

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



**EFFECTO DE LA INOCULACION CON HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Oenothera picensis Phil.* EN SUELOS
CONTAMINADOS CON 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.

**DANIELA FRANCISCA BERRIOS LÓPEZ
TEMUCO – CHILE**

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EFFECTO DE LA INOCULACION CON HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES
EN EL CRECIMIENTO DE *Oenothera picensis* Phil. EN SUELOS CONTAMINADOS
CON 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.

DANIELA FRANCISCA BERRIOS LÓPEZ
PROFESOR GUIA: DR.PABLO ENRIQUE CORNEJO RIVAS

TEMUCO – CHILE

2012

**EFFECTO DE LA INOCULACION CON HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES
EN EL CRECIMIENTO DE *Oenothera picensis* Phil. EN SUELOS CONTAMINADOS
CON COBRE.**

PROFESOR GUIA
PROFESOR CONSEJERO

: 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

: DR. FELIX SEBASTIAN MEIER
ROMERO
Ingeniero Agrónomo
Doctor y Magister en Ciencias de Recursos
Naturales.
Laboratorio de Micorrizas Arbusculares,
BIOREN-UFRO

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

Dedico esta tesis en memoria de una gran mujer, Mi abuela. Volaste lejos a descansar y cuidarnos desde lo más alto. Nos vemos pronto.

AGRADECIMIENTOS

Este camino comenzó hace ya unos años, fue largo muchas veces difícil y otras muy amable, soñé muchas veces con este momento y por fin puedo decir que lo he logrado.

Quiero agradecer a mi familia a mis padres por su apoyo incondicional, por la entrega de valores que hoy me hacen ser quien soy, porque siempre quisieron que su hija fuera más que ellos y sé que hoy se enorgullecen de mi, a mis hermanos por su cariño y espera, agradecer a Francisco Huala amigo, confidente y compañero en esta travesía, gracias por tu ayuda y tu amor eterno. A mis amigas las Danielas, por sus lindas palabras siempre cuando las necesite. A los colegas y amigos de enseñanzas Sebastián Meier, Gustavo Curaqueo, Alex Seguel, Susana García, gracias por la orientación, apoyo y paciencia. A Paula Aguilera amiga fraternal gracias por los ricos cafecitos conversados. Al Dr. Pablo Cornejo, una luz en los momentos de desesperación, gracias por la paciencia, enseñanzas y por mostrarme un mundo nuevo de conocimientos. A todos quienes se me quedan en el tintero muchas gracias.

Agradecer en especial al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico a través de FONDECYT 1108013. Además a la Universidad de La Frontera a través del Programa de Apoyo a Profesores Patrocinantes de Alumnos de Pre y Postgrado” ex Convenio de Desempeño-Modalidad II.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1 Micorrizas arbusculares	3
2.1.1 Ecofisiología de la simbiosis micorrízica	3
2.1.2 Ciclo de vida de los hongos formadores de MA	4
2.1.3 Filogenia y diversidad	7
2.1.4 Efectos ecosistémicos de la simbiosis micorrícica	8
2.2 Contaminación de suelos por actividades mineras.	10
2.2.1 La minería del cobre en Chile.	11
2.2.2 Suelos contaminados con Cu en Chile.	11
2.2.3 Degradación sobre ecosistemas.	12
2.3 Alternativas de Remediación	13
2.3.1 Fitorremediación	13
2.3.2 Fitoextracción	13
2.3.3 Fitoacumulación	14
2.4 Metalofitas	14
2.4.1 Metalofitas endémicas de Chile	15

2.4.2	<i>Oenothera picensis</i>	15
2.5	Mecanismos de las plantas micorrizadas frente al estrés por metales pesados	16
2.5.1	Glomalina	18
2.6	Perspectivas futuras	18
3.	MATERIALES Y METODOS	20
3.1	Materiales	20
3.1.1	Suelo	20
3.1.2	Material vegetal	22
3.1.3	Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares	22
3.1.4	Condiciones de establecimiento, crecimiento y cosecha	23
3.2	Métodos	25
3.2.1	Diseño experimental	25
3.3	Determinaciones	26
	pH	26
	Colonización	26
	Densidad de Micelio	27
	Esporas	28
	Estabilidad estructural de los agregados	29
	Glomalina	30

	Biomasa radical	31
3.3.1	Análisis Estadístico	32
4.	PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION	33
4.1	Producción de Biomasa	33
4.2	pH	34
4.3	Colonización	35
4.4	Densidad de Micelio	36
4.5	Densidad de esporas	37
4.7	Estabilidad estructural de agregados al agua	38
4.8	Glomalina	39
5.	CONCLUSIONES	40
6.	RESUMEN	42
7.	SUMMARY	43
8.	LITERATURA CITADA	44

INDICE DE CUADROS

Nº		Página
1	Tratamientos de la especie vegetal en estudio	25

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de HMA y estructuras características de sus fases intra y extrarradicales (extraído de González–Guerrero, 2005).	6
2	Filogenia propuesta para los hongos formadores de micorrizas arbusculares basadas en la secuencia de la subunidad pequeña de (SSU) del ARNr (Schüßler <i>et al.</i> , 2001)	8
3	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).	12
4	Mecanismos de tolerancia al estrés por metales pesados desarrollados por la simbiosis MA. (Extraído de Cornejo <i>et al.</i> , 2008, adaptado de Göre & Paszkowski 2006).	17
5	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 <i>et al.</i> , 2008).	19
6	Ubicación geográfica del área de estudio (Tomada de González <i>et al.</i> , 2008).	20
7	Sector aledaño a la Fundición Ventanas, ubicada en el valle de Puchuncaví. a) Panorámica de la Fundición Ventanas, b) Suelo aledaño y c) Cárcava del sector aledaño.	21
8	Establecimiento del experimento. a) Bandejas almacigueras, b) <i>Oenothera picensis</i> y c) Columnas	24
9	Producción de materia seca (g) aérea y radical, tratados con GC= <i>Glomus claroideum</i> , GA= <i>Glomeromicetos</i> , a concentraciones de 0 y 300 mg kg ⁻¹	33

	de Cu	
10	pH del suelo, tratamientos Controles (sin inocular), GC= <i>Glomus claroideum</i> , GA= <i>Glomeromicetos</i> , a concentraciones de 0 y 300 mg kg ⁻¹ de Cu .	34
11	Colonización micorrícica en <i>Oenothera picensis</i> . Tratamientos GC= <i>Glomus claroideum</i> , GA= <i>Glomeromicetos</i> , a concentraciones de 0 y 300 mg kg ⁻¹ de Cu.	35
12	Densidad de micelio total en <i>Oenothera picensis</i> . Tratamientos GC= <i>Glomus claroideum</i> , GA= <i>Glomeromicetos</i> , a concentraciones de 0 y 300 mg kg ⁻¹ de Cu.	36
13	Densidad de esporas de HMA en rizosfera de <i>Oenothera picensis</i> . Tratamientos GC= <i>Glomus claroideum</i> , GA= <i>Glomeromicetos</i> , a concentraciones de 0 y 300 mg kg ⁻¹ de Cu.	37
14	Estabilidad de los agregados al agua. Tratamientos GC= <i>Glomus claroideum</i> , GA= <i>Glomeromicetos</i> , a concentraciones de 0 y 300 mg kg ⁻¹ de Cu.	38
15	Concentraciones de Glomalina Relacionada a la Proteína del Suelo (GRSP) de suelos tratados con GC= <i>Glomus claroideum</i> , GA= <i>Glomeromicetos</i> , a concentraciones de 0 y 300 mg kg ⁻¹ de Cu.	39

1. INTRODUCCION

Como consecuencia de diversas actividades industriales, se ha generado una grave dispersión de contaminantes en la atmósfera, el agua y el suelo. Este último se caracteriza por ser un medio estático, donde los contaminantes pueden permanecer por periodos prolongados de tiempo. Este tipo de permanencia es preocupante, debido a la presencia de compuestos inorgánicos, como lo son los metales pesados (MP), los cuales no son biodegradables. Estos MP se encuentran en altos niveles en suelos cercanos a minas y fundiciones de metales, donde es posible encontrar metales tales como cobre (Cu), cadmio (Cd), plomo (Pb) entre otros, los cuales debido a su alta presencia limitan el establecimiento de la mayoría de las plantas. No obstante lo anterior, existe un grupo de plantas denominadas metalofitas, las cuales son capaces de crecer en ecosistemas contaminados con metales. En adición, dentro del grupo de plantas metalofitas, se encuentra un subgrupo de plantas conocidas como hiperacumuladoras, las cuales han desarrollado diversos mecanismos fisiológicos para resistir/tolerar altos contenidos de MP, por lo que muchas de ellas son endémicas de suelos contaminados.

Debido a la propia inmovilidad de la planta, se ve obligada a buscar estrategias para sobrevivir a este tipo de suelo y es aquí donde se encuentran también algunos grupos de hongos, los cuales forman simbiosis mutualistas con la mayoría de las raíces de las plantas, los cuales se denominan hongos micorrícicos arbusculares (HMA).

En particular, la mayoría de metalofitas que toleran la presencia de MP como Cu son especies que impiden su entrada a la raíz y su transporte a los tejidos aéreos, lo que se conoce como exclusión. Pero ya sea que las plantas incluyan los MP o bien los excluyan, debe garantizar mecanismos de tolerancia interna para inmovilizar, compartimentalizar y así evitar los efectos tóxicos de los MP que llegan al interior de las células.

Por lo anterior, conocer la capacidad que poseen metalofitas micorrizables para crecer en suelos contaminados con MP, en particular Cu, resulta de gran importancia para incorporarlas como herramientas biotecnológicas en programas de biorremediación, en particular en países como el

nuestro, donde la actividad minera es de una enorme magnitud, así como su efecto en el ambiente.

Como hipótesis de este estudio se propone que la combinación entre la especie *Oenothera picensis*, la cual crece de forma natural en suelos contaminados con Cu en el valle de Puchuncaví, y ecotipos nativos de HMA de esos suelos serán altamente efectivos en el crecimiento y el potencial uso como herramienta en fitorremediación de esos suelos.

Por lo anterior, los objetivos propuestos para esta tesis fueron los siguientes.

- **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la utilización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) sobre el crecimiento de *Oenothera picensis* en suelos contaminados con Cobre (Cu).

- **Objetivos específicos**

- 1) Evaluar el efecto de niveles crecientes de Cu sobre el establecimiento y desarrollo de la simbiosis planta/HMA.
- 2) Evaluar el comportamiento de *O.picensis* y de diversos ecotipos de HMA en la fitorremediación de suelos afectados por altos niveles de cobre

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micorrizas arbusculares

Las micorrizas arbusculares (MA), son una asociación mutualista establecida entre determinados hongos del suelo, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), y las raíces de la mayoría de las plantas terrestres (Cornejo *et al.*, 2008). Este tipo de asociación es la más extendida en el mundo ya que alrededor de un 90% de las plantas terrestres son capaces de establecer algún tipo de micorriza. Por una parte el hongo ayuda a la planta a absorber nutrientes minerales y agua desde el suelo, mientras que la planta le cede al hongo compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis. (González-Guerrero, 2005). Además de favorecer la nutrición de las plantas, también contribuyen a la protección de las mismas frente a patógenos del suelo y otorgan una mayor tolerancia frente a estreses abióticos, como pueden ser estrés de tipo salino, hídrico, o debido a la presencia de metales pesados (Azcón, Aguilar *et al.*, 1991; Meier *et al.*, 2012). Entre otros aspectos importantes de esta asociación en ambientes degradados y contaminados, la red de hifas extrarradicales que se forman en el suelo y ciertas sustancias secretadas por el hongo durante la asociación favorecen la formación de agregados estables en el suelo, permitiendo una mejor conservación de la estructura física de este (Borie *et al.*, 2000).

2.1.1 Ecofisiología de la simbiosis micorrícica

El carácter mutualista de la simbiosis supone que ambos simbiosiontes, en la mayoría de las ocasiones, resultan beneficiados de esta asociación, lo que generalmente se traduce en una mejor nutrición de ambos. La primera evidencia experimental sobre la transferencia de compuestos carbonados de la planta al hongo fue proporcionada por Ho y Trappe en el año 1973, quienes usando carbono ¹⁴ demostraron que, tras unas semanas, se detectaba carbono marcado en el micelio del hongo. La planta le proporciona al hongo C orgánico derivado de la fotosíntesis, siendo el hongo capaz de absorber glucosa, que es rápidamente transformada a trehalosa y

glucógeno, y finalmente a lípidos de reserva (Bécard *et al.*, 1991). Existe una dualidad fisiológica entre las hifas intrarradicales y extrarradicales del HMA, presentando las primeras la capacidad de metabolizar glucosa e incapaces de utilizar otros compuestos carbonados. Por su parte las hifas del micelio extrarradical son incapaces de metabolizar glucosa y fructosa, pero por glucogénesis son capaces de metabolizar lípidos, derivados del micelio intrarradical y desde ahí transportados al micelio extrarradical (Bago *et al.*, 2002). Esta marcada compartimentación del metabolismo del hongo, asociada a la diferenciación que experimenta el micelio al establecer la simbiosis, podría estar en la base de la incapacidad del hongo para crecer independiente de la planta (González-Guerrero, 2005).

