

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**INFLUENCIA DE DOS PLANTAS METALOFITAS Y UNA AGRICOLA
SOBRE EL DESARROLLO DE LA SIMBIOSIS MICORRIZICA
ARBUSCULAR A NIVELES CRECIENTES DE TOXICIDAD POR
COBRE.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

ROBERTO ANDRES COX SAEZ

PROFESOR GUIA: PABLO CORNEJO RIVAS

TEMUCO – CHILE
2011

INFLUENCIA DE DOS PLANTAS METALOFITAS Y UNA AGRICOLA SOBRE EL DESARROLLO DE LA SIMBIOSIS MICORRIZICA ARBUSCULAR A NIVELES CRECIENTES DE TOXICIDAD POR COBRE.

PROFESOR GUIA

: NOTA:

DR. PABLO CORNEJO RIVAS
Ingeniero Agrónomo
Doctor en Biología Agraria y Acuicultura
Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales.
Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración
Universidad de la Frontera

PROFESOR CONSEJERO

: NOTA:

MG. SEBASTIAN MEIER ROMERO
Ingeniero Agrónomo
Magister en Cs. de Recursos Naturales

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, a través del proyecto FONDECYT 11080131.

Agradezco de forma especial a los profesores y buenos amigos, Pablo Cornejo y Sebastián Meier, quienes en todo momento me apoyaron para finalizar de buena forma este trabajo. También quiero agradecer a todos quienes me ayudaron a finalizar esta etapa de la vida, mi familia y amigos. A todos ellos muchas gracias.

A Matias Catrileo Quezada abatido por la espalda por una bala de carabineros de Chile en un proceso de recuperación de tierras, y a Erik von Jentschky Vergara y Carla Mellado Valdebenito, hermanos, luchadores, que un día la naturaleza los quiso junto a ella.

hasta pronto amigos...

INDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	10
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	13
2.1	Descarga de metales pesados por actividades mineras	13
2.1.1	La minería del cobre en Chile	13
2.1.2	Efecto sobre los ecosistemas	14
2.1.3	Efecto sobre la diversidad y funcionalidad de los microorganismos del suelo	15
2.2	Presencia de metalofitas endémicas en zonas contaminadas	16
2.2.1	Características de la flora metalofita	16
2.2.2	Utilización de plantas agrícolas con fines de fitorremediación	18
2.2.3	Metalofitas presentes en Chile	18
2.2.4	Utilización de plantas agrícolas con fines de fitorremediación	19
2.3	Micorrizas arbusculares	20
2.3.1	Taxonomía y diversidad	21
2.3.2	Asociaciones de metalofitas con hongos micorrizicos arbusculares	23
2.3.3	Mecanismos de tolerancia a estrés por metales en metalofitas micorrizadas	24
2.3.4	Contribución de la simbiosis micorrizica arbuscular al crecimiento vegetal en suelos contaminados con metales	25
2.3.5	Expectativas de su aplicación biotecnológica en Chile	27
3	MATERIALES Y METODOS	29
3.1	Materiales	30
3.1.1	Suelo	30
3.1.2	Plantas	31
3.1.3	Inóculos de hongos micorrizicos arbusculares	32
3.2	Métodos	33

3.2.1	Diseño experimental	33
3.2.2	Condiciones de establecimiento, crecimiento y cosecha	34
3.2.3	Determinaciones	35
3.3	Análisis estadístico	37
4	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSION	38
4.1	Producción de biomasa	38
4.2	Colonización radical	40
4.3	Densidad de esporas	42
4.4	Densidad de micelio	45
4.5	Acumulación de cobre en esporas	46
5	CONCLUSIONES	49
6	RESUMEN	51
7	SUMMARY	52
8	LITERATURA CITADA	53

INDICE DE CUADROS

N°		Página
1	Esquema de tratamientos para cada especie vegetal en el estudio	33

INDICE DE FIGURAS

Nº		Página
1	Interacciones involucradas en la degradación de los ecosistemas naturales ocasionadas por la descarga de metales pesados (Cornejo, <i>et al.</i> , 2008; modificado de Barea, <i>et al.</i> , 1999).	14
2	Respuestas típicas de las plantas frente a la presencia de metales pesados en el suelo (Adriano, 2001).	17
3	Estructuras de HMA. a) Arbúsculos y b) vesículas de aproximadamente 400 millones de años. c) Arbúsculos y d) vesículas de HMA actuales.	21
4	Relaciones filogenéticas en el phylum Glomeromycota basadas en las secuencias de la subunidad pequeña del ARNr (SSU, 18S) (basado en Schüßler, <i>et al.</i> , 2001b, revisado por Walker y Schüßler 2004).	22
5	Mecanismos de tolerancia al estrés por metales pesados desarrollados por la simbiosis (extraído de Cornejo, <i>et al.</i> , 2008).	25
6	Estrategia propuesta para el estudio de la diversidad de hongos MA y actuación en zonas afectadas por actividades mineras para la recuperación de cubierta vegetal (tomado de Cornejo, <i>et al.</i> , 2008).	27
7	Ubicación geográfica del área de estudio.	29
8	Sector aledaño a la Fundición Ventanas, ubicada en el valle de Puchuncaví. a) Fundición Ventanas, b) cárcavas en sector aledaño y c) vista panorámica del sector.	30
9	Plantas utilizadas en el estudio a) <i>Imperata condensata</i> , b) <i>Oenothera picensis</i> y c) <i>Helianthus annuus</i> .	31
10	Obtención de plántulas para el estudio e instalaciones físicas a) Almaciguera para <i>Oenothera picensis</i> , <i>Helianthus annuus</i> e <i>Imperata condensata</i> inoculados con <i>Glomus claroides</i> , b) invernaderos del departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Temuco.	34

INDICE DE FIGURAS

- 11 Producción de biomasa seca (g) aérea y radical con y sin inoculación del HMA 39
Glomus claroideum (GC) y HMA nativos (HN), bajo diferentes condiciones de Cu en suelo (0 a 450 mg Cu Kg⁻¹) en a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y c) *Helianthus annuus*. SM = Plantas sin micorriza, S.N.C.= Suelo no contaminado. S.C. =Suelo contaminado base, † = Planta muerta.
- 12 Colonización micorrícica en a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y c) 41
Helianthus annuus. SM = Plantas sin micorriza, S.N.C.= Suelo no contaminado. S.C. =Suelo contaminado base, † = Plantas muertas. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey P<0,05).
- 13 Cuantificación de esporas de hongos micorrícico arbusculares en 20 gramos de 43
suelo para a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y c) *Helianthus annuus*. SM = Plantas sin micorriza, S.N.C.= Suelo no contaminado. S.C. =Suelo contaminado base, † = Plantas muertas. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey P<0,05).
- 14 Densidad de micelio de HMA sometidos a niveles crecientes de contaminación 45
por Cobre para las plantas metalofitas a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y una agrícola c) *Helianthus annuus*. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey P<0,05).
- 15 Acumulación de cobre en esporas, a) Espora de *Glomus claroideum* en suelos no 47
contaminados, b) colonia de esporas *Glomus claroideum* acumulando cobre en suelos contaminados y c) espora de *Glomus claroideum* con su contenido interno expuesto. Esporas presentes en los tratamientos de *Imperata condensata* Cu+300 y Cu+450.
- 16 Efecto de la concentración de cobre en suelo sobre la acumulación de cobre en 48
esporas. a) Cantidad de esporas verdes y b) proporción (%) según el total de esporas verdes en los tratamientos de *Imperata condensata* (I). GC = *Glomus claroideum*, NC= no contaminado, Ø = Suelo contaminado base.

1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas naturales y agrícolas pueden recibir el impacto negativo de distintas actividades económicas y procesos industriales, las cuales producen diversos desechos que incidirán en la diversidad y estructura de las comunidades bióticas generando de esta manera una reducción de la cobertura vegetal y pérdida en la productividad y la estabilidad de estos ecosistemas. Dentro de estos impactos negativos, la contaminación por metales pesados tales como el cobre (Cu), es un ejemplo significativo de cómo estos procesos pueden destruir el equilibrio y la estabilidad de los sistemas suelo-planta en extensas zonas de nuestro país, repercutiendo negativamente en el medioambiente, y finalmente en las poblaciones humanas cercanas a las zonas afectadas. En particular, los metales presentes en los residuos mineros poseen un alto riesgo potencial, tanto para la población humana como para el medio ambiente, por lo que su manejo debe ser una prioridad asociada a la actividad minera y que, sin embargo, sólo durante los últimos años ha sido considerada.

En Chile, la minería del Cu representa la principal actividad económica, siendo el principal productor de este metal a nivel mundial. Debido a la magnitud de esta actividad, esta ha producido un severo impacto sobre los ecosistemas naturales y agro-ecosistemas, generando una serie de problemas ambientales difíciles de remediar en el corto plazo. Como ejemplo de lo anterior, en la zona central de Chile grandes extensiones de terrenos orientados a la producción agrícola han sido afectadas, provocando una reducción en la estabilidad del ecosistema y, por ende, de sus niveles de productividad.

En nuestro país la situación resulta preocupante, considerando que los estudios científicos relativos al tema son escasos, situación que no se corresponde con la magnitud de las actividades mineras desarrolladas, en especial en la zona norte y centro-norte de Chile. Estas actividades mineras han provocado una serie de impactos ambientales, los que sólo a partir del año 1970

fueron considerados y estudiados, a partir de lo cual se crearon las primeras acciones tendientes a restaurar sitios afectados por la acción de la actividad minera del Cu.

En términos generales, es conocido que la presencia de altos niveles de metales en los ecosistemas naturales produce toxicidad, tanto a organismos superiores como a microorganismos. No obstante, estas mismas condiciones de estrés resultan muchas veces un mecanismo de selección masal de aquellos organismos que naturalmente presentan o han desarrollado estrategias fisiológicas para hacer frente a la toxicidad por metales (Cu en particular) como es el caso de plantas denominadas “metalofitas”, por su capacidad de desarrollarse en ambientes con altos contenidos de metales. Una alternativa para la remediación de suelos contaminados por desechos mineros es la utilización de este tipo de plantas junto a microorganismos del suelo adaptados o no a este tipo de stress; en especial, aquellos que favorecen el establecimiento de plantas capaces de desarrollarse en ecosistemas contaminados.

En particular, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos conocidos ampliamente por su contribución al crecimiento vegetal mediante la simbiosis que establecen con las raíces de la gran mayoría de plantas terrestres (más del 85%). Este tipo de hongo se encuentra en la mayoría de los suelos del mundo, desde suelos netamente agrícolas hasta suelos altamente contaminados con metales. Esta capacidad de adaptarse a ambientes tóxicos es debido a que pueden presentar una serie de mecanismos de tolerancia a metales, que le permitirían a desarrollarse junto a diversas especies vegetales, con una mayor posibilidad de desarrollo y crecimiento en suelos sometidos a este tipo de stress.

Es por esto que como hipótesis general de la presente tesis se propone que: Las poblaciones de HMA nativos presentes en zonas contaminadas con Cobre, favorecerán el establecimiento y desarrollo de metalofitas, así como también de plantas agrícolas sometidas a niveles crecientes de este metal. De forma adicional, se plantea que quedará como remanente un mayor número de propágulos de hongos micorrícico nativos, aspecto que resultará sin duda importante en el

entendido que estos microorganismos pueden favorecer el sucesivo establecimiento de plantas en un programa de remediación a largo plazo

Por lo anterior, el objetivo general de esta tesis fue “analizar el desarrollo de la simbiosis establecida entre ecotipos de hongos micorrízico arbusculares adaptados y no adaptados a niveles crecientes de Cu en suelo utilizando metalofitas endémicas y una planta agrícola para analizar la posibilidad de su incorporación en programas de fitorremediación”.

Adicionalmente, los objetivos específicos del presente estudio son:

- 1) Analizar el efecto de niveles crecientes de Cu en suelo sobre la densidad de propágulos de HMA asociados a dos especies metalofitas endémicas de Chile central y una planta agrícola.
- 2) Cuantificar el efecto de niveles crecientes de Cu en suelo sobre la producción de biomasa de las plantas seleccionadas micorrizadas o no con hongos nativos y un aislado exógeno de HMA.
- 3) Discriminar la o las asociaciones planta/HMA más efectivas en promover procesos de fitorremediación en el suelo estudiado, definiendo su potencial utilidad en la implementación de programas de remediación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descarga de metales pesados por actividades mineras.

Un problema global que genera una creciente preocupación social es la progresiva degradación de los recursos naturales. Esta degradación es debida principalmente a la pérdida del equilibrio de los ecosistemas naturales, por el uso deficiente de éstos por parte del hombre, así como también debido al vertido de diversos contaminantes a la atmósfera, agua, suelo y subsuelo (Jensen *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2007). Entre estos, la actividad minera genera grandes cantidades de desechos, muchos de ellos enriquecidos en metales, tales como Cu, Hg, Cd, Zn, As, Cr, Pb, entre otros (Adriano, 1986; del Río *et al.*, 2002) los cuales causan un efecto negativo en los ecosistemas naturales y agrícolas.

El ingreso de metales a los suelos tiene diferentes orígenes, tal como el litogénico, a partir de la erosión geológica de los minerales primarios que forman el suelo y que condicionan su composición química. Sin embargo, esta fuente representa una mínima fracción respecto de la entrada total de metales a los suelos (Kabata-Pendias, 1992), siendo su principal fuente las actividades humanas, tales como la minería, la agricultura, las actividades industriales y los residuos domésticos (Adriano, 2001). De estos últimos, la minería constituye la mayor fuente de ingreso de metales al ambiente (Hinde, 2000), debido principalmente a procesos industriales y al enorme volumen de material particulado presente en los desechos sólidos y las aguas residuales generados en la obtención de materias primas. A nivel mundial, existen estudios que demuestran el efecto deletéreo sobre los ecosistemas, en muchos casos generando la pérdida irreversible del suelo, debido a que estos metales no son biodegradables (Reimann *et al.*, 2001).

2.1.1 La minería del cobre en Chile. En Chile, la industria minera constituye la principal actividad económica, en particular la minería del Cu, que a nivel mundial representa el 33,3% de las reservas, siendo el primer productor mundial (30% del total de en 2009). Además, asociado a

la actividad minera se producen otros productos, tales como molibdeno (27,6%; 2° productor), plata (7%; 7° productor) y oro (1,7%; 12° productor). Por lo anterior, y dada la importancia que representa esta actividad en Chile, el impacto que genera en los distintos ecosistemas es igualmente de una magnitud considerable.

2.1.2 Efecto sobre los ecosistemas. Es bien conocido que excesivas cantidades de metales producen pérdidas graves de la calidad del suelo, debido a que no son biodegradables (Reimann *et al.*, 2001), generando efectos tóxicos a macro y microorganismos que se traducen en una importante disminución de la biodiversidad (Giller *et al.*, 1998; Sarabia *et al.*, 2003). Lo anterior provoca, por tanto, un impacto negativo no sólo en la diversidad de las comunidades bióticas, sino también una pérdida en la funcionalidad de las distintas especies, lo que desencadena un círculo de efectos negativos que pone en riesgo la sostenibilidad de los ecosistemas (Figura 1) (Kennedy y Smith, 1995). En el caso de los ecosistemas terrestres, naturales y agrícolas, resulta interesante destacar que su funcionamiento, estabilidad y productividad dependen en gran medida de la riqueza de especies de la cubierta vegetal, su diversidad y la estructuración de las poblaciones de la misma (Herrera *et al.*, 1993; Albaladejo *et al.*, 1996) En la Figura 1 se observa el efecto primario que tendrían niveles tóxicos de metales en el suelo.

