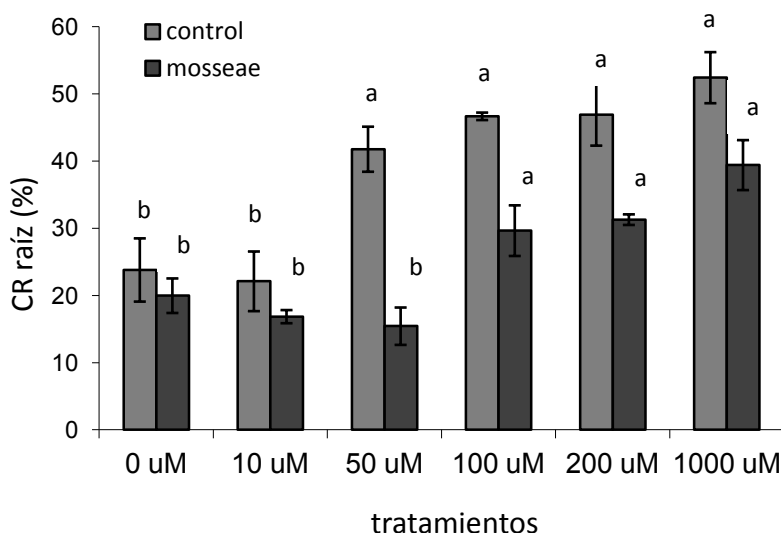


Gráfico 22. Conductividad relativa en raíz de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 30. Análisis de Varianza para CR de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	2189,44	1	2189,44	296,92	0,0000
B:cobre	4416,9	5	883,38	119,80	0,0000
INTERACCIONES					
AB	686,712	5	137,342	18,63	0,0000
RESIDUOS	265,454	36	7,37372		
TOTAL (CORREGIDO)	7558,51	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

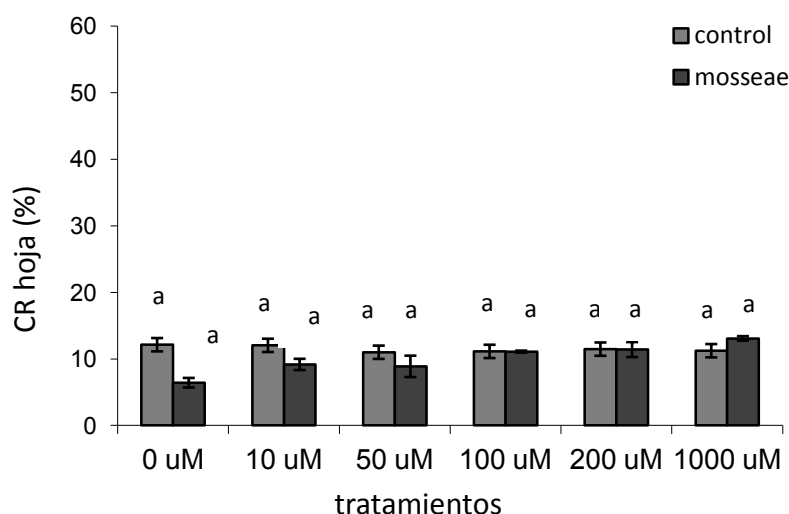


Gráfico 23. Conductividad relativa en hoja de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de

distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 31. Análisis de Varianza para CR de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	26,7569	1	26,7569	23,56	0,1200
B:cobre	43,3528	5	8,67055	7,64	0,0901
INTERACCIONES					
AB	70,6989	5	14,1398	12,45	0,0276
RESIDUOS	40,8799	36	1,13555		
TOTAL (CORREGIDO)	181,688	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los resultados de este trabajo muestran que el cobre afectó la integridad de las membranas celulares, lo que se puso en evidencia por la liberación de electrolitos, que fue significativamente mayor en las plantas no inoculadas que en las inoculadas y en las raíces más que en las hojas, resultados similares fueron reportados por Ruscitti et al. (2011), en plantas cultivadas en presencia de concentraciones tóxicas de cromo en el suelo. Davies et al. (2002) propuso que los primeros efectos sobre las membranas celulares de la raíz por acción del cromo podrían atribuirse al alto potencial de reducción del Cr^{6+} el cual es retenido en las vacuolas y paredes celulares de la raíz, mientras que el Cr que alcanza las hojas es principalmente Cr^{3+} . Resultados similares se observaron en plantas de maíz sometidas a concentraciones elevadas de Cd (Krantev et al., 2008). En el caso del cobre, los iones Cu^{2+} pueden interactuar con los grupos S y N en las proteínas celulares, que de esta manera podrían alterar los canales iónicos de las membranas, lo cual promovería un alto flujo de iones de las células (Bačkor et al., 2007).

El modelo proteico de la hoja fue modificado por la alta concentración de Cu y por la micorrización. El aumento en la concentración de Cu provocó una modificación del perfil proteico comprendido entre los 94 y 67 kDa. Las plantas micorrizadas, en presencia de Cu presentaron un polipéptido de aproximadamente 73 kDa, que sería el resultado de la inoculación y exposición al metal pesado ya que estas bandas no están presentes en las plantas no inoculadas (figura 12). El patrón proteico de la raíz también fue modificado por el Cu y la micorrización. Con el aumento en la concentración de cobre se observó una disminución en el contenido de proteínas. Las plantas micorrizadas presentaron un polipéptido de aproximadamente 112 kDa, que de la misma forma que la proteína de 73 kDa en la parte aérea aparece en respuesta a la micorrización (figura 13).

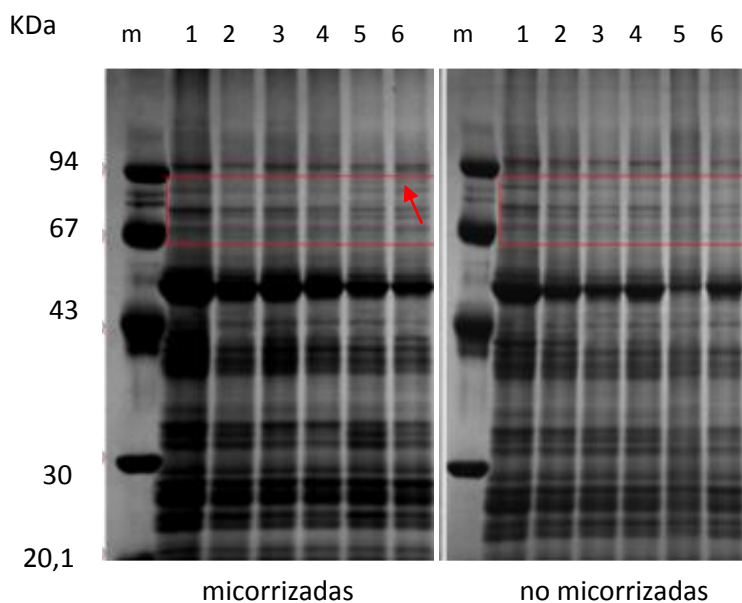


Figura 12. Patrón proteico de hojas de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0 μM , 2: 10 μM , 3: 50 μM , 4: 100 μM , 5: 200 μM y 6: 1000 μM .

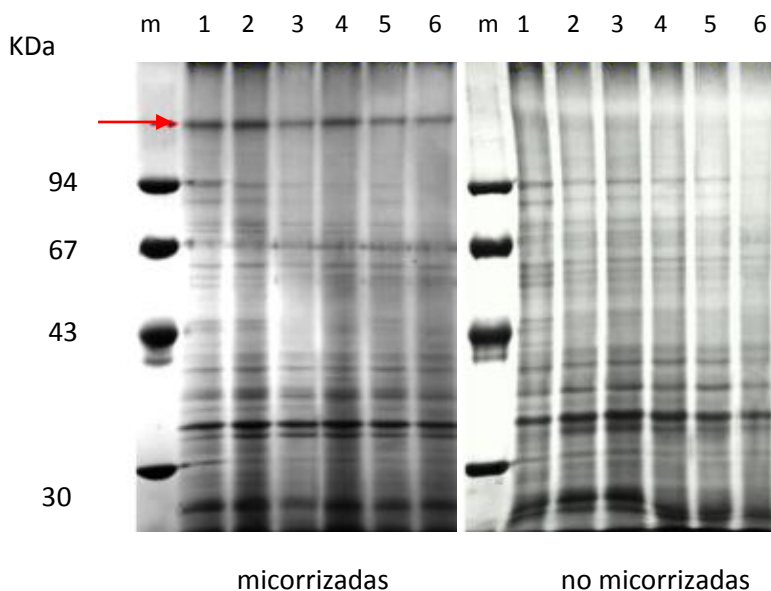


Figura 13. Patrón proteico de raíces de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0 μM , 2: 10 μM , 3: 50 μM , 4: 100 μM , 5: 200 μM y 6: 1000 μM .

Jonak et al. (2004) trabajando con alfalfa expuesta a altas concentraciones de cadmio y cobre, observaron que la detoxificación de los metales pesados estuvo relacionada a cambios en la expresión de genes, síntesis de péptidos y proteínas quinasas. Estos autores encontraron cuatro quinasas que se activan rápidamente por efecto del cobre, mientras que las mismas proteínas también son inducidas por el cadmio, aunque esta respuesta es más lenta. Zhang et al. (2009) encontraron resultados similares en arroz, en donde las elevadas concentraciones de cobre no sólo inhibieron la germinación de las semillas, además indujeron la síntesis de proteínas de bajo peso molecular, las que aparentemente estarían involucradas en mecanismos de tolerancia y respuesta a la toxicidad al cobre. En este trabajo, se observaron cambios en la expresión de proteínas en relación a la presencia de cobre y de la micorrización. Si bien no se realizaron estudios tendientes a identificar la actividad biológica del polipéptido, el hecho de que la presencia del mismo dependa de la presencia del cobre y de la micorrización sugiere que la inoculación con HMA contribuiría a que las plantas toleren concentraciones superiores de cobre. Varios autores han observado en plantas micorrizadas diferencias en el patrón de expresión de proteínas en respuesta a los MP (Ouziad et al. 2005; Hildebrandt et al. 2007) o bajo otros estreses abióticos (Sannazzaro et al., 2007).

El área foliar de las plantas de pimiento cultivadas en hidroponía, disminuyó al aumentar la concentración de cobre. En las plantas no inoculadas se observó una disminución significativa a partir de 50 μM y una caída aún mayor en las plantas cultivadas en presencia de 1000 μM . En las plantas micorrizadas también se produjo una reducción del área a partir de 50 μM y de 200 μM . En todos los tratamientos las plantas micorrizadas mostraron mayor área foliar que las no inoculadas (gráfico 24). El análisis multivariado mostró diferencias significativas en área foliar para micorrización, cobre y la interacción de ambos factores, demostrando que la micorrización atenúa el efecto tóxico del metal en el área foliar (cuadro 32).

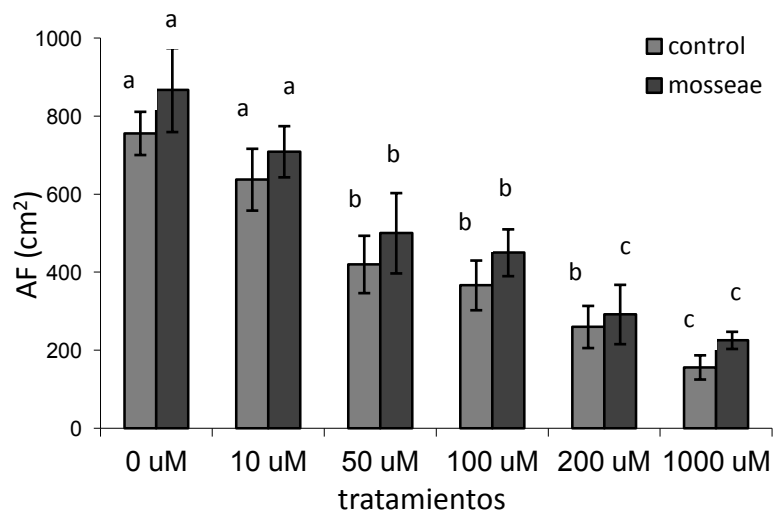


Gráfico 24. Área foliar de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funnelformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 32. Análisis de Varianza para AF - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	67200,3	1	67200,3	16,27	0,0003
B:cobre	1,43987E6	5	287974,	69,72	0,0000
INTERACCIONES					
AB	105460,	5	21092,0	5,11	0,0012
RESIDUOS	148696,	36	4130,44		
TOTAL (CORREGIDO)	1,76123E6	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El peso seco de las plantas cultivadas en hidroponía, disminuyó con el agregado del cobre en la solución, aunque las diferencias fueron significativas a partir de 200 μ M, tanto en las plantas inoculadas como en las no inoculadas (gráfico 25) (figura 14). Según el análisis multivariado las diferencias significativas en el peso seco se observaron con el aumento de la concentración de cobre en la solución (cuadro 33).

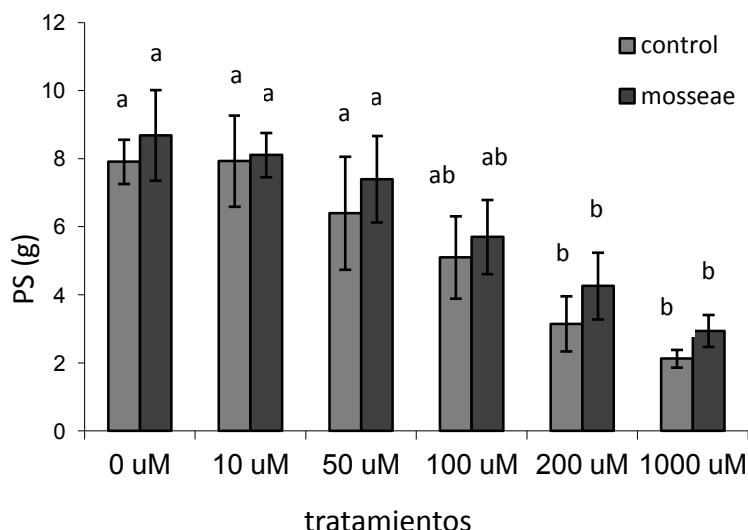


Gráfico 25. Peso seco de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 33. Análisis de Varianza para PS - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	1,91467	1	1,91467	1,23	0,2747
B:cobre	204,026	5	40,8053	26,22	0,0000
INTERACCIONES					
AB	7,22941	5	1,44588	0,93	0,4737
RESIDUOS	56,0319	36	1,55644		
TOTAL (CORREGIDO)	269,202	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Mirlean et al. (2007) en plantas de vid cultivadas en presencia de altas concentraciones de cobre, observaron una disminución en el peso seco y área foliar, sugiriendo que algunos procesos metabólicos podrían ser afectados por las altas concentraciones del metal. Malekzadeh et al. (2012) observaron que la colonización micorrícica hizo que las plantas de tomate acumularan más materia seca y tuvieran un mayor área foliar que las plantas no micorrizadas en presencia de metales pesados, que de la misma forma que los resultados de este trabajo indican que la micorrización promueve el crecimiento de las plantas en esta situación. Malekzadeh et al. (2012) atribuyeron la respuesta a una menor traslocación de los metales pesados hacia los tallos y a la acumulación de estos en las estructuras fúngicas representando una barrera biológica que podría proteger a la planta, en coincidencia con Joner et al. (2000) que encontraron que el micelio de algunos *Glomus* spp. atrapa los metales pesados.

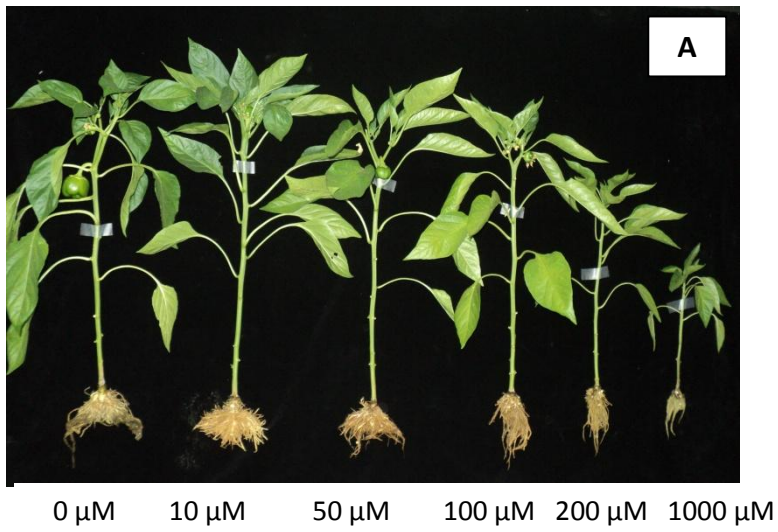
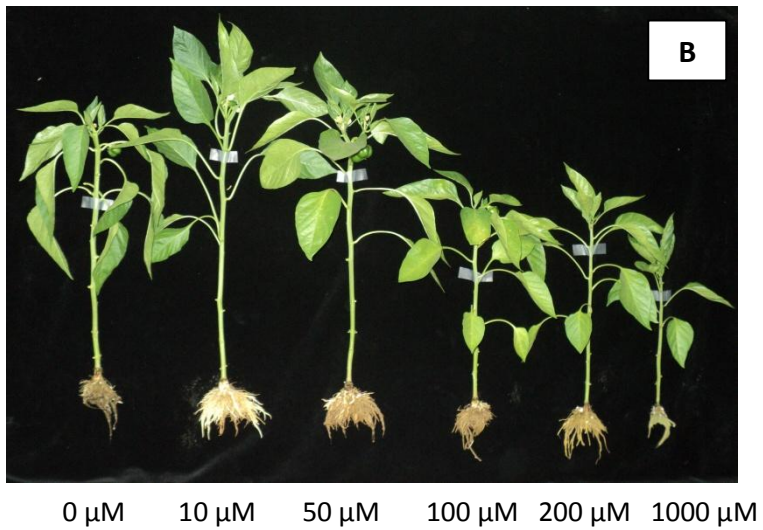


Figura 14. Plantas de pimiento cultivadas en hidroponía en presencia de distintas concentraciones de cobre, (A) no inoculadas, (B) inoculadas y (C) detalle de hoja con síntomas de toxicidad por cobre, expuesta a la máxima concentración (1000 μM).



Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas en presencia de cobre, en suelo.

En un suelo sin Cu, la colonización fue de 48%, 46% y 73,3% para NI, FM y RI respectivamente (tabla 9). El aumento de la concentración de Cu provocó una disminución en el porcentaje de colonización en todos los tratamientos analizados. En las plantas NI el porcentaje de micorrización con 8 mM de Cu fue de 4% mientras que fue de 25% y 58% para FM y RI respectivamente. Estos datos sugieren que la interacción de los hongos nativos es más sensible que los inoculados a la presencia de cobre (tabla 9).

La viabilidad de las hifas expresada como la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) fue de 43%, 42% y 60% para NI, FM y RI respectivamente, en el suelo libre de Cu. El agregado de 2mM de Cu al suelo no afectó la viabilidad de las estructuras fúngicas independientemente del inóculo. El agregado de 8mM de Cu afectó significativamente la actividad de esta enzima que presentó valores de 2%, 21% y 53% para NI, FM y RI respectivamente. La dependencia micorrícica en Cu0 fue de 15 y 22% para FM y RI respectivamente, y aumentó significativamente a 30 y 50% para FM y RI respectivamente, con el incremento a Cu8 en el suelo (tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de colonización (M), porcentaje de hifas viables (SDH) y dependencia micorrícica (DM) de plantas de pimiento no inoculadas (NI) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (FM) o *Rhizophagus intraradices* (RI), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.

Cu (mM)	No inoculadas			<i>Funneliformis mosseae</i>			<i>Rhizophagus intraradices</i>		
	M (%)	SDH (%)	DM (%)	M (%)	SDH (%)	DM (%)	M (%)	SDH (%)	DM (%)
0	48a	43a	-	46a	42a	14,80b	73,3a	60a	21,65bc
2	44a	43a	-	42a	41a	39,52a	66,2a	61a	36,51b
4	36a	33a	-	36a	30ab	18,95b	59a	57a	15,15c
8	4b	2b	-	25b	21b	30,00a	58a	53a	49,77a

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Numerosos estudios han descrito la influencia de las micorrizas sobre la tolerancia de las plantas a los metales pesados, observándose una amplia gama de respuestas. Una de las preguntas que nos hemos planteado en este trabajo es si diferentes especies de HMA son afectadas diferencialmente por la presencia de metales pesados en el suelo. Heggo et al. (1990) y Ruscitti et al. (2011) han descrito que la sensibilidad de los hongos a altas concentraciones de MP se presenta como una reducción o retraso de su habilidad para colonizar las plantas. En este trabajo, *Rhizophagus intraradices* mostró una mayor capacidad de colonización que *Funneliformis mosseae* y mantuvo niveles similares de colonización a 2 y 4 mM de cobre, siendo estos valores más altos que los reportados por Kaya et al. (2009) para *Glomus clarum*; por Ruscitti et al. (2011) y Cekic et al. (2012) para *F. mosseae* y *R. intraradices*, y por Ronco et al. (2008) para *F. mosseae*. Sin embargo, la colonización micorrícica de las raíces de pimiento fue reducida significativamente por la mayor concentración de cobre. Resultados similares fueron descritos por Pawlowska & Charvat (2004) quienes demostraron que *R. intraradices* fue más tolerante en presencia de otros metales. Los resultados de este trabajo demuestran que la habilidad de *R. intraradices* para colonizar las raíces de pimiento disminuye al incrementarse el nivel de cobre. Tal cual era de esperar la viabilidad de las hifas fue mayor en ausencia de cobre y disminuyó en relación directa con el incremento de su concentración. La sensibilidad a la toxicidad por cobre fue reflejada por la reducción de la viabilidad de las hifas que fue mayor en *Funneliformis mosseae* que en *Rhizophagus intraradices* en la medida que el contenido de cobre en el suelo fue mayor. En este trabajo, las plantas de pimiento micorrizadas con *F. mosseae*, *R. intraradices* y las colonizadas por hongos nativos si bien no fueron afectadas por 2 y 4 mM de cobre, si lo fueron por concentraciones mayores como 8 mM. En este contexto, el inóculo nativo fue más afectado que los inóculos de hongos introducidos tal cual lo describió Yruela (2005). Por otro lado, se han reportado en suelos con elevados niveles de cobre, altos niveles de colonización micorrícica, indicando que los HMA son tolerantes a concentraciones relativamente altas de este metal. Sin embargo, la respuesta de las micorrizas arbusculares a los metales pesados no es uniforme y se ha observado gran variabilidad dependiendo de la combinación hongo-planta (Hall, 2002).

