

INFLUENCIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES *Glomus* spp. EN EL CRECIMIENTO Y ACUMULACIÓN DE COBRE EN GIRASOL *Helianthus annuus* L.

INFLUENCE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL *Glomus* spp. ON GROWTH AND ACCUMULATION OF COPPER IN SUNFLOWER *Helianthus annuus* L.

Paulina A. Castañón-Silva¹, Michael A. Venegas-Urrutia¹,
María G. Lobos-Valenzuela², Hernán J. Gaete-Olivares^{1,3*}

¹Depto. Biología y Ciencias Ambientales, ²Depto. Química y Bioquímica, ³Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales CIGREN, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Av. Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso, Chile. (castanon.paulina@gmail.com) (mvenegas.mv@gmail.com) (hernan.gaete@uv.cl) (gabriela.lobos@uv.cl).

RESUMEN

La actividad minera del cobre (Cu) en Chile genera grandes cantidades de desechos tóxicos que contaminan los suelos; una alternativa para recuperar estos suelos es utilizar micorrizas, microorganismos del suelo adaptados a esta condición para inocular las raíces de las plantas. El objetivo del presente estudio fue determinar la influencia de micorrizas arbusculares (MA) del género *Glomus* spp. en el crecimiento y la acumulación de Cu de girasol (*Helianthus annuus* L.). En la cuenca del río Aconcagua, Chile central, se recolectaron muestras de suelo contaminados con Cu; los suelos 1 y 2 del Valle de Catemu y el suelo 3 del Valle de Puchuncaví. En esos suelos, inoculados (M^+) y no inoculados (M^-) con MA se sembraron semillas de girasol. A los 50 d se midió la biomasa seca, colonización micorrízica y concentración de Cu en los tejidos de las plantas. Los suelos presentaron una textura franco-arenosa, 3.5-12.8 % materia orgánica, pH 6.7-6.9, Cu total 382-7678 mg kg⁻¹, y Cu disponible 72-574 mg kg⁻¹. El mayor crecimiento de las plantas se presentó en los tratamientos M^+ ($p \leq 0.05$) respecto a sus testigos M^- . Hubo una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la colonización (67, 32 y 58 %) al aumentar el Cu en el suelo y las plantas M^+ presentaron mayor capacidad para acumular Cu (285-697 mg kg⁻¹) en los tres suelos respecto a sus testigos M^- . La acumulación de Cu fue mayor en la raíz que en el tejido aéreo. Se concluye que las MA (*Glomus* spp.) contribuyen al crecimiento y la

ABSTRACT

The copper (Cu) mining activity in Chile generates large amounts of toxic wastes that pollute soils; an alternative to recuperate these soils is to use mycorrhizae, soil microorganisms adapted to this condition, to inoculate plant roots. The objective of this study was to determine the influence of arbuscular mycorrhizae (AM) of the *Glomus* spp. genus on the growth and accumulation of Cu in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In the Aconcagua River basin, central Chile, soil samples polluted by Cu were collected; soils 1 and 2 of the Catemu Valley and soil 3 of the Puchuncaví Valley. In these soils, inoculated (M^+) and not inoculated (M^-) with AM sunflower seeds were planted. After 50 d, dry biomass was measured, as well as mycorrhizal colonization and Cu concentration in the plant tissues. The soils presented a sandy-loam texture and were characterized by 3.5 to 12.8 % of organic matter, pH 6.7 to 6.9, total Cu 382 to 7678 mg kg⁻¹, and Cu available 72 to 574 mg kg⁻¹. The greatest growth of plants occurred in M^+ treatments ($p \leq 0.05$) as compared to their M^- witnesses. There was a significant decrease ($p \leq 0.05$) in colonization (67, 32 and 58 %) when increasing the Cu in the soil and M^+ plants presented a higher capacity to accumulate Cu (285-697 mg kg⁻¹) in the three soils as compared to their M^- witnesses. The Cu accumulation was higher in the root than in the aerial tissue. It is concluded that the AMs (*Glomus* spp.) contributed to the growth and accumulation of Cu in sunflower, favoring the processes of soil recuperation.