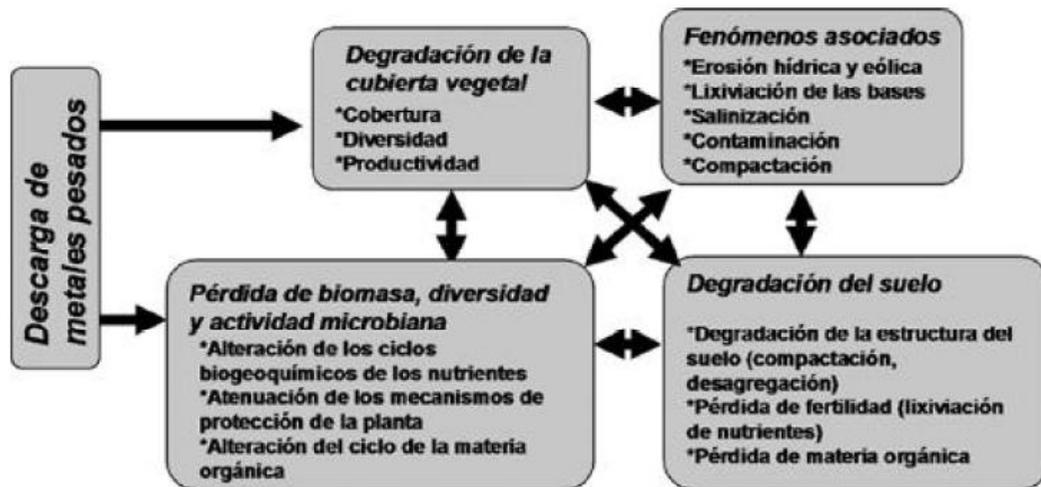


Figura 1. Interacciones involucradas en la degradación de los ecosistemas naturales ocasionadas por la descarga de metales pesados (Cornejo *et al.*, 2008, modificado de Barea *et al.*, 1999).

Se deduce, por tanto, que las actividades mineras en general, y la descarga de metales en particular, tendrían un efecto directo degradando la cubierta vegetal y afectando el normal funcionamiento de la microbiota edáfica. Esto repercutiría posteriormente en la pérdida de calidad física, química y biológica del suelo, retroalimentando los efectos negativos y generando una espiral de degradación. Si bien es cierto, estos procesos son comunes a cualquier tipo y/o origen de degradación de las características del suelo, cabe notar que debido a la naturaleza tóxica de los metales sus efectos primarios son, principalmente, sobre los componentes bióticos del suelo.

2.1.3 Efecto sobre la diversidad y funcionalidad de los microorganismos del suelo. Como ya se mencionó, debido a la naturaleza tóxica de los metales, sus efectos primarios son principalmente sobre los componentes bióticos del suelo. Las altas concentraciones de metales que se encuentran en desechos de las actividades mineras son tóxicas para microorganismos del suelo, causando en sus poblaciones una reducción de biomasa, cantidad y diversidad (Giller *et al.*, 1998; Edvantoro *et al.*, 2003; Shukurov *et al.*, 2005).

Estudios realizados en Israel, concluyeron que los microorganismos del suelo son adecuados bioindicadores en suelos afectados por contaminación con metales. Esto fue comprobado tras realizar una investigación en un gradiente de deposiciones de desechos de una industria minera y metalúrgica en un radio de 15 Km., encontrándose que la menor biomasa de microorganismos se hallaba en las zonas contiguas a la industria (Shukurov *et al.*, 2005). Como se mencionaba anteriormente la exposición continua a niveles tóxicos de metales puede incidir negativamente en las poblaciones de microorganismos del suelo; no obstante, igualmente pueden favorecer el desarrollo de poblaciones microbianas que hayan desarrollado diversos mecanismos de tolerancia y/o resistencia (Ellis *et al.*, 2003).

En el caso de los hongos del suelo, estos mecanismos de tolerancia/resistencia incluyen: *i*) la adsorción de metales a la superficie de la pared celular (biosorción), *ii*) transporte e

incorporación celular (bioacumulación), y *iii*) la transformación de metales a través de reacciones de reducción, oxidación y metilación (Gadd, 1986; Gadd, 1993). De estos diferentes mecanismos de detoxificación, la biosorción ha recibido la mayor atención. Esta consiste en que la pared de las células del hongo, formadas principalmente por polisacáridos y quitina, puede actuar como una barrera a los iones de metales y otros solutos, como también puede controlar su asimilación celular (Gadd, 1996; Ahalya *et al.*, 2003).

2.2 Presencia de Metalofitas endémicas en zonas contaminadas.

2.2.1 Características de la flora metalofita. Muchos de los metales, como el caso del Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn son micronutrientes esenciales para muchos organismos vivos, pero si estos se encuentran en concentraciones elevadas son tóxicos (Lambers *et al.*, 1998). En sitios cercanos a minas y fundiciones de metales es común encontrar extensas áreas contaminadas con diversos elementos tóxicos, limitando el crecimiento de la mayoría de las plantas.

A pesar de lo mencionado anteriormente, existe un grupo de plantas, denominadas metalofitas, que dominan en zonas contaminadas con metales siendo el origen de estas áreas distintos procesos naturales (por ejemplo, suelos serpentinos o ultramáficos) o antropogénicos (Por ejemplo, fundiciones de metales, vertederos de residuos de la minería, etc.). Estas plantas han desarrollado a lo largo del tiempo mecanismos biológicos que les permiten resistir concentraciones de metales que son tóxicas para la mayoría de plantas (Reeves y Baker, 2000).

Dentro de este grupo se encuentran las metalofitas estrictas, las cuales son resultado de millones de años de fuertes presiones selectivas en suelos con altos niveles naturales de metales, como es el caso de los suelos de la zona centro-norte de Chile, provincias ricas en yacimientos de hierro, oro, plata, cobre y manganeso.

1 Por otro lado, es sabido que el tiempo de exposición a metales regula el grado de resistencia. La resistencia es limitada en poblaciones de plantas que se ven expuestas después de algunos

años a contaminaciones con metales, por ejemplo, en zonas aledañas a fundiciones de metales. Estas especies tolerantes a metales son denominadas pseudometalofitas y poseen una mayor resistencia a concentraciones altas de metales (Pollard *et al.*, 2002). Muchas de estas especies toleran elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y/o translocación hacia los tallos, lo que les permite mantener concentraciones relativamente bajas en la biomasa aérea, independientemente de la concentración en el suelo (Baker, 1981). Sin embargo, otras absorben los metales activamente a partir del suelo y los acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea, siguiendo por tanto una estrategia de acumulación. Una respuesta intermedia es la que presentan las plantas indicadoras, cuya concentración metálica refleja la del suelo (Baker, 1981). Entre las acumuladoras se han reconocido diferentes grados de acumulación de metales (Figura 2), desde pequeñas translocaciones sobre el nivel del suelo hasta concentraciones excepcionalmente elevadas de metales pesados como el Ni, Zn y Co en su biomasa aérea sin mostrar ningún síntoma visible de toxicidad, denominándose estas últimas hiperacumuladoras (Brooks *et al.*, 1977).

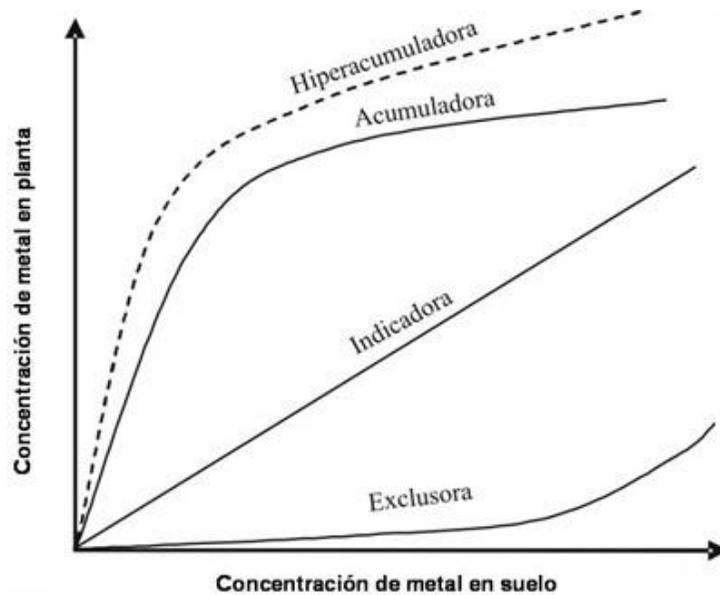


Figura 2. Respuestas de las plantas frente a la presencia de metales en el suelo (Adriano, 2001).

De forma general, las hiperacumuladoras alcanzan concentraciones de metales en hojas entre 10 y 100 veces las concentraciones “normales” (Chaney *et al.*, 2000). Actualmente se utiliza el

término hiperacumuladora de metales para designar plantas que acumulan sobre 10.000 mg kg⁻¹ de Mn y Zn, sobre 1.000 mg kg⁻¹ de Co, Cu, Pb, Ni, As y Se y sobre 100 mg kg⁻¹ de Cd (Figura 2).

2.2.2 Utilización de especies metalofitas para la remediación de suelos. La utilización de plantas para limpiar suelos contaminados se realiza desde hace unos 300 años, cuando fueron propuestas para el uso en el tratamiento de aguas residuales (Timofeev-Resovsky *et al.*, 1962). Además, existen reportes sobre el empleo de plantas acuáticas en aguas contaminadas con Pb, Cu, Cd, Fe y Hg. En Rusia, en los años sesenta se realizaron investigaciones utilizando plantas para recuperar suelos contaminados con radionucleótidos. Por ejemplo, en el año 1962, en plena era nuclear, se investigaba el uso de plantas semi-acuáticas para la detoxificación de suelos contaminados con desechos nucleares (Timofeev-Resovsky *et al.*, 1962).

Por otra parte, la remediación de los suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas es también ampliamente reconocida y los ejemplos de estudios son muy numerosos. Algunos ejemplos destacables corresponden a especies de la familia de las Brassicaceas. En este aspecto Kumar *et al.*, (1995a), probaron la tolerancia a metales de varias de éstas especies, entre ellas la mostaza india (*Brassica juncea*), la mostaza negra (*Brassica nigra* Koch), el nabo (*Brassica campestris* L.) y la col rizada (*Brassica oleracea* L.), mostrando que a pesar de que todas acumulaban metales en sus tejidos, *B. juncea* mostró una gran capacidad de acumulación y translocación de Cu, Cr, Cd, Ni, Pb, Zn hacia los tejidos aéreos. Así también, *Thlaspi caerulescens* fue evaluada para procesos de remediación en suelos contaminados con Zn y Cd, lográndose eliminar por este medio más de 8 mg/Kg de Cd y 200 mg/Kg de Zn, representado estos valores el 43 y 7% del total de estos metales en un suelo agrícola, respectivamente (Lombi *et al.*, 2001).

2.2.3 Metalofitas presentes en Chile. Uno de los primeros trabajos de descripción de flora metalófitas en Chile se realizó el 2002, en la región de O'Higgins, donde se comparó el

comportamiento de dos poblaciones de Flor del mono (*Mimulus luteus* var. *variegatus*) en cuencas prístinas (río Cipreses y río Las Cayanas) y una población en un área muy contaminada por actividades mineras (Sewell). Los resultados indicaron que las poblaciones de flor del mono colectadas en las cuencas prístinas presentaron una menor longitud y cantidad de raíces que la población que se encontraba en la zona contaminada cuando ambas poblaciones fueron sometidas a niveles crecientes de toxicidad por Cu en suelo (Ginocchio *et al.*, 2002). Hasta el año 2004 se habían descrito seis plantas tolerantes a metales presentes en Chile: *Mimulus luteus* var. *variegatus*, *Cenchrus echinatus*, *Erygeron berterianum*, *Mullinum spinosum*, *Nolana divaricata* y *Dactylium* sp. (Ginocchio y Baker, 2004).

No obstante lo anterior, González *et al.*, (2008), realizaron una prospección de especies vegetales capaces de establecerse en el ecosistema mediterráneo del Valle de Puchuncaví, alrededor de la fundición Ventanas (Región de Valparaíso), identificando 22 metalófitas a las que adicionalmente se les estudió su capacidad de acumular Cu. Entre éstas destacaban *Oenothera picensis* (antes *Oenothera affinis*) y *Baccharis linearis*, las cuales eran capaces de acumular 614 y 314 mg Cu kg⁻¹ en su parte aérea, respectivamente. Este ecosistema ha recibido el depósito de material enriquecido con metales por varias décadas, generando serios problemas de pérdida de cobertura y diversidad de la vegetación autóctona (Ginocchio, 2000; González *et al.*, 2008). No obstante, además de la presencia de una notable diversidad de metalófitas, también existe una significativa diversidad de hongos micorrízico arbuscular (HMA) (Cornejo *et al.*, 2008), los cuales forman comunidades complejas, con numerosos ecotipos asociados a las distintas plantas. En este sentido, resulta interesante poder conocer las combinaciones específicas planta-hongo que puedan significar el mayor aprovechamiento de la simbiosis que genera este particular tipo de hongos del suelo.

2.2.4 Utilización de plantas agrícolas con fines de fitorremediación. La incorporación de plantas agrícolas en proyectos de fitorremediación lleva relativamente poco tiempo de estudio. Es así como estudios realizados por Christie *et al.*, (2004), concluyeron que el girasol o

maravilla, (*Helianthus annuus* L.), planta que desarrolla gran biomasa aérea, es capaz de acumular, por tanto, grandes cantidades de metales.

La inclusión de especies agrícolas para cuantificar su capacidad de captar metales en suelos contaminados en asociación con HMA, se justificaría debido a que algunas especies han sido seleccionadas para producir una gran biomasa. Además de su disponibilidad estratégica que presentan en comparación con plantas metalofitas nativas, pues a diferencia de las anteriores, una planta agrícola presenta una alta disponibilidad de semillas en el mercado.

2.3 Micorrizas arbusculares.

Los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) constituyen el tipo de simbiosis más extendido en la naturaleza, siendo establecida por más del 85 % de las plantas terrestres, y encontrándose prácticamente en la totalidad de los ecosistemas terrestres (Smith y Read, 1997). Desde hace unos 400 millones de años los HMA y las plantas coevolucionaron (Figura 3), lo cual puede ser la causa de la biotrofia obligada por parte del hongo. Esto condiciona que el hongo tenga la necesidad de encontrar y colonizar una raíz hospedadora para poder completar su ciclo de vida, que culmina con la formación de nuevos propágulos viables (Azcón-Aguilar, *et al.*, 1991). Esta es una de las principales limitantes del estudio de este grupo de hongos, ya que no es posible su multiplicación en condiciones axénicas (Azcón-Aguilar *et al.*, 1991, Bago *et al.*, 2000).

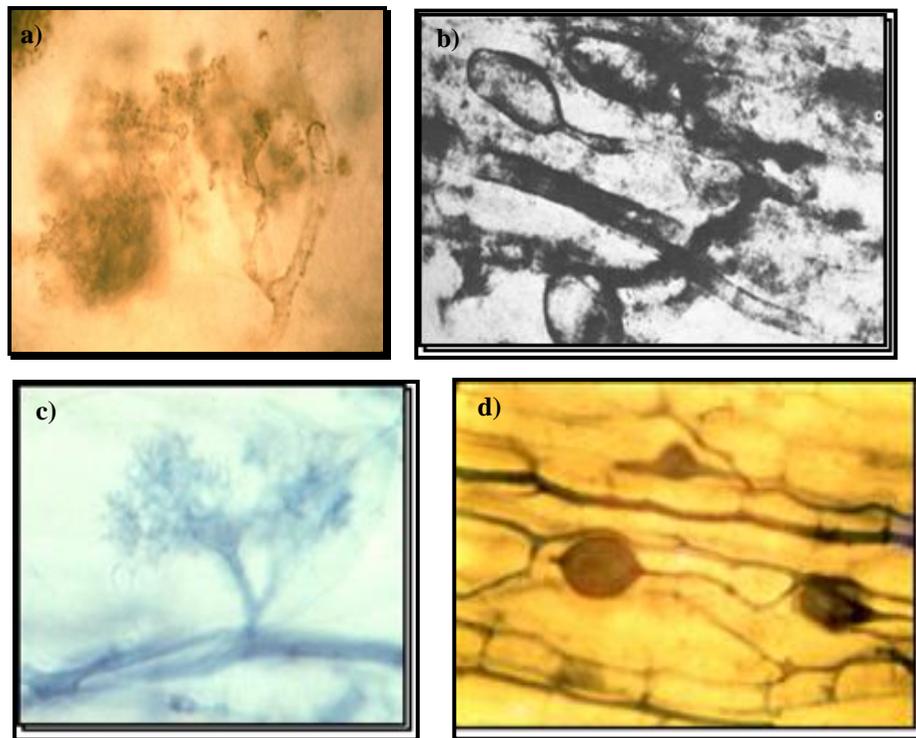


Figura 3. Estructuras de HMA. a) Arbúsculos y b) vesículas de aproximadamente 400 millones de años. c) Arbúsculos y d) vesículas de HMA actuales.