La dependencia micorrícica (DM), es decir, la relación entre la biomasa de las plantas micorrizadas y las no micorrizadas, alcanzó valores de 30% y 50% en plantas cultivadas en presencia de la mayor concentración de cobre, con *F. mosseae* y *R. intraradices* respectivamente. Ruscitti et al. (2011) y Davies et al. (2002) presentaron resultados similares en plantas de pimiento y girasol, respectivamente que crecieron en presencia de altos niveles de cobre en el suelo. El valor de DM demostró claramente que el pimiento es afectado por los MP, ya

que, sin cobre la dependencia fue del 15% y 22% para *F. mosseae* y *R. intraradices* respectivamente, lo cual demostró la relación favorable entre el pimiento y el inóculo utilizado.

El peso seco total de las plantas micorrizadas fue mayor que el de las plantas NM independientemente del inóculo utilizado. La presencia de cobre redujo el peso seco total a partir de 4 mM en las plantas inoculadas con FM y RI, mientras que en las NI esa disminución se observó a partir de 2mM. Con 8 mM de Cu, las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* crecieron mas ya que alcanzaron valores de peso seco total 50% mayor que las NI y en las inoculadas con *Funneliformis mosseae* el peso seco fue un 30% mayor (gráfico 26).

El aumento de cobre en el suelo provocó una reducción del área foliar, tanto en las plantas inoculadas como en las NI, siendo mayor el área foliar en las inoculadas respecto a las NI. En ausencia de Cu, las plantas inoculadas con *F. mosseae* y con *R. intraradices* presentaron 25% mas área foliar que las NI, mientras que con el agregado de 8 mM de Cu el aumento fue de 36% para *F. mosseae* y de 30% para *R. intraradices* (gráfico 27).

El análisis multivariado mostró diferencias significativas en el peso seco total para la micorrización, el cobre y la interacción micorrización : cobre (cuadro 34). Mientras que para el área foliar las diferencias significativas se observaron para la micorrización y las concentraciones de cobre (cuadro 35).

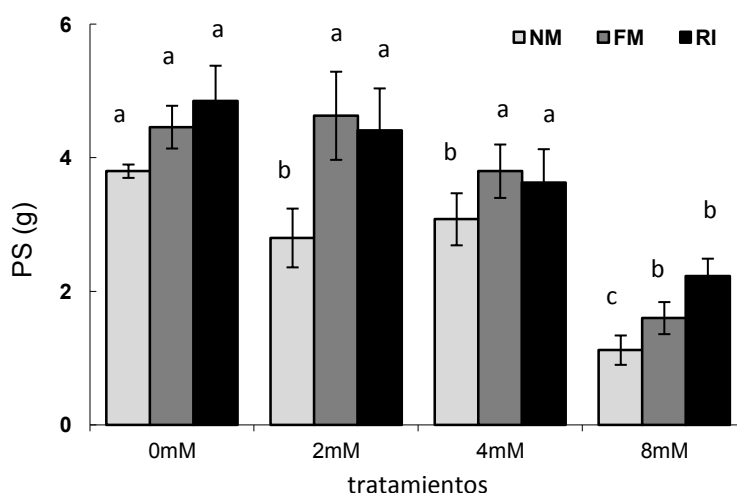


Gráfico 26. Peso seco de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

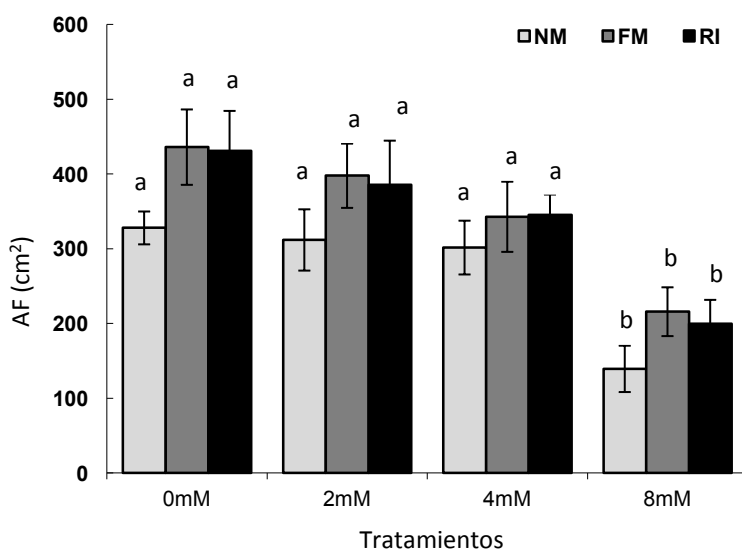


Gráfico 27. Área foliar de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices* cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 34. Análisis de Varianza para PS total - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	11,966	2	5,98301	33,78	0,0000
B:cobre	49,7633	3	16,5878	93,65	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,79244	6	0,465407	2,63	0,0324
RESIDUOS	6,37683	36	0,177134		
TOTAL (CORREGIDO)	70,8986	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 35. Análisis de Varianza para área foliar - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	59180,4	2	29590,2	16,90	0,0000
B:cobre	317606,	3	105869,	60,46	0,0000
INTERACCIONES					
AB	5968,88	6	994,814	0,57	0,7528
RESIDUOS	63037,7	36	1751,05		
TOTAL (CORREGIDO)	445793,	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En el presente estudio, la colonización micorrícica mostró una relativa tolerancia a las concentraciones de cobre en el suelo, consideradas dentro del rango de riesgo, estos resultados coinciden con los descritos por Mirlean et al. (2007). Los resultados de este trabajo muestran que en ausencia de cobre las plantas inoculadas crecieron más y entre éstas las inoculadas con *R. intraradices* fueron las que más crecieron, el efecto detrimental producido por la presencia de cobre fue mayor en las plantas no inoculadas. En las concentraciones más altas de cobre ensayadas el área foliar y el peso seco mostraron una reducción respecto al control, resultados que son similares a los descritos por Singh & Sinha (2004). En este trabajo la presencia de cobre no sólo redujo el peso seco sino también el área foliar de las plantas de pimiento, resultados similares fueron encontrados por Singh & Agrawal (2007) en *Beta vulgaris* y Moreno et al. (1997) en lechuga.

El contenido de carotenoides y clorofila, no presentó diferencias significativas, en este ensayo, entre las plantas de los diversos tratamientos sea inoculados y no inoculados y las diversas concentraciones de cobre en el suelo. Más aún tampoco se encontraron diferencias en el contenido de clorofila a y b (datos no mostrados) (tabla 10, cuadro 36 y 37). En contraposición con estos resultados Ruscitti et al. (2011) observaron una disminución en el contenido de clorofila a, b, total y carotenos utilizando concentraciones elevadas de cromo.

La liberación de solutos, medida como la conductividad relativa (%) presentó en general valores mayores en raíz que en hoja dependiendo de las concentraciones de Cu y los inóculos utilizados. La mayor liberación de electrolitos de las hojas, se observó en las NI con la mayor concentración de Cu en el suelo. La CR en hoja fue mayor al aumentar el contenido de Cu, en las NI

se observaron diferencias significativas entre 8 mM y el resto de las concentraciones y en las inoculadas con FM se observaron diferencias significativas entre 0 y 2 mM frente a 4 y 8 mM. En las plantas micorrizadas con *R. intraradices* se observó la misma tendencia. La interacción micorriza y Cu no presentó diferencias significativas. En la raíz, la mayor liberación de electrolitos se produjo en las NI con 8 mM, con diferencias significativas respecto al resto de las concentraciones y un aumento de la liberación de electrolitos de 31,5% entre el control (Cu0) y 8 mM de Cu. Las plantas inoculadas con *F. mosseae* no presentaron diferencias significativas al aumentar la concentración de Cu, excepto en Cu8. En las plantas RI se observó un incremento que fue significativo entre todas las concentraciones, siendo de 36%, entre Cu0 y Cu8 y 26% entre Cu2 y Cu8. En la máxima concentración de Cu, las plantas inoculadas con *F. mosseae* mostraron el mejor comportamiento respecto a este parámetro analizado (tabla 11). El análisis multivariado mostró diferencias significativas para la micorrización, el cobre y en la interacción de ambos factores en la CR de raíz (cuadro 38) y sólo para el cobre en la CR de hoja (cuadro 39).

Las membranas celulares son las primeras estructuras afectadas por el estrés. La medida de la liberación de electrolitos de los tejidos vegetales es un método clásico para estimar la integridad de las membranas en respuesta a los estreses ambientales. La prevención de la peroxidación de los lípidos y el mantenimiento de la integridad de las membranas han sido considerados procesos clave en la tolerancia al estrés (Beltrano et al., 2013b). Nuestros datos muestran que el efecto del cobre sobre las membranas, expresado como liberación de electrolitos, fue significativamente mayor en las plantas no inoculadas comparado con las inoculadas y en la raíz comparado con las hojas, esto coincide con lo descrito por Kaya et al. (2009). En nuestro estudio, la liberación de electrolitos de raíz y hoja de las plantas no micorrizadas fue afectada por la mayor concentración de cobre; mientras que en las plantas micorrizadas la liberación fue menor y se incrementó moderadamente demostrando que la inoculación mantuvo la integridad de las membranas, coincidiendo con Beltrano & Ronco (2008); Evelin et al. (2012) y Beltrano et al. (2013a).

Tabla 10. Contenido de clorofila total (Cl) y carotenoides (Cr) de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.

Cu (mM)	No inoculadas		<i>Funneliformis mosseae</i>		<i>Rhizophagus intraradices</i>	
	Cl ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Cl ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Cl ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
0	6,88a	1,21a	5,60a	1,25a	6,47a	1,30a
2	6,46a	1,22a	5,29a	1,28a	6,84a	1,24a
4	5,99a	1,16a	6,48a	1,14a	5,85a	1,22a
8	6,79a	1,14a	6,09a	1,11a	7,23a	1,18a

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 36. Análisis de Varianza para clorofila total - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	5,23345	2	2,61672	2,17	0,1292
B:cobre	2,53629	3	0,845431	0,70	0,5581
INTERACCIONES					
AB	6,86311	6	1,14385	0,95	0,4740
RESIDUOS	43,4682	36	1,20745		
TOTAL (CORRERIDO)	58,1011	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 37. Análisis de Varianza para carotenos - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,022598	2	0,011299	0,21	0,8107
B:cobre	0,102826	3	0,0342752	0,64	0,5940
INTERACCIONES					
AB	0,0238555	6	0,00397591	0,07	0,9982
RESIDUOS	1,92671	36	0,0535196		
TOTAL (CORRERIDO)	2,07598	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 11. Liberación de electrolitos de las membranas celulares de raíz (LE raíz) y de hoja (LE hoja) de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.

Cu (mM)	No inoculadas		<i>Funneliformis mosseae</i>		<i>Rhizophagus intraradices</i>	
	LE raíz (%)	LE hoja (%)	LE raíz (%)	LE hoja (%)	LE raíz (%)	LE hoja (%)
0	34,00b	29,11b	31,20b	31,73b	28,21d	30,4b
2	37,56b	33,36b	30,50b	32,03ab	32,54c	33,57ab
4	37,12b	33,48b	30,23b	34,59a	35,43b	35,27a
8	49,6a	40a	37,56a	38,00a	43,80a	36,28a

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 38. Análisis de Varianza para CR de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	445,485	2	222,742	24,73	0,0000
B:cobre	1001,43	3	333,81	37,06	0,0000
INTERACCIONES					
AB	150,531	6	25,0886	2,79	0,0250
RESIDUOS	324,273	36	9,00759		
TOTAL (CORRERIDO)	1921,72	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 39. Análisis de Varianza para CR de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	11,7734	2	5,8867	0,72	0,4952
B:cobre	375,898	3	125,299	15,25	0,0000
INTERACCIONES					
AB	47,055	6	7,8425	0,95	0,4692
RESIDUOS	295,707	36	8,21408		
TOTAL (CORRERIDO)	730,433	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La fotosíntesis neta disminuyó significativamente a medida que aumentó la concentración de cobre en el suelo, independientemente del inóculo utilizado. Las plantas inoculadas con *F. mosseae* y *R. intraradices* mantuvieron valores más altos en su función fotosintética con 8 mM de cobre, respecto a las no inoculadas (tabla 12). En las plantas NI la transpiración y la conductancia estomática no mostraron diferencias significativas con el aumento del cobre en el suelo. En las plantas inoculadas con *F. mosseae*, en cambio, la transpiración y la conductancia estomática disminuyeron significativamente con el aumento del

cobre. Mientras que con *R. intraradices* disminuyó significativamente la transpiración, aunque la conductancia estomática no se modificó. La eficiencia en el uso del agua disminuyó significativamente en 4 y 8 mM en las plantas no inoculadas, mientras que en las plantas inoculadas, no se modificó independientemente del inóculo utilizado (tabla 12).

Tabla 12. Fotosíntesis neta (Fn), transpiración (T), conductancia estomática (Ce) y eficiencia del uso del agua (EUA) de plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae* o *Rhizophagus intraradices*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.

	Cu (mM)	Fn ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	T ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ce ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	EUA ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
NI	0	7,00a	2,18a	100,50a	3,34a
	2	6,32ab	1,95a	96,67a	3,36a
	4	5,43bc	1,93a	89,33a	2,82b
	8	4,98c	2,08a	105,66a	2,48b
FM	0	7,67a	2,8a	135,67a	2,91a
	2	6,32b	2,35ab	102,50b	2,69a
	4	6,10b	2,27bc	102,83b	2,71a
	8	5,90b	1,85c	92,50b	2,69a
RI	0	7,62a	2,75a	126,50a	2,79a
	2	7,20ab	2,92a	129,83a	2,51a
	4	6,32b	2,18b	109,60a	2,92a
	8	6,13b	2,25b	122,17a	2,74a

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

El análisis multivariado mostró que para la fotosíntesis neta y la transpiración hubo diferencias significativas para la micorrización y el cobre, para la conductancia estomática, en cambio, las diferencias significativas fueron debidas sólo a la micorrización, sin diferencias en las interacciones. En la eficiencia en el uso del agua, las diferencias significativas se observaron para la micorrización, el cobre y las interacciones entre ambos (cuadro 40, 41, 42 y 43).

Cuadro 40. Análisis de Varianza para fotosíntesis (Fn) - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	11,1964	2	5,59822	4,56	0,0137
B:cobre	38,4746	3	12,8249	10,45	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,51579	6	0,419298	0,34	0,9125
RESIDUOS	88,3817	72	1,22752		
TOTAL (CORRERIDO)	140,568	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 41. Análisis de Varianza para transpiración (T) - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	3,3506	2	1,6753	7,74	0,0009
B:cobre	3,6716	3	1,22387	5,66	0,0015
INTERACCIONES					
AB	2,58125	6	0,430208	1,99	0,0784
RESIDUOS	15,575	72	0,216319		
TOTAL (CORRERIDO)	25,1784	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 42. Análisis de Varianza para conductancia estomática (Ce) - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	8868,51	2	4434,26	5,07	0,0087
B:cobre	4051,96	3	1350,65	1,54	0,2105
INTERACCIONES					
AB	5381,41	6	896,902	1,03	0,4160
RESIDUOS	62986,7	72	874,815		
TOTAL (CORRERIDO)	81288,6	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 43. Análisis de Varianza para eficiencia en el uso del agua (EUA) - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	1,21005	2	0,605026	3,50	0,0355
B:cobre	1,5326	3	0,510865	2,95	0,0382
INTERACCIONES					
AB	3,13649	6	0,522749	3,02	0,0108
RESIDUOS	12,4539	72	0,17297		
TOTAL (CORRERIDO)	18,333	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En nuestro estudio, coincidimos con Göhre & Paszkowski (2006) quienes informaron que la elevada concentración de cobre redujo el crecimiento y la fotosíntesis neta, y el contenido de clorofila total y carotenos no fue afectado. Las plantas que crecieron en suelos contaminados mostraron una reducción significativa en la conductancia estomática y en la tasa fotosintética por incremento del metal, comparadas con las que crecieron en ausencia de cobre. La función fotosintética ha sido afectada directa o indirectamente por los metales pesados (Clijsters & Van Assche, 1985). El estrés por metales pesados induce un desorden nutricional en la planta y podría producir daños en las macromoléculas, resultando en una pérdida de la actividad fotosintética y en la

integridad de las membranas, pudiendo acelerar los procesos de senescencia. Por otro lado, la producción de radicales libres inducidos por el exceso de cobre también provoca daño en las membranas (Liu et al., 2004). La reducción en el crecimiento producida por MP se ha relacionado con el daño ultraestructural y los cambios fisiológicos debidos al estrés oxidativo (Lombardi & Sebastiani, 2005). Los efectos directos de los MP sobre la fotosíntesis tienen que ver con daños en la maquinaria fotosintética; en los cloroplastos alteran la arquitectura de las membranas tilacoidales afectando las reacciones lumínicas especialmente asociadas al fotosistema II. El exceso de cobre tiene un efecto importante en la ultraestructura del cloroplasto, resultando en una degradación de los grana y las laminillas del estroma y un aumento en el número y tamaño de la plastoglobulina (Baszynski et al., 1988). Sandmann & Boger (1980) correlacionaron estos disturbios con procesos de peroxidación lipídica.

En las plantas superiores, la fotosíntesis se ve reducida también en forma indirecta por la acumulación de MP en las hojas lo cual influye en el funcionamiento estomático. El cadmio disminuyó la fotosíntesis neta y la transpiración en *Acer saccharinum* L. (Lamoreaux & Chaney, 1978). Otros metales como Cd, Ni y Pb también causan cierre estomático en *Helianthus annuus* L. (Bazzaz et al., 1974) y *Zea mays* L. También se observó que el Zn y el Cd disminuyeron la eficiencia en el uso del agua (Van Assche & Clijsters, 1980), de igual forma que ocurrió en este trabajo por efecto del cobre en las plantas no micorrizadas.

6- Efecto de la micorrización sobre la partición del cobre en plantas de pimiento.

Evaluación de la partición del cobre en plantas no inoculadas o inoculadas, determinación de índices de eficiencia.

A bajas concentraciones (1mM), el cobre se acumuló principalmente en raíz, sin diferencias significativas entre las plantas no micorrizadas y micorrizadas; en el resto de las fracciones analizadas (tallos, hojas basales, hojas apicales y fruto) la acumulación de cobre alcanzó valores basales mínimos. Al aumentar la concentración del metal (2 mM) se modifica la respuesta de las plantas micorrizadas respecto de las no micorrizadas, en las primeras se

observó mayor acumulación no sólo en la raíz sino también en el resto de las fracciones, con diferencias significativas respecto de las no micorrizadas. En el caso de la raíz el aumento de la acumulación de las plantas micorrizadas respecto de las no micorrizadas fue de 352%, en el tallo 935%, en las hojas basales 1100%, en las hojas apicales 468% y en el fruto 211% (gráfico 28). En la mayor concentración de cobre ensayada (4 mM) se incrementó significativamente la acumulación respecto a la concentración anterior, tanto en las plantas micorrizadas como en las no micorrizadas y fue mayor en la raíz (figura 15). El contenido de cobre en la raíz de las plantas no inoculadas se incrementó aproximadamente 900% en 4 mM respecto de 2 mM, mientras que el de las plantas micorrizadas se incrementó 220%. En 2mM existe una marcada diferencia en el comportamiento de las plantas micorrizadas, donde se observó un aumento considerable de la absorción de cobre respecto de las no inoculadas. En 4 mM la absorción aumentó significativamente tanto en las no inoculadas como en las inoculadas (gráfico 28).