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2012. Aprobado: abril, 2013.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 47: 309-317. 2013.

Key words: mycorrhizal colonization, phytostabilization and *Helianthus annuus* L.

acumulación de Cu en girasol y favoreciendo los procesos de recuperación de suelos.

Palabras clave: colonización micorrízica, fitoestabilización y *Helianthus annuus* L.

INTRODUCCIÓN

Los suelos agrícolas cercanos a las actividades mineras en la cuenca del río Aconcagua, en Chile central, se caracterizan por presentar concentraciones altas de metales entre los que destaca el cobre (Ávila *et al.*, 2010), que proviene de las emisiones de material particulado de la fundición y refinería Ventana, en concentraciones de 104 a 530 mg Cu kg⁻¹ (De Gregori *et al.* 2003). El cobre (Cu) es un nutriente esencial pero en altas concentraciones puede ser tóxico para la biota animal y vegetal asociada al suelo (Adriano, 2001). Por tanto, hay interés creciente por manejar estos suelos, reducir el riesgo ecológico y recuperar las zonas impactadas. Entre las alternativas de manejo de estos suelos destaca la fitoremediación para lo cual se usa un grupo de plantas metalófilas (Pollard *et al.*, 2002), que pueden crecer en suelos con metales. Estas plantas poseen mecanismos específicos que les permiten acumular más de 1000 mg kg⁻¹ de Cu sin presentar síntomas visibles de toxicidad (Lasat, 2000), por lo que son una alternativa para recuperar suelos contaminados por actividades mineras (Ginocchio y Baker, 2004).

El efecto acumulador de algunas plantas puede ser potenciado con el uso de microorganismos del suelo, como las micorrizas arbusculares (MA), que están estrechamente relacionados con las raíces de las plantas (Novoa *et al.*, 2010). El efecto en la tolerancia y la acumulación de metales que tienen las MA depende de las propiedades físicas y químicas de los suelos y el tipo de planta hospedera (Chen *et al.*, 2007). El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un rizofiltrador potencial de cadmio, níquel, cobre, cinc, cromo, plomo y radioisótopos; además es micotrófica del género *Glomus* spp. (Davies *et al.*, 2001) y absorbe metales en mayor cantidad en sus raíces que en sus brotes (Christie *et al.*, 2004). Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la influencia de MA del género *Glomus* spp. sobre el crecimiento y la acumulación de Cu en plantas de girasol creciendo en suelos agrícolas cercanos a la actividad minera en la cuenca del río Aconcagua.

INTRODUCTION

Agricultural soils near mining activities in the Aconcagua River basin, in central Chile, are characterized by having high concentrations of metals, among which copper stands out (Ávila *et al.*, 2010), which results from emissions of material in particles from Ventana smelting and refining, in concentrations of 104 to 530 mg Cu kg⁻¹ (De Gregori *et al.*, 2003). Copper (Cu) is an essential nutrient, but in high concentrations it can be toxic to the animal and plant biota associated to the soil (Adriano, 2001). Therefore, there is a growing interest for managing these soils, reducing the ecological risk and recuperating the zones impacted. Among the management alternatives for these soils, phytoremediation stands out, for which a group of metalophile plants is used (Pollard *et al.*, 2002), which can grow in soils with metals. These plants possess specific mechanisms that allow them to accumulate more than 1000 mg kg⁻¹ of Cu without presenting visible symptoms of toxicity (Lasat, 2000), and making them an alternative for recovering soils contaminated by mining activities (Ginocchio and Baker, 2004).