2.3.1 Taxonomía y diversidad. Los primeros intentos de clasificar los HMA datan de finales del siglo XIX y comienzos del XX, incluyéndose inicialmente en la familia Endogonaceae, dentro del phylum Zygomycota, debido al parecido de sus esporas con las de los zigomicetos (Gerdemann y Trappe, 1974). En los últimos años, la sistemática del grupo de HMA ha sufrido numerosas modificaciones, debido principalmente a la incorporación de estudios moleculares en la filogenia de estos hongos.

Según Morton y Benny (1990), las alrededor de 150 especies de HMA conocidas hasta esa fecha se incluían dentro del orden Glomales de la clase Zygomycota, distribuidos en seis géneros y tres familias: *Gigaspora* y *Scutellospora* (Fam. Gigasporaceae), *Glomus* y *Sclerocystis* (Fam. Glomaceae) y *Acaulospora* y *Entrophospora* (Fam. Aculosporaceae). Esta clasificación había sido, hasta hace relativamente poco tiempo, aceptada en forma generalizada.

Estudios moleculares posteriores, basados en el análisis de la subunidad 18S del ADNr, han demostrado la naturaleza monofilética de los HMA, lo que ha permitido incluirlos en un nuevo phylum denominado Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001). Este phylum se compone de una sola clase, los Glomeromycetes, que a su vez comprende cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales. Es de destacar el hecho de que el género *Glomus*, que presenta características morfológicas y estructurales bien definidas, muestra divergencias filogenéticas importantes, que han implicado su subdivisión en al menos tres grupos, dos de los cuales se incluyen en el orden Glomerales (*Glomus* A y B), y el tercero en Diversisporales (*Glomus* C) (Schwarzott *et al.*, 2001). Walker y Schüßler (2004) realizaron la última modificación del phylum Glomeromycota, incluyendo la familia Pacisporaceae, representada por el género *Pacispora* (Oehl y Sieverding, 2004). En la Figura 3 se muestra la clasificación actualmente aceptada para los hongos formadores de micorrizas arbusculares.

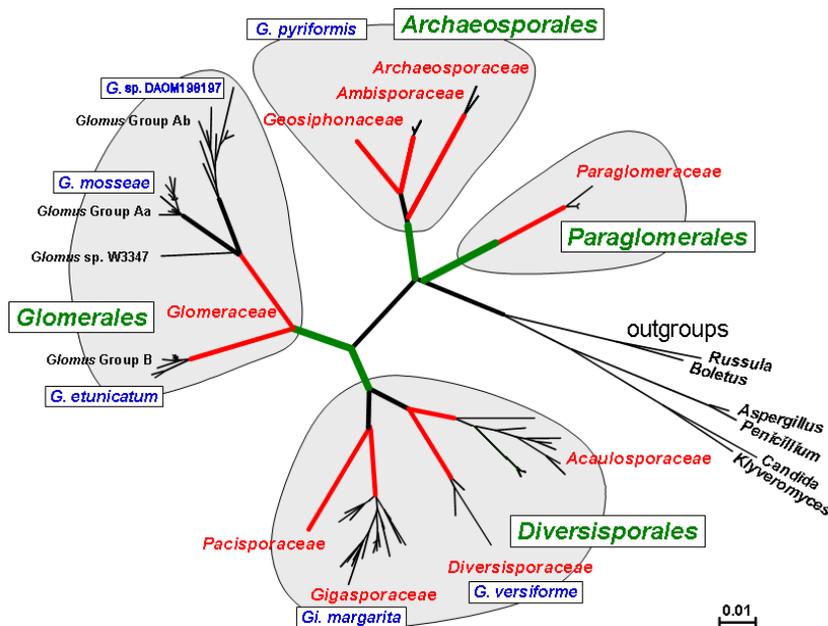


Figura 4. Relaciones filogenéticas en el phylum Glomeromycota basadas en las secuencias de la subunidad pequeña del ARNr (SSU, 18S) (basado en Schüßler *et al.*, 2001b, revisado por Walker y Schüßler, 2004).

2.3.2 Asociaciones de metalofitas con hongos micorrizicos arbusculares. La dependencia por los hongos endomicorrizicos es una característica relevante que ayuda a las plantas a sobrevivir en sitios contaminados (González-Chávez *et al.*, 2004). González-Chávez *et al.*, (2002c), demostraron que el micelio de los HMA es capaz de acumular altas concentraciones de Cu y As, lo que se traduce en menor toxicidad por metales a sus plantas hospederas. Según los mismos autores, los HMA, independientemente de su tolerancia a metales, reducen la utilización de As en plantas tolerantes y no tolerantes de *Holcus lanatus* (pasto miel). Esto se traduce en que una planta no tolerante puede establecerse en suelos contaminados cuando sus raíces están colonizadas por estos hongos y que incluso una planta tolerante pueda generar mejores mecanismos de resistencia a metales al estar colonizadas, siendo la regulación de la relación As/P el mecanismo que toma parte en este caso.

Hetrick *et al.*, (1994), mostraron que ecotipos de HMA fueron primordiales para el establecimiento y crecimiento de *Andropogon gerardii* en sitios cercanos a producciones mineras; además, observaron que en plantas colonizadas, el zinc se acumuló en alta concentración en las raíces, pero no en los tallos.

Dentro de las comunidades de plantas estudiadas por González *et al.* (2008), se ha observado una alta riqueza de ecotipos de HMA asociados a plantas como *Baccharis linearis* (7 ecotipos) o *Imperata condensata* (8 ecotipos), pertenecientes principalmente a los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Dentro de éstos, *Acaulospora* aff. *lacunosa*, uno de los ecotipos de más amplia distribución en el ecosistema mencionado, se encuentra incluso en suelos extremadamente contaminados (831 mg Cu kg⁻¹ total y 326 mg Cu kg⁻¹ disponible, con un pH del suelo de 4,2), y conforma prácticamente la totalidad de la comunidad de HMA asociados a *Oenothera picensis*, registrándose una alta especificidad en esta asociación planta-HMA (Cornejo, *et al.*, 2008).

2.3.3 Mecanismos de tolerancia a estrés por metales en metalofitas micorrizadas. Los mecanismos que se presentan en la simbiosis micorrícica arbuscular para hacer frente al estrés por el exceso de metales en el suelo son muy similares a los que presentan las plantas, y se expresan principalmente en el estado simbiótico entre la planta y el HMA, destacando entre otros (ver Figura 4): (1) inmovilización en el suelo por la secreción de sustancias quelantes (glomalina); (2) enlace de metales a los biopolímeros de la pared celular (quitina, glomalina); (3) inmovilización sobre la superficie de la membrana plasmática una vez atravesada la pared celular; (4) transportadores de membrana que ingresan metales desde el suelo al citosol; (5) quelación intracelular por metalotioneínas, ácidos orgánicos de cadena corta; (6) exportación de metales desde el citosol mediante transportadores de membrana; y, (7) confinamiento de metales en vacuolas (González-Chávez *et al.*, 2004; González-Guerrero, 2005; Göhre y Paszkowski, 2006). En adición, un mecanismo que sólo presentaría el hongo para aliviar el estrés por metales sería (8) su transporte a través de las hifas, favorecido por tratarse de organismos con hifas cenocíticas. Por otra parte, (9) la posible existencia de transportadores en la membrana de los arbusculos que exportan metales hacia la matriz interfacial (zona de contacto íntimo entre la membrana plasmática del hongo y la célula radical), permitiría una mayor incorporación de metales por la planta. Esto explicaría que algunas especies de plantas micorrizadas incrementen sus contenidos de metales en la parte aérea (Ebbs y Kochian, 1998).

Además, estudios recientes proponen un nuevo mecanismo de compartimentalización de metales, mediante la movilización de elementos tóxicos a estructuras fúngicas extraradicales, tales como las esporas, siendo esta una posible estrategia para mantener estructuras vitales para el hongo libres de metales (Ferrol *et al.*, 2009).

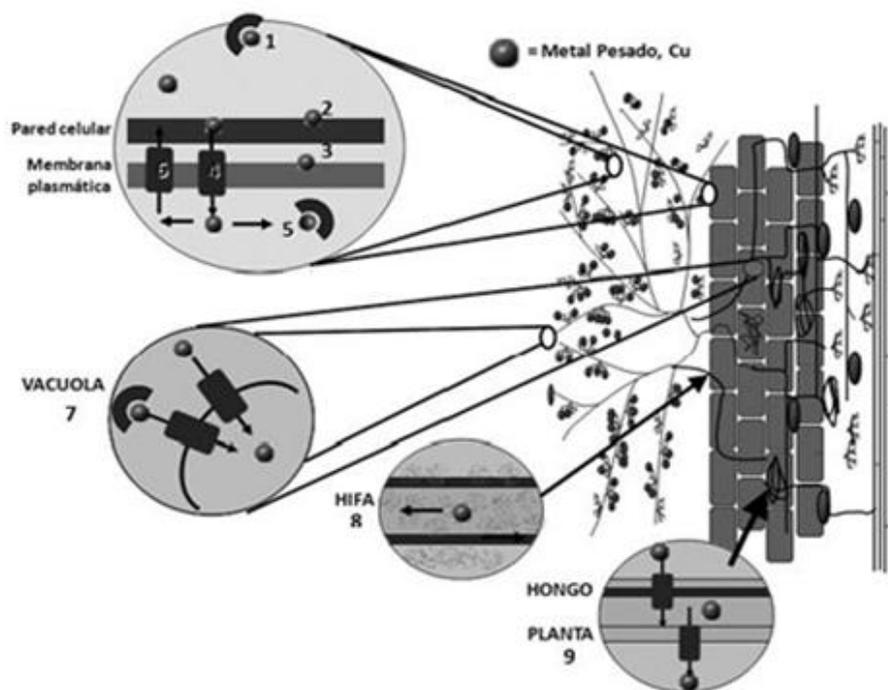


Figura 5. Mecanismos de tolerancia al estrés por metales pesados desarrollados por la simbiosis (extraído de Cornejo *et al.*, 2008).

2.3.4 Contribución de la simbiosis MA al crecimiento vegetal en suelos contaminados con metales. Las bases fundamentales sobre las que se establece la simbiosis son nutritivas, proporcionando elementos nutritivos, principalmente P, que se encuentran menos disponibles para la planta, y ésta le cede al hongo productos carbonados procedentes de la fotosíntesis (Baligar y Fageria, 1997; Clark y Zeto, 2000) y agua, dada la mayor accesibilidad de este a recursos del suelo más distantes del sistema radical (Bago *et al.*, 2000).

No obstante, se generan otros beneficios de la asociación, entre los que destacan una mayor tolerancia de la planta micorrizada al ataque de patógenos del sistema radical (Hooker *et al.*, 1994), a la presencia de metales en el suelo (del Val *et al.*, 1999; Vivas *et al.*, 2005), al estrés hídrico (Sánchez-Díaz y Honrubia, 1994; Marulanda *et al.*, 2003), o a condiciones extremas de pH del suelo (Siqueira y Moreira, 1997; Clark *et al.*, 1999). Por otra parte, la red de hifas extraradicales y ciertas sustancias secretadas por el hongo durante la asociación favorecen la

formación de agregados estables en el suelo y, por ende, la conservación de la estructura física de éste (Wright y Upadhyaya, 1998; Borie *et al.*, 2000; Jeffries y Barea, 2001). Una de estas sustancias secretadas por el hongo durante la asociación simbiótica con la planta es la glomalina (*Glomalin related soil protein*, GRSP), una glicoproteína producida por los HMA (Wright *et al.*, 1998; Nichols, 2003). Los HMA colonizan más del 80% de las plantas vasculares, y son encontrados alrededor del mundo en casi todos los suelos, esto explica que la glomalina haya sido detectada en grandes cantidades, las que varían entre 2-15 hasta >60 mg g⁻¹ (Wright y Upadhyaya, 1998; Nichols, 2003). En suelos contaminados con metales pesados (62-831 µg Cu g⁻¹) el rango encontrado presentó una mayor variación (6.6-36.8 mg g⁻¹), lo que sugiere que su cantidad dependerá además del nivel de contaminación del suelo (Cornejo *et al.*, 2008a). Finalmente, trabajos recientes muestran que la glomalina puede secuestrar elementos tóxicos (González-Chávez *et al.*, 2004; Cornejo *et al.*, 2008a; Vodnik *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere que la glomalina es un mecanismo importante para reducir la biodisponibilidad de elementos tóxicos, debido a que promueve procesos de fitoestabilización en suelos polucionados por la actividad minera (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004; Vodnik *et al.*, 2008).

El efecto protector de las micorrizas sobre los tejidos de la parte aérea de la planta ha sido observado en múltiples ocasiones, habiéndose descrito protección frente a Al (Cumming y Ning, 2003), Cs (Berreck y Hanselwandter, 2001), Sr (Entry *et al.*, 1999), Cd (Rivera-Becerril *et al.*, 2002), Mn (Malcová *et al.*, 2003), Zn (Bi *et al.*, 2003) y Cu (Griffioen *et al.*, 1994). Este efecto protector es debido fundamentalmente a la inmovilización del metal en el micelio del hongo, especialmente en las paredes celulares (Joner *et al.*, 2000), aunque también en estructuras del micelio interno como son las vesículas o, a un nivel intracelular, los gránulos de polifosfato (Rauser y Ackerley, 1987; Turnau *et al.*, 1993; Weiersbye, 1999). La acumulación del metal en el micelio interno del hongo, es lo que explicaría su acumulación en las raíces de la planta micorrizada considerada en su conjunto (raíz + hongo) (Rivera-Becerril *et al.*, 2002; Rufyikiri *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). De hecho, los tejidos vegetales de la raíz micorrizada tienen menores niveles de metales pesados que los de la raíz no micorrizada cuando la planta crece en suelos con niveles elevados de metales (Rivera-Becerril *et al.*, 2002).

La actividad industrial minera eleva la concentración de metales en el suelo hasta límites no tolerables para el desarrollo de muchas especies vegetales. En este contexto cobran especial relevancia las micorrizas, al representar éstas el componente fundamental de la interface planta-suelo.

2.3.5 Expectativas de su aplicación biotecnológica en Chile. Existen una serie de alternativas adecuadas para la remediación (Figura 5) de vastas zonas afectadas por la actividad minera, las cuales han sido objeto de variados estudios. Una alternativa viable es la utilización biotecnológica de plantas asociadas a microorganismos del suelo en programas de fitorremediación. Los HMA, dada su presencia en la mayoría de los ecosistemas terrestres y su conocido efecto beneficioso sobre el establecimiento y crecimiento de las plantas, son potencialmente una de las mejores alternativas para su aplicación en este tipo de programas. Este proceso recibe el nombre de micorrizorremediación, debido a la asociación de hongos con plantas para ser usados en fitorremediación de suelos contaminados (Kahn, 2002).



Figura 6. Estrategia propuesta para el estudio de la diversidad de HMA y actuación en zonas afectadas por actividades mineras para la recuperación de cubierta vegetal (tomado de Cornejo *et al.*, 2008).

Un esquema general como el presentado en la Figura 5 representa un protocolo de actuación a implementar, que además permitiría la obtención de aislados de HMA de aquellos ecotipos más aptos para el proceso de micorrizorremediación (Cornejo *et al.*, 2008). En este esquema, la identificación del HMA es clave, en particular su caracterización genética, ya que permitiría su posterior detección colonizando las raíces, a diferencia de la caracterización morfológica, que sólo permitiría identificar las esporas del HMA en el suelo, pero no en la raíz (Cornejo *et al.*, 2004).