En relación a las MA, la nutrición mineral es uno de los aspectos más estudiados de la simbiosis, debido a la importancia que ésta tiene en el desarrollo vegetal. Los aspectos que favorecen la nutrición pueden ser diversos, como la presencia de las hifas que como consecuencia de su tamaño y distribución son capaces de explorar un mayor volumen de suelo que las propias raíces, por lo que aumentan la capacidad de absorción de nutrientes. También estas son capaces de competir más eficientemente que las raíces con otros microorganismos del suelo por los nutrientes (Linderman, 1992).

Este tipo de asociación micorrícica puede ser responsable del 100% de la incorporación de fósforo (P) en algunas especies vegetales. Esta absorción corresponde a un mecanismo altamente eficiente, en el que se incorpora rápidamente P a través de las hifas del micelio extrarradical. Esta incorporación se debe a la presencia de transportadores de alta afinidad, asociado a un simporte de protones que es creado por distintas H^+ -ATPasas (Ferrol *et al.*, 2002). Para evitar la acumulación de iones fosfato, que dificultarían el funcionamiento normal del hongo mediante un incremento de la presión osmótica, éstos se polimerizan formando cadenas de polifosfatos, las cuales se acumulan en las vacuolas. Luego éstos polifosfatos son transportados al micelio intrarradical vehiculizado en el interior de las vacuolas tubulares que se encuentran asociadas a los microtúbulos del citoesqueleto, que dirigen las corrientes citoplasmáticas (Olsson *et al.*, 2002; Uetake *et al.*, 2002). Una vez en el micelio intrarradical, el polifosfato es hidrolizado, liberándose

el P mediante la actividad de ciertas fosfatasa alcalinas presentes en la vacuola (Gianinazzi – Person & Gianinazzi, 1978).

Los HMA, también transfieren nitrógeno (N) a la planta en forma de amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-). En este caso, la fuente de nitrógeno en forma de amonio es preferida por los HMA, la absorción se lleva a cabo mediante transportadores específicos, luego es incorporado al glutamato para obtener glutamina en el ciclo de la glutamina sintasa/glutamato sintasa. La asimilación del N se ve facilitada por la acción de la enzima nitrato-reductasa. Según trabajos realizados por López Pedraza *et al.* (2006), se ha aislado el gen que codifica una nitrato reductasa en *Glomus intraradices*, que se expresa fundamentalmente en el arbúsculo. Este tipo de actividad permite la reducción del nitrato y su incorporación a la glutamina en forma de amonio.

2.1.2 Ciclo de vida de los hongos formadores de MA

Como se ha mencionado anteriormente, los HMA son simbioses obligados, ya que requieren de una planta susceptible de formar micorrizas, y así poder colonizar la raíz y completar su ciclo de vida. Los HMA producen esporas de origen asexual, y a través de la germinación de éstas comienza su ciclo de vida. Este es un proceso independiente de la presencia de la planta hospedadora, y que requiere de condiciones adecuadas de humedad y temperatura (González - Guerrero, 2005). El proceso se inicia a partir de una hifa de penetración, la cual es originada de una espora germinada. Estas hifas pueden ser de tipo intercelular e intracelular en la raíz, y desarrollan unas estructuras denominadas arbúsculos, los cuales son ramificaciones laterales repetitivas que tienen lugar en las células del córtex. Simultáneamente a la colonización de la raíz, el hongo desarrolla en el suelo una red de micelio, el cual constituye la fase extrarradical de la simbiosis, la cual es la principal responsable de la absorción de nutrientes minerales, absorbidos por la planta. Debido a la complejidad de la simbiosis se han desarrollado técnicas de cultivo, tales como el cultivo monoxénico, el cual permite el desarrollo de la misma en condiciones *in vitro*, permitiendo observar el desarrollo del micelio extrarradical. De esta manera se ha observado que el desarrollo del hongo se inicia primeramente a través de hifas

relativamente gruesas denominadas hifas exploradoras, estas hifas sufren periódicas ramificaciones (hifas secundarias, terciarias, cuaternarias, etc.) y son las responsables del avance del micelio y de la extensión de la colonia fúngica. A intervalos regulares, se forman estructuras muy ramificadas, que se asemejan a los arbúsculos, conocidas como BAS (del inglés Branched Absorbing Structures) (González-Guerrero, 2005), cuya hipotética función sería la absorción de nutrientes del suelo (Bago, 2000). Los BAS son estructuras transitorias y al cabo de unos días pierden su contenido citoplasmático a menos que desarrollen esporas. Con el desarrollo de estas nuevas esporas, se dará inicio a un nuevo ciclo.

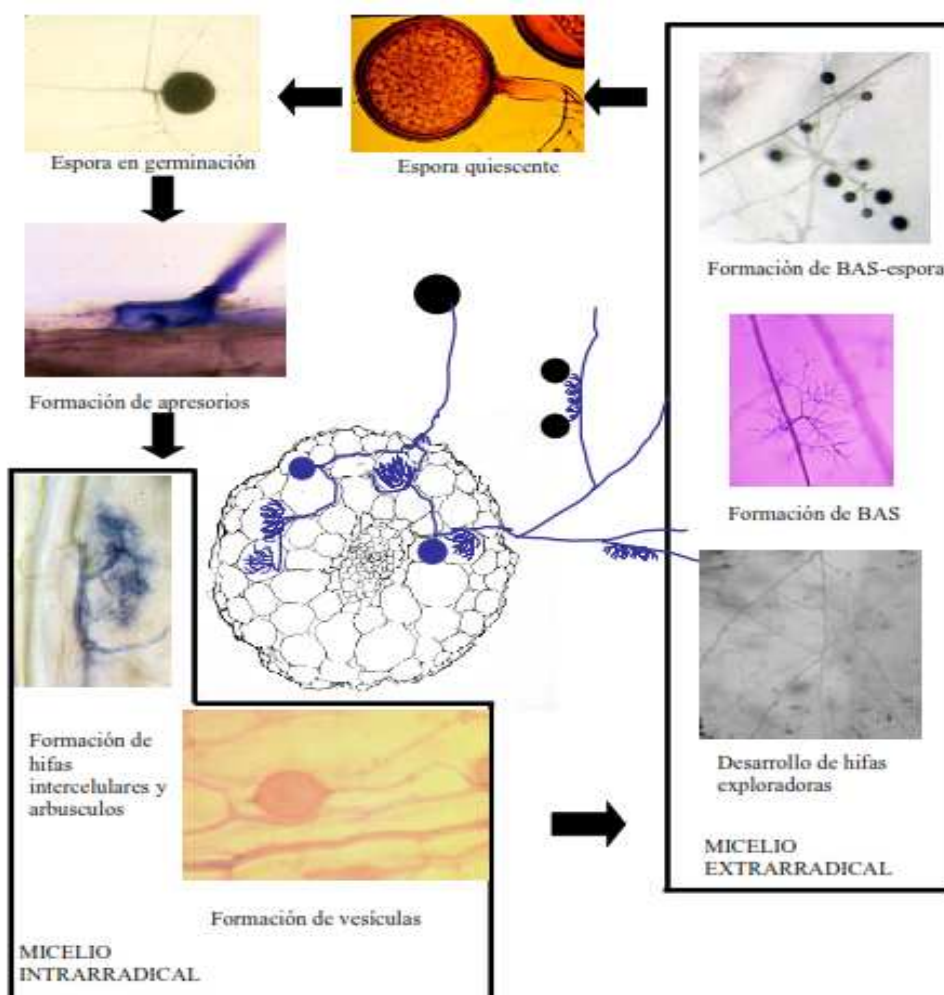


Figura 1. Ciclo de vida de HMA y estructuras características de sus fases intra y extrarradicales (extraído de González-Guerrero, 2005).

2.1.3 Filogenia y diversidad

Registros fósiles y los resultados de las dataciones moleculares sugieren que los HMA tuvieron origen hace 460 millones de años (Redecker *et al.*, 2000), cumpliendo un rol importante en la absorción de nutrientes de baja movilidad como el P y agua por parte de los antecesores de las plantas actuales. Lo anterior fue ratificado por la asociación entre HMA con plantas primitivas, como los briofitos (Schüßler, 2000).

Los intentos por clasificar a los HMA se remontan a fines del siglo XIX y principios del XX, cuando éstos hongos se incluían en la familia Endogonaceae, dentro del phylum Zygomycota, basándose principalmente en el parecido de esporas y esporocarpos a los de los zigomicetos (Gerdemann y Trappe, 1974). Actualmente, debido a la incorporación de estudios moleculares, especialmente el análisis de la subunidad 18s del gen ADNr se ha podido determinar su origen monofilético y se ha agrupado en un nuevo phylum, denominado Glomeromycota. Este phylum se encontraría más próximo de los ascomicetos y basidiomicetos, con los que compartiría un ancestro común. (Schüßler *et al.*, 2001). Este nuevo phylum se compone de una nueva clase, los Glomeromycetes, que a su vez comprende cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaesporales. Es de destacar que el género *Glomus*, que representa características morfológicas y estructurales bien definidas, muestra divergencias filogenéticas importantes, que han llevado a 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). La última modificación del phylum Glomeromycota, incluye a la familia Pacisporaceae, representada por el género *Pacispora* y realizada por Walker y Schüßler (2004).

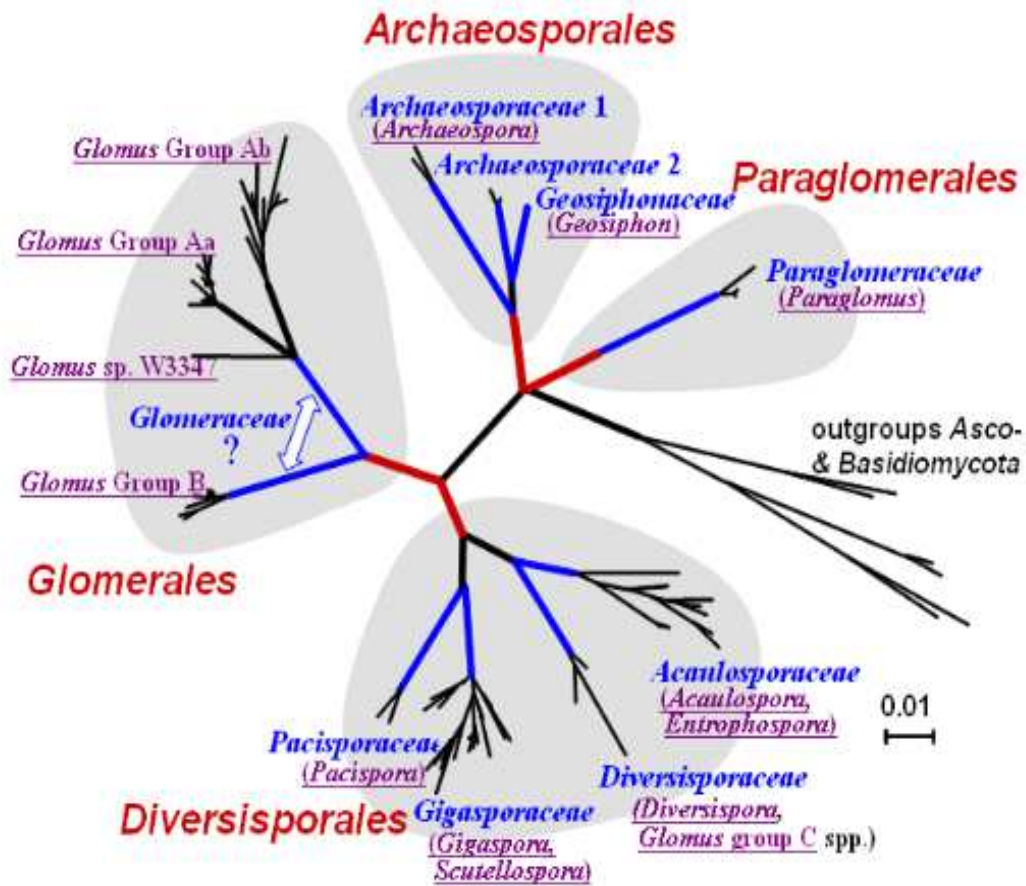


Figura 2. Filogenia propuesta para los hongos formadores de micorrizas arbusculares basadas en las secuencias de la subunidad pequeña de (SSU) del ARNr. (Schüßler *et al.*, 2001).