The accumulating effect of some plants can be potentiated with the use of microorganisms in the soil, such as arbuscular mycorrhizae (AM), which are closely related to the roots of plants (Novoa *et al.*, 2010). The effect on tolerance and the accumulation of metals that the AMs have depend on the physical and chemical properties of the soils and the type of host plant (Chen *et al.*, 2007). The sunflower (*Helianthus annuus* L.) is a potential root filter of cadmium, nickel, copper, zinc, chromium, lead and radioisotopes; it is also mycotrophic to the *Glomus* spp. genus (Davies *et al.*, 2001) and absorbs metals in a higher amount through its roots than in its shoots (Christie *et al.*, 2004). Therefore, the objective of this study was to determine the influence of AM from the genus *Glomus* spp. on the growth and Cu accumulation in sunflower plants that grow in agricultural soils near the mining activity in the Aconcagua River basin.

MATERIALS AND METHODS

For this experiment, three soil samples were collected in agricultural areas with copper mining activities in the localities

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este experimento se recolectaron tres muestras de suelo en zonas agrícolas con actividad minera de cobre en las localidades de Catemu (suelo 1 y suelo 2; Valle Catemu) y Puchuncaví (suelo 3; Valle Puchuncaví), en la cuenca del río Aconcagua, Región de Valparaíso, Chile. Las muestras de suelo fueron compuestas, se tomaron de suelo superficial (hasta 20 cm de profundidad) 20 kg por muestra, y se transportaron en bolsas plásticas al laboratorio de Ecotoxicología y Medio Ambiente de la Universidad de Valparaíso. Las muestras se secaron en estufa (modelo LDO-150N, Labtech Hebro, Santiago, Chile) a 40 °C por 24 h (Sadzawka *et al.*, 2006). Para evitar la presencia de MA nativas u otros microorganismos que pudieran interferir en el experimento y alterar las mediciones, los suelos se esterilizaron 20 min, en autoclave, durante 2 d (Novoa *et al.*, 2010).

Las propiedades físicas y químicas de los suelos se determinaron en triplicado: 1) textura por el método del hidrómetro simplificado de acuerdo con Sheldrick y Wang (1993); 2) porcentaje de materia orgánica (MO) por el método de calcinación en mufa a 550 °C y dilución con ácido clorhídrico (HCl) (Sadzawka *et al.*, 2007); 3) concentración de fósforo (P) disponible por el método de Olsen mediante una extracción con una solución de bicarbonato de sodio 0.5 N a pH 8.5; 4) P en el extracto por espectroscopía de absorción molecular con el método de azul de metileno y con ácido ascórbico como reductor (Sadzawka *et al.*, 2006); 5) pH con un potenciómetro digital (modelo Q-400m2, QUIMIS, Diadema, Sao Paulo, Brasil) según la metodología de Jackson (1964); 6) concentración total y disponible de Cu mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP) (modelo AES OPTIMA 2000 DV, Perkin Elmer®, EE.UU.); 7) digestión de suelos para determinar de Cu total se realizó con una mezcla de ácidos y oxidantes (HNO₃, HCl, H₂O₂ y HClO₄) (Sadzawka *et al.*, 2005), y esta metodología fue validada con Material de Referencia Certificado (Montana Soil NIST 2710 y San Joaquín Soil NIST 2709, EE.UU.); 8) Cu disponible se determinó luego de la extracción desde el suelo con ácido dietilentriamín pentacético (0.05M DTPA+0.01M CaCl₂+0.1M trietanolamina, a pH 7.3) con 2 h de agitación con movimiento recíproco (Lindsay y Norvell, 1978).

El experimento se realizó entre julio y diciembre del 2010 y en agosto del 2010 se sembraron semillas de girasol desinfectadas (80 % germinación), marca Vilmorin, e inoculadas con MA comerciales (MYCOSYM TRI-TON® de MYCOSYM International Company AG de producción en Málaga, España, con oficinas comerciales en Basilea, Suiza), un producto granular compuesto principalmente de arcilla, como material

of Catemu (soil 1 and soil 2; Catemu Valley) and Puchuncaví (soil 3; Puchuncaví Valley) in the Aconcagua River basin, Valparaíso Region, Chile. The soil samples were composed and taken from the superficial soil (down to 20 cm of depth), 20 kg per sample, and transported in plastic bags to the Ecotoxicology and Environment laboratory of the Valparaíso University. The samples were dried in a stove (LDO-150N model, Labtech Hebro, Santiago, Chile) at 40 °C for 24 h (Sadzawka *et al.*, 2006). In order to avoid the presence of native AMs or other microorganisms that could interfere in the experiment and alter measurements, the soils were sterilized for 20 min, in autoclave, for 2 d (Novoa *et al.*, 2010).