Resultados recientes obtenidos en estudios bajo condiciones controladas, sugieren que la interacción entre HMA nativos de la zona central de Chile y *Oenothera picensis* propician la absorción y acumulación de Cu y Zn en la raíz de esta planta, favoreciendo la fitoestabilización de estos metales (Meier *et al.*, 2008). En base a lo mencionado anteriormente, es evidente el avance tecnológico que puede representar la micorrizorremediación en programas de fitorremediación de suelos contaminados con metales provenientes de las actividades mineras. En especial si se considera que en el corto plazo será necesaria la adopción de medidas de gestión adecuadas por parte de las empresas que produzcan una fuerte contaminación ambiental, con el fin de reducir sus niveles de contaminación y/o mitigar los daños ocasionados (por ejemplo mediante la aplicación de las normativas serie ISO). En este contexto, se justifica plenamente el estudio de las comunidades de HMA nativas de suelos que hayan sido contaminados por actividades mineras, y los mecanismos de tolerancia a metales que presenten, toda vez que potenciarían significativamente los procesos de biorremediación con plantas micorrizables.

Adicionalmente, cabe mencionar que el objetivo final de la biorremediación es la recuperación del ecosistema, con un buen funcionamiento de los procesos de ciclado de nutrientes, en los que los microorganismos, entre ellos los HMA, juegan un papel crucial. Por tanto, resulta de gran importancia el aislar y seleccionar los organismos nativos, tanto HMA como metalofitas, cuya reintroducción favorezca en mayor medida la recuperación del ecosistema (Herrera *et al.*, 1993; Requena *et al.*, 1997; Cornejo, 2006).

3. MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este estudio se utilizaron muestras de suelo y material vegetal obtenidos desde sectores aledaño a la Fundición Ventanas (CODELCO), ubicada en el valle de Puchuncaví (UTM 6372975N; 267350E), comuna de Puchuncaví, Región de Valparaíso, Chile (Figura 7). Para el desarrollo del experimento se utilizó el invernadero dependiente del Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales de la Universidad de la Frontera, Región de la Araucanía.

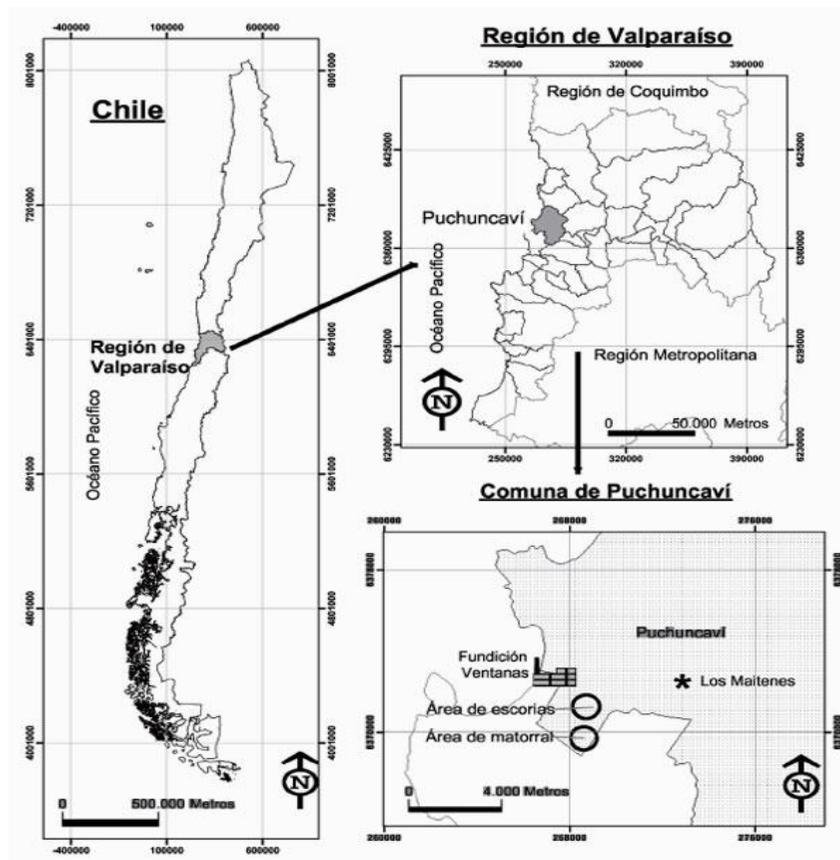


Figura 7. Ubicación geográfica del área de estudio (Obtenida de González *et al.*, 2008).

3.1 Materiales

3.1.1 Suelo

Los suelos se recogieron en un sector aledaño a la Fundición Ventanas (Figura 8), aproximadamente a 1,5 km en dirección sureste. Estos suelos se caracterizan por poseer altos niveles de contaminación ($92\text{-}872\text{ mg kg}^{-1}$ de Cu; Cornejo et al. 2008). En forma paralela, se considero un sitio control de colecta y extracción de suelos que no presentaba contaminación. Todos los suelos pertenecían a la serie Chilicauquén, y presentaban características similares a los suelos contaminados en parámetros de textura (70% arena; 16% de limo; 10% arcilla) y materia orgánica (1.8%).

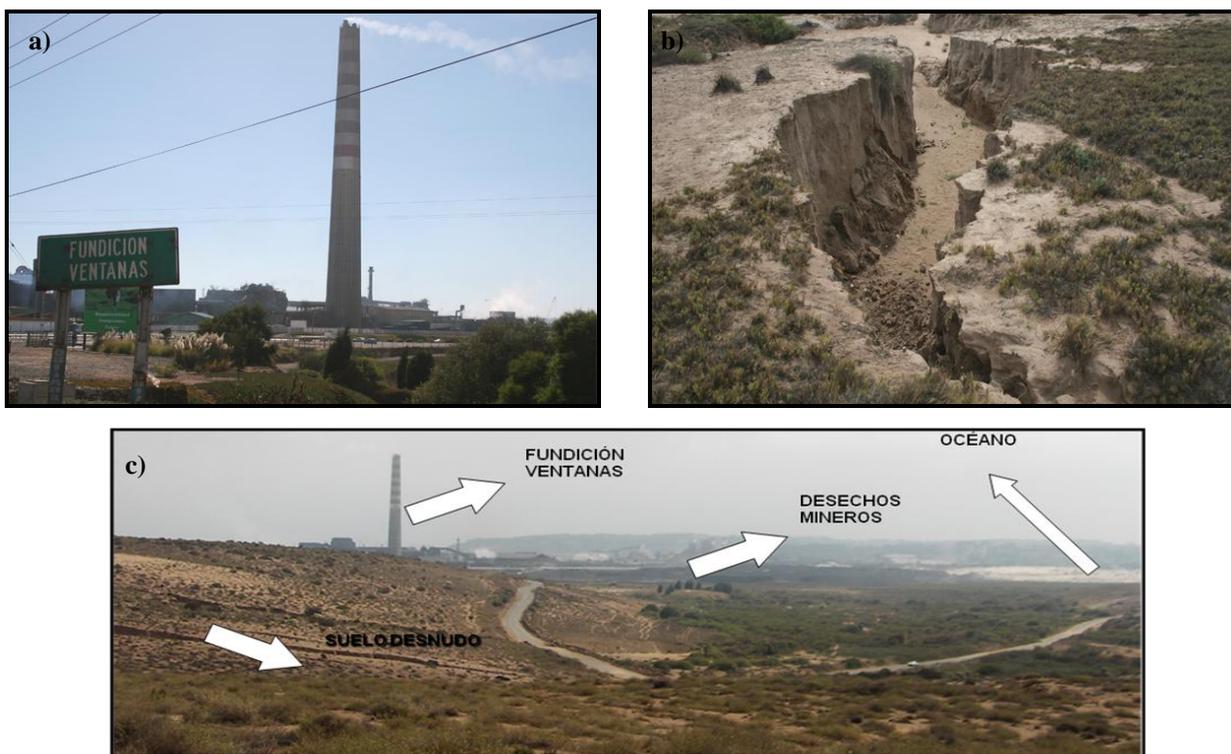


Figura 8. Sector aledaño a la Fundición Ventanas, ubicada en el valle de Puchuncaví. a) Fundición Ventanas, b) cárcavas en sector aledaño y c) vista panorámica del sector aledaño.

3.1.2 Plantas. Se utilizaron dos especies vegetales nativas: *Imperata condensata* y *Oenothera picensis* (antes *Oenothera affinis*), de las cuales se colectaron estolones y semillas, respectivamente. La especie agrícola utilizada fue la Maravilla (*Helianthus annuus*) y de la cual se obtuvieron semillas en el mercado local. A continuación se presenta una somera descripción de cada especie vegetal.

a) *Imperata condensata*. Planta perenne (Figura 9a), perteneciente a la familia Poaceae, formadora de densas matas gracias a sus rizomas profundos y largos. Cañas floríferas de 20-60 cm de alto, erectas. Espiguillas de 4-5 mm de largo, cubierta densamente de pelos de 9-12 mm. Crece en forma espontánea especialmente en suelos arenosos, la presencia de gruesos rizomas dificulta las labores agrícolas (Matthei, 1995).

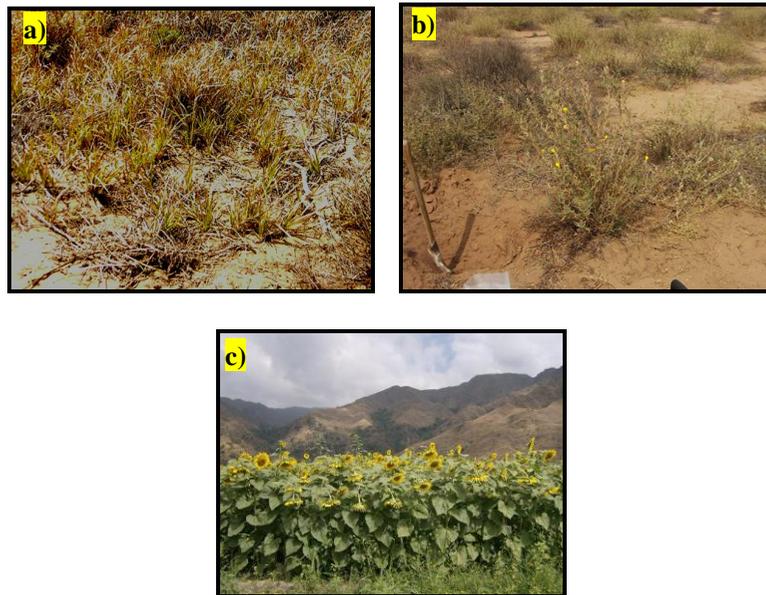


Figura 9. a) *Imperata condensata*, b) *Oenothera picensis* y c) *Helianthus annuus*.

b) *Oenothera picensis*. Perteneciente a la familia Onagraceae (Fig. 9b), es una especie bianual de tallos largos, 40-100 cm de alto, con numerosas ramificaciones basales. Hojas basales en roseta, de 10 a 25 cm de largo, las hojas del tallo son más pequeñas. Tubo floral 1,5-3 cm de largo. Su origen es Chile y zonas límites con Argentina. Es una especie frecuente a orillas de

caminos como también en huertos frutales y praderas degradadas (Matthei, 1995). La población de la especie *Oenothera picensis* identificada en esta investigación podría considerarse como una buena candidata para iniciativas de remediación en Chile, ya que es una hierba nativa perenne, resistente a la sequía, fácil de propagar y que produce una gran biomasa.

c) ***Helianthus annuus***. El girasol o maravilla (Figura 9c), es una planta herbácea perteneciente a la familia Asteraceae (Compositae) y es cultivada como oleaginosa y ornamental en todo el mundo. Posee hojas de forma triangular, ásperas al tacto. Los frutos son grandes, de unos dos centímetros de largo, y de color blanco, gris o negro, según la variedad de que se trate. Es originaria de México y Suroeste de Estados Unidos (González, 1984). Se adapta a condiciones tropicales, subtropicales y templadas. Su ciclo vegetativo puede fluctuar entre 90 a 130 días (Doorenbos y Kassam, 1979). El girasol se desarrolla en una amplia gama de suelos (Doorenbos y Kassam, 1979), por lo que puede prosperar en diversos tipos texturales, a excepción de las texturas arenosa y arcillosa. Requiere una profundidad mínima de 25 a 35 cm (Aragón, 1995), siempre que el agua esté fácilmente disponible en este estrato. Aragón (1995), lo califica como un cultivo tolerante a la salinidad y a excesos de sodio.

3.1.3 Inóculos de hongos micorrízicos arbusculares.

a) **Hongos micorrízicos arbusculares nativos.** Se utilizaron hongos nativos de la zona aledaña a la Fundación Ventanas, para ello se colectó suelo, se tamizó en húmedo con una serie de tamices Tyler y se usó como inóculo las fracciones retenidas superiores a 53 micras e inferiores a 500 micras.

b) ***Glomus claroideum***. HMA que no está presente en la zona de estudio, el inóculo se obtuvo de suelos agrícolas de la zona sur de Chile. En este caso, se utilizó como inóculo una proporción de sustrato de crecimiento del hongo (suelo : arena : vermiculita 1:1:1) utilizando sorgo (*Sorghum bicolor*) como planta hospedera.

3.2 Métodos

3.2.1 Diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con 3 repeticiones por cada situación estudiada. En este estudio, se utilizaron diseños multifactoriales, debido a que el estudio incluyó micorrización (con y sin micorrizas) y otros factores de análisis como plantas (3 especies) y distintos niveles de concentración de Cu (5 niveles crecientes). Se realizó un estudio de 2 plantas metalófitas (*Imperata condensata* y *Oenothera picensis*), una de aptitud agrícola (*Helianthus annuus*), hongos MA nativos del Valle de Puchuncaví obtenidos de suelos contaminados, y de hongos MA de suelos agrícolas del sur de Chile, en sistemas de bioensayos para analizar el comportamiento de la simbiosis (hongo y planta) frente a concentraciones crecientes de Cu. Cada tratamiento (Figura 10) tuvo 3 repeticiones, lo que se tradujo en 45 macetas individuales para cada planta en estudio, dando un total de 135 unidades experimentales totales. Para los tratamientos con incorporación de Cu se utilizó Cloruro de cobre ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$). La descripción para cada tratamiento se detalla en el siguiente Cuadro.

Cuadro 1. Tratamientos para cada especie vegetal en estudio

Tratamientos	Descripción
1	Suelo no contaminado estéril (testigo) (S.N.C.)
2	Suelo no contaminado con MA nativos (S.N.C. + MA Nat)
3	Suelo no contaminado inoculado con GC (S.N.C. + G.C.)
4	Suelo contaminado sin adición de Cu estéril (S.C.)
5	Suelo contaminado sin adición de Cu con MA (S.C. + MA Nat.)
6	Suelo contaminado sin adición de Cu inoculado con GC (S.C. + G.C.)
7	Suelo contaminado con solución de 150 ppm de Cu estéril (S.C. + Cu 150)
8	Suelo contaminado con solución de 150 ppm de Cu con MA (S.C. + Cu 150 + MA Nat.)
9	Suelo contaminado con solución de 150 ppm de Cu inoculado con GC (S.C. + Cu 150 + G.C.)
10	Suelo contaminado con solución de 300 ppm de Cu estéril (S.C. + Cu 300)
11	Suelo contaminado con solución de 300 ppm de Cu con MA (S.C. + Cu 300 + MA Nat.)
12	Suelo contaminado con solución de 300 ppm de Cu inoculado con GC (S.C. + Cu 300 + G.C.)
13	Suelo contaminado con solución de 450 ppm de Cu esteril (S.C. + Cu 450)
14	Suelo contaminado con solución de 450 ppm de Cu con MA (S.C. + Cu 450 + MA Nat)
15	Suelo contaminado con solución de 450 ppm de Cu inoculado con GC (S.C. + Cu 450 + G.C.)

Abreviaciones: S.N.C.= suelo no contaminado, S.C.= suelo contaminado, MA Nat.= micorriza arbuscular nativa, G.C.=*Glomus claroideum*.