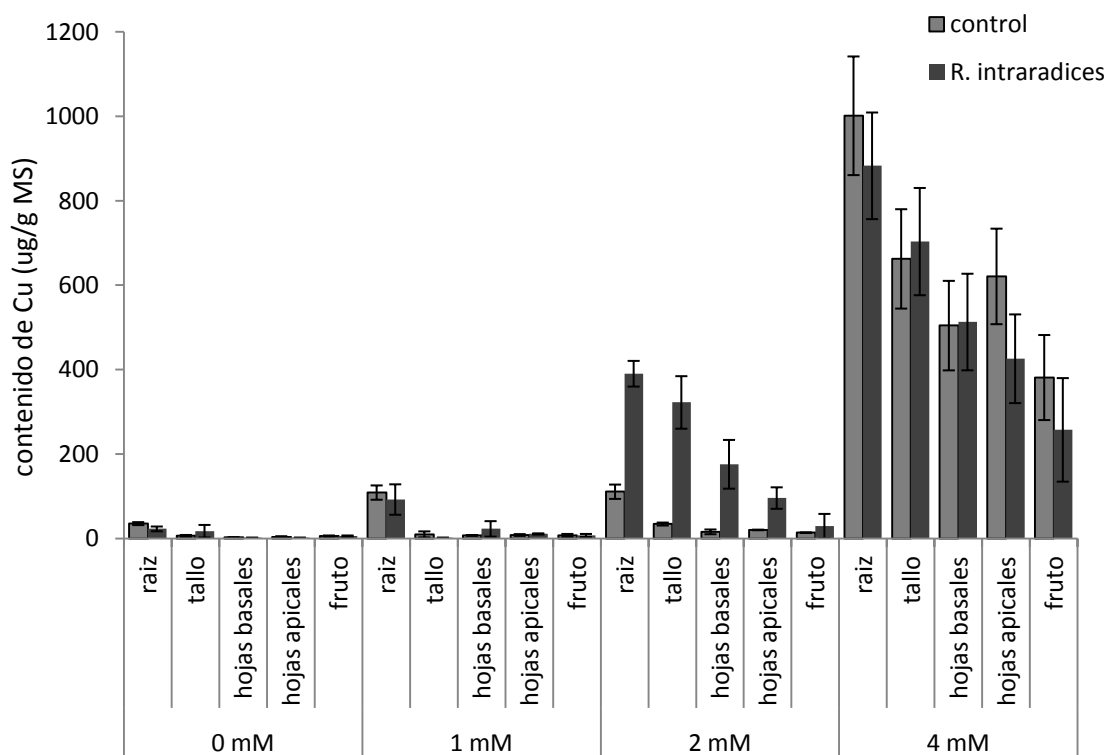


Gráfico 28. Contenido de cobre en distintas fracciones de plantas de pimiento no inoculadas e inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media ($p < 0,05$).

Para simplificar la explicación sobre la acumulación de cobre en la planta se agruparon los datos según dos fracciones: raíz y parte aérea, de esta forma es fácil de observar la mayor absorción por parte de las plantas micorrizadas en 2 mM y mayor traslocación a la parte aérea. En 4 mM aumentó significativamente la absorción, más en las plantas no inoculadas que en las inoculadas, siendo importante la traslocación a la parte aérea (gráfico 29).

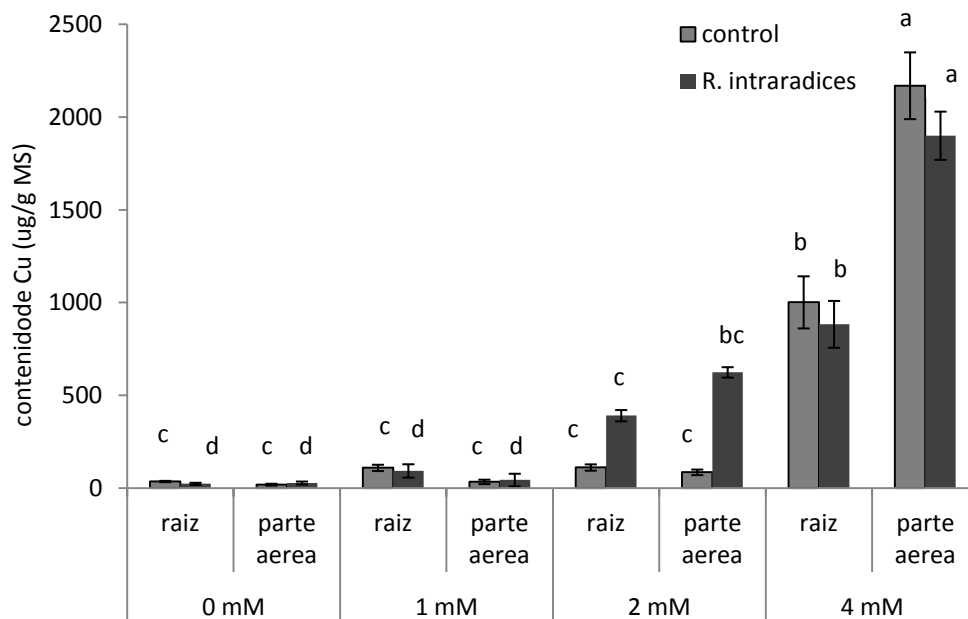


Gráfico 29. Contenido de cobre en raíz y parte aérea de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Con los valores de contenido de cobre por gramo de materia seca y el peso de los distintos órganos de la planta analizados (raíz, tallo, hojas basales, hojas apicales y fruto) se pudo determinar la distribución porcentual del cobre en los distintos órganos de las plantas no inoculadas e inoculadas (gráfico 30). En la concentración más baja de cobre (1mM) se observó mayor acumulación en la raíz que en la parte aérea. En 2 mM se produjo una traslocación a la parte aérea significativamente mayor en las plantas micorrizadas con *R. intraradices* adquiriendo importancia el tallo y las hojas basales. En 4 mM las plantas no micorrizadas traslocan al tallo, a las hojas basales, a las hojas apicales y al fruto; mientras que en las plantas micorrizadas sigue siendo mayor la participación del tallo y en menor proporción el resto de los órganos (gráfico 30).

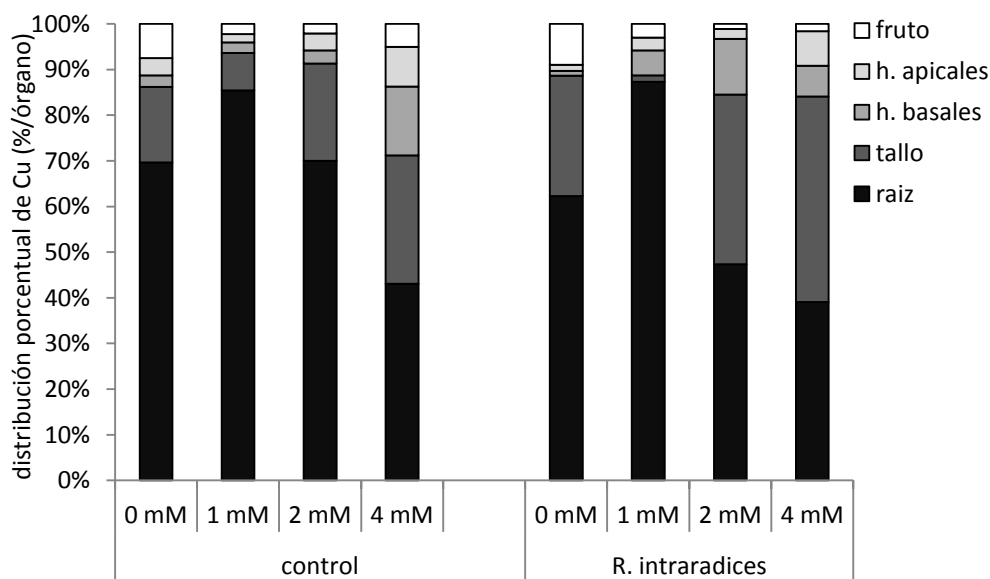


Gráfico 30. Distribución porcentual de cobre en los distintos órganos de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre.

Cuando calculamos la dependencia por cobre (DCu) analizamos la relación de peso seco entre las plantas creciendo en suelo contaminado con cobre versus las plantas control, sin adición de cobre; observamos que esta relación en las plantas micorrizadas fue más afectada que en las plantas no micorrizadas, porque las plantas micorrizadas sin cobre tuvieron un crecimiento vigoroso comparadas con las no micorrizadas. La traslocación del cobre de la raíz a la parte aérea fue medida por el índice de eficiencia de traslocación (TE), las plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas exhibieron diferencias significativas en la absorción y traslocación del metal. Cuando TE presentó valores mayores a 1 indica que la traslocación fue efectivamente de la raíz a la parte aérea (Tabla 13). Los índices de eficiencia de absorción, de eficiencia de traslocación y de eficiencia de fitoextracción fueron mayores en las plantas micorrizadas creciendo en suelo con 2 mM de cobre; mientras que no hubo diferencias en 0, 1 y 4 mM (Tabla 13).

Tabla 13. Índice de eficiencia de absorción (UE), eficiencia de traslocación (TE), eficiencia de fitoextracción (PE) y dependencia por cobre (DCu) en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Rhizophagus intraradices*.

	UE ($\mu\text{g g}^{-1}$)	TE	PE ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DCu (%)	UE ($\mu\text{g g}^{-1}$)	TE	PE ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DCu (%)
Cu (mM)	No inoculadas				<i>Rhizophagus intraradices</i>			
0	25,1c	----	1,7c	----	18,9d	----	6,9c	----
1	128,3b	0,18c	19,3b	-3,5b	105,1c	0,14c	12,6c	25,9c
2	163,3b	0,47b	52,3b	28,3a	828,6b	1,12b	438,1b	49,2b
4	2426,4a	1,42a	1424,9a	17,8a	2428,8a	1,75a	1545,8a	70,7a

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Es bien conocido que la asociación de las plantas con microorganismos del suelo, incluyendo hongos micorrícicos, modifica las respuestas al estrés inducido por metales pesados e incrementa la tolerancia en suelos contaminados (Göhre & Paszkowski, 2006). Incluso algunos estudios concluyeron que la simbiosis es parcialmente responsable de la sobrevivencia de las plantas en esos ambientes extremos (Hildebrandt et al., 2007; Ruscitti et al., 2011). La absorción de metales por las plantas micorrizadas depende de muchos factores como las propiedades fisicoquímicas del suelo, las plantas hospedantes, el hongo involucrado y la concentración del metal en el suelo (Wang & Chao, 1992; Pawlowska & Charvat, 2004). Cuando los suelos contienen cantidades potencialmente tóxicas de MP, la presencia de micorrizas usualmente induce bajas concentraciones del metal en la parte aérea de la planta y en consecuencia un efecto benéfico en el crecimiento. En este trabajo encontramos diferencias significativas entre plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas en respuesta al incremento de cobre en el suelo. Mientras que el incremento en la tolerancia a cobre en las plantas micorrizadas podría asociarse con una reducción de la transferencia del metal a los tallos en ciertos casos, las micorrizas aumentan el crecimiento vegetal y también la acumulación de los metales en los órganos vegetales (Ruscitti et al., 2011). Algunos autores observaron una reducción en la acumulación de cobre en los tallos de plantas micorrizadas y una reducción más significativa bajo condiciones de elevada concentración del metal (Lin et al., 2007). En nuestro caso, la acumulación de cobre en raíces y tallos está relacionada con la cantidad del metal en el suelo, es decir, la respuesta fue diferente según la dosis empleada. En general, la

acumulación de MP es mayor en raíces que en tallos, en nuestro estudio, los resultados no coinciden con Lin et al. (2007) y Zhang et al. (2009), quienes muestran una reducción en la acumulación en raíces y tallos de las plantas micorrizadas. En este trabajo, más allá de las diferencias observadas en la traslocación del metal podemos concluir que el inóculo micorrícico y las plantas de pimiento exhibieron una relativa tolerancia al cobre a concentraciones consideradas dentro del rango de riesgo.

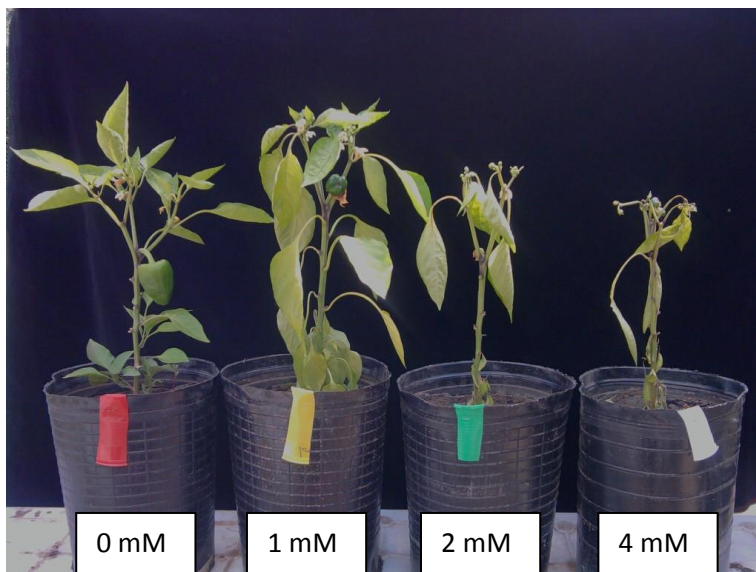


Figura 15. Plantas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.

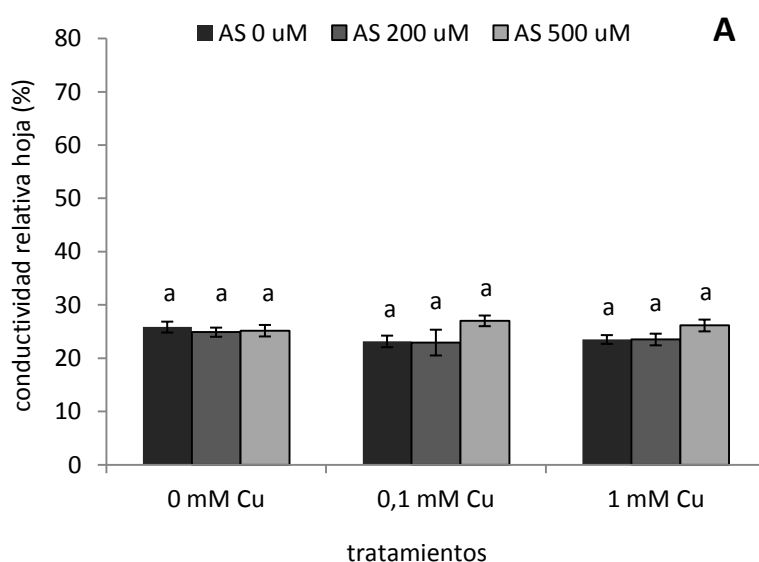
7- Efecto del ácido salicílico exógeno sobre la toxicidad por cobre en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas

Evaluación de los tratamientos con ácido salicílico sobre plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas, para aumentar la tolerancia al cobre del suelo.

El ácido salicílico (AS) es una hormona vegetal de naturaleza fenólica que regula diversos procesos del metabolismo de las plantas (Popova et al., 1997). Según diversos estudios realizados con esta hormona, se encontró que juega un rol importante en la regulación del crecimiento vegetal, el desarrollo, la interacción con otros organismos y las respuestas al estrés ambiental (Yalpani et al., 1994; Senaratna et al., 2000). Además, su participación fue comprobada en la germinación de semillas, producción de frutos, floración en plantas

termogénicas, absorción y transporte de iones, tasa fotosintética, conductancia estomática y transpiración (Klessig & Malamy, 1994; Khan et al., 2003). El AS es considerado una importante molécula en la señalización de procesos metabólicos, la cual está involucrada en la resistencia a enfermedades, en respuesta al ataque de varios patógenos, y a diversas situaciones de estrés abiótico. Actúa regulando la cascada oxidativa que conduce a una respuesta hipersensible y muerte celular programada y como señal para el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (Shirasu et al., 1997). El AS y otros salicilatos afectan actividades fisiológicas y bioquímicas de las plantas y juegan un rol importante en la regulación del crecimiento y productividad (Hayat et al., 2008).

En este trabajo observamos que la conductividad relativa de las hojas alcanzó valores de 30% aproximadamente, y no fue modificada por la presencia de cobre ni de AS, lo que indica que no se produjo un daño en las membranas celulares de las hojas por acción del cobre. El ácido salicílico tampoco afectó la integridad de las membranas. La micorrización presentó diferencias, aunque no significativas, las plantas micorrizadas alcanzaron valores máximos de conductividad de 31% mientras que las no micorrizadas no superaron el 27%, al ser valores bajos no se puede considerar que haya un daño que afecte el funcionamiento de las membranas celulares de las hojas (gráfico 31). Las interacciones entre todos los factores no presentaron diferencias significativas (cuadro 44).



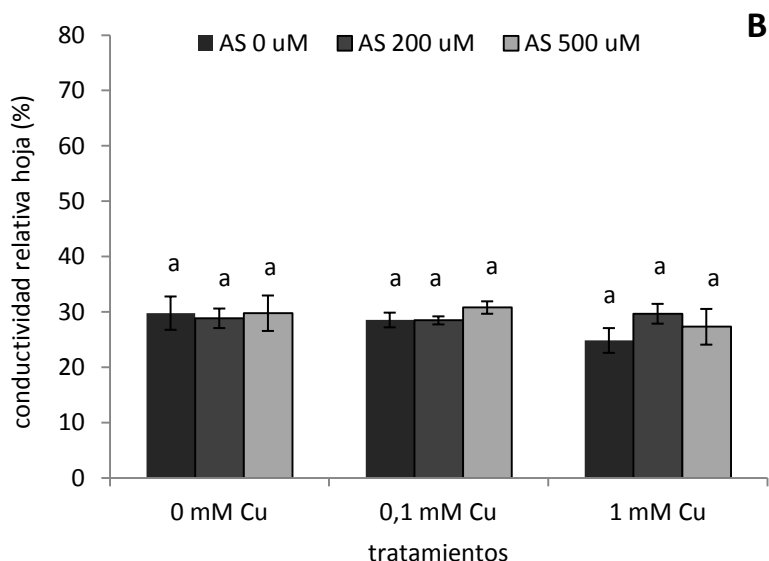


Gráfico 31. Conductividad relativa de hojas de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 44. Análisis de Varianza para CR de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	214,602	1	214,602	44,55	0,0000
B:cobre	22,1545	2	11,0773	2,30	0,1148
C:AS	29,9149	2	14,9574	3,11	0,0570
INTERACCIONES					
AB	9,40686	2	4,70343	0,98	0,3864
AC	10,586	2	5,29301	1,10	0,3442
BC	36,5987	4	9,14967	1,90	0,1318
ABC	16,8294	4	4,20735	0,87	0,4894
RESIDUOS	173,413	36	4,81703		
TOTAL (CORRERIDO)	513,506	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En cambio, las membranas celulares de las raíces presentaron un comportamiento diferente al aumentar la concentración de cobre en la solución (figura 16). Tanto en las plantas no micorrizadas como micorrizadas, la conductividad relativa aumentó al aumentar la concentración del metal. En las plantas no micorrizadas (gráfico 32 A), en los tratamientos de 0 μ M de ácido salicílico se observó un incremento de 58% entre las concentraciones de 0 mM y 1 mM de cobre; un incremento de 62% en los tratamientos de 200 μ M de ácido salicílico y 73% para 500 μ M de ácido salicílico (gráfico 32 A). No se observaron

diferencias significativas entre los tratamientos de ácido salicílico para una misma concentración de cobre.

En las plantas micorrizadas, los incrementos fueron de 66%, 71% y 73% para las concentraciones de ácido salicílico de 0 μM , 200 μM y 500 μM respectivamente, comparando el testigo sin cobre y la mayor concentración del metal (gráfico 32 B). Se pudo observar que no existieron diferencias significativas entre las plantas sin inocular e inoculadas con *F. mosseae*, tampoco existieron interacciones entre todos los factores analizados (cuadro 45).