The physical and chemical properties of the soils were determined by triplicate: 1) texture through the simplified hydrometer method, based on Sheldrick and Wang (1993); 2) percentage of organic matter (OM) through calcination in furnace at 550 °C and dilution with chloride acid (HCl) (Sadzawka *et al.*, 2007); 3) concentration of phosphorous (P) available by the Olsen method through an extraction with a sodium bicarbonate solution of 0.5 N at a pH of 8.5; 4) P in the extract through molecular absorption spectroscopy with the methylene blue method and with ascorbic acid as a reducer (Sadzawka *et al.*, 2006); 5) pH with a digital potentiometer (Q-400m2 model, QUIMIS, Diadema, Sao Paulo, Brazil) based on the methodology described by Jackson (1964); 6) total and available concentration of Cu through atomic emission spectroscopy with inductively coupled plasma (ICP) (AES OPTIMA 2000 DV model, Perkin Elmer®, USA); 7) digestion of soils to determine total Cu was performed with a mixture of acids and oxidants (HNO₃, HCl, H₂O₂ and HClO₄) (Sadzawka *et al.*, 2005), and this methodology was validated with Certified Reference Materials (Montana Soil NIST 2710 and San Joaquín Soil NIST 2709, USA); 8) Cu available was determined after the extraction from the soil with dietilentriamin pentacetic acid (0.05M DTPA+0.01M CaCl₂+0.1M trietanolamine, at pH 7.3) with 2 h of agitation with reciprocal movement (Lindsay and Norvell, 1978).

The experiment was performed between July and December 2010, and on August 2010 disinfected sunflower seeds were planted (80 % germination), Vilmorin brand, and inoculated with commercial AM (MYCOSYM TRI-TON® from MYCOSYM International Company AG of production in Málaga, Spain, with commercial offices in Basel, Switzerland), which is a granular product composed mainly of clay, as a bearer. The experimental design was random blocks based on the M⁺ and M⁻ treatments. In each one of the three soils, two treatments were applied: inoculated (M⁺) and not inoculated (M⁻) with AM, with four repetitions each. Plastic containers of 1.5 kg were

portador. El diseño experimental fue de bloques al azar con base en los tratamientos M^+ y M^- . En cada uno de los tres suelos se aplicaron dos tratamientos: inoculados (M^+) y no inoculados (M^-) con MA, con cuatro repeticiones cada uno. Se usaron envases de plástico de 1.5 kg y en cada uno se agregó 1 kg de suelo y tres semillas de girasol; la unidad experimental fue las tres plantas germinadas de cada envase de plástico. En los tratamientos M^+ se agregaron 3 g de inóculo de MA alrededor de las semillas. Las condiciones experimentales fueron de invernadero: temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), 50 % humedad relativa (± 2 %) y fotoperiodo 14 h luz y 10 h oscuridad. Los riegos se hicieron cada 2 d con 22 mL de agua potable para cada unidad experimental (Ginocchio y Narváez, 2002). Una vez por semana en cada planta se midió: altura, diámetro del tallo y número de hojas.