3.2.2 Condiciones de establecimiento, crecimiento y cosecha. El método utilizado para la producción de las plántulas para utilizar en el ensayo fue el de bandejas almacigueras plásticas (Figura 11a), luego de lo cual se realizó el trasplante a macetas de 700 ml. Como sustrato de crecimiento de las plantas se utilizaron: i) para los tratamientos con suelos estériles una mezcla de suelo, arena, sepiolita y vermiculita en proporciones 1:1:1:1, ii) en el caso de los tratamientos con inoculación de *Glomus claroideum* una mezcla de inóculo, suelo, arena sepiolita y vermiculita en proporciones 2:1:1:1:1, iii) en el caso de los tratamientos con hongos nativos para ser utilizada con las especies endémicas *Imperata condensata* y *Oenothera picensis* se utilizó una mezcla de inóculo, suelo rizosférico correspondiente a cada planta, arena, sepiolita y vermiculita en proporciones 2:1:1:1:1, iv) y para los tratamientos con hongos nativos para ser utilizados con la especie agrícola *Helianthus annuus* se utilizó una mezcla de inóculo, una mezcla de suelo rizosférico de *Imperata condensata* y *Oenothera picensis*, arena sepiolita y vermiculita en proporciones de 1:1:1:1:1:1. Los inóculos se obtuvieron mediante la técnica de cultivos trampas.



Figura 10. a) Almaciguera para *Oenothera picensis*, *Helianthus annuus* e *Imperata condensata* inoculados con *Glomus claroideum*, b) invernaderos del departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco.

El ensayo se llevó a cabo bajo condiciones controladas en invernadero (Fig. 11b), con una temperatura que oscilaba entre los 25 ± 3 °C durante el día y 15 ± 3 °C durante la noche, y un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad. Las macetas fueron llenadas con una mezcla de suelo

estéril correspondiente a cada tratamiento y arena en una proporción de 2:1, para completar 600 gramos por maceta. Para los tratamientos con adición de Cu se utilizó una solución de Cloruro de cobre ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), en proporciones correspondientes a cada tratamiento (150-300-450 ppm de Cu). El riego fue de forma manual con agua destilada. Las plantas fueron suplementadas con fertilizante de estimulación de desarrollo vegetal (Blister), con un contenido de N-P-K de 16-8-8 % respectivamente. El estudio tuvo una duración de 5 meses desde el establecimiento de plántulas hasta la cosecha del material vegetal y biológico. Para la cosecha del material vegetal se procedió a separar la parte aérea de la raíz en bolsas de papel para el posterior procesamiento de éstas en el laboratorio, que consistió en su secado en horno de ventilación forzada a 65°C por 48 h y pesado. Para el material biológico (suelo) se procedió a recuperar el sustrato de las macetas en bolsas plásticas para su posterior análisis en laboratorio.

3.2.3 Determinaciones

b) Esporas. Las esporas fueron separadas del sustrato por el método del tamizado húmedo y decantado (Gerdemann y Nicholson, 1963) con algunas modificaciones en la etapa del tamizado, debido a que los suelos con los que se trabajó poseían bajos niveles de materia orgánica. Las esporas separadas del sustrato se contaron. A continuación se mencionan algunos detalles del procedimiento.

1. Se pesaron 20 g de suelo, se mezclaron vigorosamente con agua y se centrifugaron a 2500 rpm durante 2 min.
2. El sobrenadante, que contenía una gran parte de los materiales orgánicos gruesos del suelo, esporas rotas, trozos de raíz y otros materiales poco densos, se descartó.
3. Seguidamente, el sedimento se mezcló y suspendió en una solución de sacarosa al 70% p/v y posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones anteriores.

4. El sobrenadante se vertió sobre una serie de tamices Tyler de 500, 250 y 53 μm de luz, se lavó con agua y se recolectó en una placa de Doncaster para su observación en el microscopio estereoscópico, a 50-75 aumentos.
5. Finalmente, y de acuerdo a las características de cada especie, se realizó la cuantificación de las esporas correspondientes a cada una de las especies inoculadas.

c) Colonización HMA en raíces de plantas. Para la determinación de la colonización en la raíz se utilizó el Método del intercepto de líneas de McGonigle et al., (1990), en el cual se utilizan trozos de raíces enteras, de aproximadamente 1 cm, los que son previamente teñidos según el procedimiento de Phillips y Hayman (1970) con algunas modificaciones. El colorante azul-tripán tiñe las estructuras que presentan quitina, como son las paredes celulares de los HMA (Bartnicki-García, 1968). Luego los trozos teñidos son distribuidos en placas cuadrículadas para su observación bajo lupa estereoscópica a 40x.

Las raíces se separaron del sustrato utilizando tamices de la serie Tyler de 2 y 1 mm de luz. Posteriormente se lavaron con agua y se pesaron. Se tomaron dos sub-muestras de raíz, una para su tinción y la otra para la determinación de los hongos colonizadores mediante técnicas moleculares. El procedimiento de tinción y cuantificación fue el siguiente:

1. Se cortaron las raíces en segmentos de alrededor de 1 cm y se sumergieron en una solución de KOH al 10% p/v, en la que se mantuvieron durante tres días.
2. Posteriormente se eliminó la solución de KOH y las raíces se lavaron con abundante agua.
3. Las raíces se sumergieron en una solución de HCl al 1% p/v, donde permanecieron un día.
4. Posteriormente se eliminó la solución de HCl y se añadió solución de azul-tripán al 0.05% p/v en ácido láctico, donde se mantuvieron 1 día.
5. Finalmente se eliminó la solución de azul-tripán, se lavaron con agua y se conservaron en ácido láctico hasta su observación.

6. Para la cuantificación de la colonización, las raíces teñidas se extendieron sobre placas de metacrilato, con una cuadrícula de 1,3 x 1,3 cm, contándose con ayuda del microscopio estereoscópico las intersecciones entre las raíces y la cuadrícula. La proporción de raíz micorrizada se obtiene de la relación entre las intersecciones donde la raíz presenta colonización, respecto del total de intersecciones raíz-cuadrícula.

$$\%Colonización = \frac{\text{Interceptos}(+) \times 100}{\text{Total de interceptos}}$$

d) Micelio Total. Las hifas micorrícicas extrarradicales totales se determinaron por la metodología alternativa para suelos derivados de cenizas volcánicas descrito por Rubio et al., (2003). La cuantificación de la densidad total de hifas se realizó mediante el método de intersección en línea de Newman (1966) luego de su tinción con azul de tripán y su recolección en filtro de membrana de 0.45 μm de tamaño de poro (White Gridded HAWG, Millipore Corp., Bedford-Madison, USA).

3.3 Análisis estadístico.

El efecto de la adición de Cu, el tipo de HMA utilizado, y la interacción de estos factores, según la planta considerada fueron analizados por un Anova multifactorial utilizando el programa SPSS v. 10.0. Cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), las medias fueron comparadas mediante el test de rango múltiple de Tukey.

4. PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Producción de biomasa

En la Figura 11 se muestra la producción de biomasa para los tratamientos sin micorrizas (SM), con hongos nativos (HN) y con el hongo micorrícico exógeno *Glomus claroideum* (GC), a niveles crecientes de contaminación por Cu. La producción de biomasa se comportó de forma diferente para cada planta evaluada. En el caso de *Oenothera picensis* (Fig. 11a), planta metalofita nativa, a niveles crecientes de toxicidad por Cu su producción de biomasa fue mayor con la inoculación de GC, en comparación a las inoculadas con HN. Además de la menor producción de biomasa que tuvieron las plantas de *O. picensis* con HN, en el tratamiento Cu450 no se logró el establecimiento de las plantas a lo largo del estudio, muriendo éstas antes de finalizar el ensayo, lo que complementaría lo señalado anteriormente, concluyendo que la asociación Planta-GC fue más favorable para el desarrollo de biomasa en *O. picensis* a niveles crecientes de toxicidad por Cu.

En el caso de *Imperata condensata* (Figura. 11b), planta igualmente metalofita nativa, los resultados mostraron que, en general, a medida que aumentaban los contenidos de Cu, la producción de biomasa también lo hacía. Esto se observó en particular en los tratamientos HN y SM. En el caso del tratamiento GC con Cu450, la producción de biomasa decayó levemente. En base a los resultados obtenidos, la mayor producción de biomasa a niveles crecientes de toxicidad por Cu se encontró en los tratamientos SM, lo que evidenciaría algún tipo de mecanismo fisiológico capaz de hacer frente a condiciones tóxicas por Cu sin la necesidad de micorrización. Esto podría explicarse debido a que hay plantas que exudan altas cantidades de exudados radicales para hacer frente a situaciones de estrés por metales, y que quizás las harían menos dependientes de la asociación micorrícica para su desarrollo. En esta especie en particular, las exudaciones radicales ante condiciones de contaminación por Cu fueron estudiadas por Meier *et al.* (2010) en solución nutritiva, encontrando que las exudaciones

radicales de *I. condensata*, específicamente de ácido cítrico y oxálico, se elevaban a medida que los niveles de contaminación por Cu aumentaban.

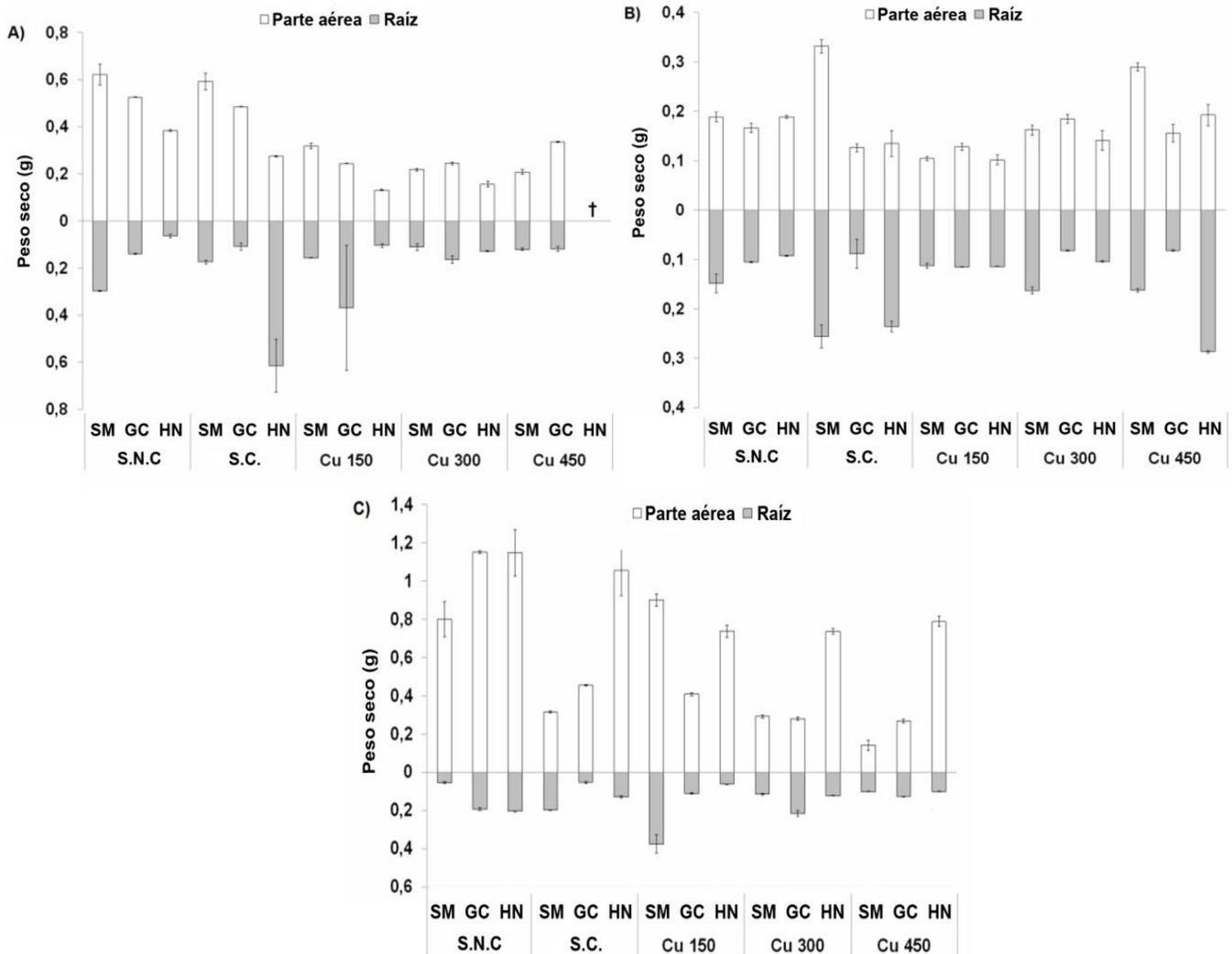


Figura 11. Producción de biomasa seca (g) aérea y radical con y sin inoculación del HMA *Glomus claroideum* (GC) y HMA nativos (HN), bajo diferentes condiciones de Cu en suelo (0 a 450 mg Cu Kg⁻¹) en a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y c) *Helianthus annuus*. SM = Plantas sin micorriza, S.N.C.= Suelo no contaminado. S.C. =Suelo contaminado base, † = Planta muerta.

Por otra parte, los resultados para *Helianthus annuus* (Fig. 11c), una planta agrícola, fueron notoriamente distintos a los observados en las metalofitas. Esto, porque la respuesta a la

inoculación con HN fue ampliamente superior a la inoculación con GC, incluso llegando a desarrollar su biomasa en forma uniforme a medida que la toxicidad por Cu aumentaba. La producción de biomasa en los tratamientos sin micorrización se mostraron claramente como los más afectados a niveles crecientes de toxicidad por los niveles de Cu en suelo, sugiriendo la necesidad clara de esta planta de establecer la asociación simbiótica con hongos micorrizicos para su crecimiento y desarrollo en zonas afectadas por desechos mineros. Resultados similares encontraron Davies *et al.*, (2001), quienes sometieron a *H. annuus* a niveles crecientes de Cr en suelo, observándose que la diferencia de producción de biomasa total entre plantas micorrizadas y no micorrizadas se acentuaba mas en los niveles altos de contaminación, sugiriendo claramente la necesidad de la micorrización en condiciones de stress si se pretende utilizar esta especie en particular con fines de biorremediación.

4.2 Colonización radical

En la Figura 12 se presenta la colonización micorrícica para los tratamientos inoculados con HN y GC, a niveles crecientes de contaminación por Cu. En general, en las raíces creciendo en suelos no contaminados, la colonización con GC fue mayor en las tres plantas analizadas. Esta respuesta favorable a la asociación con GC podría representar una ventaja frente a los HN en el caso particular de *O. picensis* (Figura 12a) en suelos con niveles críticos de contaminación por Cu, complementando además los resultados presentados para la producción de biomasa, donde dentro de los tratamiento con adición de Cu, el que presentaba mayor rendimiento se encontraba en asociación con GC, siendo el más favorable. En el caso de *I. Condensata* (Figura 12b) la respuesta de la colonización en los tratamientos con suelos contaminados, se observó en general superior para la asociación con los HN, incrementándose por sobre la media del resto en el tratamiento con mayor nivel de Cu (Cu450).

Los resultados de colonización para *H. annuus* (Figura 12c) fueron, en general, para ambas asociaciones de hongos en suelos contaminados, crecientes a medida que aumentaban los niveles de Cu en suelo, llegando a un máximo de 40 % para la asociación con GC en el suelo Cu+300.

En el tratamiento Cu450, ambas asociaciones micorrícicas mostraron reducciones leves en los porcentajes de colonización radical, pero manteniendo siempre una tendencia a presentar una mayor colonización en los tratamientos inoculados con GC. En este caso, y asociando esto a los resultados de producción de biomasa para *H. annuus*, se puede observar que a pesar de que los HN produjeron un menor porcentaje de colonización, el desarrollo de biomasa fue significativamente mayor que en la asociación con GC.