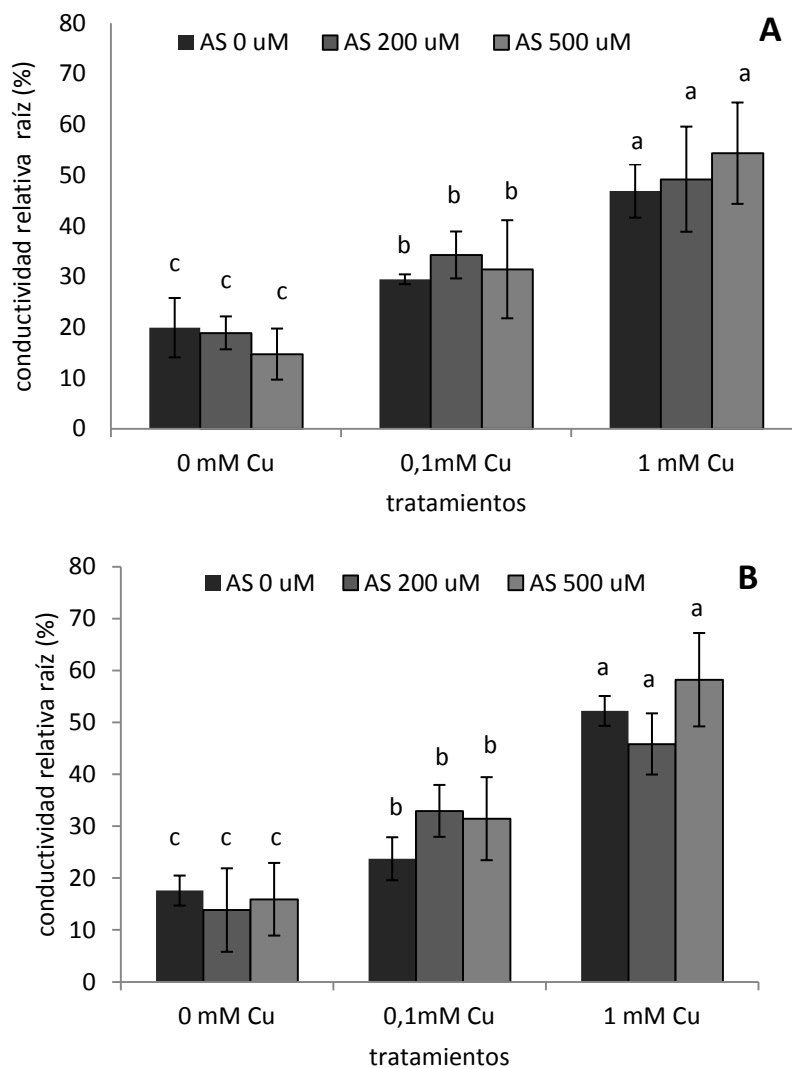


Gráfico 32. Conductividad relativa de raíces de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 45. Análisis de Varianza para CR de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	8,21128	1	8,21128	0,12	0,7301
B:cobre	11163,3	2	5581,67	82,14	0,0000
C:AS	79,3801	2	39,69	0,58	0,5626
INTERACCIONES					
AB	50,965	2	25,4825	0,37	0,6898
AC	55,0573	2	27,5286	0,41	0,6698
BC	366,983	4	91,7458	1,35	0,2694
ABC	66,7689	4	16,6922	0,25	0,9105
RESIDUOS	2582,36	38	67,9569		
TOTAL (CORRERIDO)	14496,3	55			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El contenido de malonildialdehído determinado en raíz fue muy bajo y sin diferencias significativas entre tratamientos (datos no mostrados). El MDA de hoja presentó diferencias significativas con el incremento del cobre, y aumentó en el tratamiento de 500 μM de ácido salicílico, en las plantas no micorrizadas, y disminuyó significativamente en la concentración de 0,1 mM de cobre cuando se le agregó 200 μM de ácido salicílico, con más concentración de esta hormona el efecto se diluyó (gráfico 33 A).

En las inoculadas los valores alcanzados fueron más bajos que las no micorrizadas, según el tratamiento. Las diferencias significativas, como en el caso analizado anteriormente se observaron con la mayor concentración de cobre y 500 μM de ácido salicílico (gráfico 33 B).

Al realizar el análisis multivariado se observó que existen diferencias significativas con el agregado del cobre y también con las concentraciones diferentes de ácido salicílico, hay una interacción positiva entre estos dos factores, es decir, aumentó el contenido de MDA al aumentar el cobre y la concentración de AS (cuadro 46).

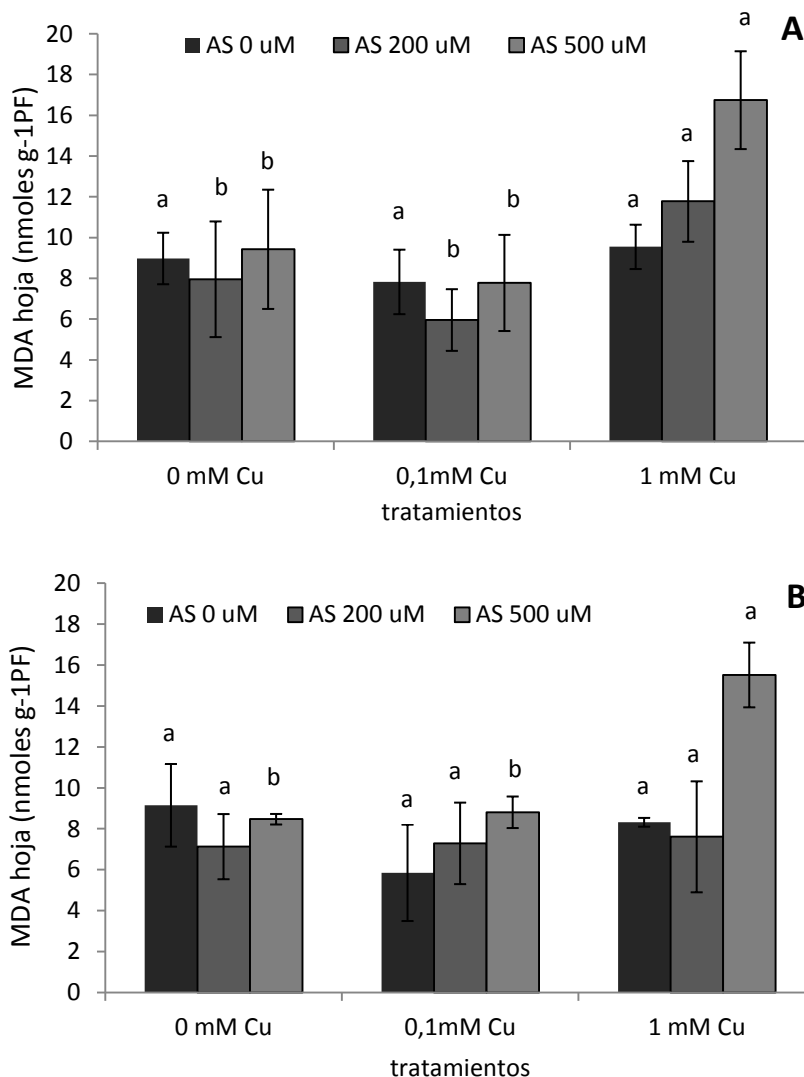


Gráfico 33. Malonildialdehído de hojas de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 46. Análisis de Varianza para MDA - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	14,9542	1	14,9542	2,31	0,1369
B:cobre	197,862	2	98,9308	15,31	0,0000
C:AS	118,602	2	59,3012	9,18	0,0006
INTERACCIONES					
AB	9,10227	2	4,55114	0,70	0,5010
AC	3,19026	2	1,59513	0,25	0,7825
BC	94,1519	4	23,538	3,64	0,0136
ABC	29,3129	4	7,32823	1,13	0,3559
RESIDUOS	232,568	36	6,46021		
TOTAL (CORRERIDO)	699,743	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El contenido de proteínas en hoja, en las plantas no inoculadas mostró valores uniformes con una significativa disminución en la concentración más elevada de cobre, y sin ácido salicílico (gráfico 34 A). En las plantas micorrizadas no se observaron diferencias significativas con el aumento del cobre ni con la concentración de ácido salicílico (gráfico 34 B).

El análisis de varianza multivariado mostró diferencias significativas sólo por efecto del cobre y no se observaron interacciones entre los distintos factores (cuadro 47).

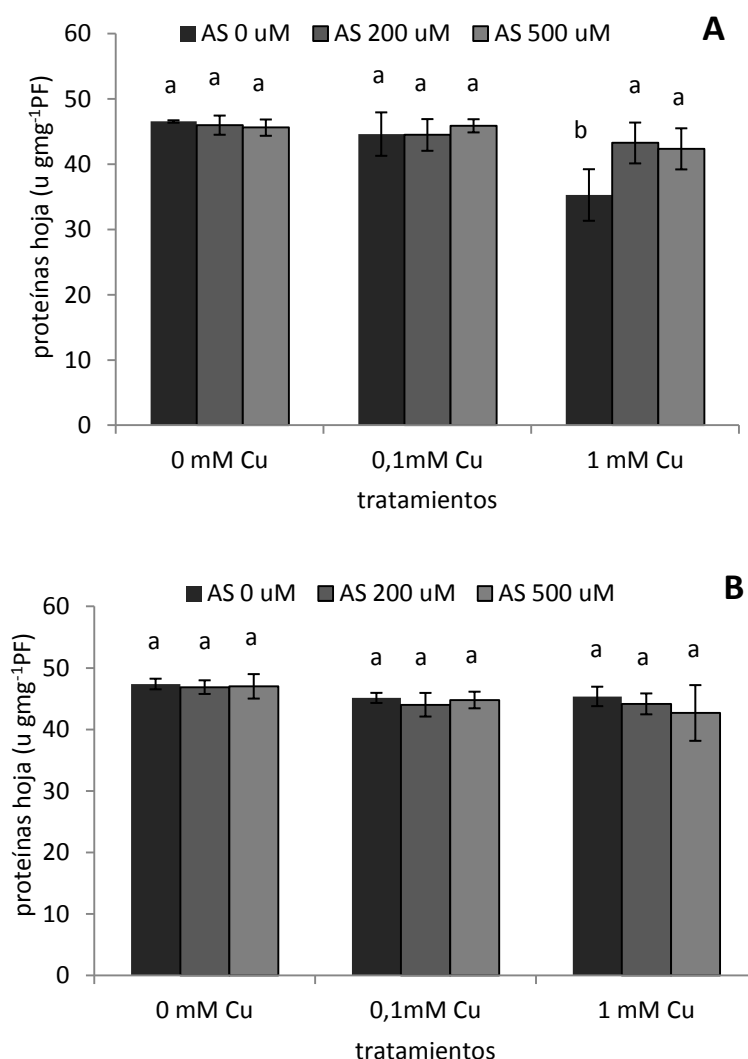


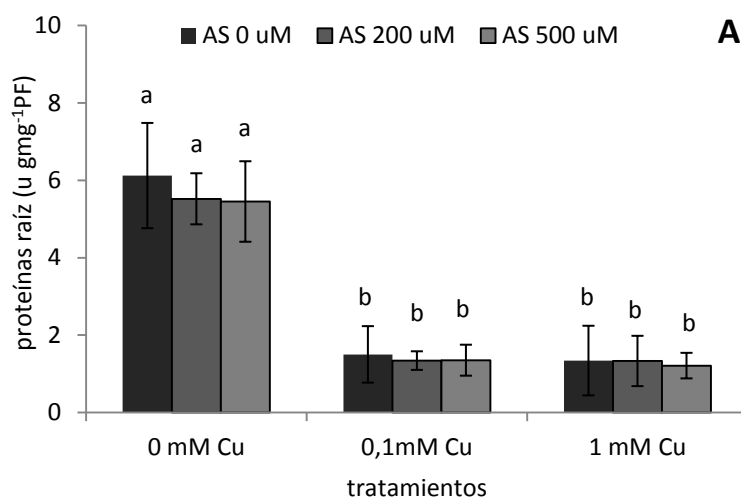
Gráfico 34. Proteínas de hojas de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 47. Análisis de Varianza para proteínas de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	29,4979	1	29,4979	3,13	0,0855
B:cobre	175,312	2	87,656	9,29	0,0006
C:AS	5,98297	2	2,99149	0,32	0,7302
INTERACCIONES					
AB	39,5329	2	19,7665	2,10	0,1378
AC	36,6242	2	18,3121	1,94	0,1582
BC	34,3317	4	8,58292	0,91	0,4686
ABC	55,4414	4	13,8604	1,47	0,2318
RESIDUOS	339,585	36	9,43291		
TOTAL (CORRERIDO)	716,308	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El contenido de proteínas de la raíz fue menor que el de las hojas, fue afectado por el cobre y por la inoculación. En las plantas no inoculadas, en los tratamientos con cobre, el contenido de proteínas disminuyó significativamente, 76% en 0,1 mM y 78% en 1 mM respecto al tratamiento sin cobre, independientemente de la concentración de ácido salicílico (gráfico 35 A). En las plantas inoculadas, los valores de proteínas fueron más elevados en los controles y en los tratamientos con cobre, la disminución entre el tratamiento sin cobre y 0,1 mM del metal fue de 59%, 44% y 52% para 0, 200 y 500 μ M de AS y entre el tratamiento sin cobre y 1 mM la disminución fue de 88%, 88% y 71% para 0, 200 y 500 μ M de AS respectivamente (gráfico 35 B). Al realizar el análisis multivariado se observaron diferencias significativas en la micorrización, el cobre y en la interacción de ambos, demostrando que el efecto tóxico del cobre en el contenido de proteínas de raíz fue atenuado por la micorrización y por el ácido salicílico (cuadro 48).



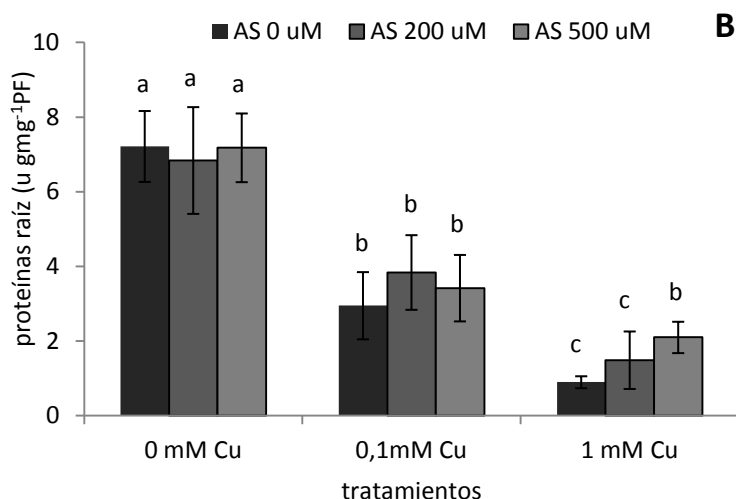


Gráfico 35. Proteínas de raíces de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 48. Análisis de Varianza para proteínas de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	27,006	1	27,006	19,85	0,0001
B:cobre	240,535	2	120,267	88,38	0,0000
C:AS	1,3731	2	0,686548	0,50	0,6080
INTERACCIONES					
AB	13,5849	2	6,79246	4,99	0,0122
AC	3,7969	2	1,89845	1,40	0,2609
BC	6,68179	4	1,67045	1,23	0,3164
ABC	5,39366	4	1,34842	0,99	0,4249
RESIDUOS	48,988	36	1,36078		
TOTAL (CORRERIDO)	347,359	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El contenido de prolina determinado en las hojas se incrementó significativamente al aumentar la concentración de cobre en el medio, este incremento se observó tanto en plantas micorrizadas como no micorrizadas. El AS disminuyó el contenido de prolina en 0 y 0,1 mM de cobre en las plantas inoculadas, no así en 1mM donde los tratamientos con 200 y 500 µM de AS alcanzaron los valores más altos de contenido de prolina, tanto en plantas micorrizadas como no micorrizadas (gráfico 36 A y B). En las plantas no micorrizadas, en 1mM de cobre el aumento del contenido de prolina en hoja fue de aproximadamente 100% al agregar 200 y 500 µM de AS, en cambio en las micorrizadas fue de 63% y 86% en 200 y 500 µM de AS respectivamente. El análisis multivariado mostró diferencias significativas con el agregado de cobre

y también en las interacciones micorrización : cobre, cobre : ácido salicílico y micorrización : cobre : ácido salicílico (cuadro 49).

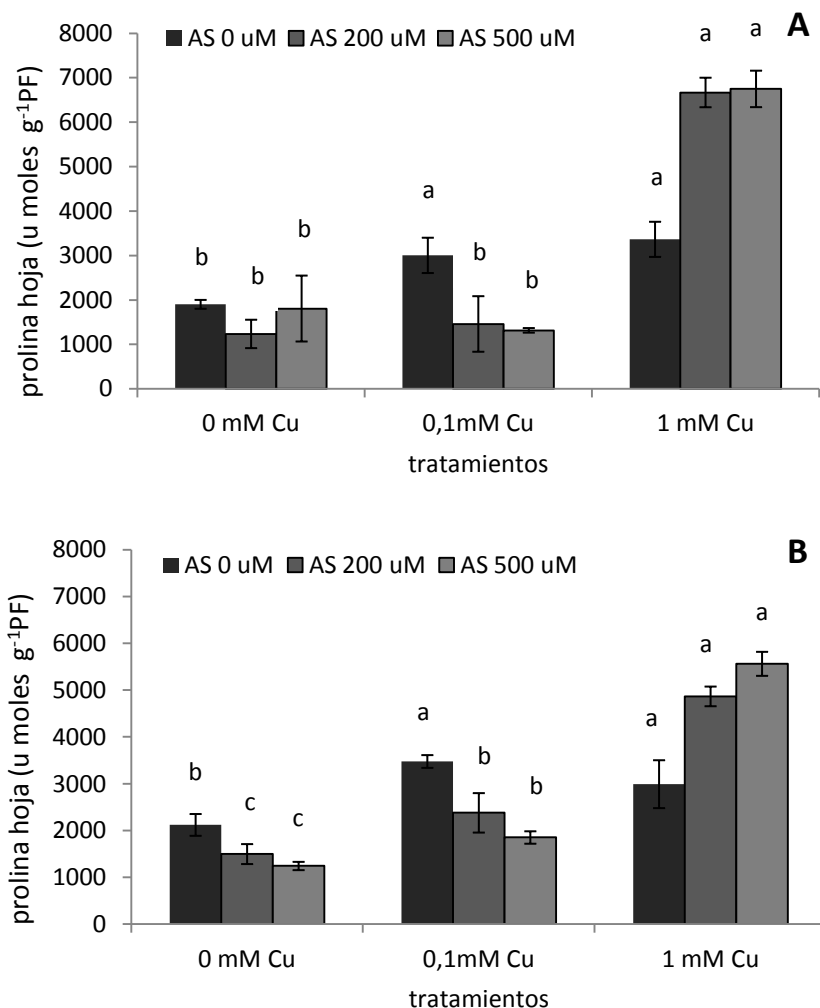


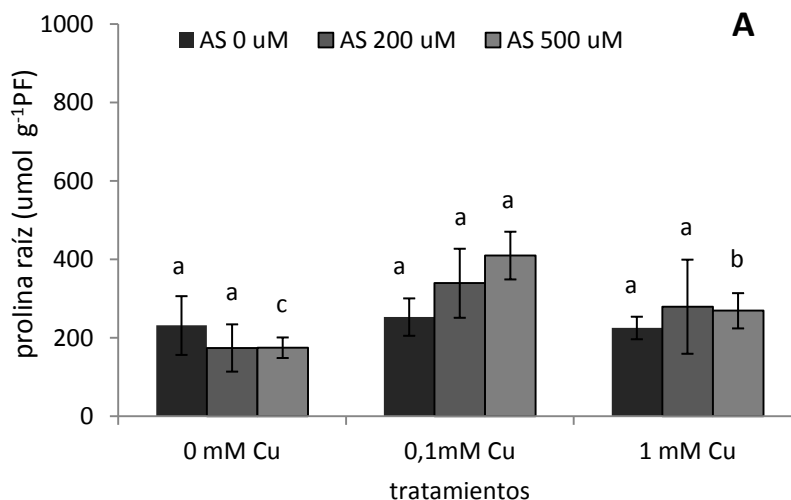
Gráfico 36. Prolina de hojas de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 49. Análisis de Varianza para prolina de hoja - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	362482,	1	362482,	2,74	0,1067
B:cobre	1,15655E8	2	5,78276E7	437,29	0,0000
C:AS	719227,	2	359613,	2,72	0,0798
INTERACCIONES					
AB	7,1201E6	2	3,56005E6	26,92	0,0000
AC	571871,	2	285935,	2,16	0,1302
BC	4,08589E7	4	1,02147E7	77,24	0,0000
ABC	1,76812E6	4	442029,	3,34	0,0203
RESIDUOS	4,62846E6	35	132242,		
TOTAL (CORRERIDO)	1,73966E8	52			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El contenido de prolina de la raíz fue significativamente más bajo que el de la hoja, tanto en plantas micorrizadas como no micorrizadas. En las plantas no micorrizadas, en los tratamientos con 0 y 200 μM de ácido salicílico no se observaron diferencias significativas por efecto del cobre. Sólo con 500 μM de AS, el contenido de prolina en la raíz presentó diferencias significativas por acción del metal, observándose el valor más alto en 0,1 mM. En las plantas micorrizadas, los valores más bajos se observaron en el control sin cobre, sin diferencias significativas con el AS, igual que en las plantas no micorrizadas el mayor valor observado corresponde al tratamiento 0,1 mM de cobre y 500 μM de AS. En 1mM el AS disminuyó el contenido de prolina del tratamiento de 500 μM de AS (gráfico 37). El análisis multivariado arrojó diferencias significativas para la micorrización, el cobre y las interacciones micorrización : cobre y cobre : ácido salicílico (cuadro 50).