2.1.4 Efectos ecosistémicos de la simbiosis micorrícica

La base de la simbiosis MA, es principalmente nutricional; sin embargo, las ventajas ecosistémicas que ésta produce son numerosas. En la simbiosis participan diversos propágulos de HMA, ya sean esporas, micelio y trozos de raíz previamente colonizadas, emitiendo hifas, de forma intracelular o intercelular, funcionando como un sistema radical complementario, permitiendo aumentar la captación de nutrientes y agua desde el suelo y direccionándolo posteriormente hacia la planta (Cornejo *et al.*, 2008). Otras de las ventajas que se generan en esta

asociación, son la tolerancia de las plantas micorrizadas 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; Meier *et al.*, 2012), al estrés hídrico (Sanchez–Diaz y Hornubia 1994; Marulanda *et al.*, 2003), o a condiciones extremas de pH del suelo (Siqueira y Moreira 1997; Clark *et al.*, 1999; Cornejo *et al.*, 2008).

La extensa red de hifas generadas en el suelo, permite aumentar la capacidad de estabilizar físicamente los suelos, ya sea previniendo o revirtiendo procesos de degradación de los suelos contaminados o erosionados. Esto se debe a la capacidad de extensión en el suelo, entrelazando partículas y favoreciendo la formación de agregados estables (Borie *et al.*, 2008). Este rol estabilizador posee un componente de tipo químico de alta importancia, debido a la producción de proteínas por parte de las hifas del hongo, las que son liberadas al suelo y actúan como material cementante (Redel *et al.*, 2005; Curaqueo, 2011).

Diversos estudios han observado el efecto protector de las micorrizas sobre los tejidos de la parte aérea de la planta, habiéndose descrito protección frente a Al (Cumming & Ning, 2003), Cs (Berreck & Hansel wandter, 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 se debe principalmente 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. Esta acumulación del metal en el micelio interno del hongo, explicaría la 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). Se ha observado incluso que 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). Recientemente, Cornejo *et al.* (10.1016), descubrieron además que las esporas de HMA poseen la capacidad de acumular altos niveles de Cu en forma de sales, hasta llenar la totalidad de la espora.

Todos estos efectos permiten la mejora de la calidad del suelo, un mayor crecimiento de las plantas, un aumento en la diversidad y productividad de la cubierta vegetal y el establecimiento de otros grupos microbianos beneficiosos, como *Rhizobium*, bacterias promotoras del crecimiento vegetal y bacterias solubilizadoras de fosforo (Barea *et al.*, 2005).

La actividad minera cobra importancia, debido a la perturbación que se genera en los suelos, presentando elevadas concentraciones de metales, los cuales pueden sobrepasar los límites tolerables por muchas especies vegetales, en este sentido, cobran especial relevancia las micorrizas al representar el componente fundamental de la interface planta-suelo.

2.2 Contaminación de suelos por actividades mineras.

Uno de los problemas más extendidos a nivel mundial y que genera preocupación en la sociedad es la progresiva degradación de los recursos naturales (Cornejo *et al.*, 2008). Esta degradación se debe en gran medida a la pérdida del equilibrio natural de los ecosistemas, ocasionada por el uso deficiente de los recursos naturales por parte del hombre, así como al vertido de diversos contaminantes a la atmósfera, al agua, suelo y subsuelo (Jensen *et al.*, 2000, Lynch *et al.*, 2007). La industria minera es una de las actividades más contaminantes y más perjudiciales para el medio ambiente, la cual ha provocado grandes perturbaciones antrópicas en diversas partes del mundo, provocando alteraciones en el medio ambiente en forma directa e indirecta. Los suelos sufren el daño del constante vertido de todo tipo de residuos, dado que son capaces de retener y acumular los agentes contaminantes durante años, siendo los más habituales los metales pesados (MP) provenientes de la industria minera. La consecuencia directa de esta contaminación del suelo es una ausencia de vegetación o la pérdida de su productividad, la disminución de la biodiversidad e indirectamente la contaminación del aire, y aguas superficiales y subterráneas (Chen *et al.*, 2003). Cuando un suelo ha sido continuamente utilizado, se deteriora, se degrada, y deja de poseer y aportar sus cualidades iniciales. Un suelo está contaminado, cuando sus características físicas, químicas o biológicas originales han sido alteradas de manera negativa,

debido a la presencia de componentes de carácter peligroso o dañino para el ecosistema. Entonces, la productividad del suelo se pierde total o parcialmente.

2.2.1 La minería del cobre en Chile.

La minería es la principal actividad económica de Chile, en particular la minería del cobre (Cu), que representa el 40 % del total de las exportaciones nacionales. Los recursos mineros disponibles en el caso del Cu, 33.3 % de las reservas mundiales permiten ser el primer productor mundial (37,4% del total mundial en 2004) (Cornejo *et al.*, 2008). La actividad minera del cobre genera otros muchos productos, entre los que destacan molibdeno (27,6 %, 2° productor), plata (7 %, 7° productor) y oro (1,7 %, 12° productor) (datos CODELCO Chile; 2006). Por lo anterior, y dada la importancia que representa esta actividad en Chile, el impacto que genera en los ecosistemas naturales es igualmente de una magnitud considerable (Cornejo *et al.*, 2008).

2.2.2 Suelos contaminados con Cu en Chile.

La zona centro-norte de Chile es donde principalmente se desarrollan las actividades mineras, siendo las zonas cercanas a las fundiciones las más afectadas por descarga de MP. Ejemplos de esta situación se pueden encontrar en el sector de los Maitenes, comuna de Puchuncaví, Región de Valparaíso, y sectores de faldeos cordilleranos de la zona de Codegua cercana a la mina el teniente, donde las fundiciones de Cu generaron 11.000 a 30.000 hectáreas degradadas respectivamente. El año 1990 existían en Chile 800 acopios de residuos mineros abandonados entre la II y VII región (Ginocchio, 2004), aumentando consigo la disminución de la cobertura vegetal y la degradación progresiva del suelo.

2.2.3 Degradación sobre ecosistemas.

Es sabido que los MP generan pérdidas graves de la calidad del suelo, puesto que no son biodegradables (Reimann *et al.*, 2001), generando efectos tóxicos en macro y microorganismos los cuales se traducen en una importante disminución de la biodiversidad (Giller *et al.*, 1998, Sarabia *et al.*, 2003). Este es una de las mayores problemáticas que se deriva por efecto de la actividad minera y la descarga de MP, provocando consigo un fuerte impacto negativo en las comunidades bióticas y una pérdida en la funcionalidad de las especies, desencadenando un círculo de efectos negativos que pone en riesgo la sostenibilidad de los ecosistemas (Kennedy & Smith 1995). Esto tiene repercusión directa en la pérdida de calidad física y química del suelo, retroalimentando los efectos negativos y generando una espiral de degradación (Cornejo, 2006). En la Figura 3 se esquematiza el efecto primario que tendrían niveles tóxicos de MP en el suelo.

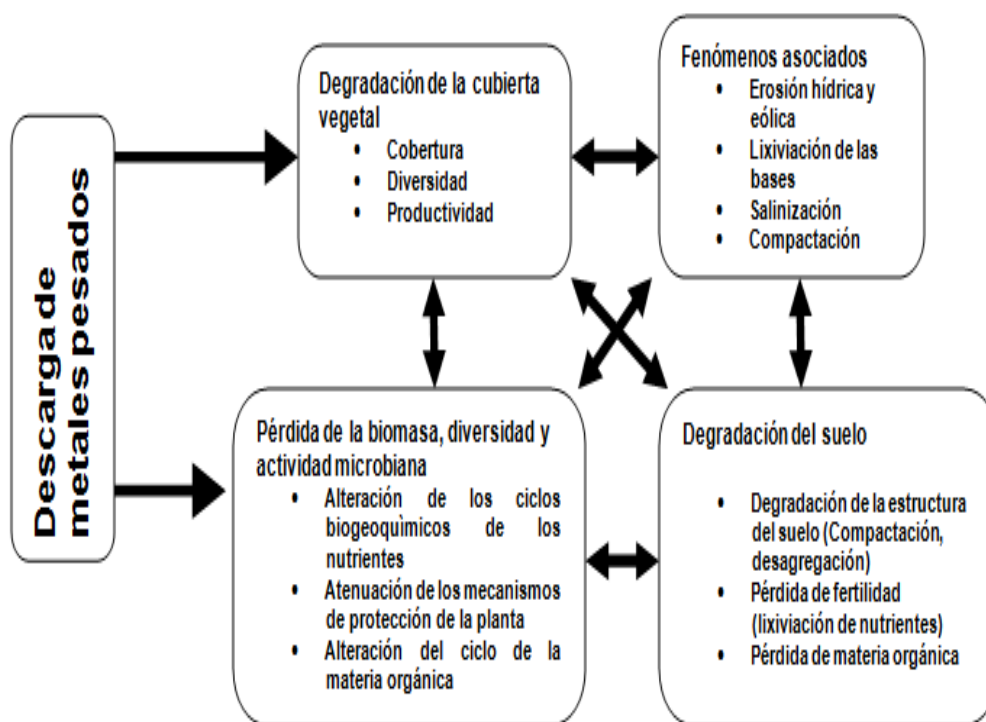


Figura 3. Interacciones involucradas en la degradación de los ecosistemas naturales ocasionadas por la descarga de metales pesados. (Cornejo *et al.*, 2008, modificado de Barea *et al.*, 1999).

2.3 Alternativas de Remediación

2.3.1 Fitorremediación

El aumento de elementos orgánicos y/o inorgánicos en los suelos, agua y aire constituye una preocupación mundial, debido a sus efectos negativos en el medio ambiente y en la salud humana. Debido a esta serie de problemáticas se han desarrollado técnicas de remediación, entre las cuales se encuentra la fitorremediación, la cual tiene por objetivo remover o dejar en formas inocuas contaminantes inorgánicos u orgánicos promoviendo la estabilización físico-química de los suelos, todo esto mediado a través del uso de especies vegetales. Existen numerosos estudios que demuestran la significativa contribución de los HMA en la remediación de suelos. Por ejemplo, se ha observado que la micorrización confiere a las plantas una mayor capacidad de establecimiento en suelos afectados por actividades mineras (Shetty *et al.*, 1994). Otros estudios han demostrado que plantas micorrizadas como *Avena sativa* y *Hordeum vulgare* extraen cantidades considerables de algunos MP como Pb y Zn. Esto demuestra su utilidad en procesos de fitoextracción y fitoestabilización (Cornejo *et al.*, 2008).

2.3.2 Fitoextracción

La fitoextracción utiliza plantas que acumulan cantidades altas de MP en su parte aérea, las cuales son utilizadas en suelos contaminados y posteriormente cosechadas e incineradas. Las cenizas resultantes representan el peso original de la biomasa seca (aproximadamente el 7%), estos tipos de desechos son tratados como residuos peligrosos o bien tratados en fundiciones para recuperar los metales presentes en ella (Ginocchio 2004). Se debe considerar que la capacidad de fitoextracción depende principalmente de la selección de la especie, su capacidad de extracción, su conformación genética y de las condiciones ambientales (Pollard *et al.*, 2002).

2.3.3 Fitoacumulación

Consiste en la utilización de plantas tolerantes a altos niveles de metales pesados para activar el funcionamiento de la biota y promover la inmovilización de este tipo de metales, la que puede ocurrir dentro de la raíz o en complejos con la materia orgánica del suelo o exudados de la planta u otros organismos (Cornejo *et al.*, 2008). En diversos estudios se ha observado el transporte de algunos MP como Zn, Cd y Cu a través de las hifas y raíces de plantas micorrizadas de *Trifolium repens* y *Zea mays*, sin que se produzca su posterior translocación a la parte aérea (Joner & Leyval 1997; 2001). El MP queda en el suelo, pero de formas menos disponibles para otros organismos, reduciendo su toxicidad (Cornejo *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2012).