Las plantas de girasol se cosecharon en la etapa fenológica principio de floración (a los 50 d), se lavaron con agua potable, se sumergieron en una solución de HCl 0.1 mol L^{-1} y se enjuagaron con agua desionizada (Sadzawka *et al.*, 2007). Después fueron secadas 48 h en estufa (modelo LDO-150N, Labtech Hebro, Santiago de Chile) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, se pesaron en una balanza analítica (modelo AAA SERIES L, Adam Equipment, EE.UU.) (Ginocchio y Narváez, 2002) y se determinó la biomasa seca aérea (hoja y tallo) y radical. El porcentaje de colonización micorrízica se evaluó cortando fragmentos de 1 cm de raíz secundaria de las plantas de girasol M^+ (recién cosechadas). Estas raíces se clarificaron en hidróxido de potasio (KOH) al $2.5\text{ } \%$ p:v $^{-1}$, se lavaron con HCl $1\text{ } \%$ para eliminar los excesos de KOH y se tiñeron con azul tripano $0.05\text{ } \%$ p:v $^{-1}$ (Phillips y Hayman, 1970). Las raíces teñidas se distribuyeron al azar en una placa petri cuadrada y el porcentaje de colonización micorrízica se evaluó con un microscopio estereoscópico (modelo StemiDV4, Zeiss, Nueva York, EE.UU.) según el método de intercepción de línea (Giovannetti y Mosse, 1980). La concentración de Cu total en los tejidos aéreos y radicular de las plantas de girasol, M^+ y M^- , se determinó mediante ICP (modelo AES OPTIMA 2000 DV, Perkin Elmer®, EE.UU.). Para la digestión de los tejidos se usó una mezcla ácida-oxidante ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{HClO}_4$) (Sadzawka *et al.*, 2005). La metodología para determinar Cu total en muestra vegetal fue validada con Material de Referencia Certificado (Virginia Tobacco Leaves CTA-VTL-2 y Spinach Leaves SRM 1570^a, EE.UU.).

Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos M^+ y M^- se usó un ANDEVA de una vía con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), y para determinar la relación entre el Cu disponible y el Cu total se realizó una correlación lineal de Pearson. Estos análisis se realizaron con el programa minitab 15 (Minitab, State College, Pennsylvania, EE.UU.). Los resultados se muestran como media $\pm$ desviación estándar (DE).

used, and in each one 1 kg of soil and three sunflower seeds were added, with the experimental unit being the three plants germinated in each plastic container. In the M^+ treatments 3 g of AM inoculum were added around the seeds. The experimental conditions were greenhouse: environmental temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), 50 % relative humidity (± 2 %) and a photoperiod of 14 h light and 10 h darkness. Irrigation was applied every 2 d with 22 mL of fresh water for each experimental unit (Ginocchio and Narváez, 2002). Once a week, each plant was measured: height, stem diameter and number of leaves.

Sunflower plants were harvested in the phenologic stage of the beginning of flowering (at 50 d), they were washed with fresh water, submerged in a solution of HCl 0.1 mol L^{-1} and rinsed with deionized water (Sadzawka *et al.*, 2007). After, they were dried for 48 h in a stove (LDO-150N model, Labtech Hebro, Santiago de Chile) at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, weighed on an analytical scale (AAA SERIES L model, Adam Equipment, USA) (Ginocchio and Narváez, 2002), and the dry aerial as well as the root biomass (leaf and stem) was determined. The percentage of mycorrhizal colonization was evaluated by cutting 1 cm fragments of secondary roots from the M^+ sunflower plants (recently harvested). These roots were clarified in potassium hydroxide (KOH) at $2.5\text{ } \%$ p:v $^{-1}$, washed with HCL $1\text{ } \%$ to eliminate KOH excess and dyed with tripane blue $0.05\text{ } \%$ p:v $^{-1}$ (Phillips and Hayman, 1970). The dyed roots were randomly distributed in a gridded petri dish and the percentage of mycorrhizal colonization was evaluated with a stereoscopic microscope (StemiDV4 model, Zeiss, New York, USA) based on the line interception method (Giovannetti and Mosse, 1980). The total Cu concentration in aerial and radicular tissues of the sunflower plants, M^+ and M^- , was determined by ICP (AES OPTIMA 2000 DV model, Perkin Elmer®, USA). To digest tissues, an acid-oxidant mixture was used ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{HClO}_4$) (Sadzawka *et al.*, 2005). The methodology for total Cu determination in plant samples was validated with Certified Reference Material (Virginia Tobacco Leaves CTA-VTL-2 and Spinach Leaves SRM 1570^a, USA).