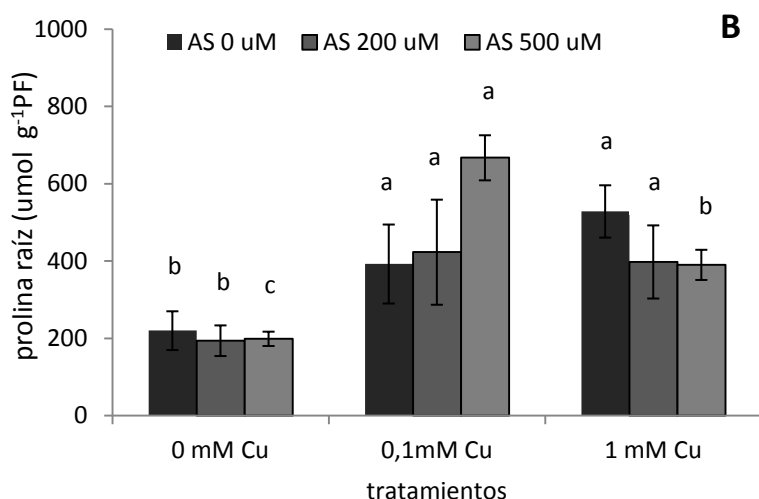


Gráfico 37. Prolina de raíces de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 50. Análisis de Varianza para prolina de raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	185574,	1	185574,	39,77	0,0000
B:cobre	437491,	2	218745,	46,88	0,0000
C:AS	26779,6	2	13389,8	2,87	0,0698
INTERACCIONES					
AB	77467,9	2	38733,9	8,30	0,0011
AC	12865,9	2	6432,95	1,38	0,2649
BC	136695,	4	34173,8	7,32	0,0002
ABC	45461,0	4	11365,3	2,44	0,0649
RESIDUOS	167992,	36	4666,44		
TOTAL (CORRERIDO)	1,09033E6	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides no presentó diferencias significativas con la aplicación de ácido salicílico ni con el cobre en las plantas no micorrizadas (tabla 14). En cambio en las plantas micorrizadas con *Funneliformis mosseae* se observaron diferencias significativas en todos estos parámetros determinados al aumentar la concentración de cobre en la solución (tabla 14). El análisis multivariado mostró diferencias significativas sólo con el agregado de cobre en el contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides, indicando una disminución de estos parámetros al aumentar la concentración del metal (cuadro 51, 52, 53 y 54).

Tabla 14. Clorofila a (Cl A), clorofila b (Cl B), clorofila total (Cl T) y carotenoides (Cr) en plantas de pimiento no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en el suelo.

Cu (mM)	AS (µM)	No inoculadas				<i>Funneliformis mosseae</i>			
		Cl A (µg ml ⁻¹)	Cl B (µg ml ⁻¹)	Cl T (µg ml ⁻¹)	Cr (µg ml ⁻¹)	Cl A (µg ml ⁻¹)	Cl B (µg ml ⁻¹)	Cl T (µg ml ⁻¹)	Cr (µg ml ⁻¹)
0	0	6,54a	1,72a	8,26a	1,51a	7,57a	2,08a	9,65a	1,58a
	200	7,22a	1,94a	9,16a	1,53a	7,58a	2,07a	9,65a	1,63a
	500	6,62a	1,76a	8,38a	1,42a	6,96a	1,94a	8,90a	1,50a
0,1	0	5,71a	1,55a	7,26a	1,35a	4,46b	1,28b	5,74b	1,04b
	200	6,45a	1,71a	8,17a	1,47a	3,84b	1,00b	4,84bc	0,87bc
	500	5,24a	1,53a	6,77a	1,14a	4,96b	1,44b	6,40b	1,13b
1	0	6,13a	1,74a	7,86a	1,51a	3,06c	0,71c	3,77c	0,79c
	200	4,83a	1,23a	6,07a	1,04a	4,91b	1,39b	6,29b	1,13b
	500	5,50a	1,41a	6,91a	1,27a	3,65b	1,02bc	4,67bc	1,04b

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 51. Análisis de Varianza para clorofila A - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:COBRE	59,0681	2	29,534	10,39	0,0003
B:AS	0,960271	2	0,480136	0,17	0,8452
C:MICO	8,74592	1	8,74592	3,08	0,0879
INTERACCIONES					
AB	0,496523	4	0,124131	0,04	0,9962
AC	13,0326	2	6,51628	2,29	0,1155
BC	0,604377	2	0,302188	0,11	0,8994
ABC	11,5027	4	2,87567	1,01	0,4142
RESIDUOS	102,306	36	2,84183		
TOTAL (CORRERIDO)	196,716	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 52. Análisis de Varianza para clorofila B - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:COBRE	4,35194	2	2,17597	7,77	0,0016
B:AS	0,0231523	2	0,0115761	0,04	0,9596
C:MICO	0,466116	1	0,466116	1,66	0,2053
INTERACCIONES					
AB	0,135516	4	0,033879	0,12	0,9741
AC	1,12256	2	0,56128	2,00	0,1496
BC	0,107302	2	0,0536512	0,19	0,8266
ABC	1,28319	4	0,320798	1,15	0,3511
RESIDUOS	10,0861	36	0,280168		
TOTAL (CORRERIDO)	17,5758	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 53. Análisis de Varianza para clorofila total - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:COBRE	95,3834	2	47,6917	9,79	0,0004
B:AS	1,2657	2	0,632849	0,13	0,8785
C:MICO	13,2531	1	13,2531	2,72	0,1077
INTERACCIONES					
AB	1,10718	4	0,276795	0,06	0,9937
AC	21,7992	2	10,8996	2,24	0,1213
BC	1,21927	2	0,609634	0,13	0,8827
ABC	20,2806	4	5,07014	1,04	0,3996
RESIDUOS	175,308	36	4,86966		
TOTAL (CORRERIDO)	329,616	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 54. Análisis de Varianza para carotenoides - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:COBRE	1,74455	2	0,872276	5,00	0,0121
B:AS	0,0209934	2	0,0104967	0,06	0,9417
C:MICO	0,394394	1	0,394394	2,26	0,1413
INTERACCIONES					
AB	0,0568949	4	0,0142237	0,08	0,9875
AC	0,437432	2	0,218716	1,25	0,2975
BC	0,161287	2	0,0806435	0,46	0,6334
ABC	0,604102	4	0,151025	0,87	0,4937
RESIDUOS	6,2781	36	0,174392		
TOTAL (CORRERIDO)	9,69776	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En las plantas no micorrizadas, la actividad de las enzimas peroxidasa se incrementó con el agregado de cobre a la solución, en 1 mM de cobre se observó una disminución de la actividad en los tratamientos con AS (gráfico 38A). En las plantas micorrizadas la actividad enzimática fue significativamente mayor que en las plantas no micorrizadas ante el agregado de cobre, solo en el control sin cobre se observaron diferencias significativas en los tratamientos con AS (gráfico 38B). El análisis multivariado mostró diferencias significativas en la micorrización, el cobre, el ácido salicílico y las interacciones micorrización : cobre y cobre : ácido salicílico (cuadro 55).

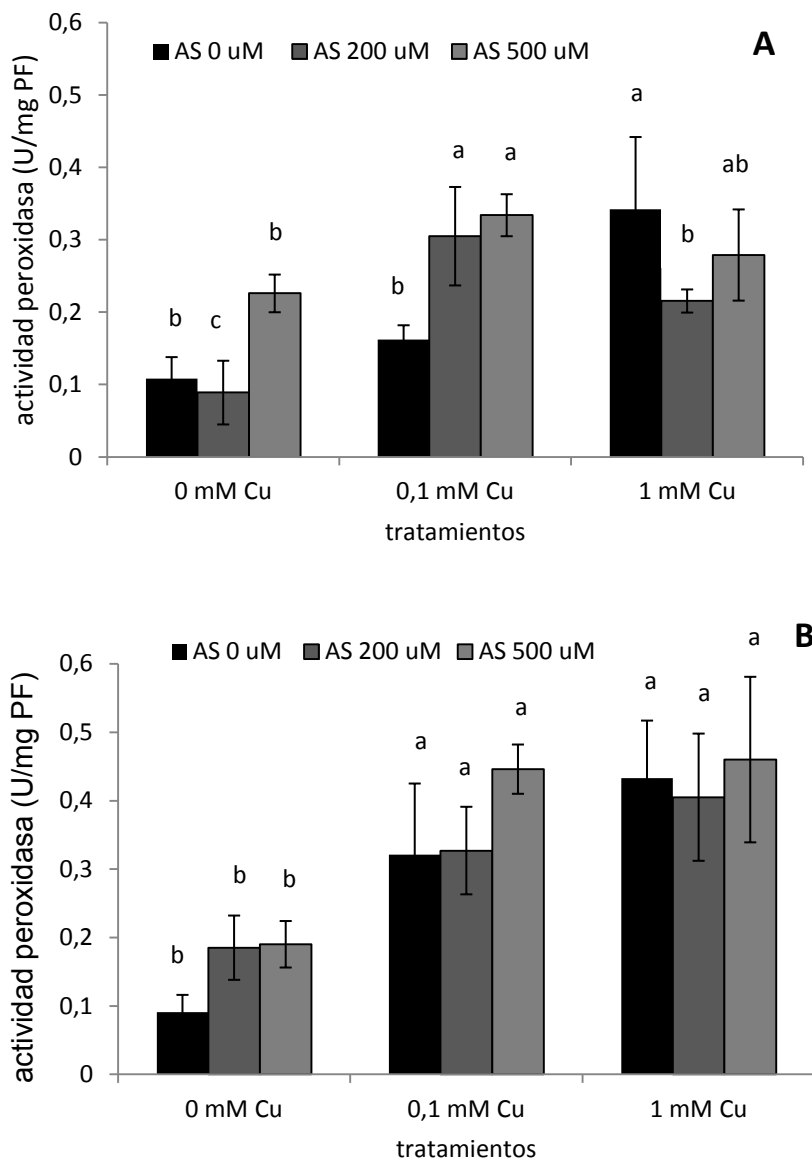


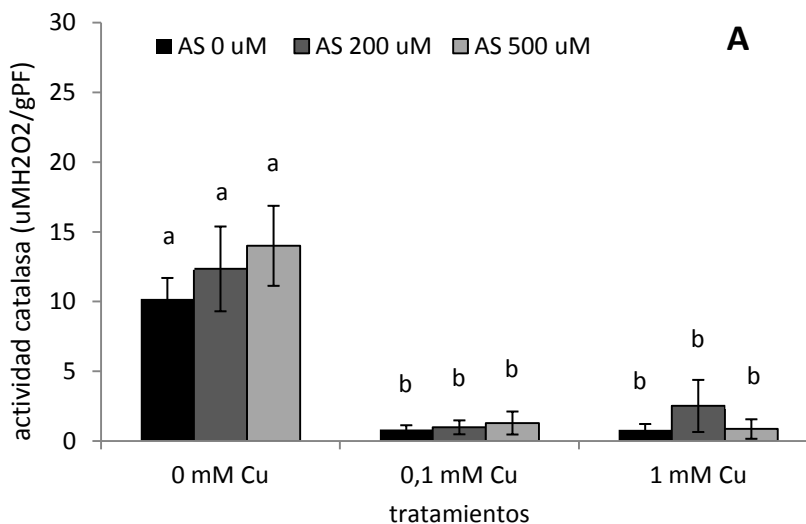
Gráfico 38. Actividad de enzimas peroxidadas en hojas de plantas de pimienta no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 55. Análisis de Varianza para actividad de enzimas peroxidadas - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,10644	1	0,10644	25,88	0,0000
B:cobre	0,436952	2	0,218476	53,11	0,0000
C:AS	0,0666237	2	0,0333119	8,10	0,0012
INTERACCIONES					
AB	0,0443732	2	0,0221866	5,39	0,0089
AC	0,00143737	2	0,000718684	0,17	0,8404
BC	0,0553101	4	0,0138275	3,36	0,0195
ABC	0,0370774	4	0,00926934	2,25	0,0825
RESIDUOS	0,148081	36	0,00411336		
TOTAL (CORREGIDO)	0,896295	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La actividad de la enzima catalasa presentó diferencias significativas en respuesta a la presencia de cobre en el sustrato, la actividad disminuyó significativamente ante el agregado del metal, en las plantas no micorrizadas. No se observaron diferencias significativas con el ácido salicílico (gráfico 39 A). En el caso de las plantas micorrizadas el comportamiento fue similar, aunque en las plantas sin cobre los valores fueron mayores de igual forma que se observó al analizar la actividad de enzimas peroxidadas (gráfico 39 B). El análisis multivariado indicó la presencia de diferencias significativas para el cobre, la micorrización y la interacción de ambos factores (cuadro 56).



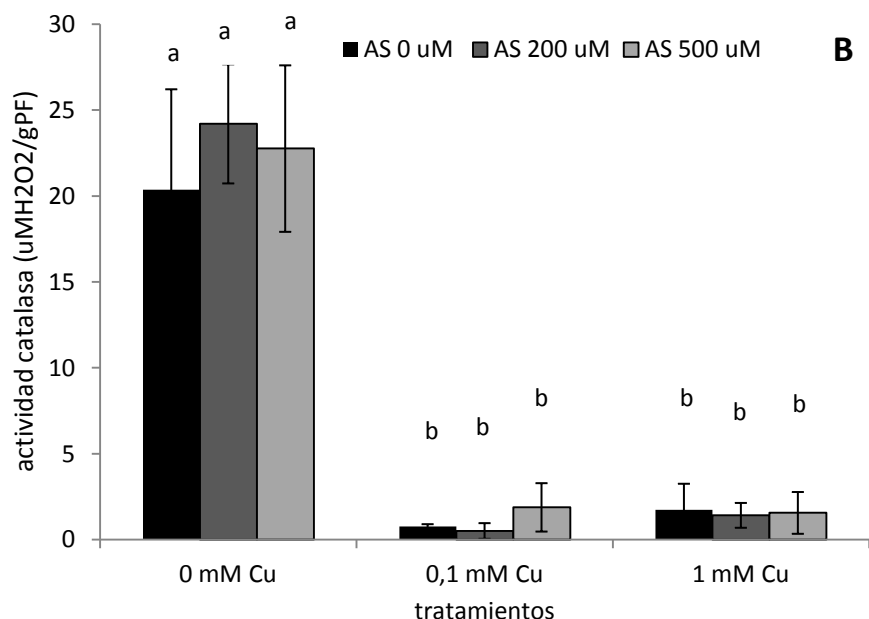


Gráfico 39. Actividad de la enzima catalasa en hojas de plantas de pimiento no inoculadas (A) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (B), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Se presentan los valores promedio, las barras verticales muestran el error estándar de la media y las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 56. Análisis de Varianza para actividad de enzima catalasa - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	337,513	1	337,513	17,76	0,0002
B:cobre	2387,77	2	1193,88	62,83	0,0000
C:AS	65,6223	2	32,8112	1,73	0,1923
INTERACCIONES					
AB	642,884	2	321,442	16,92	0,0000
AC	18,7611	2	9,38057	0,49	0,6144
BC	74,0477	4	18,5119	0,97	0,4337
ABC	71,7102	4	17,9276	0,94	0,4501
RESIDUOS	684,048	36	19,0013		
TOTAL (CORREGIDO)	4282,36	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Está documentado que el AS aumenta el área foliar y la producción de materia seca en maíz y soja (Khan et al., 2003), el aumento de la germinación y el crecimiento de las plántulas fueron observados también en trigo (Shakirova, 2007). Khodary (2004) observó un incremento significativo en el crecimiento, contenido de pigmentos y tasa fotosintética en plantas de maíz, asperjadas con AS; en nuestro ensayo la respuesta en el contenido de pigmentos no fue tan clara y se modificó en presencia de los hongos micorrícicos. Hussein et al. (2007) en un experimento con plantas de trigo, bajo condiciones de salinidad, observaron un aumento de la productividad. Sin embargo, las plantas que

recibieron tratamiento con AS tuvieron mayor contenido de prolina, en coincidencia con nuestro trabajo. En general, la aplicación exógena de AS aumenta la eficiencia del sistema antioxidante en las plantas (Knorz et al., 1999; Hayat et al., 2010). Además, el tratamiento con AS resultó en un aumento de la actividad catalasa y peroxidasa (Janda et al., 2003), jugando un rol importante en la Resistencia Sistémica Adquirida y la tolerancia al estrés oxidativo. En nuestro caso, la actividad catalasa fue afectada por la presencia de cobre pero no por el AS. Pero si se observó un aumento en la actividad peroxidasa en coincidencia con Hayat et al. (2008) en plantas de tomate.

El rol del AS morigerando la toxicidad por MP está ampliamente documentado. La aplicación exógena de esta hormona disminuyó el efecto tóxico generado por el Cd en cebada (Metwally et al., 2003) y en maíz (Pal et al., 2002). Mishra & Choudhuri (1999) también observaron este efecto protector ante un estrés producido por plomo y mercurio en arroz. Estos autores informan un deterioro de las membranas celulares de las hojas de arroz debido a un incremento de la actividad lipooxigenasa inducida por los MP y mitigada por la aspersion de AS en forma exógena. En nuestro trabajo el efecto del AS sobre el daño en las membranas celulares no fue significativo. Hamada (2001) concluyó que el pretratamiento de plántulas de trigo con ácido salicílico pudo aliviar el efecto inhibitorio del estrés por cobre y estimuló el crecimiento vía un aumento en la tasa fotosintética, aumentando la tolerancia a este metal. En este trabajo el efecto del AS no fue significativo, creemos que esta respuesta tiene que ver con el momento de aplicación del mismo, en la mayoría de los trabajos la aplicación se realiza en estadio de plántula, mientras que en nuestro caso las plantas habían superado dicho estadio y probablemente esa fue la causa de la falta de respuesta (figura 17).



Figura 16. Plantas de pimiento cultivadas en condiciones de hidroponia, en presencia de diferentes concentraciones de cobre (A); detalle de raíces de plantas de pimiento en ausencia de cobre, donde se observa la formación de nuevas raíces (B); detalle de raíces de pimiento en presencia de cobre, donde se observa necrosis y ausencia de nuevas raíces (C).



Figura 17. Plantas de pimienta no inoculadas: A, B y C o inoculadas con *Funneliformis mosseae*: D, E y F; con 0 μM de AS: A y D; con 200 μM de AS: B y E; con 500 μM de AS: C y F. En cada foto la planta de la izquierda creció con 0 mM de Cu; la del centro con 0,1 mM de Cu y la planta de la derecha con 1 mM de Cu.

8- Amplificación de los genes cuya expresión ha sido modificada por la presencia de metales pesados.

Evaluación de la expresión de genes y proteínas en plantas no inoculadas e inoculadas, en presencia de cobre.

Al analizar el patrón proteico y el densitograma de las hojas de plantas de pimienta crecidas con concentraciones crecientes de cobre, se observó en dos regiones, entre 94 y 67 kDa y debajo de 43 kDa, algunas bandas que van degradándose a medida que aumenta la concentración del metal (figura 18 y 24). Según algunos autores (Hall, 2002; Lou et al., 2004) la presencia de elevadas concentraciones de MP induce la proteólisis de algunas proteínas para aumentar la expresión de otras que actuarían en mecanismos de defensa o tolerancia ante esta situación de estrés. Estos resultados coinciden con lo informado para maíz (Labra, et al., 2006) y para arroz (Ahsan et al., 2007), donde un incremento de la cantidad de Cr o Cu, respectivamente, mostró

variaciones del análisis proteico de las semillas. El análisis de SDS - PAGE es usado frecuentemente para visualizar, en forma preliminar, cambios en los patrones de polipéptidos de tejidos sometidos a concentraciones elevadas de MP. Aunque debería ser complementado con un análisis 2-DE para determinar con detalle la modificación del patrón proteico de las plantas sometidas a MP (Sobkowiak & Deckert, 2006).