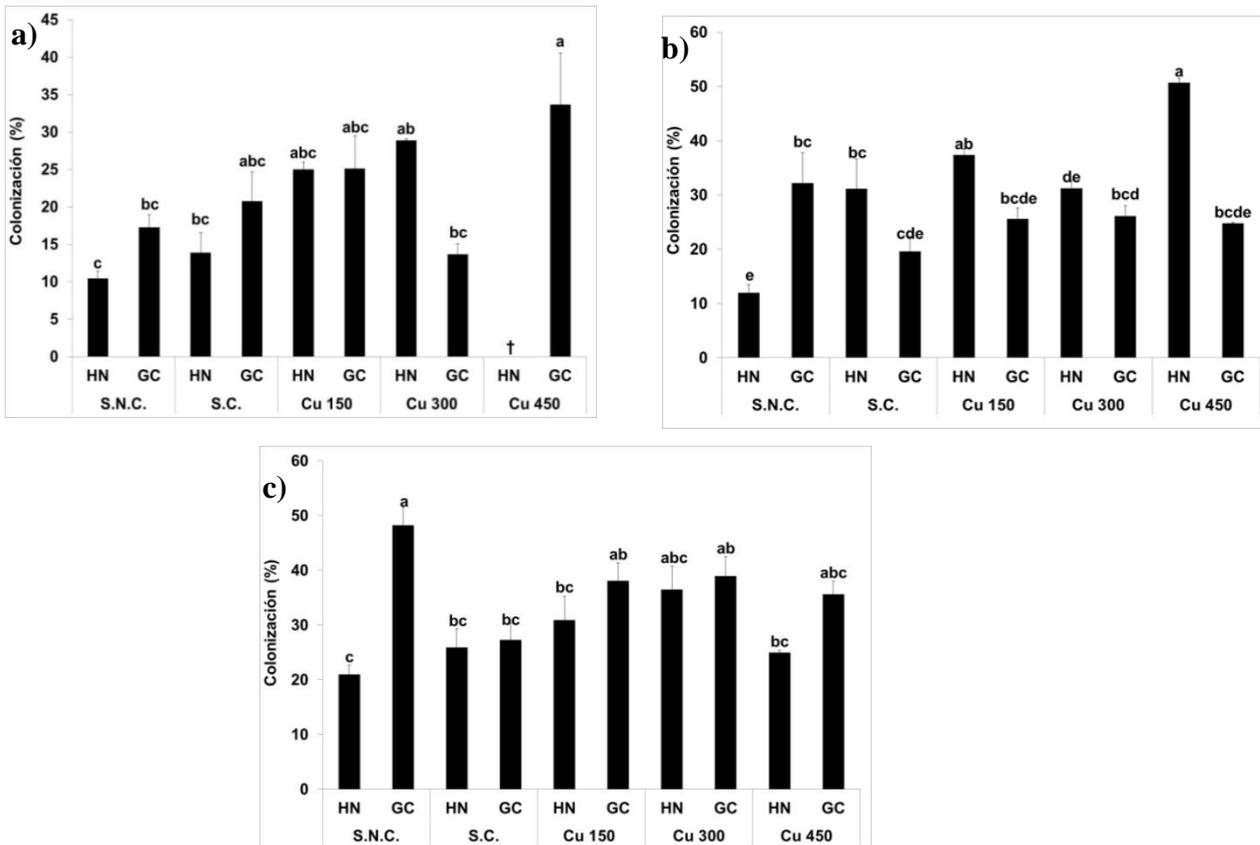


Figura 12. Colonización micorrícica en a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y c) *Helianthus annuus*. SM = Plantas sin micorriza, S.N.C.= Suelo no contaminado. S.C. =Suelo contaminado base, † = Plantas muertas. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey P<0,05).

Los resultados de colonización radical para las tres plantas fueron, en general, favorables frente a la adición de Cu, aumentando los porcentajes de colonización frente al stress provocado por el exceso del metal en la rizosfera. Estos resultados no concordarían con los obtenidos por Díaz *et*

al. (1996), quienes concluyeron que la colonización por HMA se ve reducida por niveles altos de metales en suelo. No obstante, resultados similares a los obtenidos en este estudio encontraron Estaún *et al.* (2010), quienes observaron que a medida que se incrementaban los niveles de Cromo en suelo, la colonización radical en *Plantago lanceolata*, asociadas el hongo micorrizico arbuscular *Glomus intraradices*, aumentaba frente al creciente nivel del metal en el suelo. Por su parte, Chen *et al.* (2005), en un estudio donde analizaron la colonización radical en las especies *Kummerowi astriata*, *Ixeris denticulate*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, y *Echinochloa crusgalli*, observaron que se produjo una disminución en la colonización radical desde 72 hasta 4% al incrementar las dosis de Pb de 300 a 600 mg kg⁻¹. Por el contrario, Leung *et al.* (2006), observaron un aumento de la colonización radical en *Pteris vittata* al aumentar las dosis de As (26.4%; 30.3%; 40.6% de colonización a 0, 50 y 100 mg kg⁻¹ de As). Este estudio y otros semejantes permiten observar que la colonización radical de hongos micorrizicos en condiciones de altos niveles de metales es muy variable, por lo que se hace necesario seguir profundizando las investigaciones en este aspecto.

4.3 Densidad de esporas

En la Figura 13 se presenta el número de esporas por cada 20 gramos de suelo para todas las plantas en los tratamientos con HN y GC, a niveles crecientes de contaminación por Cu. La producción de esporas en el caso de *O. picensis* (Figura 13a) fue disminuyendo de forma estable a medida que aumentaban los contenidos de Cu en el suelo. En esta especie en particular, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos de HN y GC, solo en los suelos no contaminados se evidencio una mayor producción de esporas con HN. A diferencia de lo descrito anteriormente, en el caso de *I. condensata* (Figura 13b) la producción de esporas aumentó a medida que la toxicidad por Cu se incrementaba en los tratamientos, sin diferencias apreciables entre los tratamientos HN y CG. Los resultados para *H. annuus* (Figura 13c) mostraron diferencias de gran magnitud entre los tratamientos con HN y GC. Primero, sobre suelos no contaminados la producción de esporas fue mayor con la inoculación de GC, con 67 esporas cuantificadas a diferencia de las 20 esporas para los tratamientos con HN. Luego, en los

tratamientos sobre suelo contaminado base se mantuvo cierta diferencia a favor de GC, pero disminuyendo la magnitud de la diferencia respecto de la inoculación con HN. Y finalmente, en el caso de los tratamientos con adición de Cu, los resultados mostraron claramente que la inoculación con HN, probablemente por la condición de estar más adaptados a condiciones de estrés por contaminación con Cu, produjeron una cantidad considerablemente mayor de esporas en comparación con las producidas por el hongo exógeno GC. En el caso de los HN la producción de esporas fue creciente a medida que aumentaba la cantidad de Cu añadido, con un punto máximo en el tratamiento Cu300, donde se cuantificaron 88 esporas en 20 g de suelo. Los tratamientos con GC también produjeron más esporas a medida que aumentaba la toxicidad por Cu, en menor cantidad que los HN, con 44 esporas en el tratamiento Cu450.

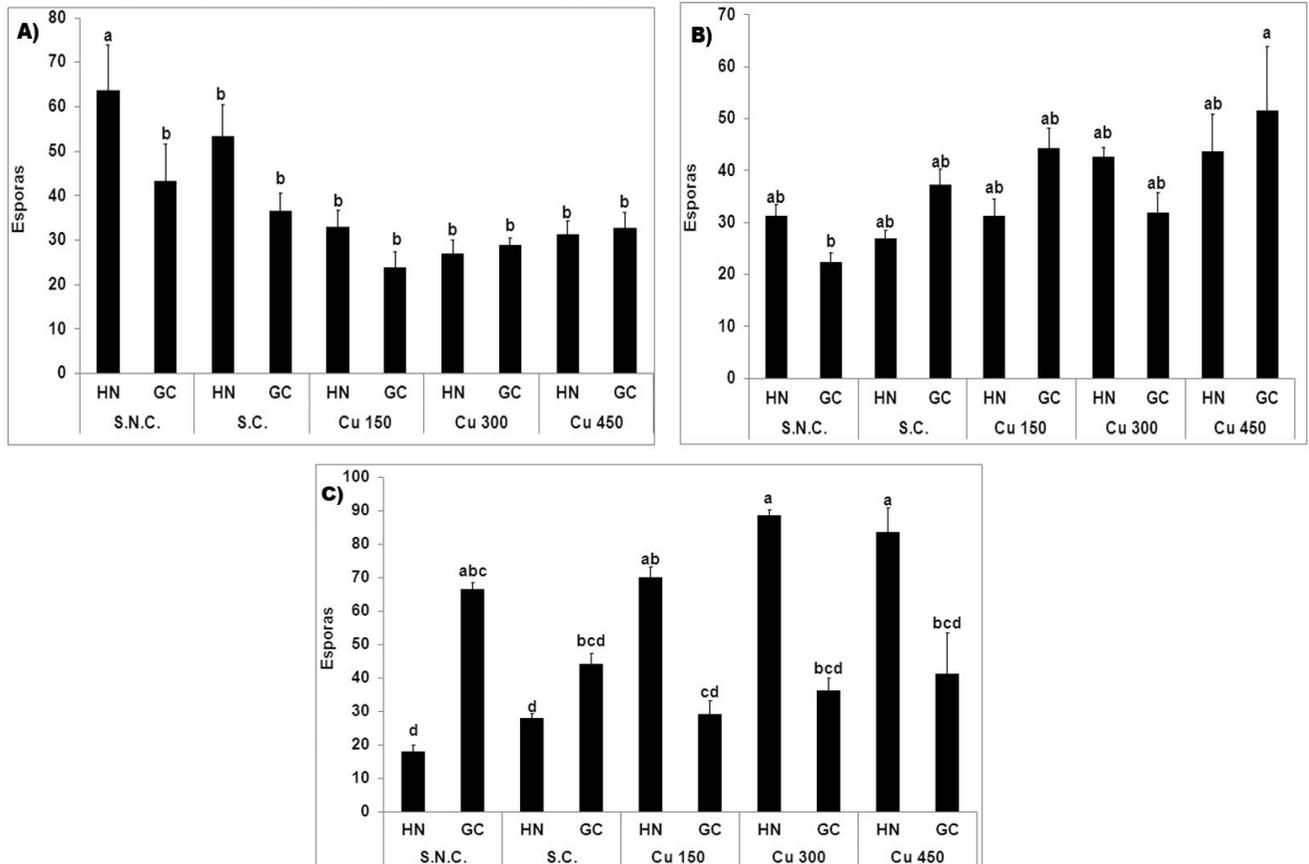


Figura 13. Cuantificación de esporas de hongos micorrizico arbusculares en 20 gramos de suelo para a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y c) *Helianthus annuus*. SM = Plantas sin micorriza, S.N.C.= Suelo no contaminado. S.C. =Suelo contaminado base, † = Plantas muertas. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey P<0,05).

Los resultados para producción de esporas HMA fueron muy diferentes para cada especie de planta, y en cada asociación con HMA. Según estudios realizados por del Val *et al.*, (1999), la producción de esporas en HMA bajo condiciones de stress por metales pesados se ve afectada negativamente a medida que la toxicidad en suelos aumenta. Esto se puede corroborar con los resultados de *O. picensis* donde casi sin diferencias entre la asociación con HN o GC, la densidad de esporas fue afectada por el aumento continuo del contenido de Cu en suelo. Pero, en contraposición a lo anterior, *I. condensata* y *H. annuus* se vieron afectadas positivamente. En otro estudio, Díaz *et al.*, (1996) concluyeron que en concordancia con la tasa de colonización radical, la producción de espóra se vería afectada en suelos contaminados con metales, y con una alta variabilidad, lo que representaría una contradicción con los resultados obtenidos en este experimento, donde se puede observar que sólo en el caso de *O. picensis* la densidad de esporas disminuyó en función del aumento en la adición de Cu en suelo. En el resto de los tratamientos y, en general independiente de si la asociación fue con hongos adaptados a o no a toxicidad por metales y de la planta asociada a éstos, los resultados fueron distintos a lo previamente reportado en la literatura.

Por otra parte, Leyval *et al.*, (1997) y Zak *et al.*, (1982) estimaron rangos probables de producción de esporas de HMA bajo condiciones de toxicidad por metales en suelo, los cuales pueden llegar a ser muy variables. Estos rangos van desde 3-46 a 390-2070 cada 100 gramos de suelo. Esta estimación concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, donde encontramos de 20 a 100 esporas en 20 gramos de suelo, lo que correspondería entre 100 y 400 esporas cada 100 gr de suelo, aproximadamente. Es por esto que en el caso del estudio de las asociaciones simbióticas entre HMA y plantas en ambientes contaminados por metales, es difícil generalizar sobre posibles comportamientos, lo que en buena parte es debido al poco desarrollo existente aún hoy en día en estos aspectos de esta línea de investigación.

4.4 Densidad de micelio

En la Figura 14 se muestra la densidad de micelio micorrízico total en suelo para los distintos tratamientos analizados. En el caso de *O. picensis* (Figura 14a) se observó una clara diferencia en la longitud de micelio extraradical entre el suelo no contaminado y los suelos contaminados para la asociación con hongos nativos. En el caso de los tratamientos inoculados con *G. claroideum*, las diferencias no fueron de una magnitud tan acentuada como en el caso de HN. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas para la densidad de micelio a niveles crecientes de Cu en suelo, sólo se observó una importante baja del micelio en el tratamiento Cu+300 para ambas asociaciones micorrizicas.

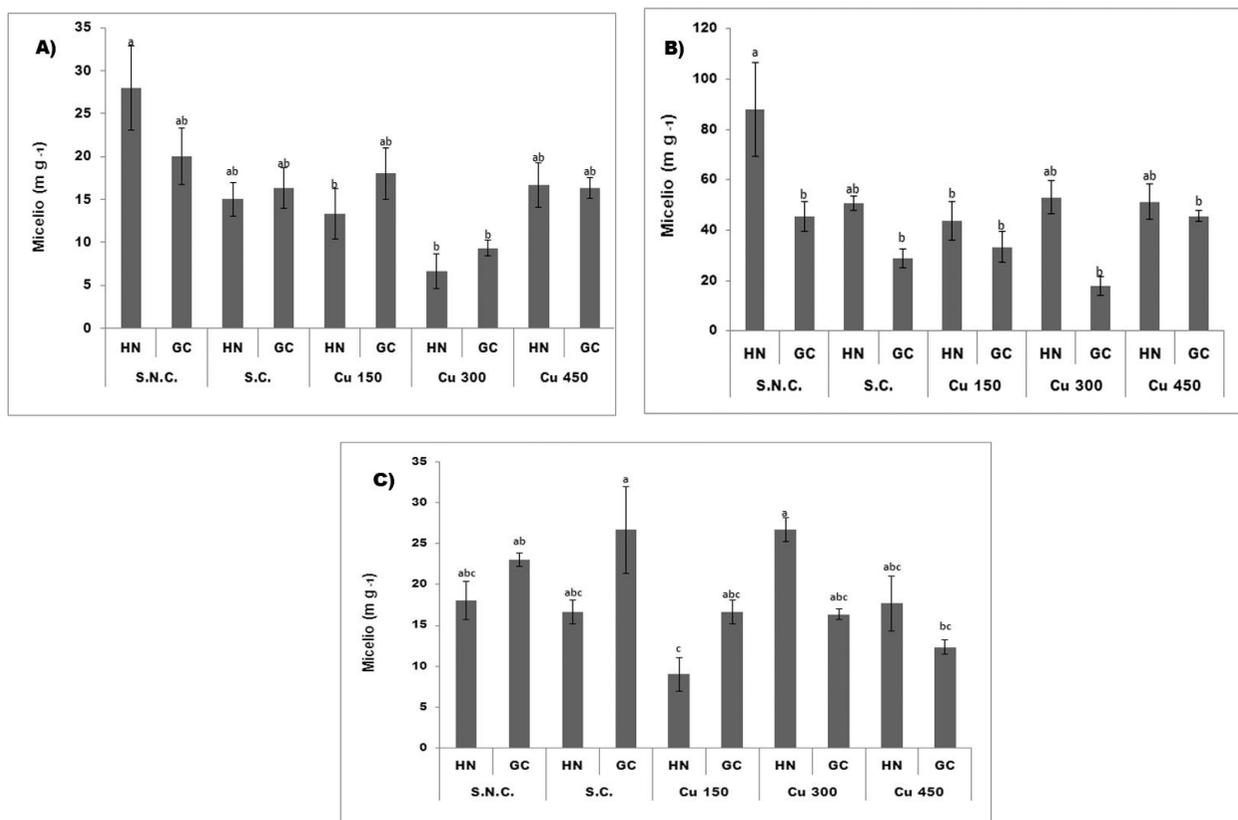


Figura 14. Densidad de micelio de HMA sometidos a niveles crecientes de contaminación por Cobre para las plantas metalofitas a) *Oenothera picensis*, b) *Imperata condensata* y una agrícola c) *Helianthus annuus* (Maravilla). Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey P<0,05).