2.4 Metalofitas

Gran parte de los metales presentes en el suelo, como el Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Zn y Ni, son micronutrientes esenciales para muchos organismos vivos, pero si se encuentran en concentraciones elevadas son tóxicos (Lambers *et al.*, 1998). En sitios cercanos a fundiciones mineras es común encontrar este tipo de metales en extensas áreas, limitando el crecimiento de plantas y el desarrollo de la fauna. A pesar de esto existe un grupo de plantas llamadas metalofitas, las cuales han desarrollado una serie de mecanismos fisiológicos que les permiten crecer en zonas contaminadas con metales. Se pueden encontrar metalofitas estrictas endémicas y otro tipo de plantas denominadas pseudometalófitas, es decir poblaciones tolerantes de especies comunes (Pollard *et al.*, 2002). Dentro del grupo de metalofitas existe un grupo aun más reducido denominado hiperacumuladoras, definidas como especies metalofitas capaces de concentrar metales en altas cantidades (en tejidos aéreos). En el caso del Cu, estas plantas pueden acumular más de 1.000 mg kg^{-1} del contaminante en su biomasa aérea en base a su materia seca (Baker & Brooks 1989; McGrath 1993; González *et al.*, 2008). Esta resistencia por parte de la planta le permite llevar a cabo su desarrollo en estos ambientes, debido a la restricción en la absorción y/o translocación hacia los tallos, permitiéndoles mantener concentraciones relativamente bajas en la biomasa aérea, independiente de la concentración del suelo (Baker,

1981). Entre las acumuladoras se han reconocido diferentes grados de acumulación de metales, desde pequeñas translocaciones sobre el nivel del suelo hasta concentraciones elevadas de metales pesados como el Ni, Zn, y Co en su biomasa aérea, sin mostrar sintomatología aparente de toxicidad, denominándose hiperacumuladoras (Brooks *et al.*, 1977).

2.4.1 Metalofitas endémicas de Chile

En nuestro país el estudio de estas especies es reciente. Dentro de éstos, algunos trabajos realizados por González *et al.* (2008), describen 22 especies metalofitas acumuladoras de Cu en la zona del valle de Puchuncaví, Región de Valparaíso, cercanas a la Fundición Ventanas. Este ecosistema ha recibido el depósito de material enriquecido con metales pesados por varias décadas, generando serios problemas de pérdida de cobertura y diversidad de la vegetación autóctona (Ginocchio, 2000; González *et al.*, 2008). Además de la presencia de una notable diversidad de metalofitas, también existe una significativa diversidad de HMA (Cornejo *et al.*, 2008). En este estudio se encontraron distintos ecotipos de HMA, asociados a plantas como *Oenothera picensis*, *Baccharis linearis* e *Imperata condensata*, pertenecientes principalmente a los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. *Acaulospora aff. lacunosa*, se encontró 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).

2.4.2 *Oenothera picensis*

Oenothera picensis Phil. se desarrolla frecuentemente en orillas de caminos como también en praderas degradadas; además, es resistente a la sequía y necesita escasa mantención (Matthei, 1995).

Esta especie no es considerada hiperacumuladora, pero en trabajos realizados por González *et al.* (2008), se identificó esta especie con concentraciones elevadas de Cu, sobre 614 mg Cu kg⁻¹. Esta especie es de interés debido a la asociación que presenta con ecotipos de HMA del género

Acaulospora, uno de los géneros más extendidos en el ecosistema de la zona de Puchuncaví (Cornejo *et al.*, 2008).

2.5 Mecanismos de las plantas micorrizadas frente al estrés por metales pesados

Debido a la biotrofia obligada de los HMA, los mecanismos por los cuales hacen frente a altos niveles de MP se expresan prácticamente en su totalidad en el estado simbiótico, formando la MA. Estos mecanismos son en su mayoría muy similares a los que representan las plantas (Figura 4). Estos son (1) inmovilización en el suelo por la secreción de sustancias quelantes (glomalina); (2) enlace de MP a los biopolímeros de la pared celular (quitina); (3) inmovilización sobre la superficie de la membrana plasmática una vez atravesada la pared celular; (4) transporte de membrana que ingresan MP desde el suelo al citosol; (5) quelación intracelular por metalotioneínas, ácidos orgánicos, aminoácidos; (6) exportación de MP desde el citosol mediante transportadores de membrana; y (7) confinamiento de MP en vacuolas (González-Chávez *et al.*, 2004, González-Guerrero 2005, Göhre & Paszkowski 2006; Cornejo *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2012). En adición, mecanismos que sólo presentaría el hongo para aliviar el estrés por MP 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 arbuscúlos que exportan MP hacia la matriz interfacial (zona de contacto íntimo entre la membrana plasmática del hongo y la célula radical), permitiría una mayor incorporación de MP por la planta.

Las bases biológicas de la simbiosis MA y los mecanismos que presentan ambos simbioses para hacer frente a la toxicidad por MP convierten a esta asociación en un componente clave en ecosistemas contaminados (Cornejo *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2012).

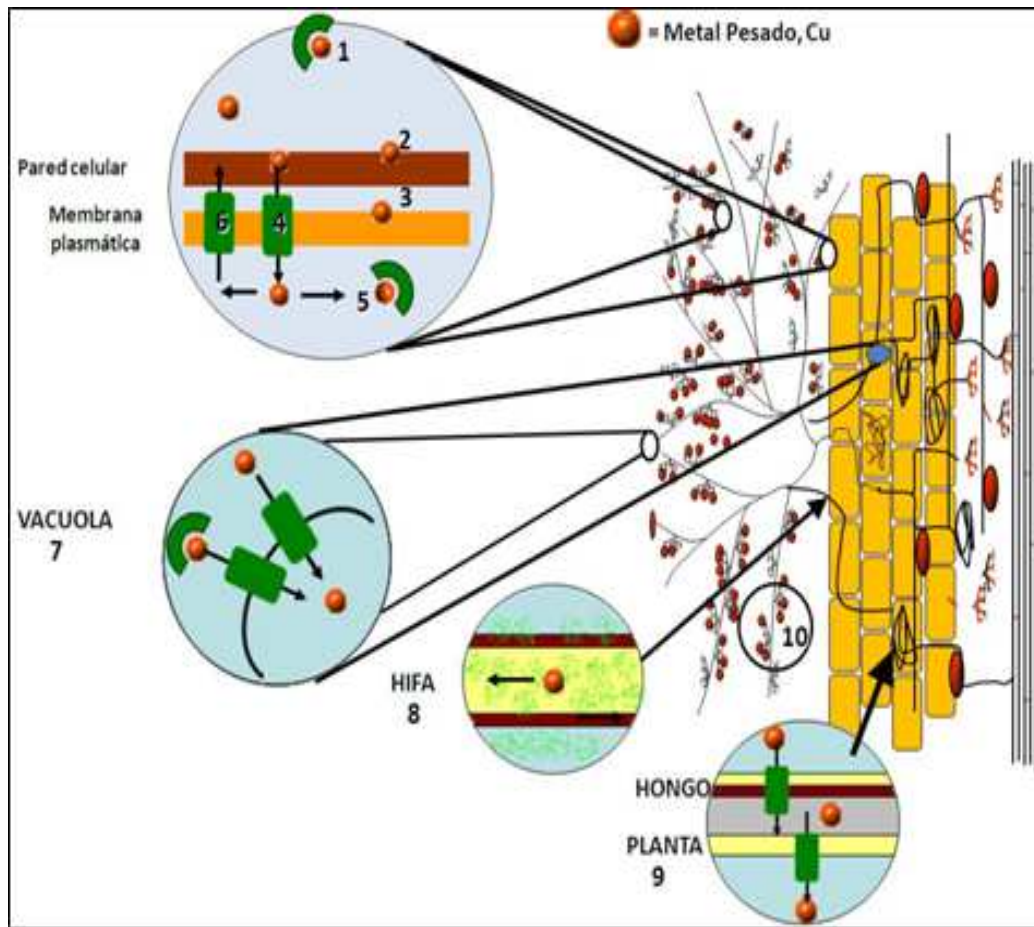


Figura 4. Mecanismos de tolerancia al estrés por metales pesados desarrollados por la simbiosis MA (Extraído de Cornejo *et al.*, 2008, adaptado de Göre & Paszkowski 2006).

2.5.1 Glomalina

La glomalina es una glicoproteína producida por los HMA y liberada en el suelo por transformaciones de las estructuras fúngicas, siendo acumulada en grandes cantidades (Wright, Upadhyaya, 1998). Esta glicoproteína une las partículas del suelo, estabilizando los agregados, ayudando así a evitar procesos degradativos como la erosión hídrica y/o eólica. Se ha encontrado con relativa abundancia ($2 - 15 \text{ mg g}^{-1}$ suelo) en un amplio rango de suelos, sean estos ácidos o calcáreos y bajo diversos cultivos, tales como praderas, cereales, especies forestales, etc... (Wright, Upadhyaya, 1998). Estudios realizados por Cornejo *et al.* (2008) y Vodnik *et al.* (2008), sugieren que existe una directa relación entre los niveles de MP en el suelo, en particular, Cu, Zn y Pb, y la cantidad de glomalina acumulada. Además esta proteína tiene la capacidad de incorporar y secuestrar en su estructura diversos metales a través de uniones estables con algunos de sus grupos funcionales, pudiendo llegar a representar cantidades importantes de la totalidad de MP presentes en el suelo (González – Chávez *et al.*, 2004; Cornejo *et al.*, 2008).

2.6 Perspectivas futuras.

Existen diversos estudios que sugieren alternativas para la remediación de las zonas afectadas por la actividad minera. Dentro de estas alternativas está la utilización de plantas asociadas a microorganismos del suelo en programas de fitorremediación. Los HMA son una destacable alternativa a este problema, ya que están presentes en la mayoría de los ecosistemas terrestres y su efecto beneficioso sobre el establecimiento y crecimiento de las plantas los convierten en una de las mejores alternativas para la aplicación en programas de fitorremediación, llamada en este caso “micorriorremediación” (Kahn, 2002)

El esquema presentado en la Figura 5 representa un protocolo de actuación a implementar, que permitiría la obtención de aislados de HMA de aquellos ecotipos mas aptos para el proceso de micorriorremediación (Cornejo *et al.*, 2008). La identificación del HMA es clave, en particular su caracterización genética, ya que permitiría la posterior detección de diferentes ecotipos

colonizando las raíces, a diferencia de la caracterización morfológica que solo permitiría la identificación de esporas del HMA en el suelo, pero no en la raíz (Cornejo *et al.*, 2004).

Estudios realizados bajo condiciones controladas sugieren que la interacción entre HMA nativos de la zona central de Chile y *Oenothera picensis* favorecen la absorción y acumulación de Cu y Zn en la raíz de esta planta, favoreciendo la fitoestabilización de estos metales (Meier *et al.*, 2008). 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 de HMA como metalofitas, cuya reintroducción favorezca en mayor medida la recuperación del ecosistema (Herrera *et al.*, 1993; Requena *et al.*, 1997; Cornejo, 2006; Meier *et al.*, 2012).

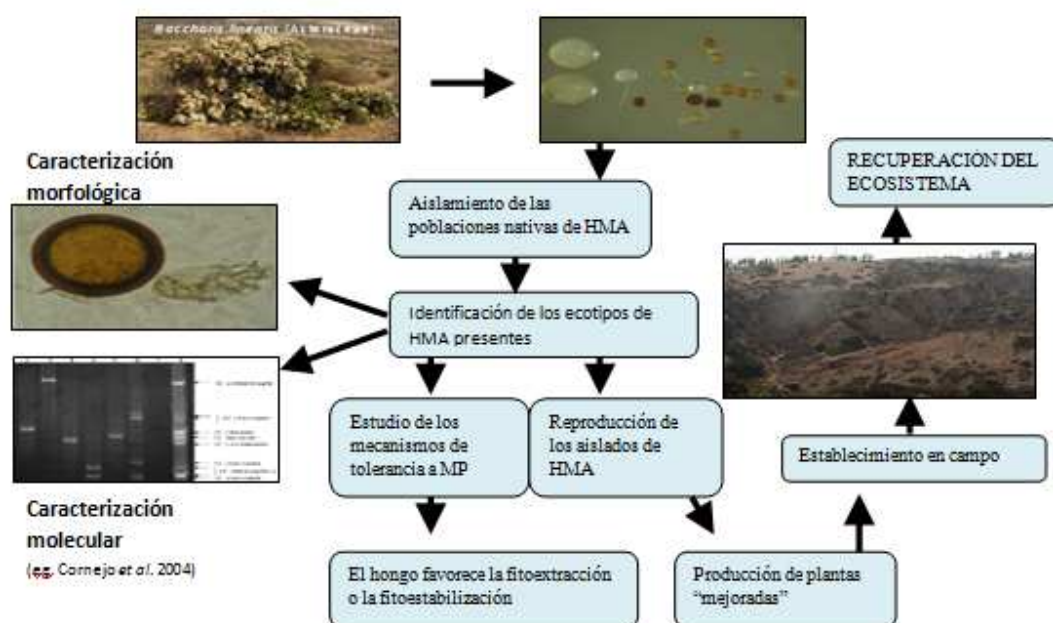


Figura 5. Estrategia propuesta para el estudio de la diversidad de HMA y actuación en zonas afectadas por actividades mineras para la recuperación de cubierta vegetal (Tomado de Cornejo *et al.*, 2008).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Suelo

El suelo fue obtenido desde un ambiente mediterráneo, aledaño a la Fundición Ventanas (CODELCO), ubicada en el valle de Puchuncaví ($32^{\circ} 46' 30''$ S $71^{\circ} 28' 17''$ O), Región de Valparaíso, Chile (Figura 6). Desde esta zona se tomó también el material vegetal, los cuales fueron utilizados para el posterior desarrollo del experimento. Este se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales de la Universidad de La Frontera, Región de la Araucanía.