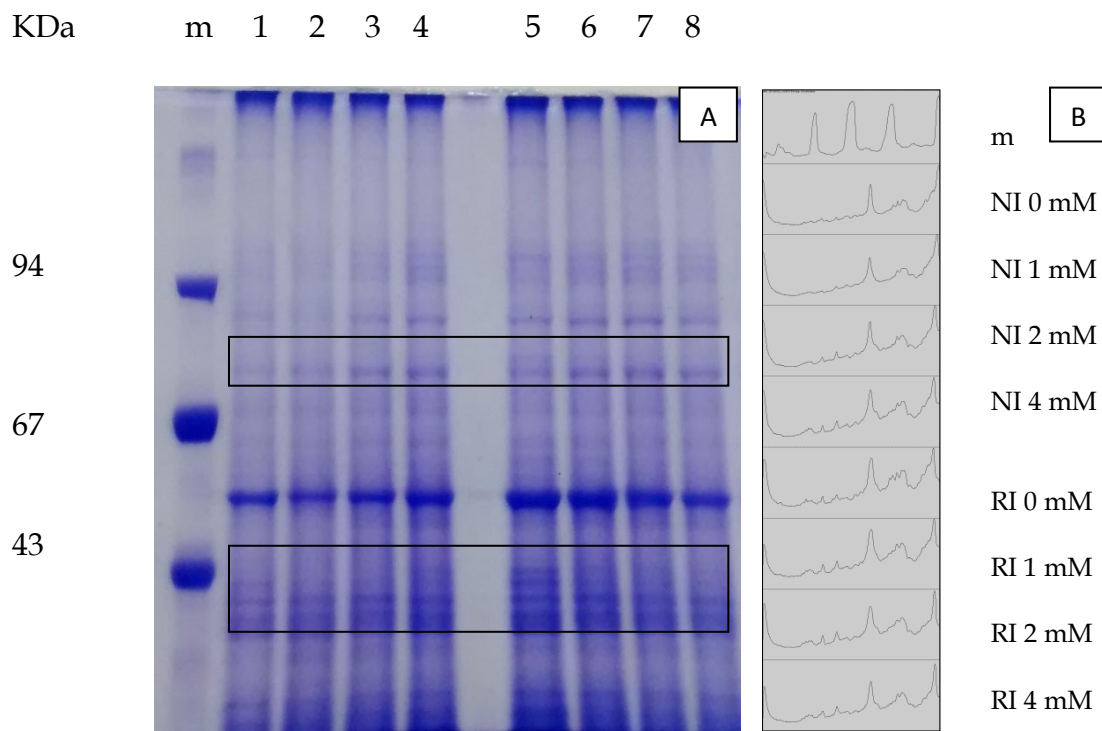


Figura 18. Patrón proteico de hojas de plantas de pimiento no inoculadas (NI) o inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (RI), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: NI 0 mM, 2: NI 1 mM, 3: NI 2 mM, 4: NI 4 mM, 5: RI 0 mM, 6: RI 1 mM, 7: RI 2 mM y 8: RI 4 mM (A). Densitograma donde los picos representan las bandas del marcador de peso molecular y las concentraciones de cobre ensayadas (B).

Con el fin de amplificar los genes de las proteínas cuya expresión fue afectada por la presencia de metales pesados, se procedió a extraer ADN por medio de dos metodologías diferentes, en la figura 19 se muestran las cantidades de ADN genómico extraído con los dos protocolos descritos oportunamente en materiales y métodos. Se observó que en la extracción de ADN con el Kit de extracción de ácidos nucleicos, se obtuvo más cantidad y

calidad de ADN comparado con el protocolo CTAB modificado que además tuvo un menor rendimiento y el ADN aparece degradado. En función de estos resultados, se decidió utilizar el protocolo de extracción de ADN Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega.

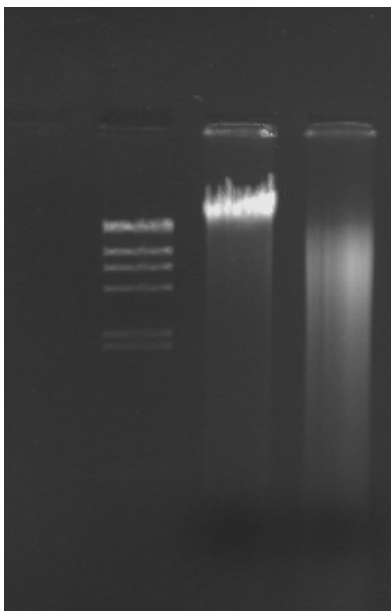


Figura 19. ADN extraído con Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega (calle 2) y ADN extraído con Protocolo CTAB modificado (calle 3). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.

Dado que con el Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega se obtuvo mejor calidad y cantidad de DNA, se utilizó este protocolo para obtenerlo a partir de las muestras de hojas congeladas de pimiento sometidas a distintas dosis de cobre. Se obtuvo un rendimiento aceptable de ADN y no se observó degradación (figura 20).

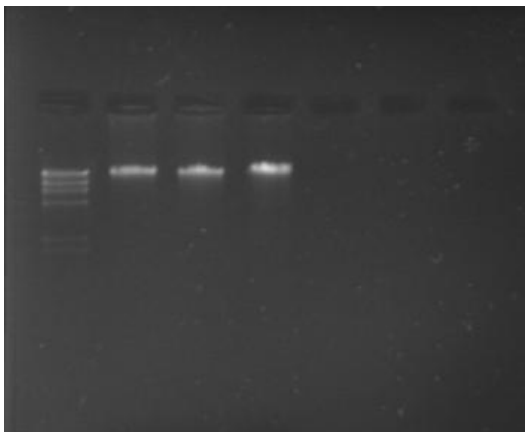


Figura 20. ADN extraído con Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega de muestras expuestas a 0 mM, 2 mM y 4 mM de cobre (calle 2, 3 y 4). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.

El ADN obtenido se utilizó como molde para realizar la amplificación de tres genes: Glutación reductasa, Glicerol 3 fosfato acyltransferasa y Metalotioneína. La glutación reductasa es una enzima que se expresa como resultado de la exposición de las plantas a un estrés abiótico como puede ser la adición de metales pesados. La Metalotioneína es una proteína que se asocia a metales pesados, especialmente a Cu y que secuestra importantes cantidades del elemento, esta proteína tendría un rol regulatorio en la expresión de genes. La otra enzima incluida en el análisis es la glicerol 3 fosfato acyl transferasa, que tiene que ver con la síntesis de un azúcar que suele acumularse en condiciones de estrés abiótico. Con las secuencias de los genes disponibles en el banco de datos del NCBI y utilizando el software del NCBI se trabajó en el diseño de primers que amplifiquen fragmentos parciales de cada uno de los genes que codifican las enzimas seleccionadas. El largo de los fragmentos a amplificar considerando las secuencias analizadas fueron de 930 pb el fragmento de glicerol 3 fosfato acyltransferasa, 429 pb el fragmento de la Metalotioneína y 413 pb el fragmento de la glutación reductasa.

Por otro lado con el software Optimase Protocol Writer se diseñó en base a las secuencias de los primers, el largo del fragmento a amplificar y el buffer de reacción, las condiciones de amplificación que se presentan a continuación.

Glicerol 3 fosfato acyltransferasa

930 pb - PCR - Mezcla de Reacción			
Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen a tomar
H ₂ O			9,8 µl
Buffer	10X	X	1,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	5 mM	0,2 mM	0,6 µl
ADN	12 ng/µl		1 µl
Primer f	100 ng/µl	0,3 µM	0,5 µl
Primer r	100 ng/µl	0,3 µM	0,5 µl
Taq polimerasa	5 U/µl	1U	0,2 µl
			15 µl

930 pb - PCR - ciclado			
Paso	Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	1	2 minutos	94°C
2	30	30 segundos	94°C
		30 segundos	58°C
		1 minuto	72°C
3	1	5 minutos	72°C

Metalotioneína

429 pb - PCR - Mezcla de Reacción			
Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen a tomar
H ₂ O			9,8 µl
Buffer	10X	X	1,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	5 mM	0,2 mM	0,6 µl
ADN	12 ng/µl		1 µl
Primer f	100 ng/µl	0,3 µM	0,5 µl
Primer r	100 ng/µl	0,3 µM	0,5 µl
Taq polimerasa	5 U/µl	1U	0,2 µl
			15 µl

429 pb - PCR - ciclado			
Paso	Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	1	2 minutos	94°C
2	30	30 segundos	94°C
		30 segundos	58°C
		30 segundos	72°C
3	1	5 minutos	72°C

Glutación reductasa

413 pb - PCR - Mezcla de Reacción			
Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen a tomar
H ₂ O			9,8 µl
Buffer	10X	X	1,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	5 mM	0,2 mM	0,6 µl
ADN	12 ng/µl		1 µl
Primer f	100 ng/µl	0,3 µM	0,5 µl
Primer r	100 ng/µl	0,3 µM	0,5 µl
Taq polimerasa	5 U/µl	1U	0,2 µl
			15 µl

413 pb - PCR - ciclado			
Paso	Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	1	2 minutos	94°C
2	30	30 segundos	94°C
		30 segundos	60°C
		30 segundos	72°C
3	1	5 minutos	72°C

En la figura 21 se puede ver que las reacciones de amplificación realizadas con los primers diseñados, bajo las condiciones ensayadas, sólo permitieron amplificar la secuencia parcial del gen de la Glicerol 3 fosfato acyltransferasa (GL) que corresponde a un fragmento de 930 pb, que es el número de nucleótidos esperado considerando la ubicación de los primers en la secuencia descrita del gen (según el número de identificación de la secuencia en el NCBI). Los dos fragmentos más pequeños correspondientes a los otros genes no se obtuvieron aún cuando se realizaron nuevos diseños de los primers sobre la base de las secuencias conocidas. En futuros trabajos, se desarrollarán nuevas reacciones de amplificación de los genes descritos y luego de amplificar con éxito los mismos se procederá a evaluar la expresión de estos genes realizando reacciones de amplificación en qPCR de manera de evaluar los niveles de expresión de estos genes en relación a la presencia de cobre.

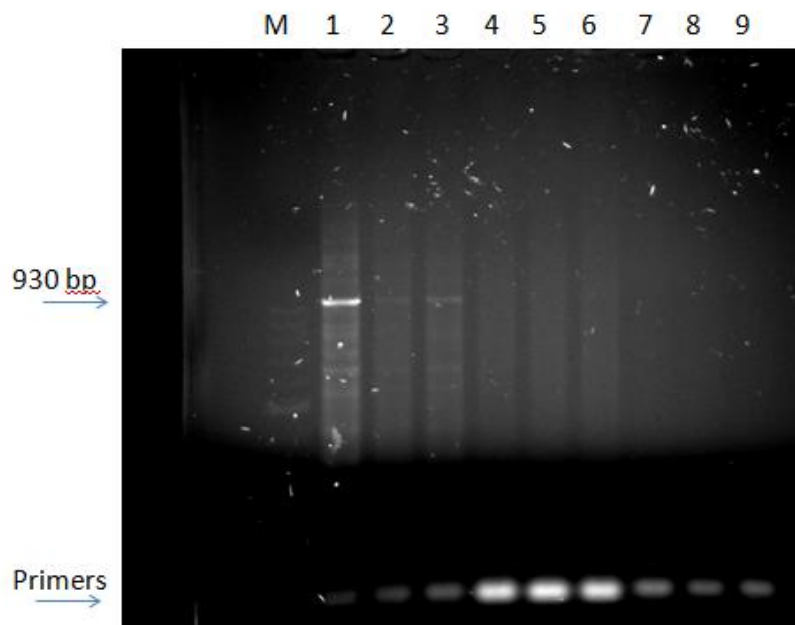


Figura 21. Amplificación de Glicerol 3 fosfato acyltransferasa (GL), Glutation reductasa (GR) y Metalotioneína (M). El producto de reacción fue sembrado en el siguiente orden: GL (calles 1, 2 y 3), GR (calles 4, 5 y 6) y M (calles 7, 8 y 9). M: marcador de peso molecular 100 - 1000 pb.

Posteriormente se procedió a realizar extracciones de ARN que se presentan en la figura 22, donde se observa el ARN extraído mediante el protocolo AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit, de muestras de hoja de *Capsicum annuum* crecidas con distintas concentraciones de cobre en el suelo.

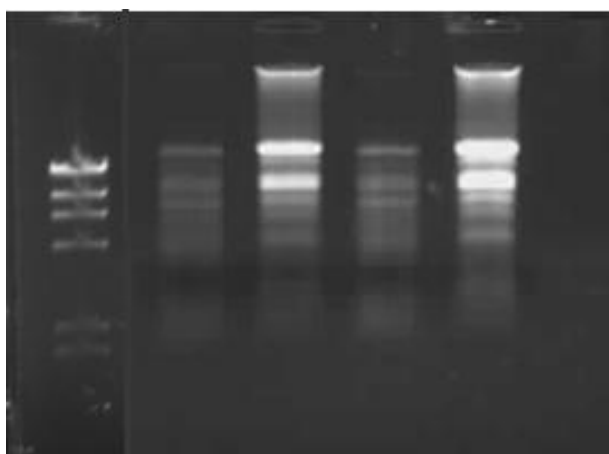


Figura 22. ARN extraído con AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit de muestras expuestas a 0 mM de cobre (calle 2 y 4) y a 4 mM de cobre (3 y 5). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.

El ARN se trató con DNAasa y luego se sintetizó cDNA (figura 23), para proceder a realizar las amplificaciones de cada uno de los genes.

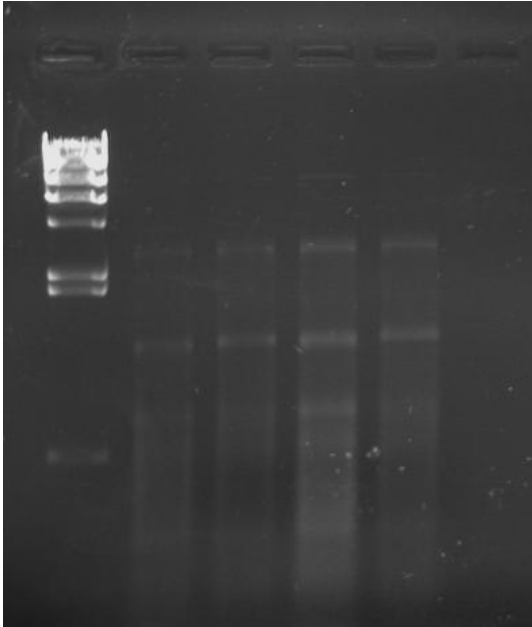


Figura 23. cDNA obtenido a partir del ARN extraído de muestras expuestas a 0 mM de cobre (calle 2 y 4) y a 4 mM de cobre (3 y 5). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular λ -HindIII.

Estos trabajos debido a problemas económicos y con el equipamiento se demoraron y es por eso que no se presentan los resultados en esta tesis, si bien se continúa con el trabajo.

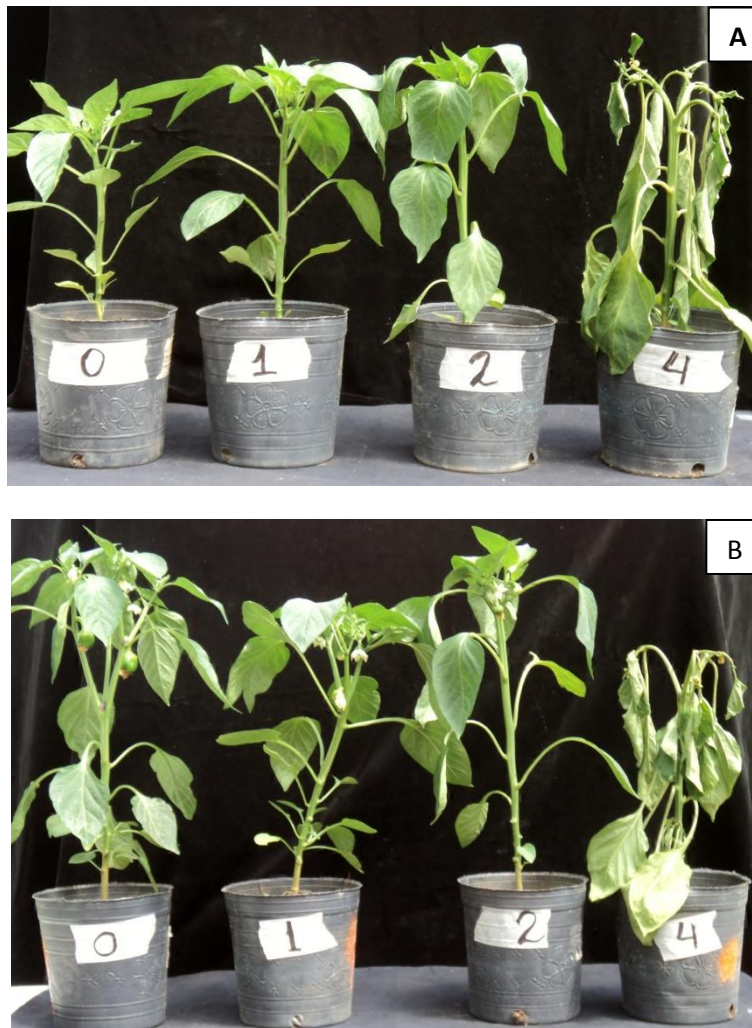


Figura 24. Plantas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre usadas en los ensayos de biología molecular. A: plantas no inoculadas, B: plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices*.

9- Efecto del cobre sobre la germinación de semillas de plantas de pimiento expuestas a diferentes niveles de contaminación por cobre.

Germinación de semillas obtenidas de plantas cultivadas con diferentes niveles de contaminación por cobre.

El porcentaje de germinación no se modificó con la concentración de cobre en la solución, de la misma forma que se observó en los ensayos de germinación con solución de cobre en la caja de Petri (gráficos 1 y 3). Por otro

lado, la longitud de la raíz disminuyó al aumentar la concentración de cobre, con diferencias significativas a partir de 100 μM , en las provenientes de plantas no inoculadas y a partir de 200 μM en las provenientes de plantas inoculadas. Se observó que en las de plantas micorrizadas la raíz tuvo un crecimiento mayor en la concentración de 200 μM respecto a las de plantas no micorrizadas, evidenciando la mayor tolerancia de las plantas inoculadas con hongos micorrícicos (tabla 15, cuadro 57 y 58).

Tabla 15. Porcentaje de germinación y longitud de la raíz de semillas y plántulas provenientes de plantas no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en la solución nutritiva.

Cu (mM)	No inoculadas		<i>Funneliformis mosseae</i>	
	germinación (%)	long. raíz (cm)	germinación (%)	long. raíz (cm)
0	78a	4,5a	88a	4,3a
10	75a	4,1a	95a	4,1a
50	75a	4,6a	86a	3,9a
100	90a	3,2ab	78a	2,8ab
200	85a	1,3b	80a	2,2ab
1000	74a	0,9b	90a	0,9b

Se presentan los valores promedio, las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre ($p < 0,05$).

Cuadro 57. Análisis de Varianza para germinación - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0	1	0	0,00	1,0000
B:cobre	13,3333	5	2,66667	0,45	0,8070
INTERACCIONES					
AB	164,333	5	32,8667	5,58	0,2015
RESIDUOS	141,333	24	5,88889		
TOTAL (CORREGIDO)	319,0	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 58. Análisis de Varianza para long. raíz - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:mico	0,0136111	1	0,0136111	0,58	0,4554
B:cobre	66,8714	5	13,3743	565,71	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2,78472	5	0,556944	23,56	0,0000
RESIDUOS	0,5674	24	0,0236417		
TOTAL (CORREGIDO)	70,2371	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Como se mencionó anteriormente, la sensibilidad de las plantas no está influenciada solamente por el tipo y concentración del contaminante, sino que depende también del estado de desarrollo de la planta (Liu et al., 2005). La germinación y el crecimiento de las plántulas son algunos de los procesos fisiológicos de mayor sensibilidad en las plantas y es regulado por la interacción de varias hormonas y factores ambientales (Iglesias & Babiano, 1996). Existen muchas investigaciones que indican que la germinación es un proceso altamente afectado por los metales pesados, sin embargo, no están muy documentados los mecanismos moleculares involucrados en la inhibición de la germinación de las semillas. El primer paso para comprender los procesos moleculares es la identificación de genes o proteínas que se expresan en respuesta al estrés abiótico, para producir plantas transgénicas con mayor tolerancia a MP (Di Donato et al., 2004). Estudios proteómicos revelaron que la toxicidad por cobre inhibe la germinación por la sub-regulación de la actividad de las enzimas α -amilasa o enolasa, afectando la absorción de agua y la movilización de las sustancias de reserva (Zhang et al., 2009). En este trabajo la germinación no se vio afectada por las dosis de cobre aplicadas a las plantas madres, de igual forma que ocurrió en los ensayos cuando las semillas se hicieron germinar con soluciones de cobre en distintas concentraciones. Si se observó la inhibición del crecimiento de la raíz, como también se había observado en el primer ensayo.

Otras investigaciones aseguran que el Cu no es de elevada toxicidad para el proceso de germinación, pero sí para el crecimiento de las plántulas y especialmente el crecimiento de la raíz (Kjar et al. 1998; Munzuroglu & Geckil, 2002), coincidiendo con nuestros resultados. Según numerosas investigaciones, el cobre se acumula primariamente en los tejidos de la raíz con poca traslocación a los tallos; por este motivo el efecto principal de la toxicidad por cobre es sobre el crecimiento de la raíz con una reducción en el número y longitud de los pelos radicales y daño en las cutículas radicales (Sheldon & Menzies, 2005). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el cobre se traslocó desde la raíz hacia la parte aérea llegando incluso a las semillas que al germinar evidenciaron una inhibición en el crecimiento de la raíz (figura 25). Esto confirma lo observado al analizar la partición del cobre en la planta, donde se encontró el metal en el fruto.



Figura 25. Semillas obtenidas de plantas de pimiento cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre en la solución nutritiva. A: no inoculadas, B: inoculadas con *Funneliformis mosseae*.