In order to determine the significant differences between M^+ and M^- treatments a one-way ANOVA was used with the Tukey ($p \leq 0.05$) test, and to determine the relationship between Cu available and total Cu, a linear Pearson correlation was carried out. These analyses were performed with the minitab 15 program (Minitab, State College, Pennsylvania, USA). The results are shown as mean $\pm$ standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

The soils presented a sandy-loam texture (Table 1) and were classified as Entisols (Soil Survey Staff, 1999). When OM increases, the total and available

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los suelos presentaron textura franco-arenosa (Cuadro 1) y fueron clasificados como Entisoles (Soil Survey Staff, 1999). Al aumentar la MO la concentración de Cu total y disponible disminuye en los suelos, lo cual se debe a la alta afinidad de la MO por los iones de Cu, disminuyendo su biodisponibilidad (Kabata-Pendias y Pendias, 2000). El pH fue levemente ácido y al disminuir, el Cu total y disponible aumentó en el suelo. La concentración de P disponible fue mayor en los suelos 2 y 3 (66 y 48 mg kg⁻¹) comparados con el suelo 1 (17 mg kg⁻¹). De acuerdo con estos valores el suelo 1 presentaría la mayor limitación para el crecimiento de las plantas ya que el P es un factor limitante (Sánchez, 1976), pero según la clasificación de Vásquez (1997) todos los suelos corresponderían a clase alta (>11 mg kg⁻¹). El Cu total en los suelos varió de 382 a 7678 mg kg⁻¹, superando lo reportado por De Gregori *et al.* (2003) en el mismo sector (104-530 mg kg⁻¹), lo cual sugiere una acumulación de Cu en el tiempo. Las concentraciones de Cu disponible variaron de 72 a 578 mg kg⁻¹, correlacionándose significativamente con el Cu total ($r=0.95$).

El inóculo de MA colonizó el sistema radicular de las plantas en los tres suelos (Figura 1). La colonización micorrízica disminuyó a medida que aumentó la concentración de Cu en los suelos, lo cual podría deberse a un efecto inhibitorio del Cu que puede reducir el número de esporas y la colonización de

Cu concentration decreases in the soils, which is due to the high affinity of OM to the Cu ions, decreasing its bioavailability (Kabata-Pendias and Pendias, 2000). The pH was slightly acidic and when decreasing, the total Cu available increased in the soil. The P available presented a higher concentration in soils 2 and 3 (66 and 48 mg kg⁻¹) compared to soil 1 (17 mg kg⁻¹). According to these values, soil 1 would present the greater limitation for plant growth, since P is a limiting factor (Sánchez, 1976), but according to classification by Vásquez (1997) all soils would correspond to the high class (>11 mg kg⁻¹). The total Cu in soils varied from 382 to 7678 mg kg⁻¹, exceeding the amount reported by De Gregori *et al.* (2003) in the same sector (104-30 mg kg⁻¹), which suggests an accumulation of Cu over time. The concentrations of Cu available varied from 72 to 578 mg kg⁻¹, correlating significantly with the total Cu ($r=0.95$).

The AM inoculum colonized the radicular system of plants in the three soils (Figure 1). The mycorrhizal colonization decreased as the Cu concentration increased in the soils, which could be due to an inhibiting effect by Cu that can reduce the number of spores and the colonization of the plant roots (Leyval *et al.*, 2002). These results indicate that the AMs are tolerant to concentrations of 382 to 7678 mg kg⁻¹.