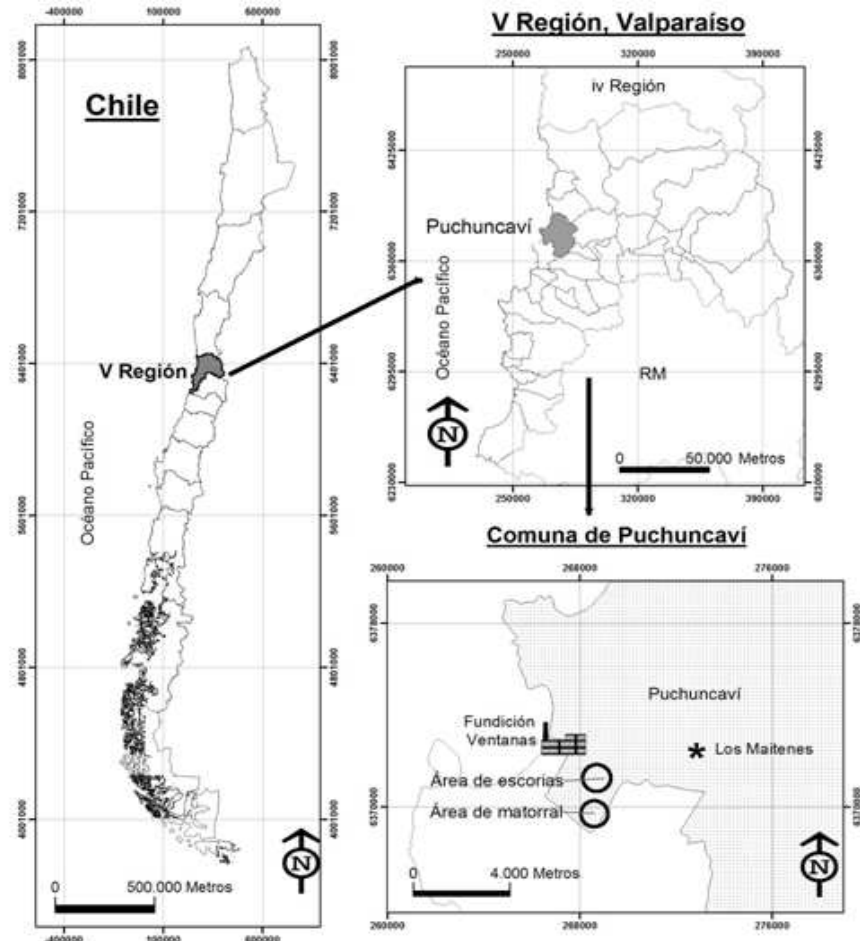


Figura 6. Ubicación geográfica del área de estudio (Tomada de González *et al.*, 2008).

La zona desde donde se obtuvo el suelo se caracteriza por la alta contaminación con Cu, debido a la descarga continua por emisiones gaseosas y el depósito de partículas enriquecidas en metales de la fundición desde el año 1964 (Cornejo *et al.*, 2008a). El suelo corresponde a la serie Chilicauquén, de textura fina, arenosa, moderadamente profundo, formado sobre substratos de arenisca cementada con arcilla de los horizontes superiores.



Figura 7. Sector alledaño a la Fundición Ventanas, ubicada en el valle de Puchuncaví. a) Panorámica de la Fundición Ventanas, b) Suelo alledaño y c) Cárcava en el sector alledaño.

3.1.2 Material vegetal

El material vegetal recolectado correspondió a semillas de *Oenothera picensis* Phil., especie perteneciente a la familia Onagraceae, bianual de tallos largos y erectos de 40 – 100 cm de longitud, cubierta con pelos densos a esparcidos, hojas basales en roseta de 10 a 25 cm de largo, lanceolados e irregularmente dentados. Con un tubo floral de 1,5 a 3 cm de largo. Originaria de Chile y algunas zonas de Argentina. Es frecuente encontrarla a orillas de caminos, huertos frutales y praderas degradadas (Matthei, 1995).

3.1.3 Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares

Se utilizaron dos tipos de HMA. El primero correspondió a un mix de HMA denominados Glomeromicetos autóctonos (GA), provenientes del suelo recolectado cercano a la Fundición Ventanas. A este suelo se le adicionó un inóculo de esporas de este mismo suelo (GA), el cual se realizó por el método de tamizado húmedo y decantado de Gerdemann y Nicholson, (1963). El segundo grupo de HMA utilizados, correspondió a un cultivo puro de inóculos del hongo *Glomus claroideum* (GC), provenientes de pots trampa realizados con suelos agrícolas de la Región de la Araucanía, con trébol y *Oenothera picensis*, como especies hospedadoras. Se realizó una extracción de esporas por el mismo método antes mencionado y se procedió a inocular como se describe en el siguiente punto

3.1.4 Condiciones de establecimiento, crecimiento y cosecha

Se utilizaron almacigueras plásticas para la obtención de plántulas (Figura 8). Se realizaron tres tratamientos distintos: (GC), (GA) y un control, sin inocular. Se utilizó arena como sustrato, previamente esterilizada a 121°C usando autoclave. Se utilizó como material vegetal semillas de *Oenothera picencis*, las cuales fueron esterilizadas en hipoclorito de sodio (NaCl 5%) durante cinco minutos, las cuales luego fueron lavadas usando agua estéril. Las semillas fueron sembradas en el sustrato y se obtuvieron plántulas después de tres meses, (se realizaron 3 repeticiones).

Posteriormente se utilizaron columnas para llevar a cabo el experimento, las que estaban separadas con malla de nylon de 63 micras. Se utilizó en ellos suelo proveniente de las cercanías de la Fundición Ventanas, el cual se obtuvo a tres profundidades: 0–10, 10–30 y 30–50 cm de profundidad. Sólo el suelo que contenía a los controles fue previamente esterilizado. El suelo de los tratamientos GA y GC fueron previamente inóculados y tratados con distintas concentraciones de cloruro de cobre ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), las que correspondieron a 0 Cu y 300 mg kg^{-1} de Cu. El ensayo se estableció bajo condiciones controladas en invernadero, con temperaturas que oscilaron entre los $22 \pm 3^\circ\text{C}$ durante el día y $15 \pm 3^\circ\text{C}$ durante la noche, con aire acondicionado sin control de Humedad Relativa.

El estudio tuvo una duración de 6 meses desde el establecimiento de las semillas hasta la cosecha de las plantas. Para la cosecha del material vegetal y biológico, se procedió a separar la parte aérea de la raíz en bolsas de papel para el posterior análisis en laboratorio. El material biológico (suelo) se recuperó de cada una de las profundidades y se almacenó en bolsas plásticas, con su respectiva identificación y se analizó posteriormente en laboratorio.

a)



b)



c)



Figura 8. Establecimiento del experimento. a) Bandejas almacigueras, b) *Oenothera picensis* y c) Columnas

3.2 Métodos

3.2.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con 3 repeticiones por cada tratamiento formado. En este estudio, se utilizó un diseño bifactorial, que incluyó micorrización (con o sin micorrizas, siendo utilizados dos tipos de HMA) y 2 niveles de concentración de cobre. El estudio se realizó con la especie metalofita *Oenothera picensis* como planta hospedadora y hongos MA nativos del Valle de Puchuncaví, obtenidos de suelos contaminados, y de hongos MA obtenidos de un pote trampa. Se realizó en sistemas de columnas para analizar el comportamiento de la simbiosis frente a concentraciones crecientes de Cu. Cada tratamiento (Cuadro 1) tuvo 3 repeticiones, dando un total de 18 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 de la especie vegetal en estudio

Tratamientos	Descripción
1	Suelo estéril (Testigo) S.N.C con adición de Cu (0)
2	Suelo estéril (Testigo) S.N.C con adición de Cu (300)
3	Suelo contaminado (S.C) con adición de Cu (0) + <i>Glomus claroideum</i> (GC)
4	Suelo contaminado (S. C) con adición de Cu (300) + <i>Glomus claroideum</i> (GC)
5	Suelo contaminado (S.C) con adición de Cu (0) + <i>Glomeromicetos</i> (GA)
6	Suelo contaminado (S.C) con adición de Cu (300) + <i>Glomeromicetos</i> (GA)

Abreviaciones: S.NC.= suelo no contaminado, S.C.= suelo contaminado, GC= *Glomus claroideum*, GA=*Glomeromicetos*, 0= mg kg^{-1} de Cu, 300= mg kg^{-1} de Cu.

3.3 Determinaciones

a) pH

Se determinó el pH del suelo, con un pH – metro, en una mezcla de suelo/H₂O en proporción 2/5 p/p. Para esto el pH – metro fue calibrado previamente y se procedió a pesar 4 gr de suelo, los cuales se mezclaron con 10 mL de agua destilada en cada muestra.

b) Colonización

Se midió el porcentaje de colonización radical, a través de una placa cuadrículada, contando el número de intersecciones horizontales de acuerdo al método del intercepto de líneas descrito por Giovannetti & Mosse, 1980, y McGonigle *et al.*, 1990. La observación se llevo a cabo en una lupa estereoscópica a 40 aumentos.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se cortaron las raíces en segmentos de aproximadamente 1 cm y se sumergieron en una solución de KOH al 10% p/v, en la que se mantuvieron durante tres días.
2. Se elimino la solución de KOH y las raíces se lavaron con abundante agua.
3. Luego se sumergieron en una solución de HCl al 1% p/v, donde permanecieron por un día.
4. Posteriormente se eliminó la solución de HCl y se añadió solución de azul tripán al 0,05% p/v en acido láctico, donde se mantuvieron un día.
5. Finalmente se elimino la solución de azul tripán, se lavaron con agua y se conservaron en acido láctico hasta su observación (Procedimiento descrito por Phillips y Hayman, 1970)
6. Para la cuantificación de la colonización, las raíces teñidas se extendieron sobre placas de metacrilato cuadrículada, contándose con ayuda de la lupa estereoscópica, y la proporción de la raíz micorrizada se obtuvo a través de la siguiente formula.

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

c) Densidad de Micelio

Las hifas extrarradicales totales se determinaron por la metodología descrita 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).

El procedimiento fue el siguiente:

- Se peso 1 gr de suelo y se le agregaron 4 ml de azul de tripan.
- Se llevó a agitador por 30 minutos a 260 rpm.
- Luego se le agregó 16 mL de agua destilada y se llevo a baño maría por 10 minutos.
- Se recogió 1 mL de la muestra en un filtro de membrana cuadriculado de 0,45µm de tamaño de poro.

La cuantificación de micelio se realizó midiendo la longitud total de la retícula y el área total analizada, y se obtuvo la longitud de micelio presente en la superficie analizada del filtro, usando la siguiente ecuación:

$$R = \left[\pi \frac{AN}{2H} \times Fd \times Fps \right]$$

donde R es la longitud de hifas en el área de medición, A es el área de medición en el filtro, N es el número de intersecciones, H es la longitud total de la retícula utilizada, Fd es el factor de dilución del suelo (20 mL de agua) y Fps es el factor de humedad del suelo.

d) Esporas

La extracción de las esporas se llevó a cabo por el método de tamizado húmedo y decantado (Gerdemann y Nicholson, 1963), con algunas modificaciones por el tipo de suelo.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Se pesaron 20 gramos de suelo fresco y cuidadosamente fueron pasando con ayuda de agua a través de un conjunto de tamices serie Tayler de 425 μm , 250 μm , 100 μm y 53 μm de luz, separando piedras y restos de raíces.
- Se procedió a arrastrar el contenido de los tamices 100 y 53 μm de luz, con ayuda de una piseta a tubos de centrifuga de 50 mL.
- Se añadió agua hasta 20 mL y se llevo a centrifuga a 2500 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó.
- Posteriormente, se completó hasta 40 mL con solución de sacarosa al 70% p/v y se centrifugó a 2500rpm, durante 10 minutos.
- Se extrajo el sobrenadante, vertiéndolo en el tamiz de 53 μm de luz, se lavó con agua destilada con una piseta y se recolectó en una placa Doncaster para su observación bajo microscopio estereoscópico, a 40 - 45 aumentos.
- Finalmente se observó de acuerdo a características morfológicas de cada especie, las distintas esporas y se realizó la cuantificación.

e) Estabilidad estructural de los agregados

Corresponde al resultado de la fuerzas de cohesión entre las partículas de suelo para resistir la aplicación de fuerzas distrutivas. Para la determinación se utilizó la metodología descrita por Kemper y Roseau (1968).