Para *I. condensata* (Figura 14b), se observó una marcada diferencia en la longitud del micelio con la asociación de hongos nativos en suelo contaminado y no contaminado, siendo en este último tratamiento casi un 40% mayor que la observada en suelos contaminados. El comportamiento de la densidad de micelio de hongos nativos, a medida que aumentaban los niveles de Cu en suelo, no presentó grandes diferencias. Se observó, sin embargo, en el caso de *G. claroideum*, que la longitud de micelio no presentó grandes diferencias en suelo no contaminado, y tampoco a medida que aumentaban los contenidos de Cu en el suelo. En el caso de *H. annuus* (Figura 14c), a pesar de que en ambos casos de asociación micorrizica habían ciertas diferencias entre tratamientos, estas no permitieron demostrar alguna tendencia del comportamiento del micelio a niveles crecientes de Cu.

4.5 Acumulación de Cu en esporas.

En la Figura 15 se muestran fotografías tomadas a esporas de *G. claroideum* en suelo no contaminado y en suelos con altos niveles de Cu, asociadas a *I. condensata*. En los tratamientos Cu300 y Cu450 se observó la presencia de sales del metal en su interior, generando un color verdoso, indicativo de la acumulación de Cu. Esta capacidad de secuestrar Cu en órganos externos como las esporas no habían sido descrita en condiciones de suelo en la literatura científica, ni se ha reportado en recientes investigaciones. Sólo existe un reciente trabajo de Ferrol *et al.*, (2009) en el cual, a través de condiciones monoxénicas, se constató la presencia de esporas “verde-azuladas” de *Glomus intraradices* cuando éstas fueron crecidas expuestas a altos niveles de sulfato de cobre. Esta acumulación de Cu en las esporas representaría una estrategia para mantener alejado al metal de estructuras importantes para el metabolismo del hongo, como lo es el citosol, similar a lo que sucede con la estrategia de acumulación de Cu dentro de la vacuola. En el caso de esta tesis, se trabajó en base a cloruro de cobre para generar el ambiente de toxicidad. Probablemente es debido a esto que las esporas extraídas presentaban el color verde (Figura 15b y c), a diferencia del trabajo realizado por Ferrol *et al.*, (2009), donde utilizaron otras sales de Cu, hipotetizando que los precipitados corresponden a fosfatos de Cu. Concordando con lo concluido por Ferrol *et al.*, (2009), del total de esporas de los tratamientos

donde se hallaron los ejemplares acumuladores, sólo una parte presentaba signos de acumulación dentro de ellas. Esto representaría una estrategia de sobrevivencia del hongo, acumulando el exceso de Cu solamente en algunas esporas, protegiendo de esta manera al resto de la colonia fúngica.

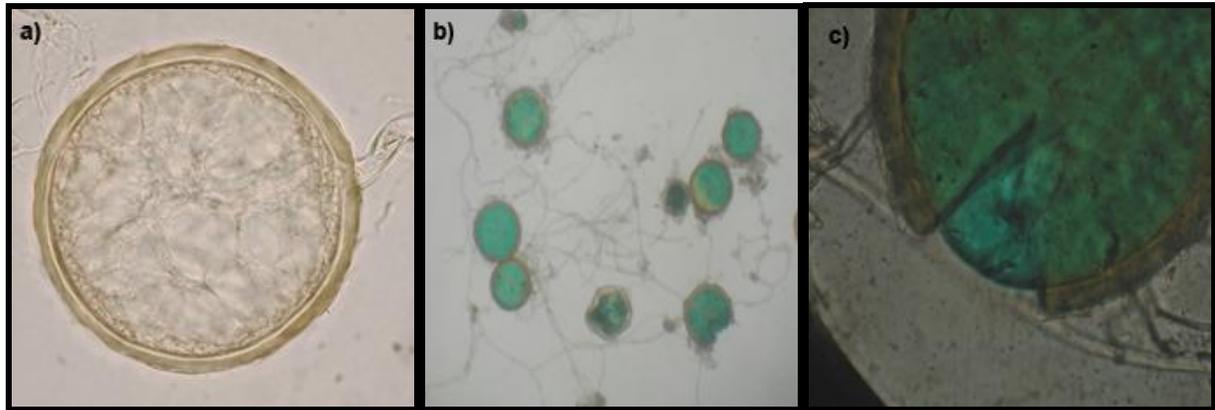


Figura 15. a) Espora de *Glomus claroideum* en suelos no contaminados, b) colonia de esporas *Glomus claroideum* acumulando cobre en suelos contaminados y c) espora de *Glomus claroideum* con su contenido interno expuesto. Esporas presentes en los tratamientos de *Imperata condensata* Cu+300 y Cu+450.

En la Figura 16 se muestra la cantidad de esporas verdes y proporción según el total de esporas de *G. claroideum* asociadas a *I. condensata* a niveles crecientes de contaminación por Cu. Como se puede apreciar, sólo se presentaron casos de acumulación de Cu en los tratamientos que poseían altos niveles contaminación, siendo mayor la presencia (Figura 16a) y proporción respecto al total (Figura 16b) de esporas verdes a medida que se aumentó el nivel de toxicidad. Esto respondería a lo anteriormente descrito sobre una posible estrategia de sobrevivencia, acumulando Cu solo en algunas esporas de la colonia para proteger al resto. Según los resultados obtenidos, se podría corroborar esta estrategia hipotética, pues como se logró ver en el tratamiento Cu450, se cuantificaron más esporas y una mayor proporción con respecto al total de estas en comparación al tratamiento Cu350.

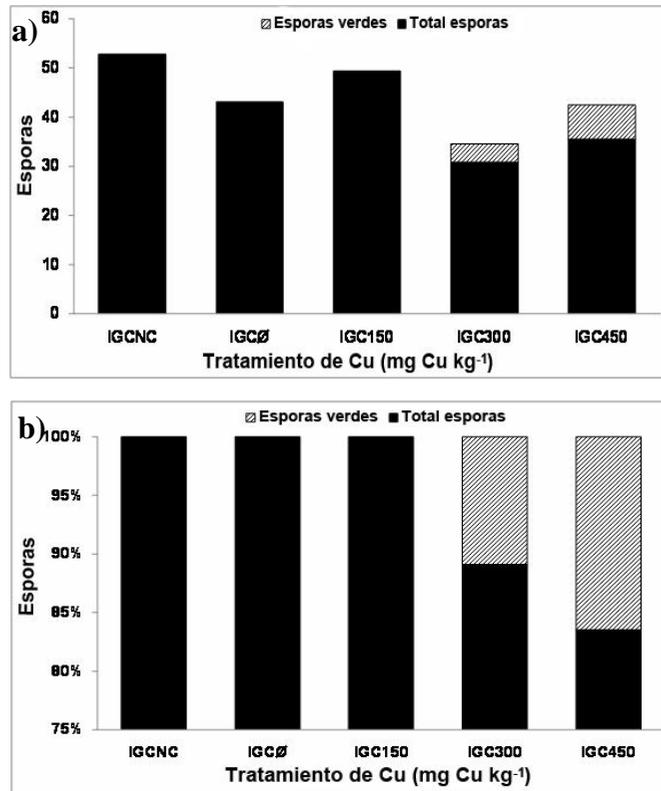


Figura 16. a) Cantidad de esporas verdes y b) proporción (%) según el total de esporas verdes en los tratamientos de *Imperata condensata* (I). GC = *Glomus claroideum*, NC= no contaminado, Ø = Suelo contaminado base.

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis de Grado, se puede concluir que la asociación micorrícica entre ecotipos de HMA adaptados y no adaptados con plantas metalofitas y/o agrícolas, creciendo en ambientes con altos niveles de toxicidad por Cu, es una opción útil como posible herramienta biotecnológica en programas de bioremediación de suelos afectados por desechos de la minería del cobre. En particular, se pueden extraer las siguientes conclusiones particulares:

- La densidad de propágulos de HMA se comportó de diferente forma dependiendo de la especie vegetal, el tipo de inóculo utilizado, y el nivel de Cu establecido. Así por ejemplo, la colonización tendió a aumentar a medida que aumentaba la toxicidad por Cu. Por su parte la densidad de esporas aumentó a medida que aumentaba el Cu en suelo en *O. picensis* y *H. annuus*; en cambio en *I. condensata* este parámetro disminuyó. Adicionalmente, la densidad de micelio mostró una tendencia a disminuir con altos niveles de Cu, en particular en la rizosfera de las especies metalofitas.
- La producción de biomasa por *Oenothera picensis* fue considerablemente afectada a niveles crecientes de Cu, siendo mayor cuando se asoció con el ecotipo de hongo no adaptado. En *Helianthus annuus*, el comportamiento de la producción de biomasa fue favorable con la asociación a ecotipos nativos, no presentando mayores diferencias de esta a niveles crecientes de toxicidad por Cu. Por su parte, en *Imperata condensata*, la producción de biomasa puede ser un aspecto no relevante en términos de la asociación simbiótica con HMA, debido a la presencia de exudados radicales descritos en esta especie. Estos aspectos refuerzan la necesidad de conocer el efecto que tendrán las asociaciones específicas planta-HMA previo a la instalación de programas de biorremediación.

- En suelos con altos niveles de Cu, específicamente en los tratamientos Cu300 y Cu450, el HMA no adaptado *Glomus claroideum* en asociación con *Imperata condensata*, generó mecanismos de exclusión extraradical de Cu en algunas de las esporas producidas, siendo la cantidad de esporas que presentan esta habilidad mayor en cantidad y proporción a niveles más altos de Cu en suelo, y que puede justificar el uso de este HMA en suelos altamente contaminados, asociado a esta especie metalofita.
- Finalmente, se puede afirmar que en términos de una posible utilización de una combinación Hongo-Planta para futuros programas de fitoremediación de suelos contaminados por metales pesados, la asociación entre HMA endémicos de zonas contaminadas y *Helianthus annuus*, surge como la alternativa más favorable en comparación a las metalofitas endémicas, principalmente por su producción de biomasa y la densidad de esporas de HMA remanentes a niveles crecientes de toxicidad por Cu en suelo.

6. RESUMEN

Los desechos producidos por las actividades mineras constituyen una problemática mundial. En Chile la minería representa la actividad económica más importante del país, siendo el primer productor de Cu en el mundo. No obstante lo anterior, la minería está asociada a la descarga sostenida de metales pesados, los cuales tienen una serie de efectos negativos sobre la vegetación y biología del suelo. El estudio sobre la utilización de plantas y microorganismos asociados, tales como hongos micorrízicos arbusculares (HMA), como una herramienta para la remediación de sitios contaminados por la minería surge como alternativa para recuperar la diversidad de estas áreas. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue analizar el desarrollo de la simbiosis establecida entre hongos micorrízicos arbusculares nativos (HN) de zonas contaminadas con Cobre y un hongo exógeno, *Glomus claroideum* (GC), supuestamente no adaptado a altas concentraciones de metales. Los hongos fueron sometidos a niveles crecientes y tóxicos de Cu (Cu 0, +150, +300 y +450 mg Cu Kg⁻¹) en suelo utilizando dos metalofitas endémicas, *Imperata condensata* y *Oenothera picensis* y una planta agrícola, *Helianthus annuus*. Para esto, se colectaron muestras de suelo aledaño a la Fundición de Cobre Ventana (SC), comuna de Puchuncaví, Región de Valparaíso, y suelos no contaminados (NC). El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero donde se probaron cinco tipos de suelos (NC, SC, SC+150 ppm Cu, SC+300 ppm Cu y SC+450 ppm Cu), para las tres plantas asociadas a HN y GC. Los resultados indicaron que la asociación simbiótica entre HMA adaptados y no adaptados con plantas metalofitas y agrícolas, sería una opción a considerar para la implementación de futuros programas de fitorremediación de suelos afectados por desechos mineros. En este sentido, y en especial teniendo en cuenta los altos niveles de toxicidad por Cu, la utilización de inóculos de HMA adaptados sería la mejor opción en la promoción de procesos de remediación de suelos. Adicionalmente, se observó en los tratamientos con altos niveles de Cu para *I. condensata*, un mecanismo poco conocido en la literatura científica, correspondiente a una exclusión extraradical de metales en esporas del hongo exógeno, las que presentaron una mayor proporción a medida que aumentaba el Cu disponible en suelo.

7. SUMMARY

The waste produced by mining activities are a global problema. Mining is the most important economic activity in Chile, being the first copper producer in the world. However, mining is associated with the regular heavy metals discharge, which have several negative effects on plant and soil biology. The study on the use of plants and associated microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as a tool for remediation of sites polluted by mining is an alternative to recover the diversity of these areas. Therefore, the objective of this study was to analyze the development of the symbiosis between arbuscular mycorrhizal fungi natives (HN) from Cu polluted areas and the exogenous fungus, *Glomus claroideum* (GC), supposedly not adapted to high concentrations of metals. The fungi were subjected to increasing Cu levels (Cu 0, +150, +300 and +450 mg Cu kg⁻¹) in soil using two endemic metallophytes, *Imperata condensata* and *Oenothera picensis* and the agricultural plant *Helianthus annuus*. For which, soil samples were collected in adjacent areas to the Ventanas Copper Smelter (SC), Puchuncaví, Chile, Valparaíso Region, and unpolluted soil (NC) from the same area. The experiment was conducted under green house conditions which tested five types of soils (NC, SC, SC +150 ppm Cu, SC +300 and +450 ppm Cu), for the three plants associated with HN and GC. The results showed that the symbiotic association between AMF fungus adapted and not adapted with metallophytes and agricultural plants, would be an option to consider for future implementation of phytoremediation programs in soils affected by mining waste. In this regard and considering the high levels of Cu toxicity, the use of AMF inocula would be the best option to promote soil remediation processes. In addition, it was observed in treatments with high Cu levels in *I. condensata* a mechanism not well known in the scientific literature for exclusion extraradical of metals in exogenous fungal spores, which showed a higher proportion of increasing available Cu in the soil.

8. Literatura citada

- Adriano, D. C.** 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Segunda edición. New York: Springer. New York, United States of America. 867p.
- Adriano, D. C.** 1986. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Segunda edición. New York: Springer. New York, United States of America. 533p.
- Ahalya, N., Ramachandra, T. V. y Kanamadi, R. D.** 2003. Biosorption of heavy metals. Res. J. Chem. Environ (India). 7(4): 71-78.
- Albaladejo, J., Castillo, V. y Roldán, A.** 1996. Rehabilitation of degraded soils by water erosion in semiarid environments. En: Rubio JL & A Calvo (eds) Soil degradation and desertification in mediterranean environments: 265-278. Geoforma, Logroño. 290p.
- Aragón, L. H.** 1995. Factibilidades agrícolas y forestales en la República Mexicana. Editorial Trillas. D.F., México. 177 p.
- Azcón-Aguilar, C., Bago, B. y Barea, J. M.** 1998. Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Varma A & B Hock (eds) Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology: 391-408. Springer, Heidelberg, Germany. 704 p.
- Azcón-Aguilar, C., García-García, F., y Barea, J. M.** 1991. Germinación y crecimiento axénico de los formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. En: Olivares J, Barea JM (eds) fijación y movilización biológica de nutrientes. Volumen II. Nuevas tendencias. CSIC. Madrid, España. 129-147p.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Sharchar-Hill, Y. y Pfeffer, P.** 2000. El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre raíz y su entorno. En : Alarcón A Ferrera-Cerrato R (eds) Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Colegio de Posgraduados. Ediciones mundi Prensa. Montecillo, México. 78-92p.
- Baker, A. J. M.** 1981. Accumulators and Excluders - Strategies in the Response of Plants to Heavy-Metals. Journal of Plant Nutrition (Granada). 3: 643-654.
- Baligar, V. y Fageria, N.** 1997. Nutrient use efficiency in acid soils: nutrient management and plant use efficiency. En: Moniz A, Schaffert R, Fageria N; Rosolem C, Cantarella H (eds) Plant-soil interactions at low pH: Sustainable agriculture and forestry production. Brazilian Soil Science Society (Brazil). 75-95p.