CAPITULO IV: Conclusiones

Conclusiones

La contaminación de los suelos agrícolas por metales pesados es un proceso de degradación muy extendido, que afecta a numerosas áreas del planeta (Holmgren et al., 1993; Wong et al., 2002; Nicholson et al., 2003; Romic & Romic, 2003; Mapanda et al., 2005; Luo et al., 2009; Wei & Yang, 2010). En un mundo basado en un modelo productivo intensivo, los procesos de contaminación directa (depósito de residuos urbanos, desechos de industrias, etc.) e indirecta (prácticas agrícolas inadecuadas) de los suelos seguirán produciéndose, y por tanto, afectando y perjudicando a los ecosistemas, tanto en la actualidad como en el futuro, ya que, los metales pesados son elementos persistentes en el suelo dado que no se biodegradan. La agricultura urbana puede generar riesgos para la salud humana y comprometer la seguridad alimentaria, a través del paso de los metales pesados y otros contaminantes a los alimentos por la absorción de los mismos del suelo, aire o agua contaminados (Olivares Rieumont et al., 2013). De lo expuesto se desprende la necesidad de profundizar los estudios en este tema, al respecto, de esta tesis se obtuvieron las siguientes conclusiones:

La germinación de las semillas de pimiento (*Capsicum annuum*) no fue afectada por las concentraciones de cobre ensayadas, por esto se concluye que la germinación no es un proceso fisiológico afectado por concentraciones bajas a moderadas de cobre.

El cobre inhibe el crecimiento de la raíz y en menor medida el de la parte aérea, debido a su toxicidad y no a un efecto osmótico, modificándose también la arquitectura de la raíz. La expresión de las proteínas en las raíces de las plantas de pimiento se alteró en presencia de cobre en el medio manifestada por el desarrollo de perfiles proteicos diferentes.

El pimiento es una especie micotrófica, en ausencia o presencia de bajas concentraciones de cobre, presentó valores de micorrización de 50% y de 70% con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices* respectivamente. El proceso de micorrización de las plantas de pimiento con los diferentes hongos micorrícicos ensayados, tiene un umbral de tolerancia a la presencia de cobre que está vinculado con el efecto fungicida del elemento. Al aumentar la concentración del metal la micorrización disminuyó, en presencia de 500 μM de cobre la micorrización fue de 30% y 40% con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices* respectivamente y en 1000 μM la micorrización fue nula con ambos inóculos, indicando que esta concentración es el límite de tolerancia para este

proceso en las condiciones ensayadas. El cobre afectó la viabilidad de las hifas de los hongos micorrícicos, por tanto en presencia de cobre la micorrización de las plantas de pimiento fue menor.

El estudio de los parámetros de crecimiento de plantas de pimiento analizados (altura, número de hojas, longitud de raíz, área foliar, peso seco aéreo, peso seco de raíz y peso seco total) confirma que el cobre reduce el crecimiento de las plantas y refleja el éxito de la inoculación con los hongos micorrícicos arbusculares, ya que las plantas inoculadas pudieron soportar concentraciones mayores que las no inoculadas, evidenciando que la inoculación aumenta el umbral de tolerancia al cobre.

En plantas cultivadas en condiciones de hidroponía, el cobre afectó el crecimiento en moderadas y altas concentraciones. Las plantas cultivadas en presencia de cobre absorben menos agua y nutrientes, lo que además está acompañado de una reducción de la conductancia estomática y cierre de estomas. Esto confirma que las plantas cultivadas con Cu tienen alteraciones radiculares que modifican su potencial de absorción. El cobre afectó la transpiración de las plantas, que se reflejó en el cierre estomático y provocó un aumento de la temperatura, alterando la capacidad de disipar el calor por las hojas. Las plantas micorrizadas presentaron mayor conductancia estomática que las no inoculadas, por lo que se concluye que la micorrización actúa atenuando el efecto indirecto del cobre sobre el estado hídrico desfavorable, y al mantener los estomas abiertos, tuvo un menor efecto sobre el crecimiento y la producción de biomasa. El índice de verdor, disminuyó ante la presencia de concentraciones crecientes de cobre en el suelo, efecto que no fue modificado por la micorrización. El cobre alteró la funcionalidad de las membranas celulares de la raíz afectando las proteínas de membrana, ya que la peroxidación de lípidos fue baja pero la conductividad relativa fue alta y por otro lado los perfiles proteicos de plantas expuestas a cobre fueron diferentes. La planta traslocó el cobre a la parte aérea y esto afectó la peroxidación de lípidos de membranas en las células de las hojas. Todas estas alteraciones fisiológicas observadas en las plantas de pimiento sometidas a estrés por cobre, se reflejan también en la disminución del crecimiento, determinado por la disminución del área foliar y el peso seco.

La presencia de cobre en el suelo provocó una caída en la fotosíntesis en relación directa con la concentración del elemento y la micorrización mitigó el efecto del metal. La eficiencia en el uso del agua disminuyó en presencia de altas concentraciones de cobre, efecto que es reducido por la micorrización. Esto concuerda con los valores de micorrización y viabilidad de las estructuras fúngicas, donde se pudo observar que si bien la presencia de cobre disminuyó

ambos parámetros, los hongos *F. mosseae* y *R. intraradices* tuvieron un mejor comportamiento que los hongos nativos, favoreciendo la respuesta de las plantas de pimienta. La respuesta de la micorrización en presencia de cobre difirió con las especies de hongo micorrízico utilizado y *Rhizophagus intraradices* mostró un mayor nivel de colonización comparado con *Funneliformis mosseae*.

A bajas concentraciones, el cobre se acumuló principalmente en la raíz, sin diferencias entre las plantas no inoculadas e inoculadas. A moderadas concentraciones, la micorrización aumentó considerablemente la absorción y traslocación del cobre, las plantas micorrizadas con *R. intraradices* traslocaron el cobre que se acumuló en los tallos y hojas basales. En la más alta concentración de cobre, la absorción aumentó en los dos tratamientos de inoculación (no inoculadas e inoculadas). La eficiencia de absorción, de traslocación y de fitoextracción es mayor en las plantas micorrizadas y esto además es función de la concentración de cobre en el medio. Si bien, no determinamos el contenido de cobre en las semillas podemos inferir, a través de las pruebas de germinación, que el metal se traslocó a este órgano de propagación generando efectos adversos en el crecimiento de las plántulas obtenidas.

La presencia de cobre en el medio de crecimiento de las plantas de pimienta modificó la expresión de proteínas de la hoja y la raíz, que presentaron perfiles de polipéptidos distintos con el aumento de la concentración del metal, que participarían en los mecanismos de toxicidad y tolerancia al cobre.

En base a lo expuesto, existen evidencias que permiten aceptar las hipótesis planteadas, sosteniendo que en este trabajo, se demuestra que el cobre tiene un efecto perjudicial sobre las plantas de pimienta cultivadas en condiciones controladas, mediante el estudio de los procesos morfológicos y fisiológicos involucrados. Se concluye, además, que los hongos micorrízicos arbusculares son afectados por la presencia de cobre en el suelo y que mediante la simbiosis que establecen con la planta, tienen una participación activa en el aumento de la tolerancia de las mismas al estrés por cobre.

Perspectivas futuras:

La continuidad de esta línea de investigación permitirá profundizar el conocimiento de los efectos del cobre sobre las plantas cultivadas y sobre las interacciones bióticas presentes en el agroecosistema.

Así, las futuras investigaciones deberían centrarse en:

- Estudiar el comportamiento de otros cultivos hortícolas, de hoja y de fruto, para poder corroborar las conclusiones extraídas en esta Tesis. Sería importante identificar cultivos indicadores de metales pesados y aquellos que acumulen los metales en órganos no consumibles, y obtener así conclusiones más robustas que puedan ser útiles tanto para el productor como para el consumidor.
- Ampliar el análisis del potencial fitorremediador del pimiento, al aumentar las concentraciones de cobre ensayadas en esta Tesis, e incluir otras especies hortícolas como potenciales fitorremediadoras.
- Profundizar el estudio de la expresión de los genes que estarían involucrados en la respuesta de las plantas de pimiento a las concentraciones elevadas de cobre en el suelo y el efecto de distintas interacciones bióticas en esta respuesta.
- Identificar microorganismos nativos resistentes a fin de hacer más eficientes las interacciones que le permitan a las plantas tolerar esta situación de estrés.
- Extrapolar estos estudios a situaciones de campo, ya que frecuentemente los resultados de laboratorio no responden a las condiciones que presentan los agroecosistemas, en los cuales se verifican numerosas variables biológicas que pueden modificar los diferentes procesos.

CAPITULO V: Bibliografía

- Aebi H.** 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, Yoon HS, Kim JS, Lee BH.** 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*; 67 (6): 1182-1193.
- Alvarado C, Dasgupta-Schubert N, Ambriz E, Sánchez-Yañez J, Villegas J.** 2011. Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(4) 357-364.
- Andrade SAL, Silveira APD, Jorge RA, de Abreu MF.** 2008. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by Arbuscular mycorrhiza. *Int J Phytoremediat* 10:1-13
- Angelova M, Asenova S, Nedkova V, Koleva-Kolarova R.** 2011. Copper in the human organism. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 9, No 1, pp 88-98.
- Arriagada MA, Herrera MA, Ocampo JA.** 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. *Water Air Soil Poll.* 166, 31-47.
- Augé RM.** 2001. Water relations, drought and vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3-42.
- Augé RM, Stodola AJW, Tims JE, Saxton AM.** 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant Soil*, 230: 87-97.
- Azcon, R.** 2000. Papel de la simbiosis micorrícica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. En: Alarcón A., Ferrera-Cerrato R. (eds) *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Colegio de Postgraduados, Ediciones Munid Prensa, Montecillo, Mexico, pp1-15.
- Azcón-Bieto, J, Talón M.** 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 522 pág. McGraw Hill. Interamericana.
- Bačkor MP, Váczi M, Barták J, Budová A, Dzubaj.** 2007. Uptake, photosynthetic characteristics and membrane lipid peroxidation levels in the lichen photobiont *Trebouxia erici* exposed to copper and cadmium. *Bryologist*, 110: 100-107.
- Baran E J.** 1994. *Química bioinorgánica* MCGRAW- HILL /INTERAMERICANA DE ESPAÑA, ISBN 9788448118167.

Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot F, Varma S, eds. *Micro-organisms in soils: roles in genesis and functions*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 195-212.

Baszynski T, Tukendorf A, Ruszkowska M, Skorzynska E, Maksymiec W. 1988. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non tolerant spinach exposed to excess copper. *Journal of plant physiology* 132:708-713.

Bates LS, Waldren RP, Tease ID. 1973. Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant Soil*. 85: 107-129.

Bazzaz FA, Carlson RW, Rolfe GL. 1974. The effect of heavy metals on plants: Inhibition of gas exchange in sunflower by Pd, Cd, Ni and Tl. *Environmental Pollution* 7: 241-246.

Bearden BN. 2001. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and soil water characteristics of vertisols. *Plant Soil*, 229: 245-258.

Bécard G, Pfeffer PE. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174: 62-68.

Bell FG, Bullock SET, Halbich TFJ, Lindsay P. 2001. Environmental impacts associated with an abandoned mine in the Witbank Coalfield, South Africa. *International Journal of Coal Geology* 45, 195-216.

Beltrano J, Ronco MG, Salerno MI, Ruscitti M, Peluso O. 2003. Respuesta de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) micorrizadas en situaciones de déficit hídrico y de rehidratación del suelo. *Revista de Ciencia y Tecnología* 8:1-7.

Beltrano J, Ronco MG. 2008. Improved tolerance of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) to drought stress and rewatering by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum*: effect on growth and cell membrane stability. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 20:29-37.

Beltrano J, Ruscitti MF, Arango MC, Ronco MG. 2013a. Changes in the accumulation of shikimic acid in mycorrhized *Capsicum annum* L. grown with application of glyphosate and phosphorus. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 25: 125-136.

Beltrano J, Ruscitti M, Arango MC, Ronco M. 2013b. Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and p levels. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13: 123-141.

Bethlenfalvai GJ, Linderman RG. 1992. Preface. *In Mycorrhizae in sustainable agriculture. Edited by G.J. Bethlenfalvai and R.G. Linderman.* ASA Special Publication 54, Agronomy Society of America, Madison, Wis. pp. viii–xiii.

Birhane E, Sterck FJ, Fetene M, Bongers F, Kuyper TW. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia*; 169(4): 895–904.

Birley MH, Lock K. 1998. Health and peri-urban natural resource production. *Environment and Urbanisation*, 10(1): 89-106.

Blee K A, Anderson AJ. 1998. Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *The Plant Journal*, 16 (5), 523-530.

Blum WEH. 1990. The challenge of soil protection in Europe. *Environmental Conservation* 17, 72-74.

Bocer SL. 2002. Cultivos protegidos y problemas ambientales: un estudio de la horticultura marplatense en la década del noventa. Tesis de Maestría, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Bonfante-Fasolo P. 1984. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In VA Mycorrhiza (Powell, C. L. and Bagyaraj, D. J., eds). Boca Raton: CRC Press, pp.5-33.

Bornet B, Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: reproducible and specific tools for genomic fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 19: 209–215.

Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254.

Bricker TJ, Pichtel J, Brown HJ, Simmons M. 2001. Phytoextraction of Pb and Cd from superficial soil: effects of amendments and croppings. *Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 36, 1597–1610.

Cabello M. 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology* 22: 233-236.

Cairney JWG, Meharg AA. 1999. Influences of anthropogenic pollution on mycorrhizal fungal communities. *Environ. Pollut.* 106 : 169–182.

Cekic FO, Unyayar S, Ortas I. 2012. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on biochemical parameters in *Capsicum annuum* grown under long term salt stress. *Turk J .Bot.* 36:63-72

Cervantes-García J, Solís-Guzmán G, Martínez-Trujillo M. 2011. Análisis del crecimiento de raíces primarias y raíces laterales de *Nicotiana tabaco* L. en condiciones de estrés generado por Cr(VI). *Biológicas (México)* 13: 65-69.

Chen LM, Lin CC, Kao CH. 2000. Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Bot Bull Acad Sin* 41:99–103.

Cheng Y, Zhou QX. 2002. Ecological toxicity of reactive X-3B red dye and cadmium acting on wheat (*Triticum aestivum*). *J. Environ. Sci.* 14 (1), 136-140.

Clemens S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212:475–486.

Clijsters H, Van Assche F. 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res* 7:31-40.

Colomer JC, Sánchez J. 2001. Agricultura y procesos de degradación del suelo. In: *Agricultura y Desertificación*, Martín de Santa Olalla F (Ed.). Mundi Prensa S.A., Madrid, Spain, pp. 109-131.

Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1996. Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil.* 185: 223-232.

da Silva GA, Trufem SF, Saggin Jr OJ, Maia LC. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. *Mycorrhiza* 15, 47–53.

Dassi B, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S. 1998. *Physiol & Molec Plant Pathol* 52:167-183.

Davies FT, Puryear JD, Newton RJ, Egilla JN, Grossi JAS. 2002. Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J. Plant Nutr.* 25: 2389-2407.

De Vos CHR, Schat H, Vooijs R, Who E. 1989. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene-cucubalus*. *J Plant Physiol* 135:164–169.

Del Val C, Barea JM, Azcon-Aguilar C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy metals contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65 N° 2: 718-723.

Demiral T, Türkan I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53, 247-257.

Di Donato RJ Jr, Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL. 2004. Arabidopsis yellow stripe-like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotinamine-metal complexes. *Plant J.* 39, 403-414.

Doncheva S, Amenós M, Poschenrieder Ch, Barceló J. 2005. Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56: 1213-1220.

Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Elizarrarás SM. 2005. Efecto del aluminio en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Tesis profesional de Biólogo. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

El-Kherbawy M, Angle JS, Heggo A, Chaney RL. 1989. Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biol Fertil Soils* 8 : 61-65.

Evelin H, Giri B, Kapoor R. 2012. Contribution of *Glomus intraradices* inoculation to nutrient acquisition and mitigation of ionic imbalance in NaCl-stressed *Trigonella foenum-graecum*. *Mycorrhiza* 22:203-217.

Favas PJC, Pratas J, Varun M, D'Souza R, Paul SM. 2014. Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. In: *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, Hernandez-Soriano MC (Ed). Intech: online publishing.

Felipó MT, Garau MA. 1987. La Contaminació del Sòl. Procés de Degradació del Medi Edàfic i de l'Entorn. Quaderns d'Ecologia Aplicada, Servei del Medi Ambient, Diputació de Barcelona, Barcelona, Spain.

Freeman JL, Persans MW, Nieman K, Albrecht C, Peer W, Pickering IJ, Salt DE. 2004. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16, 2176–2191.

Fuentes D, Disante KB, Valdecantos A, Cortina J, Vallejo VR. 2007. Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. *Chemosphere* 66:412–420.

Fusconi A, Gnani E, Trotta A, Berta G. 1999. Apical meristems of tomato roots and their modifications induced by arbuscular mycorrhizal and soilborne pathogenic fungi. *New Phytologist*, 142, 505–516.

Galán Huertos E, Romero Baena A. 2008. Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla*. nº 10. Revista de la sociedad española de mineralogía.

Gange A, Bower E, Brown V. 1999. *Oecologia* 120: 123-131.

Garat J, Ahumada A, Otero J, Terminiello L, Bello G, Ciampagna M. 2009. Las hortalizas típicas locales en el cinturón verde de La Plata: su localización, preservación y valorización. *Horticultura Argentina* 28(66): 32-39.

García M. 2012. Análisis de las transformaciones de la estructura agraria hortícola platense en los últimos 20 años. El rol de los horticultores bolivianos. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de La Plata.

Gaur A, Adholeya A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Sci* 86:528–534.

Ge Y, Murray P, Hendershot W. 2000. Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution* 107, 137-144.

Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology* 150, 197–202.

Ghayour-Mobarhan M, Taylora A, New SA, Lamb DJ, Ferns GAA. 2005. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. *Clin Biochem*, 42(5):364-75.

Gibson R. 2005. Principles of nutritional assessment. Second edition Oxford University Press pp. 885.

Gildon A, Tinker PB. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. 1. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* 95 : 247–261

Giuffrède López Carnelo L, Ratto de Miguez S, Marbán L. 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of the Total Environment* 204(3), 245–250.

Gnekow MA, Marschner H. 1989. Role of VA-mycorrhiza in growth and mineral nutrition of apple (*Malus pumila* var. *Domestica*) rootstock cuttings. *Plant and Soil* 119, 285– 293.

Göhre V, Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223:1115-1123.

Gonzalez-Chávez MC, Carrillo-Gonzalez R, Wright SF, Nichols KA. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ Pollut* 130Ñ 317-323.

Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of plants. *Science* 230, 674–676.

Guerra Silva BE. 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*, ISSN 0379-3962, ISSN-e 2215-3241, Vol. 21, N°. 1, págs. 191-201.

Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1–11.

Hamada AM. 2001. Vitamin or salicylic acid treatments versus the adverse effects of copper stress on photosynthesis and some related activities of wheat seedlings. In: *Proceeding XIIth International Photosynthesis Congress, Brisbane, Australia, August 18–23, 2001.*

Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J. 2002. A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell*, Vol. 14, 2413–2429.

Hayat S, Hasan SA, Fariduddin Q, Ahmad A. 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *J. Plant Int.* 3 (4), 297–304.

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14–25.

Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125, 189–198.

Heggo A, Angle JS, Chaney RL. 1990. Effects of vesiculararbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biol Biochem* 22:865-869.

Hildebrandt U, Kaldorf M, Bothe H. 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Physiol.* 154:709-717.

Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochem* 68:139-146

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347.

Holleman A, Wiberg E. 1985. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie.* Berlin.

Holmgren GGS, Meyer MW, Chaney RL, Daniels RB. 1993. Cadmium, lead, zinc, copper and nickel in agricultural soils of the United States of America. *Journal of Environmental Quality* 22, 335-348.

Hussein MM, Balbaa LK, Gaballah MS. 2007. Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3 (4), 321-328.

Iglesias RG, Babiano MJ. 1996. ABA levels in chick-pea seeds during the first twenty-four hours of germination. Effect of polyethyleneglycol. *Phytochemistry* 41, 681-683

INDEC. 2010. *Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010.*

Jack E, Hakvoort HWJ, Reumer A, Verkleij JAC, Schat H, Ernst WHO. 2007. Real-time PCR analysis of metallothionein-2b expression in metallicolous and non-metallicolous populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Environ Exp Bot* 59:84-91.

Jacquot-Plumey E, van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2001 25S rDNA-based molecular monitoring of glomalean fungi in sewage sludge-treated field plots. *Environ Microbiol* 3:525-531.

Jamal SN, Zafal M, Athar M. 2006. Effect of aluminium and chromium on the germination and growth of two *Vigna* species. *Int J Environ Sci Technol* 3:53-58.

Janda T, Szalai G, Rios-Gonzalez K, Veisz O, Paldi E. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci.* 164, 301-306.

Jonak C, Nakagami H, Hirt H. 2004. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiol.* 2004 Oct; 136(2): 3276–3283.

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

Kabata-Pendias A. 2001. Trace elements in soils and plants, 3rd edn. CRC, USA.

Kabata-Pendias A. 2011. Trace Elements in Soils and Plants. 4th edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Kastori R, Petrović M, Petrović N. 1992. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition* Volume 15, 11: 2427-2439.

Kaya C, Ashraf M, Sonmez O, Aydemir S, Levent Tuna A, Ali Cullu M. 2009. The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae.* 121:1-6.

Khan AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* 18:355–364.

Khan W, Prithviraj B, Smith DL. 2003. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J. Plant Physiol.* 160, 485–492.