Procedimiento:

- Se tamizo una proporción del suelo seco al aire en tamices serie Tyler de 2 y 1 mm.
- Se pesaron 4 gr de la fracción recogida sobre el tamiz de 1mm de luz, que fue depositada sobre un cribador de 0,25 mm, el cual se introdujo en un baño de arena lavada hasta que las partículas de suelo se humectaron a saturación.
- El cribador con la muestra húmeda se colocó en el equipo de tamizado sobre recipientes de acero inoxidable que contenían 25 mL de agua destilada.
- El equipo se hizo funcionar por 3 min (35 ciclos min^{-1}) para completar 105 inmersiones del cribador en el recipiente de acero con agua.
- Los recipientes de acero se secaron y pesaron. El suelo que queda en el depósito es el material no estable a la disgregación por efecto del agua.
- Los recipientes de acero se cambiaron por otros nuevos que contenían 25 mL de una solución dispersante (2 gr hexametáfosfato de sodio L^{-1}) y se hizo funcionar nuevamente el equipo, hasta que sólo quedaron partículas de arena sobre el cribador. Cuando el tiempo fue superior a 20 min, se procedió a la disgregación mecánica de los agregados con una varilla. Posteriormente, los recipientes se secaron y pesaron. El suelo que queda en los mismos corresponde en este caso a los agregados estables al agua.

La proporción de agregados estables al agua se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{AEA (\%)} = \frac{(\text{DH} - \text{d2} - 0.05)}{(\text{DA} - \text{d1}) + (\text{DH} - \text{d2} - 0.05)}$$

Donde AEA (%) es el porcentaje de suelo agregado estable al agua; DH el peso en gramos del recipiente de acero más el suelo y dispersante del segundo tamizado húmedo; d2 es el peso en gramos del recipiente usado para el segundo tamizado; 0.05 es la cantidad en gramos de hexametáfosfato de sodio presente en 25 mL de dispersante; DA es el peso en gramos del recipiente más el suelo del primer tamizado húmedo; y d1 es el peso en gramos del recipiente usado en el primer tamizado.

f) Glomalina

Se realizó el análisis de glomalina total y posteriormente se evaluó a través del método Bradford.

El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- Se pesó 1 gr de suelo tamizado en tamices de la serie Tyler de 2 y 1mm de luz. Se colocó el suelo en tubos de centrifuga de plástico resistente de 50 ml
- Se añadió 8 ml de citrato de sodio pH 8,0.
- Se agitó con cuidado y se llevó a autoclave por 60 minutos a 121°C y 1 atm.
- La muestra se retiró del autoclave, se dejó enfriar y se centrifugó a 3000 rpm, durante 15 minutos.
- Se transfirió el líquido cuidadosamente mediante un embudo a un matraz aforado de 50 ml.
- Al residuo contenido en el tubo, nuevamente se le agregó 8 mL de citrato de sodio pH 8,0 y se realizó dos veces este procedimiento.
- Luego se mezclaron las tres repeticiones y se aforaron a 50 mL con citrato de sodio pH 8,0.
- Del extracto de 50 mL, se tomó una alícuota la que se transfirió a tubos eppendorf de 1,5 mL y se centrifugo a 10000 rpm durante 15 minutos.

- En tubos de 1 mL se preparan las muestras midiendo 50 µL de solución PBS pH 7,4, se añadieron 50 µL de glomalina y 200 µL de reactivo Bradford, se agito suavemente en un vórtex y se leyó en un espectofotómetro a 595 nm.

g) Biomasa radical

Se realizaron análisis de peso fresco y seco de la parte aérea y de la parte radical de las plantas de *Oenothera picensis*.

La metodología usada fue la siguiente:

- Se registraron los pesos de cada una de las plantas, tanto de sus partes aéreas como radicales en una balanza analítica. Éstas fueron posteriormente puestas en bolsas de papel.
- Las bolsas fueron llevadas a estufa a 65°C por 48 horas.
- Se retiraron, enfriaron y fueron nuevamente registrados los pesos de cada una de las muestras, con lo que se calculó el porcentaje de humedad con la siguiente formula.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso húmedo de la muestra} - \text{Peso seco de la muestra} \times 100}{\text{Peso húmedo de la muestra}}$$

3.3.1 Análisis Estadístico

El tipo de HMA utilizado, el efecto de la adición de Cu, y la interacción de estos dos factores, fueron analizados por Anova bifactorial utilizando el programa JMP 8.0. Cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), las medias fueron comparadas mediante test de rango múltiple de Tukey.

4. PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Producción de Biomasa

En la Figura 9 se muestra la producción de biomasa para los tratamientos GA; GC a concentraciones crecientes de Cu 0 y 300 mg kg⁻¹. Se observó en el tratamientos GC 0 y GA 0 que el porcentaje de materia seca fue de alrededor de 0,51 gr en promedio, se pudo ver a lo largo del experimento que el crecimiento aéreo fue menor en los tratamientos con 300 mg kg⁻¹ Cu, como se verifica en la figura. La asociación planta – GA fue más favorable para el desarrollo de biomasa en *O. picensis*. Se hace notable la importancia de HMA para programas de biorremediación, donde la importancia de este tipo de asociación es fundamental. Autores como Davies *et al.*, (2001), quienes sometieron a *H. annuus* a niveles crecientes de Cr en suelo, observaron que la diferencia de producción de biomasa total entre plantas micorrizadas y no micorrizadas se acentuaba más en los niveles altos de contaminación, sugiriendo que los HM son condicionantes en situaciones de stress.

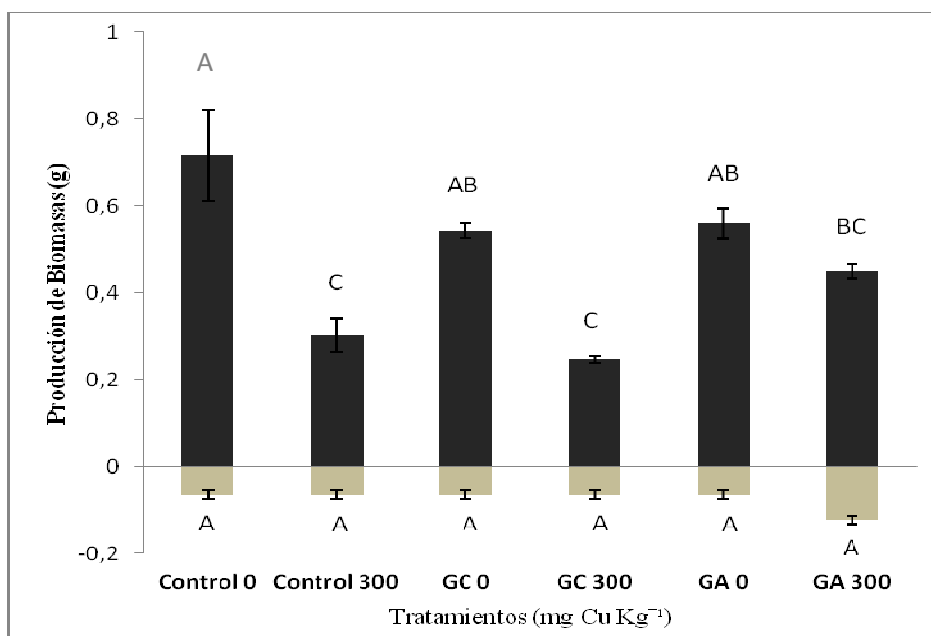


Figura 9. Producción de materia seca (g) aérea y radical, tratados con GC= *Glomus claroideum*, GA= *Glomeromicetos*, a concentraciones de 0 y 300 mg kg⁻¹ de Cu.

4.2 pH

En la Figura 10 se presentan los resultados obtenidos para pH del suelo para cada tratamiento del estudio: controles sin inocular, GC, y GA a las distintas dosis de Cu: (0) y (300) ppm.

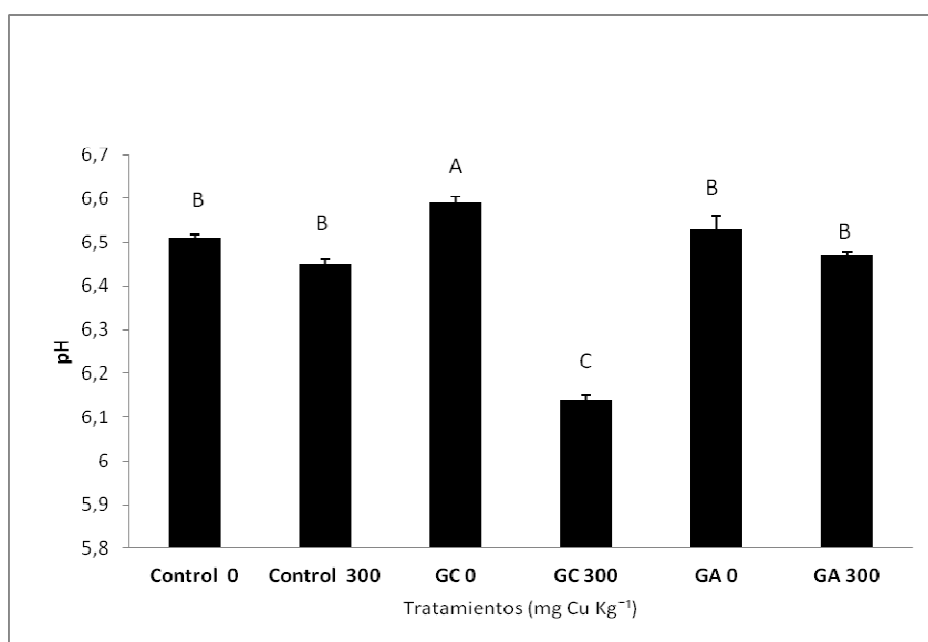


Figura 10. pH del suelo, tratamientos Controles (sin inocular), GC= *Glomus claroideum*, GA= *Glomeromicetos*, a concentraciones de 0 y 300 mg kg⁻¹ de Cu .

Los tratamientos mostraron valores de pH, en general, cercanos a 6,6. No obstante, los tratamientos con aplicación de Cu (300), presentaron valores más bajos, siendo el tratamiento con el menor valor el correspondiente a CG 300. Esto podría estar indicando que a mayor contenido de Cu los valores de pH del suelo son menores, probablemente debido a un desplazamiento de protones desde los sitios de intercambio en el suelo.

4.3 Colonización

En la Figura 11 se presenta la colonización micorrícica para los tratamientos inoculados con GC y GA, a niveles crecientes de contaminación por Cu. En general, los valores de colonización fueron similares, encontrándose en el tratamiento GA sin Cu un 68%. Los valores de colonización para todos los tratamientos se mantuvieron sobre el 60%, observando que la colonización radical de hongos micorrícicos en condiciones de altos niveles de metales en el suelo es muy variable. Resultados obtenidos por Díaz *et al.* (1996), concluyeron que la colonización por HMA se ve reducida por niveles altos de metales en el suelo. Una tendencia similar también se muestra en este estudio, donde en el control GA es mayor el porcentaje de colonización que con la adición de Cu. No obstante, los resultados de colonización micorrícica son altamente variables dependiendo de la especie y el tipo de contaminante. Así por ejemplo, Leung *et al.* (2006), observaron un aumento de la colonización radical en *Pteris vittata* al aumentar la dosis de As (26.4 %; 30.3 %; 40.6 % de colonización a 0, 50 y 100 mg kg⁻¹ de As). En nuestro caso, aunque no significativo, en el tratamiento GC se observó un aumento del porcentaje de colonización de un 8% en 300 con respecto al suelo 0, sin adición de Cu.

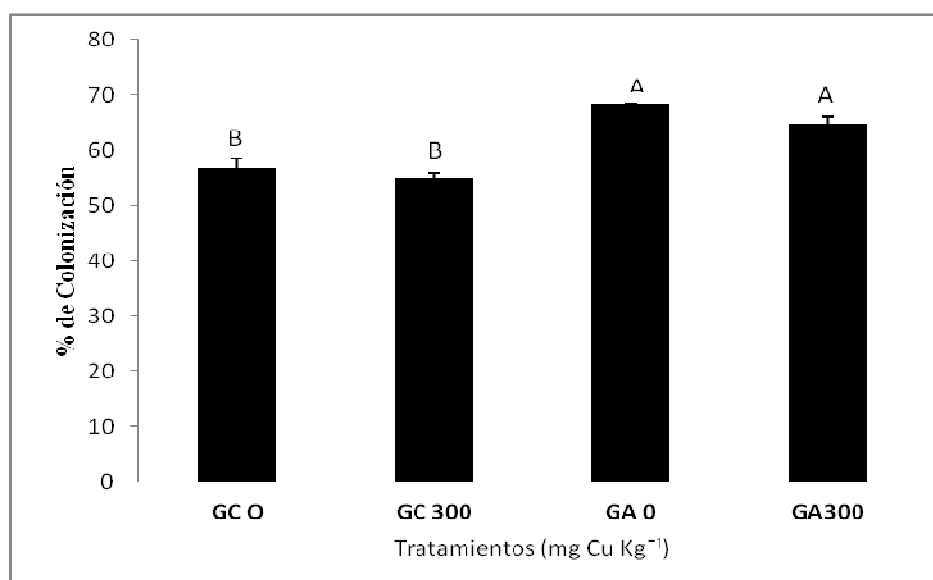


Figura 11. Colonización micorrícica en *Oenothera picensis*. Tratamientos GC= *Glomus claroideum*, GA= *Glomeromicetos*, a concentraciones de 0 y 300 mg kg⁻¹ de Cu.