- Barea, J. M., Pérez-Solís, E., del Val, C. y Azcón-Aguilar, C.** 1999. Importancia de las micorrizas en el establecimiento y protección de las plantas en suelos degradados. *Phytoma* (España). 111: 18-30.
- Bartnicki-Garcia, S.** 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiology* (USA). 22: 87-108.
- Bi, Y., Li, X. y Christie, P.** 2003. Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. *Chemosphere* (China). 50(6): 831-837.
- Berreck, M. y Hanselwandter, K.** 2001. Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of cesium and other cations by plants. *Mycorrhiza*. 10(6): 275-280.
- Borie, F., Rubio, R., Morales, A. y Castillo, C.** 2000. Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizogenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. *Revista Chilena de Historia Natural* (Chile). 73(4): 663-670.
- Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D. y Jaffre, T.** 1977. Detection of Nickeliferous Rocks by Analysis of Herbarium Specimens of Indicator Plants. *Journal of Geochemical Exploration* (Netherlands). 7: 49-57.
- Clark, R., Zobel, R. y Zeto, S.** 1999. Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by *Panicum Virgatum* in acidic soil. *Mycorrhiza* (USA). 9(3): 167-176.
- Clark, R. y Zeto, S.** 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* (USA). 23(7): 867-902.
- Cornejo, P., Meier, S., y Borie, F.** 2008. Utilización de Hongos Micorrícicos Arbusculares como Alternativa para la Recuperación de Suelos Contaminados por Actividades Mineras. *Gestión Ambiental* (Chile). 16:13-26.
- Cornejo, P., Meier, S., Borie, G., Rillig, C. y Borie, F.** 2008a. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science of The Total Environment* (Chile). 46(1-2): 154-160.
- Cornejo, P.** 2006. Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrícicos y sus efectos en la estabilización de suelos degradados. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. Granada, España. 256p.
- Cornejo, P., Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. y Ferrol, N.** 2004. Temporal temperatura gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* (Chile). 241: 265-270.

- Cumming, J. R. y Ning, J.** 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance aluminium resistance of broomsedge (*Andropogon virginicus* L.)(USA). *J. Exp. Bot.* 54(386): 1447-1459.
- Chaney, R. L., Li, Y. M., Brown, S. L., Homer, F. A., Malik, M., Angle, J. S., Baker, A. J. M., Reeves, R. D. y Chin, M.** 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water.* (USA). p. 131–160.
- Chen, B. D., Liu, Y., Shen, H. y Christie, P.** 2003. Uptake of cadmium from an experimentally contaminated calcareous soil by arbuscular mycorrhizal maize (*Zeamays* L.). *Mycorrhiza* (China). 14(6): 347-354.
- Chern, E. C., Tsai, D.W. y Ogunseitan, O. A.** 2007. Deposition of glomalin-related soil protein and se-questered toxic metals into watersheds. *Environmental Science and Technology* (USA). 41(10): 3566-72.
- Christie, P., Li, X. y Chen, B.** 2004. Arbuscular Mycohriza can Depress Translocation of Zinc To Shoots of Host Plants in Soils Moderately Polluted with Zinc. *Plant and Soil* (UK). 261 (1-2): 209-217.
- Davies, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egila, J. N., Saraiva, J.** 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* (USA). 158(6): 777-786.
- Del Rio, M., Fonta, R., Almelab, C., Vélez, D., Montorob, R. y De Haro Bailón, A.** 2002. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcóllar mine. *Journal of Biotechnology* (España). 98(1): 125-137.
- Del Val, C., Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C.** 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* (España). 65(2): 718-723.
- Díaz, G., Azcón-Aguilar, C., Honrubia, M.** 1996. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllus cytosoides*. *Plant Soil* (España). 180: 241-249.
- Doorenbos, J. y Kassam, A. H.** 1979. Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos. Estudio FAO: Riego y Drenaje Núm. 33. FAO. Roma. 212p.
- Edvantoro, B., Naidu, R., Megharaj, M. y Singleton, I.** 2003. Changes in microbial properties associated with long-term arsenic and DDT contaminated soils at disused cattle dip sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Australia). 55(3):344–351.

- Ebbs, S. y Kochian, L. V.** 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental Science & Technology (USA)*. 32(6): 802-806.
- Ellis, R. J., Morgan, P. y Weightman, A. J.** 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology (U.K.)* 69(6): 3223-3230.
- Estaún, V., Cortes, A., Velianos, K., Camprubí, A. y Calvet, C.** 2010. Effect of chromium contaminated soil on arbuscular mycorrhizal colonisation of roots and metal uptake by *Plantago lanceolata*. *Spanish Journal of Agricultural Research (España)*. 8(1): 109-115.
- Entry, J. A., Watrud, L. S. y Reeves, M.** 1999. Accumulation of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi. *Environ. Poll. (USA)*. 104(3): 449-457.
- Gadd, G. M.** 1996. Influence of microorganisms on the environmental fate of radionuclides. *Endeavour*. 20(4): 150-155.
- Gadd, G. M.** 1993. Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60.
- Gadd, G. M. y Edwards, S. W.** 1986. Heavy-metal-induced flavin production by *Debaryomyces hansenii* and possible connexions with iron metabolism. *Transactions of the British Mycological Society (United Kingdom)*. 87(4): 533-542.
- Gerdemann, J. W. y Nicholson, T.** 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving. *Transactions British Mycology Society (USA)*. 46(2): 234-235.
- Gerdemann, J. W. y Trappe, J. M.** 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycol Memori (USA)*. 5: 1-76.
- Giller, K. E., Witter, E. y Mcgrath, S. P.** 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry (United Kingdom)*. 30(10-11): 1389-1414.
- Ginocchio, R. y Baker, A.** 2004. Metalófitas en América Latina: Un recurso biológico y genético único poco conocido y estudiado en la región. *Revista Chilena de Historia Natural (Chile)*. 77: 185-194.
- Ginocchio, R., Toro, I. y Schnepf, D.** 2002. Copper tolerance in populations of *Mimulus luteus* var. *variegatus* exposed and non exposed to copper pollution. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis (Chile)*. 2 (2): 151-156.

- Ginocchio, R.** 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncavi Valley, Chile. *Chemosphere (Chile)*. 41(1-2): 15-23.
- González de Cosío, M.** 1984. *Especies vegetales de importancia económica en México*. Ed. Porrúa. Distrito Federal, México. 305 p.
- González-Chávez, M. C., Carrillo-González, R., Wrigth, S.F. y Nichols, K. A.** 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution (Mexico)*. 130(3): 317-323.
- González-Chávez, M. C., Harris, P., Dodd, J., y Meharg, A.A.** 2002b. Arsenate resistance in arbuscular mycorrhizal associations: Implications for phosphorus nutrition of plants. *New Phytol (Mexico)*. 155: 163-171.
- González-Chávez, M. C., D'Haen, J., Vangronsveld, J., y Dodd, J.** 2002c. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil (Mexico)*. 240 (2): 287-297.
- González, I., Cisternas, M., y Neaman, A.** 2008. Acumulación de cobre en una comunidad vegetal afectada por contaminación minera en el valle de Puchuncaví, Chile Central. *Revista Chilena de Historia Natural (Chile)*. 81(2): 279-291.
- González-Guerrero, M.** 2005. Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. Granada, España. 196 pp.
- Göhre, V. y Paszkowski, U.** 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta (Suiza)*. 223(6): 1115–1122.
- Griffioen, W. A. J., Ietswaart, J. H. y Ernst, W. H. O.** 1994. Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. *Plant and soil* 158(1): 83-89.
- Herrera, M. A., Salamanca, C.P. y Barea, J. M.** 1993. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology (España)*. 59(1): 129-133.
- Hetrick, D. B. A., Wilson, G. y Figge, D.A.** 1994. The Influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metal mine spoil. *Environmental Pollution (USA)*. 86(2): 171-179.
- Hinde, C.** 2000. The global mining industry. *Industry and Environment (Londres)*. 3:10-14.

- Hooker, J. E., Jaizme-Vega, M. y Atkinson, D.** 1994. Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. En: Gianinazzi S, Schüepp H (eds) Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Birkhauser-Verlag. Basel, Suiza. 191-200p.
- Jeffries, P. y Barea, J. M.** 2001. Arbuscular Mycorrhiza-a key component of sustainable plant soil ecosystems. En: HOCK (ed) The ykota IX. Fungal Associations. Springer-Verlad. Berlin, Alemania. 95-113pp.
- Jensen, D., Holm, P. y Christensen, T.** 2000. Soil and groundwater contamination with heavy metals at two scrap iron and metal recycling facilities. Waste Management & Research (Dinamarca). 18(1): 52-63.
- Kabata-Pendias, A.** 1992. Behavioural properties of trace metals in soils. Applied Geochemistry (Polonia). 8(2): 3-9.
- Kennedy, A. C. y Smith, K.L.** 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. Plant and Soil (USA). 170 (1): 75-86.
- Kumar, P. B. A. N., Dushenkov, V., Motto, H. y Raskin, I.** 1995a. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. Environmental Science and Technology (USA). 29 (5): 1232-1238.
- Khan, A.** 2006. Mycorrhizoremediation—an enhanced form of phytoremediation. Journal of Zhejiang University (Pakistan). 7(7): 503-514.
- Lambers, H., Chapin, F. S. y Pons, T. L.** 1998. Plant Physiological Ecology. Springer. New York, USA. 540p.
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter.** 1997. Effect of heavy metals pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza. 7: 39-153.
- Leung, H. M., Ye, Z. H., Wong, M.H.** 2006. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (as hyperaccumulator) in as-contaminated soils. Enviroment Pollutions. 139: 1-8.
- Lynch, R. J., Muntoni, A., Ruggeri, R. K. y Winfield, C.** 2007. Preliminary tests of an electrokinetic barrier to prevent heavy metal pollution of soils. Electrochimica Acta (Inglaterra). 52 (10): 3432-3440.
- Lombi, E., Zhao, F. J., Dunham, S. J. y McGrath, S. P.** 2001. Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soils: Natural Hyperaccumulation Versus Chemically-Enhanced Phytoextraction. Journal of Environmental Quality (UK). 30 (6): 1919-1926.

- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. y Swan J. A.** 1990. A new method which gives an objective-measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* (Canada). 115(3): 317-322.
- Malcová, R., Rydlová, J. y Vosátka, M.** 2003. Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. *Mycorrhiza* 13(371): 151-157.
- Matthei, J.** 1995. *Manual de las malezas que crecen en Chile*. Alfabeto Impresores. Santiago, Chile. 537 pp.
- Marulanda, A., Azcón, R. y Ruiz-Lozano, J. M.** 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiología Plantarum* (España). 119(4): 526-533.
- Meier, S., Seguel, A., Borie, F. y Cornejo, P.** 2008. Copper and zinc content in *Oenothera affinis* at increasing Cu levels as affected by different ecotypes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Chile). 8: 220.
- Morton, J. B. y Benny, J.** 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with a reclassification of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471- 491.
- Newman, E. I.** 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.* (USA). 3: 139-145.
- Nichols, K.** 2003. Characterization of glomalatin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. Doctor of Philosophy Thesis. University of Maryland, College Park, Maryland, USA. 285 p.
- Oehl, F. y Sieverding, E.** 2004. *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* (Alemania). 78(1): 72-82.
- Pollard, J. A., Powell, K. D., Harper F. A. y Smith, J.** 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* (USA). 21 (6): 539-566.
- Philips, J. M. y Hayman, D. S.** 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Rausser, W. E. y Ackerley, C. A.** 1987. Localization of cadmium in granules within differentiating and mature roots. *Can J Bot* 65: 643-646.

- Reeves, R. D. y Baker, A. J. M.** 2000. Metal- accumulating plants. In: RASKIN, I. and ENSLEY, B.D., eds. Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment. John Wiley and Sons. New York, USA. 193-230p.
- Reimann, C., Koller, F., Kashulinac, G., Niskavaarad, H. y Englmaiere, P.** 2001. Influence of extreme pollution on the inorganic chemical composition of some plants. *Environmental Pollution (Noruega)*. 115(2): 239-252.
- Requena, N., Jiménez, I., Toro, M. y Barea, J. M.** 1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytologist*. 136(4): 667-677.
- Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J. P., Belimov, A. A., Gianinazzi, S., Strasser, R. J. y Gianinazzi-Pearson, V.** 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisumsativum* L. genotypes. *J Exp Bot* 53: 1177-1185
- Rufyikiri, G., Thiry, Y., Wang, L., Delvaux, B. y Declerck, S.** 2002. Uranium uptake and translocation by the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, under root-organ culture conditions. *New Phytol (Belgica)*. 156: 275-281.
- Rubio, R., Borie, F., Schalchli, C., Castillo, C. y Azcón, R.** 2003. Ocurrence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilizar and fungal inoculation. *Appl. Soil Ecol.* 23: 245-255.
- Sánchez –Díaz, M. y Honrrubia, M.** 1994. Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. En: Gianinazzi S.Schüepp H (eds) impact of arbuscular mycorrizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Barkäuser Verlag (Basel). 16-178p.
- Sarabia, R., Del Ramo, J., Diaz-Mayans, J. y Torreblanca, A.** 2003. Developmental and reproductive effects of low cadmium concentration on *Artemia parthenogenetica*. *Journal of Environmental Science and Health. Part A. Toxic/hazardous substances and Environmental Engineering.* 6: 1065-1071.
- Siqueira, J. y Moreira, F.** 1997. Microbial populations and activities in highly-weathered acidic soils: highlights of the Brazilian research. En: Moniz AFurlani A, Schaffert R, Fageria N, Rosolem C, Cantarella H(eds) Plant-soil interactions at low pH: Sustainable agriculture and forestry production. Brazilian Soil Science Society (Brazil). 139-156.

- Schwarzott, D., Walker, C. y Schüßler, A.** 2001. Glomus, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (Alemania). 21(2): 190-197.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. y Walker, C.** 2001. A new fungal Phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* (Alemania) 105(12): 1413-1421.
- Shukurov, N., Pen-Mouratov, S. y Steinberger, Y.** 2005. The impact of the Almalyk Industrial Complex on soil chemical and biological properties. *Environmental Pollution* (Israel). 136(2): 331-340.
- Smith, S. E. y Read, D. J.** 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. San Diego and London. 605p.
- Timofeev-Resovsky, E. A., Agafonov, B. M. y Timofeev-Resovsky, N. V.** 1962. Fate of radioisotopes in aquatic environments (In Russian). *Proceedings of Biological Institute USSR Academy of Sciences* (Inglaterra). 22: 49-67.
- Turnau, K., Kottke, I. y Oberwinkler, F.** 1993. Paxillus involutus-Pinus sylvestris mycorrhizae from heavily polluted forest. Element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. *Bot Acta* 106: 213-219.
- Vivas, A., Barea, J. M. y Azcón, R.** 2005. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. *Environmental Pollution* (España). 134(2): 257-266.
- Vodnik, D., Grčman, H., Maček, I., van Elteren, J. C. y Kovačević, M.** 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of The Total Environment* (Eslovenia). 392(1): 130-136.
- Walker, C. y Schüßler, A.** 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research* (Inglaterra). 108: 981-982.
- Weiersbye, I. M., Straker, C. J. y Przybylowicz, W. J.** 1999. Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grassm *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nuc. Inst. Meth. Phys. Res.* 158: 335-343.
- Wright, S. y Upadhyaya, A.** 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* (USA). 198:97-107.
- Zak, J., Danielson, R., Parkinson, D.** 1982. Mycorrhizal fungal spore numbers and species occurrence in two amended mine spoils in Alberta, Canada. *Mycologia* 74:785-792.