Khodary SFA. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *Int. J. Agric. Biol.* 6, 5–8.

Killham K, Firestone MK. 1983. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. *Plant Soil* 72 :39–48.

Kjar C., Pedersen MB, Elmegaard N. 1998. Effect of soilcopper on black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in the laboratory and in the field. *Arch. Environ. Cont. Toxi.* 35: 14–19.

Klessig DF, Malamy J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1439–1458.

Knorzer OC., Lederer B, Durner J, Boger P. 1999. Antioxidative defense activation in soybean cells. *Physiol. Plant.* 107, 294–302.

Koca H, Ozdemir F, Turkan I. 2006. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Biologia Plantarum* 50 (4): 745-748.

Kohler J, Hernandez JA, Caravaca F, Roldán A. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water stressed plants. *Functional Plant Biology*. 35:141-151.

Konno H, Nakato T, Nakashima S, Katoh K. 2005. *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. *J Exp Bot* 56:1923-1931.

Kothari SK, Marschner H, Romheld V. 1991. Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant and Soil* 131, 177-185.

Kouremenou-Dona E, Artemis D, Papoutsis J, Spiliopoulou C. 2006. Copper and zinc concentrations in serum of healthy Greek adults, *Sci Total Environ*, 359(1-3): 76-81.

Kramer U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol* 16:133-141.

Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L. 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, Volume 165, Issue 9, Pages 920-931.

Labra M, Gianazza E, Waitt R, Eberini I, Sozzi A, Regondi S, Grassi F, Agradi E. 2006. *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments, *Chemosphere* 60, 1234-1244.

Laemmli UK. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, 227:680-85.

Lal R. 2001. Soil degradation by erosion. *Land Degradation & Development*, 12: 519-539.

Lamoreaux RJ, Chaney WR. 1978. The Effect of Cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiologia Plantarum* 43: 231-236.

Lee S, Moon J, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS. 2003. Overexpression of arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.* 131(2): 656-663.

Leung HM, Ye ZH, Wong MH. 2006. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (as hyperaccumulator) in as-contaminated soils. *Environ Pollut* 139:1-8.

Leyval C, Berthelin J, Schontz D, Weissenhorn I, Morel JL. 1991. Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu and Cd applied as mineral salts or sewage sludge. In: Farmer JG (ed) *Heavy metals in the environment*. CEP Consultants, Edinburgh, pp 204-207.

Leyval C, Singh BR, Joner EJ. 1995. Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water Air Soil Pollut.* 84: 203-216

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

Li XL, Marschner H, George E. 1991. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant and Soil* 136, 49-57.

Li G, Wanb S, Zhoua J, Yanga Z, Qina P. 2010. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Industrial Crops and Products* 31, 13-19.

Liao JP, Lin XG, Cao ZH, Shi YQ, Wong MH. 2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. *Chemosphere* 50 (2003) 847-853.

Lidon FC, Henriques FS. 1992. Copper toxicity in rice: diagnostic criteria and effect on tissue Mn and Fe. *Soil Sci* 154:130-135.

Lin AJ, Zhang XH, Wong M, Ye ZH, Lou LQ, Zhu YG. 2007. Increase of multi-metal tolerance of three leguminous plants by arbuscular mycorrhizal fungi colonization. *Environ Geochem Health* 29:473-481.

Linderman RG. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay GJ & Linderman RG (Eds) *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA Spec. Publ., Madison, Wisconsin. pp 45-70.

Liu J, Xiong ZT, Li TY, Huang H. 2004. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from copper contaminated and noncontaminated sites. *Environ Exp Bot* 52:43-51

Liu X, Zhang S, Shan X, Zhu YG. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amylolytic activity of wheat. *Chemosphere* 61, 293–301.

Loaiza JC. 2010. El recurso suelo. *Suelos Ecuatoriales* 41 (1):6-18

Lockitch G, Haistead AC, Wadsworth L, Quigley G, Reston L, Jacobson B. 1988. Age and sex-specific pediatric reference intervals and correlations for zinc, copper, selenium, iron, vitamin A and E, and related proteins. *Clin Chem*, 34(8):1625-8.

Lombardi L, Sebastiani L. 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sci* 168:797-802.

Loomis WD. 1969. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. *Methods Enzymol.* 13:555-563.

Lou LQ, Shen ZG, Li XD. 2004. The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environ Exp Bot* 51:111–120.

Luo L, Ma Y, Zhang S, Wei D, Zhu YG. 2009. An inventory of trace elements inputs to agricultural soils in China. *Journal of Environmental Management* 90, 2524–2530.

Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L) cultivars differ in salinity resistance, *Ann. Bot.* 78:389-398.

Maehly AC, Chance B. 1954. The assays of catalase and peroxidase. En: Glick D., ed., *Methods of biochemical analysis* vol. 1, pp.357.

Maksymiec W, Wojcik M, Krupa Z. 2007. *Chemosphere* 66, Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate 421–427.

Malekzadeh P, Khara J, Farshian S. 2007. Copper toxicity influence on antioxidant enzymes activity in tomato plants and role of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum* in the tolerance of toxicity. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (12): 2008-2013.

Malekzadeh P, Farshian SH, Ordubadi B. 2012. Interaction of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices* and *Glomus etunicatum*) with tomato

plants grown under copper toxicity. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(46), pp. 10555-10567.

Manjunath A, Habte M. 1988. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and the uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*. *Plant and Soil* 106, 97-103.

Manoharan P, Shanmugaiah V, Balasubramanian N, Gomathinayagam S, Sharma MP, Muthuchelian K. 2010. Influence of AM fungi on the growth and physiological status of *Erythrina variegata* Linn. grown under different water stress conditions. *European Journal of Soil Biology*. 46:151-156.

Mapanda F, Mangwayana EN, Nyamangara J, Giller KE. 2005. The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107, 151-165.

Marques APGC, Oliveira RS, Samardjieva AK, Pisarra J, Rangel AOSS, Castro PML. 2007. *Solanum nigrum* grown in soil contaminated soil: effect of arbuscular mycorrhizal fungi on zinc accumulation and histolocalisation. *Environ Pollut* 145:691-699.

Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.

Marschner H, Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*. 159:89-102.

Martínez-Trujillo M, Sántiz-Gómez M, Ortiz - Castro R, Carreón - Abud Y. 2009. Efecto del cobre en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. *Biológicas (México)* 11: 122-131.

Martínez-Trujillo M, Solís-Guzmán G, Jiménez-Saragoz JC, López-Hernández D, Carreón-Abud Y, Ríos-Chávez P. 2013. Morphogenic responses of the roots of *Arabidopsis thaliana* (Magnoliophyta: Brassicales) to Cr(VI) stress. *Rev. Chil. Hist. Nat.* vol.86 no.2.

McLaughlin MJ, Parker DR, Clarke JM. 1999. Metals and micronutrients—food safety issues, *Field Crops Res.* 60, 143-163.

Medina A, Vassilev N, Barea JM, Azcon R. 2005. Application of *Aspergillus niger*-treated agrowaste residue and *Glomus mosseae* for improving growth and nutrition of *Trifolium repens* in a Cd- contaminated soil. *J Biotechnol* 116:369-378.

- Mertz W.** 1981. The essential trace elements. *Science* 213:1332–1338.
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz K.** 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant. Physiol.* 132, 272–281.
- Miller RM, Jastrow JD.** 1999. Mycorrhizal fungi influence soil structure. *In* Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. *Edited by* Y. Kapulnik and D.D. Douds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 3–18.
- Mirlean N, Roisenberg A, Chies JO.** 2007. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environ Pollut* 149:10–17.
- Mishra A., Choudhuri MA.** 1999. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biologia Plantarum* 42 (3), 409–415.
- Moran R, D Porath.** 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide. *Plant Physiol* 65: 478–479.
- Moreno JL, Garcia C, Hernandez T, Ayuso M.** 1997. Application of composted sewage sludges contaminated with heavy metals to an agricultural soil: effect on lettuce growth. *Soil Sci Plant Nutr* 4:565–573.
- Munzuroglu O, Geckil H.** 2002. Effects of metals on seedgermination, root elongation, and coleoptile and hypocotyls growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Arch. Environ. Cont. Tox.* 43: 203–213.
- Muradoglu F, Gundogdu M, Ercisli S, Encu T, Balta F, Jaafar H, Zia-Ul-Haq M.** 2015. Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biological Research*, 48:11.
- Murphy A, Taiz L.** 1997. Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 *Arabidopsis* ecotypes. *New Phytol* 136:211–222.
- Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian LV, Taiz L.** 1999. Early copper-induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol* 121:1375–1382.
- Nagalakshmi N, Prasad MNV.** 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* 160: 291–299.
- Navarro Aviñó JP, Aguilar Alonso I, López-Moya JR.** 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en

plantas. *Ecosistemas, Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*. 2007/2.

Nasim G. 2010. The role of arbuscular mycorrhizae in inducing resistance to drought and salinity stress in crops. p. 119-141. In: Ashraf, M., M. Ozturk, and M.S.A. Ahmad (Eds.). *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Neumann D, Nieden UZ, Lichtenberger O, Leopold I. 1995. How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J Plant Physiol* 146:707-717.

Nicholson FA, Smith SR, Alloway BJ, Carlton-Smith C, Chambers BJ. 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the Total Environment* 311, 205-219.

Ocampo JA, Barea JM. 1982. Depressed metabolic activity of VA mycorrhizal fungi by photosynthesis inhibitor herbicides, p. 267-270. In: S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson, and A. Trouvelot (eds.). *Mycorrhizae, an integral part of plants: Biology and perspectives for their use*. INRA Publ. Colloq., France.

Ocampo JA. 1993. Influence of pesticides on VA mycorrhizal. p.214-226 In: *Pesticide-plant pathogen interactions in crop production: beneficial and deleterious effects*, CRC Press, Boca Raton, FL.. (Altman, J. ed).

Olivares Rieumont S, García Céspedes D, Lima Cazorla L, Saborit Sánchez I, Llizo Casals A, Pérez Álvarez P. 2013. Niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en hortalizas cultivadas en una zona altamente urbanizada de la ciudad de La Habana, Cuba. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (4) 285-294.

OMS. 1986. *Directives de Qualité pour L'Eau de Boisson*. Vol. 2. Critères d'hygiène et Documentation à l'appui. Genève: OMS.

Orlowska E, Ryszka P, Jurkiewicz A, Turnau K. 2005. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonization of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. *Geoderma* 129: 92-98.

Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C. 2007. Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* 172: 684-691.

Ott T, Fritz E, Polle A, Schutzendubel A. 2002. Characterization of antioxidative systems in the ectomycorrhiza -building basidiomycete *Paxillus*

involutus (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 359-366.

Ouziad F, Hidebrandt U, Schmelzer E, Bothe H. 2005. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J Plant Physiol* 162:634-649

Pal M, Szalai G, Horvath E, Janda T, Paldi E. 2002. Effect of salicylic acid during heavy metal stress. *Acta Biol. Szegediensis* 46, 119-120.

Passariello B, Giuliano V, Quaresima S, Barbaro M, Caroli S, Forte G, Garelli G, Iavicoli I. 2002. Evaluation of the environmental contamination at an abandoned mining site. *Microchemical Journal* 73, 245-250.

Pastori G, Foyer CH, Mullineaux P. 2000. Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Journal Experimental Botany* 51: 107-113.

Pawlowska TE, Charvat I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 70:6643-6649.

Peuke AD, Rennenberg H. 2005 *Phytoremediation*. *EMBO Rep* 6:497-501.

Phillips J, Hayman D. 1970. Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal funRI for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 159-161.

Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A. 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 60, 153-162.

Popova L, Pancheva T, Uzunova A. 1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23, 85-93.

Puschenreiter M, Hartl W, Horak O. 1999. Urban agriculture on heavy metal contaminated soils in Eastern Europe. Ludwig Boltzmann Institute for Organic Agriculture and Applied Ecology, Viena.

Querejeta JI, Barea JM, Allen MF, Caravaca F, Roldán A. 2003. Differential response of $\delta^{13}\text{C}$ and water use efficiency to arbuscular mycorrhizal infection in two aridland woody plant species. *Oecologia*; 135:510-515.

Quilambo OA. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal simbiosis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp 539-546.

Rabie GH. 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (4), pp. 332-345.

Rauser WE, Curvetto NR. 1980. Metallothionein occurs in roots of *Agrostis* tolerant to excess copper. *Nature* 287: 253-254.

Repetto O, Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Berta G, GianinazziPearson V, Gianinazzi S. 2003. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytol.* 157, 555-567.

Reyes Jaramillo I. 2014. Una ojeada a la clasificación del suelo. *ContactoS* 91, 30-40.

Rhodes LH, Gerdemann JW. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytologist* 75, 555-561.

Ritchie GSP, Sposito G. 1995. Speciation in soils. In: *Chemical Speciation in the Environment*, Ure AM, Davidson CM (Eds.). Blackie Academic & Profesional, Glasgow, Scotland, pp. 201-233.

Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel J-P, Belimov AA, 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

Rodríguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker A. 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996- 998.

Romic M., Romic D. 2003. Heavy metals distribution in agricultural topsoils in urban area. *Environmental Geology* 43, 795-805.

Ronco M, Ruscitti M, Arango C, Peluso O, Beltrano J. 2007. Respuesta a diferentes concentraciones de cromo en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) inoculadas con *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, XXXI Jornadas Argentinas de Botánica*. Vol. 42 Suplemento septiembre 2007. Córdoba, Argentina. ISSN 0373-520X.

Ronco MG, Ruscitti MF, Arango MC, Beltrano J. 2008. Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *J. Hort. Sc. Biotech.* 83: 497-505.

Roosens NH, Bernard C, Lephae R, Verbruggen N. 2004. Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett* 577:9-16.

Ruscitti M, Ronco M, Arango C, Beltrano J. 2007. Respuesta a la salinidad del suelo y la disponibilidad de fósforo en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) inoculadas con *Glomus intraradices*. VI Encuentro nacional científico técnico de biología del suelo, IV Encuentro sobre fijación biológica de nitrógeno. Río Cuarto, Argentina. ISBN 978-950-665-438-2.

Ruscitti MF, Arango MC, Ronco MG, Beltrano J. 2011. Inoculation with mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* or *G. intraradices* modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 23:15-25

Ryan MH, Graham JH. 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil*, 244: 263-271.

Salt DE, Rauser WE. 1995. MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* 107, 1293-1301.

Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 643-668.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Sandmann G, Boger P. 1980. Copper mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiology* 66: 797-800.

Sannazzaro AI, Echeverría M, Albertó EO, Ruiz OA, Menéndez AB. 2007. Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhizal. *Plant Physiol Biochem* 45:39-46.

Sass JE. 1958. *Botanical Microtechnique*. 3rd. Edition. The Iowa State College Press, Ames, IA, USA. 228 pp.

Schaffer GF, Peterson RL. 1993. Modifications to clearing methods used in combination with vital staining of roots colonized with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 4: 29-35.

Schüepp H, Dehn B, Sticher H. 1987. Interaktionen zwischen VA-Mykorrhizen und Schwermetallbelastungen. *Angew Bot* 61:85-95.

Schwartz C, Gerard E, Perronnet K, Morel JL. 2001. Measurement of in situ phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a former smelter site. *Science of the Total Environment* 279, 215–221.

Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K. 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30, 157–161.

Shakirova FM. 2007. Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and anti-stress action of salicylic acid. In: Hayat, S., Ahmad, A. (Eds.), *Salicylic Acid, A Plant Hormone*. Springer, Dordrecht, Netherlands.

Shalaby AM. 2003. Responses of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Spores Isolated from Heavy Metal-polluted and Unpolluted Soil to Zn, Cd, Pb and Their Interactions in vitro. *Pakistan Journal of Biological Sciences* Vol: 6 Issue: 16.

Sheldon AR, Menzies NW. 2005. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil*, 278:341–349.

Shen ZG, Zhang FQ, Zhang FS. 1998. Toxicity of copper and zinc in seedlings of Mung Bean and inducing accumulation of polyamine. *J Plant Nutr* 21(6):1153–1162.

Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar K, Dixon RA, Lamb C. 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defence mechanisms. *Plant Cell* 9: 261–270.

Singh S, Sinha S. 2004. Scanning electron microscopic studies and growth response of the plant of *Helianthus annuus* L. grown on tannery sludge amended soil. *Environ Int* 30:389–395.

Singh D, Nath k, Sharma YK. 2007. Responses of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *Journal of Environmental Biology*; 28:409–414.

Singh RP, Agrawal M. 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere* 67:2229–2240

Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 605 pp.

Snijders C. 1994. Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins. Eagan Press, Minn. Pp 37-58.

Sobkowiak R, Deckert J. 2006. Proteins induced by cadmium in soybean cells, J. Plant Physiol. 163, 1203–1206.

Song YF, Zhou QX, Xu HX, Ren LP, Gong P. 2002. Ecological toxicity of heavy metals in soils acting on seed germination and root elongation of wheat. Chin. J. Appl. Ecol. 13 (4), 459-462.

Souza Casadinho O, Bocero S. 2008. Agrotóxicos: Condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). Revista Iberoamericana de Economía Ecológica, 9: 87-101.

Stavisky A. 2010. Situación actual de la plasticultura en Argentina. En XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. Rosario: Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO).

Taiz L, Zeiger E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Massachusetts: Sinauer.

Tisdall JM. 1991. Fungal hyphae and structural stability of soil. Aust. J. Soil Res. 29: 729–743.

Trouvelot A, Kough J, Rianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Rianinazzi-Pearson V, Rianinazzi S (eds), Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects, pp.217-221. INRA-Press, Dijon, France.

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. Environ. Microbiol. 8, 971-983.

Van Assche F, Clijsters H. 1980. Zinc mediated effects on leaf CO₂ diffusion conductances and net photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. Photosynthesis Research 1: 171-180.

Van Hoof NALM, Hassinen VH, Hakvoort HWJ. 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. Plant Physiol 126:1519–1526.

Vinit-Dunand F, Epron D, Alaoui-Sosse´B, Badot P. 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science* 163: 53-58.

Vogel-Mikus.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. *Environ. Pollut.* 133: 233-242.

Wang M, Zhou Q. 2005. Single and joint toxicity of chlorigon-ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum*. *Ecotox. Environ. Safe.* 60, 169-175.

Wang YP, Chao CC. 1992. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae and heavy metals on the growth of soybean and phosphate and heavy metal uptake by soybean in major soil groups of Taiwan. *J Agric Assoc China New Ser* 157:6-20.

Wei L, Luo Ch, Li X, Shen Z. 2008. Copper accumulation and tolerance in *Chrysanthemum coronarium* L. and *Sorghum sudanense* L. *Arch Environ Contam Toxicol* 55:238-246.

Wei B, Yang L. 2010. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. *Microchemical Journal* 94, 99-107.

Weissenhorn I, Leyval C. 1995. Root colonization of maize by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant Soil* 175 : 233-238.

Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J. 1995. Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5 : 245-251.

Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as Total carotenoids, using various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *J. Plant. Phys.* Vol. 144:307-313.

Wong SC, Li XD, Zhang G, Qi SH., Min YS. 2002. Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China. *Environmental Pollution* 119, 33-44.

Wu Q, Xia R. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology* 163: 417-425.

Wu FY, Ye ZH, Wu SC, Wong MH. 2007. Metal accumulation and arbuscular mycorrhizal status in metalicolous and nonmetallicolous populations of *Pteris vittata* L. and *Sedum alfredii* Hance. *Planta* 226, 1363–1378.

Wu FY, Bi YL, Leung HM, Yec 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.

Yadav SK. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants / *South African Journal of Botany* 76, 167–179.

Yalpani N, Enyedi AJ, Leon J, Raskin I. 1994. Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193, 372–376.

Yannarelli G, Fernández-Alvarez A, Santa-Cruz D, Tomaro M. 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68, 505–512.

Yano-Melo AM, Maia LC, Saggin JR. OJ, Lima-Filho JM, Melo NF. 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micro propagated banana plantlets. *Mycorrhiza* 9:119-123.

Yao Q, Li X, Weidang A, Christie P. 2003. Bi-directional transfer of phosphorus between red clover and perennial ryegrass via arbuscular mycorrhizal hyphal links. *Eur. J. Soil Biol.*, 39, 47-54.

Yang PF, Li XJ, Wang XQ, Chen H, Chen F, Shen SH. 2007. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics* 7: 3358–3368.

Yano-Melo A, Saggin Júnior O, Lima-Filho J, Melo N, Maia, L. 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza*, 9 :119–123.

Yruela I. 2005. Copper in plants. *Braz J Plant Physiol* 17:145-156.

Yurekli, F.; Porgali, Z. B. 2006. The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48/2: 7–13.

Zacchini M, Pietrini F, Scarascia Mugnozza G, Iori V, Pietrosanti L, Massacci A. 2009. Metal Tolerance, Accumulation and Translocation in Poplar and Willow Clones Treated with Cadmium in Hydroponics. *Water Air Soil Pollut* (2009) 197:23–34.

Zhang H, Lian C, Shen Z. 2009. Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. *Annals of Botany* 103: 923–930.

Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants. A review. *Gene* 179: 21-30.