4.4 Densidad de Micelio

En la Figura 12 se muestra la densidad de micelio micorrícico total en suelo para los distintos tratamientos analizados. Se cuantificó una mayor longitud de micelio total $2,5 \text{ m g}^{-1}$ en ambos tratamientos de GA. Además se observó un leve aumento de micelio total en la adición de $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Cu}$. Por otra parte, GC se vio afectado con la adición de Cu, disminuyendo las densidades de este propágulo. Trabajos realizados por Cornejo y colaboradores muestran resultados similares a los obtenidos, donde se observó un aumento en la longitud de micelio a mayor acumulación de MP, incluso con niveles altamente tóxicos como 831 ppm de Cu total y 326 ppm de Cu disponible en suelos con pH de suelo de 4,19, para *O. picensis*.

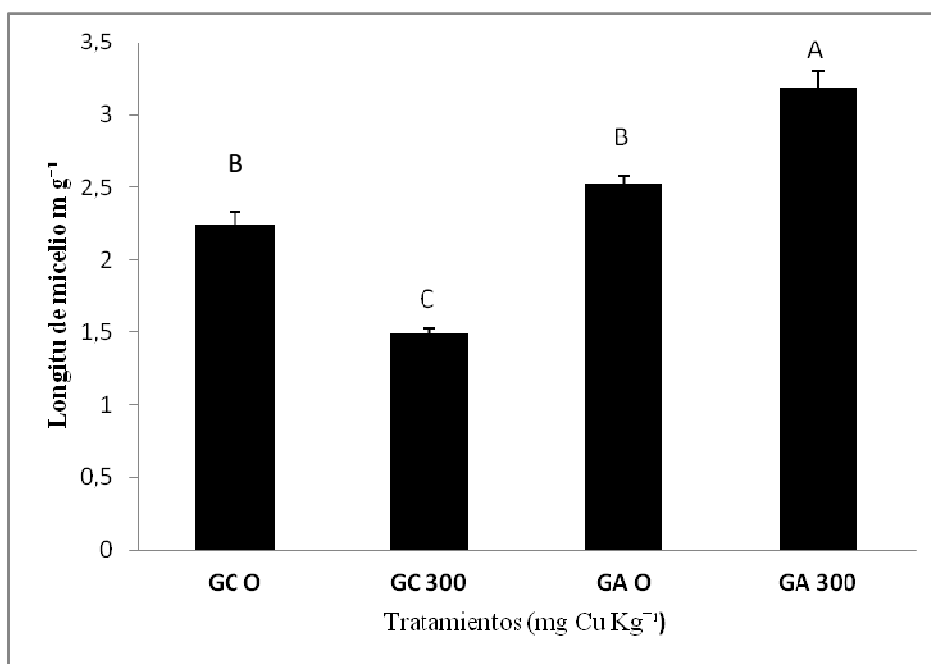


Figura 12. Densidad de micelio total en *Oenothera picensis*. Tratamientos GC= *Glomus claroideum*, GA= *Glomeromicetos*, a concentraciones de 0 y 300 mg kg^{-1} de Cu.

4.5 Densidad de esporas

En la Figura 13 se presenta el número de esporas por cada 20 gramos de suelo en los respectivos tratamientos. Se observaron claras diferencias entre los tratamientos GC y GA, donde se observó, al igual que en la densidad de micelio, la existencia de una fuerte relación entre el aumento del número de esporas en asociación con el hongo nativo, y una disminución en GC a medida que aumenta la concentración de Cu. Se alcanzaron valores promedio de 339 esporas en ambos tratamientos de asociación con GA. Resultados similares se observaron en el estudio realizado por Díaz, Honrubia (1993) y Turnau *et al* (1996), reportados por Cornejo *et al* (2008), donde se muestra un aumento en poblaciones naturales de HMA que generan colonizaciones micorrízicas efectivas o incluso incrementadas por altas concentraciones de Cd, Zn y Pb. Hecho que reviste un gran interés biotecnológico si se consideran las ventajas de la simbiosis micorrízica puede aportar a la biorremediación de suelos contaminados por MP.

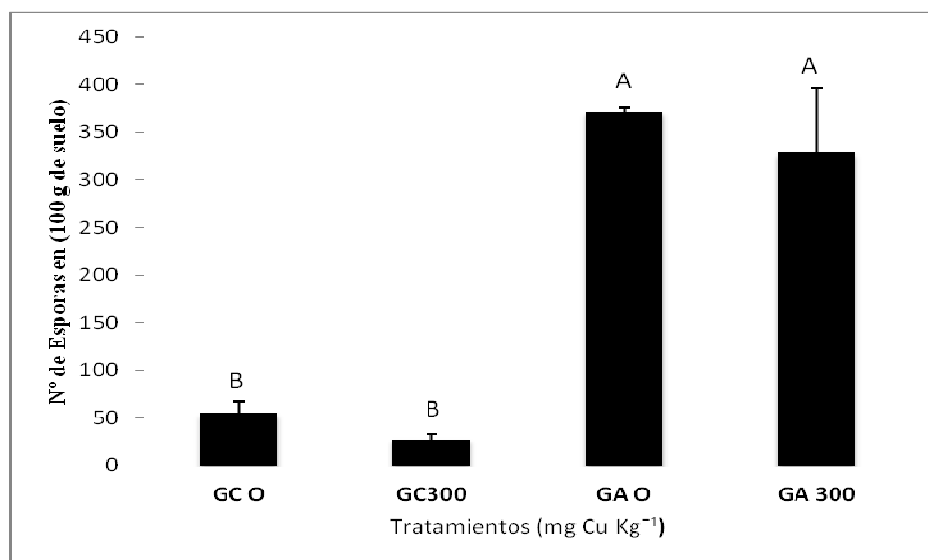


Figura 13. Densidad de esporas de HMA en la rizosfera de *Oenothera picensis*. Tratamientos GC= *Glomus claroideum*, GA= *Glomeromicetos*, a concentraciones de 0 y 300 mg kg⁻¹ de Cu.

4.7 Estabilidad estructural de agregados al agua

En la Figura 14 se presenta la estabilidad de los agregados al agua en los respectivos tratamientos. No se presentaron diferencias entre los tratamientos; sin embargo, se observó un leve aumento en ambos tratamientos con 300 mg kg⁻¹ Cu. Los valores de estabilidad oscilaron entre un 12 a un 15% respectivamente. Trabajos realizados por Cornejo *et al* (2008a), muestran parámetros entre 66,2 % y 75,4 % para *Oenothera picensis*, en suelos contaminados por descarga de MP en las cercanías de la Fundición Ventanas, en suelo no rizósferico, encontrando claras diferencias entre ambos trabajos, esto puede deberse a la metodología utilizada o bien a los tipos de suelo (rizósferico y no rizósferico).

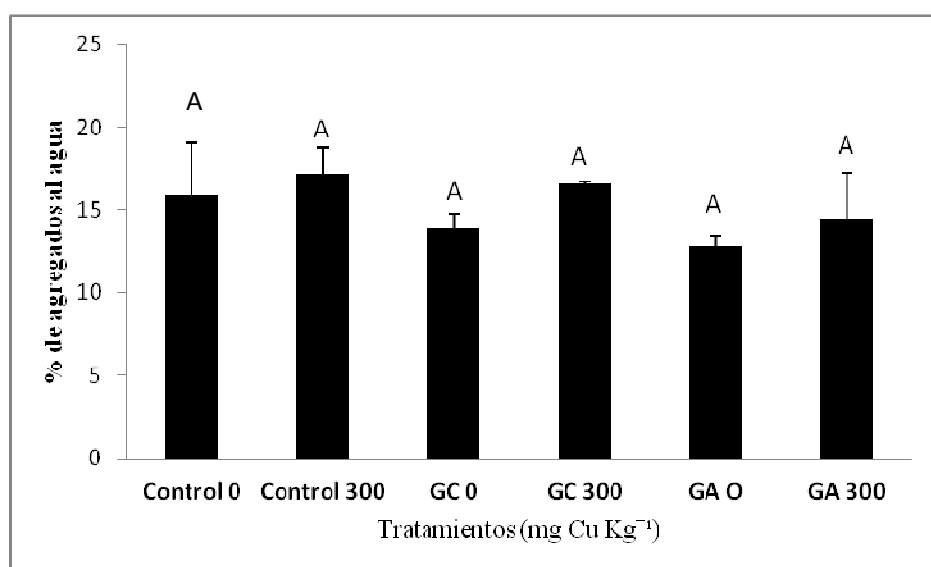


Figura 14. Estabilidad de los agregados al agua. Tratamientos GC= *Glomus claroideum*, GA= *Glomeromicetos*, a concentraciones de 0 y 300 mg kg⁻¹ de Cu.

4.8 Glomalina

En la Figura 15 se presentan las concentraciones de glomalina total. Se observó una disminución de la proteína a concentraciones crecientes de Cu en ambos tratamientos con hongos micorrícicos, GC y GA, a $300 \text{ mg Cu kg}^{-1}$. Estos resultados sugieren una contradicción en el aumento de glomalina en el tratamiento GC (0) ya que se cuantificó un menor número de propágulos de HMA. Estudios realizados por Navarrete (2010), mostraron resultados similares, sugiriendo el autor que lo que se esté cuantificando mediante el método Bradford sea inespecífico de la proteína obtenida del suelos (Janos *et al.*, 2008). No obstante, este comportamiento se podría explicar por una mayor transformación de las estructuras fúngicas en los tratamientos sin adición de Cu, que significarían un descenso de las densidades en particular de esporas y micelio, a la vez que se observa un aumento de los contenidos de glomalina. En este sentido, Rillig y Steinberg (2002) sugieren que la descomposición de las estructuras del hongo produce glomalina en el suelo, como medio de modificación de las propiedades ambientales del suelo, por lo que bajos contenidos de propágulos se asociarían a mayores niveles de glomalina.

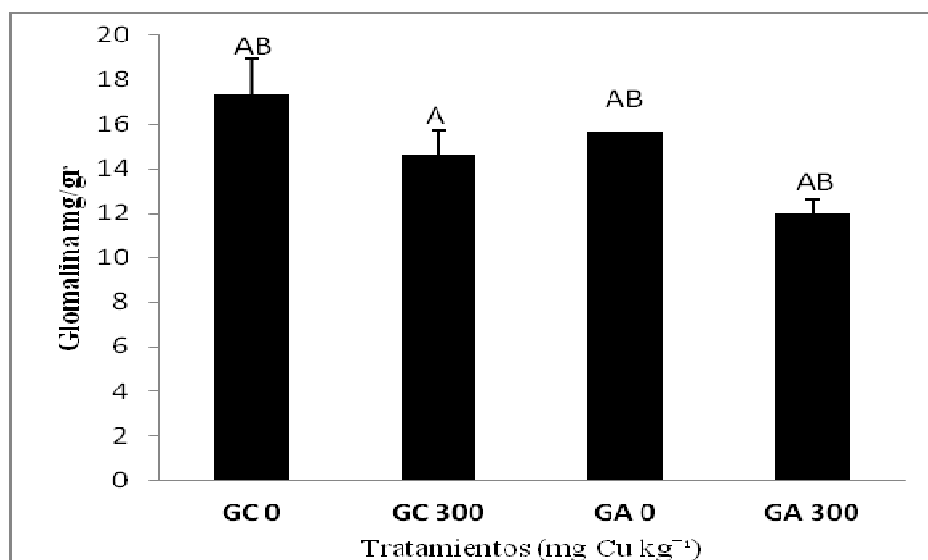


Figura 15. Concentraciones de Glomalina Relacionada a la Proteína del Suelo (GRSP) de suelos tratados con GC= *Glomus claroideum*, GA= *Glomeromicetos*, a concentraciones de 0 y 300 mg kg^{-1} de Cu.

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que la asociación entre ecotipos de HMA adaptados y no adaptados a altos niveles de toxicidad por Cu y la metalofita *Oenothera picensis*, es una alternativa viable para ser utilizada como herramienta biotecnológica en programas de biorremediación de suelos afectados por desechos mineros. En relación a los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones particulares:

- La producción de biomasa se favoreció por la asociación planta-GA, lo cual pudiese ser para su implementación en programas de biorremediación; sin embargo se observó una disminución en ambos tratamientos GA y GC a medida que aumentó la concentración de Cu.
- Las densidades de estructuras fúngicas varió según el tipo de HMA con que se inóculo a *O. picensis* y según el nivel de Cu en el suelo. Los porcentajes de colonización tendieron a aumentar levemente con la adición de Cu en los tratamientos GA, pero disminuyeron en GC afectado por la adición de este metal. Las esporas registraron el mismo comportamiento que la colonización, donde se observó una fuerte relación entre GA y el aumento de la concentración de Cu.
- La estabilidad de agregados al agua, presento resultados contradictorios con otros trabajos realizados en la zona de Puchuncaví, lo que pudo deberse a que los suelos aquí utilizados no eran de zonas rizosféricas. Por su parte, la glomalina al igual que la estabilidad mostró resultados contradictorios, ya que se observó una disminución de la proteína. Otros autores sugieren que esto puede deberse a la inespecificidad del método Bradford para cuantificación proteica.

- La asociación HMA- planta, es una alternativa viable para su posible utilización en programas de biorremediación de suelos contaminados por MP, y la asociación entre HMA nativos y plantas endémicas como *O. picensis*, surge como una alternativa favorable para este tipo de programas.

6. RESUMEN

Oenothera picensis es una pseudometalófito presente en ecosistemas con altos contenidos de cobre (Cu). Este estudio analizó la respuesta de *O. picensis* a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) bajo altos niveles de contaminación por Cu. Para esto, suelo contaminado ($350 \text{ mg Cu kg}^{-1}$) fue colectado en las cercanías de la fundición Ventanas (CODELCO), Valle de Puchuncaví. El ensayo se realizó en columnas, inoculándose plántulas de *O. picensis* con HMA autóctonos (GA) extraídos desde suelo rizosférico de sitios contaminados con Cu, o bien con un aislado de *Glomus claroideum* (GC) obtenido de un suelo agrícola. Se incluyó además un testigo sin inoculación. El suelo fue enriquecido con $300 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ y se comparó con un testigo sin adición de Cu. Se evaluó la producción de biomasa de parte aérea y radical, el crecimiento fúngico (micelio, esporas, colonización), la estabilidad de agregados al agua, pH y glomalina. Se observó una mayor acumulación de biomasa aérea y radical en plantas inoculadas con GA en el suelo con adición de Cu, que coincidió con una mayor longitud de micelio ($60,6 \text{ m g}^{-1}$), esporas (328 esporas en 100 g de suelo) y colonización (66% en GA y 56% en GC). La agregación del suelo se registró en un rango entre 12 a 15%, el pH registro un aumento significativo en todos los tratamientos con valores entre 6,6 y 7, en cuanto a la glomalina se observó una disminución en la proteína a concentraciones crecientes de Cu, en ambos tratamientos GA y GC ($300 \text{ mg Cu Kg}^{-1}$). Estos resultados sugieren un rol fundamental de los HMA nativos junto con *O. picensis* en suelos contaminados con Cu debido a la existencia de mecanismos de tolerancia desarrollados por el hongo los cuales resultarían relevantes en la creación e implementación de estrategias de biorremediación de este tipo de ecosistemas.

7. SUMMARY

Oenothera picensis is a pseudometallophyte plant present in Central Chilean ecosystems, which is a plant able to accumulate big amounts of copper (Cu) levels. In this study, we analyzed the response of *O. picensis* to the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation under high Cu supply levels. For this, contaminated soils ($350 \text{ mg Cu kg}^{-1}$) were collected from sites near to The Ventanas Smelter (CODELCO), in the Puchuncaví valley Central Chile.. This assay was carried out using soil columns and inoculating *O. picensis* plants with autochthonous AMF (GA) isolated from rhizospheric soil of Cu contaminated soils or isolated of *Glomus claroideum* (GC) spores extracted from agricultural soils. One soil without AMF inoculation was also included. In this soil was added $300 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ and we compared with one soil without Cu addition. This experiment considered different evaluations: roots and shoots biomass production, mycelium, spores number, root colonization, water stability aggregate, pH and glomalin. Our results indicated a higher roots and shoots biomass production in inoculated plants using GA in Cu contaminated soils. In addition, we obtained a higher mycelium length (60.6 m g^{-1}), number of spores ($328 \text{ spores/100 g of soil}$) and HMF colonization (66% in GA y 56% in GC). Soil Aggregation showed a range between 12 to 15%. On the other hand, pH values shows a significative number in all treatments was founded (6.6 and 7.0). Finally glomalin production presented low values at increasing Cu concentrations in both inoculation treatments GA and GC ($300 \text{ mg Cu Kg}^{-1}$). These results suggest a fundamental role of native AMF with *O. picensis* in Cu contaminated soils showing metal tolerance mechanisms, which could improve the implementation of bioremediation programs in metal contaminated soils.

8. LITERATURA CITADA

- 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, Bareas JM (eds) fijación y movilización biológica de nutrientes. Volumen II. Nuevas tendencias. SCIC. Madrid, España.129–147p.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Sharchar – Hill, Y. y Pfeffer, P.** 2000. El micelio de la micorriza arbuscular como Puente simbiótico entre la 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.
- Barea, J. M., Pozo J. M., Azcón R., y Azcón-Aguilar, C.** 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental. Botany* 56:1761-1778.
- 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.
- 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.
- Borie, F., Rubio, R., Morales, A.** 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 8:9-18.
- 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). 7:48-57.
- 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.
- 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. España 256pp.

- 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., y 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., Pérez-Tienda, J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., Azcón-Aguilar, C., Ferrol, N.** 2012. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology & Biochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.031>.
- 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.
- Curaqueo, G., Barea, J. M., Acevedo, E., Rubio, R., Cornejo, P., Borie, F.** 2011. Effects of different tillage system on arbuscular mycorrhizal fungal propagules and physical properties in a Mediterranean agroecosystem in central Chile. *Soil and Tillage Research (Chile)* 113:11:18
- 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 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 fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol (España)*. 65 (2): 718-123.
- Díaz, D., Honrubia, M.** 1993. Notes on Glomales from Spanish semiarid lands. *Nova Hedwigia* 57: 159-168.
- 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.
- Ferrol, N., Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C.** 2002. Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil*. 244:231-237.

- Gerdermann, J. W. y Nicholson, T.** 1963. Spore of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving. Transactions British Mycology Society (USA). 46(2):234-235.
- Gerdermann, J. W. y Trappe, J. M.** 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycol Memori (USA). 5:1-76.
- Gianinazzi –Pearson, V., Gianinazzi, S.** 1978. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. Physiol Plant Pathol 12: 45-53
- Giller, K. E., Witter, E. y Mcgranth, S. P.** 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. Soil Biology and Biochemistry (United Kingdom). 30(10-11):139-1414.
- Ginocchio, R.** 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncavi Valley, Chile. Chemosphere. (Chile). 41(1-2):15-23.
- 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.
- Giovanetti, M., Mosse, B.** 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. Home New Phytologist. 84, 489-500.
- Göhre, V. y Paszkowski, U.** 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta (Suiza). 223(6):1115-1122.
- 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- 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, España. 196pp.
- 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.
- Griffioen, W. A. J., Ietswaart, J. H y Ernst, W. H. O.** 1994. Mycorrhizal infection of an Agrotis capillaries population on a copper contaminated soil. Plant and soil 158(1):83-89.

- Ho, I., y Trappe, J. M.** 1973. Translocation of ^{14}C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244:30-31.
- 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 Mycorrhizal on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhauser-Verlag. Basel, Suiza. 191-200pp.
- 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.
- Joner, E. J., Briones, R., y Leyval, C.** 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil*. 226:227-234.
- Kennedy, A. C y Smith, K. L.** 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. *Plant and Soil* (USA). 170(1):75-86.
- Kemper, W. D. y Roseau, R. C.** 1986. Aggregate stability and size distribution. *Methods of soil Analysis. Part I, Physical and mineralogical methods*. Madison, Wisconsin. American Society of Agronomy. 245-44pp.
- Lambers, H., Chapin, F. S. y Pons, T. L.** 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer. New York, USA. 540p.
- Linderman, R. G.** 1992. Vesicular- arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. En: Bethlenfalvay, G. J. & Linderman, R. G. (eds) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA, Madison, Wisconsin, USA. 47-70pp.
- Leung, H. M., Ye, Z. H., Wong, M. H.** 2006. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (as hyperaccumulator) in as-contaminated soils. *Environment Pollution*. 139: 1-8.
- Lynch, R. J., Muntoni, A., Ruggeri, R. K. y Winfield, C.** 2007. Preliminary test of an electrokinetic barrier to prevent heavy metal pollution of soil. *Electrochimica Acta* (Inglaterra). 52 (10):3432-3440.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. y Swan J. A.** 1990. A new method wich 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. 537pp.
- 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., Borei, F., Bolan, N., Cornejo, P.** 2012. Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Critical Reviews Environmental Science and Technology*. 42: (7) 741-775.
- Navarrete, E.** 2010. Efecto de la aplicación de Biosólidos sobre los propágulos de Hongos Micorrízicos y la disponibilidad de Cu y Zn en un Andisol. Tesis de Pregrado. Chile. 58 pp.
- Newman, E. I.** 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.* (USA). 3:139-145.
- Olsson, P.A., Van Aarle, I.M., Allaway, W.G., Ashford, A.E., Rouhier, H.** 2002. Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiol* 130: 1162-1171.
- Pollard, J. A., Powell, K. D., Harper, F. A y Smith, J.** 2002. The genetic basis of metal in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* (Alemania). 78(1):72-82.
- Philips, J. M. y Hayman, D. S.** 1970. Improved procedures for clearing roots and parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Reimann, C., Koller, F., Kashulinac, G., Niskavaara, H. y Englmaier, P.** 2001. Influence of extreme pollution in the inorganic chemical composition of some plants. *Environmental Pollution* (Noruega). 115(2):239-252.
- Redel, Y., Rubio, R. y Borie.** 2005. Efecto de la Adición de Residuos de Cosecha y de un Hongos Micorrízico Sobre el Crecimiento Trigo y Parámetros Químicos y Biológicos de un Andisol. *Agricultura Técnica*. V.66. n. 2. Chillán, Chile. 175p.
- Redecker, D., Kodner, R. y Graham, L. E.** 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Rillig M., C. Steinberg, P.D.** 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1371-1374

- Rivera-Berrecil, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J. P., Belimov, A. A., Gianinazzi, S., Strasser, R. J. y Gianinazzi-Pearson, V.** 2002. Cadmiun accumulation and buffering of cadmium-induced strees by arbuscular mycorrhiza in three Pisumsativum L. genotypes, J Exp Bot 53:1177-1185.
- Rubio, R., Borie, F., Schalchli, C., Castillo, C. y Azcón, R.** 2003. Ocurrance and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilizar and fungi inoculation. Appl. Soil Ecol. 23:245-255.
- Sánchez-Díaz, M. y Honrrubia, M.** 1994. Water relations and allevation of drought stress in mycorrhizal plants. En: Gianinazzi S. Schüepp H (eds) impact of arbuscular mycorrhizal 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 cadmiun concentration on Artemia parthenogenetica. Journal of Environmental Science and Health. Part A. Toxic/hazardous substances and Environmental Engineerring. 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 AFuralani 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.
- Shetty, K.G. Bad, H. Dah, F. & AP Schwab.** 1994. Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine soil. Environmental Pollution 86: 181-188.
- Schüßler, A.** 2000. Glomus claroideum forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort Anthoceros punctatus. Mycorrhiza. 10: 15-21
- Schüßler, A., Schwarzott, D. y Walker, C.** 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol Res. 105: 1413-1421.
- Turnau, K., Miszalki, Z., Trouvelot, A., Bonfante, P., y Gianinazzi, S.** 1996. Oxalis acetosella as a monitoring plant on highly polluted soils. En: Azcón-Aguilar C & JM Barea (eds) Mycorrhizae in integrated systems, from genes to plant development: 479-482. European Commission, Luxembourg. 689 pp.

- Uetake, Y., Kojima, T., Ezawa, T., Saito, M.** 2002. Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol* 154: 761- 768
- 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. y Grčman, H., Maček, I., van Elteren, J. C. y Kovačević, M.** 2008. The contribution of glomalin-related soil to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment (Eslovenia)*. 392(1):130-982.
- Walker, C. y Schüßler, A.** 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research (Inglaterra)*. 108:981-982.
- Wright, S. y Upadhyaya, A.** 1998. A of soil for aggregate stability and glomalina, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant soil (USA)*. 198:97-107.
- Chen, B., Li, X., Tao, H., Christie, P. y Wong, M.** 2003. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere* 50: 839-846