Sunflower plants in M⁺ treatments from the three soils presented greater growth ($p \leq 0.05$) compared to their control; these results are similar

Cuadro 1. Propiedades físicas y químicas de los suelos de Catemu (suelos 1 y 2) y Puchuncaví (suelo 3) en Valparaíso, Chile.

Table 1. Physical and chemical properties of the soils in Catemu (soils 1 and 2) and Puchuncaví (soil 3), in Valparaíso, Chile.

Propiedades	Suelo 1	Suelo 2	Suelo 3
Físicas:			
Zona	Valle Catemu	Valle Catemu	Valle Puchuncaví
Coordenadas geográficas	32° 48' S 70° 57' O	32° 46' S 70° 59' O	32° 44' S 71° 28' O
Distancia a la actividad minera, km	1.0	0.5	1.5
Textura	Franco-arenosa	Franco-arenosa	Franco-arenosa
Químicas:			
pH	6.9	6.2	6.7
Materia orgánica, %	12.8 ± 0.4	3.5 ± 0.1	5.9 ± 0.5
P disponible, mg kg ⁻¹	17 ± 1	66 ± 6	48 ± 4
Cu total, mg kg ⁻¹	382 ± 16	7,678 ± 1024	730 ± 45
Cu disponible, mg kg ⁻¹	72 ± 4	578 ± 29	214 ± 6

las raíces de las plantas (Leyval *et al.*, 2002). Estos resultados indican que las MA son tolerantes a concentraciones de 382 a 7678 mg kg⁻¹.

Las plantas de girasol de los tratamientos M⁺ de los tres suelos presentaron mayor crecimiento ($p \leq 0.05$) comparado con sus testigos; estos resultados son similares a los observados por Davies *et al.* (2001), quienes reportan mayores alturas, diámetros de tallos y número de hojas en plantas de girasol M⁺. Las alturas y los diámetros de los tallos fueron menores en los suelos 2 y 3, lo cual se podría deber a que estos suelos presentaron las mayores concentraciones de Cu (Cuadro 2), ya que según Peralta *et al.* (2004), el Cu afecta el metabolismo de las plantas causando menor crecimiento. La biomasa seca aérea y radical fue mayor ($p \leq 0.05$) en los tratamientos M⁺ (Cuadro 2), lo cual es similar a lo encontrado por Novoa *et al.* (2010) quienes indican que la biomasa seca aérea y radical fue mayor en alfalfa con MA del género *Glomus* spp. Las plantas de girasol del suelo 1 presentaron el crecimiento mayor y la concentración menor de P (17.1 mg kg⁻¹) (Cuadro 1), lo que pudo ayudar al crecimiento porque la adición de cantidades bajas de P es compatible e incluso complementaria con las MA en la estimulación del crecimiento de las plantas (Saggin y Siqueria, 1996).

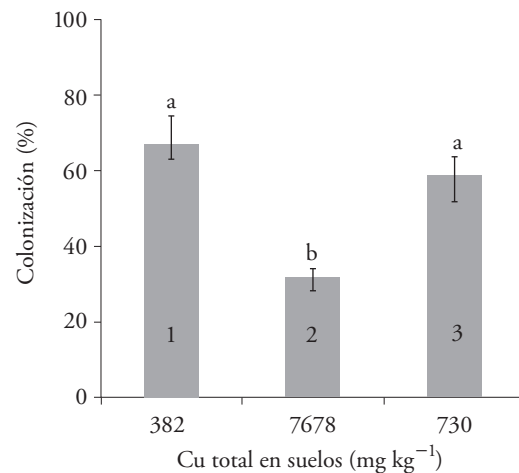


Figura 1. Porcentaje de colonización micorrízica (media ± DE) en raíces de girasol M⁺ con concentraciones distintas de Cu en el suelo. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los suelos ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Percentage of mycorrhizal colonization (mean ± SD) in M⁺ sunflower roots at different concentrations of Cu in the soil. Different letters indicate significant differences between soils ($p \leq 0.05$).

to those observed by Davies *et al.* (2001), who report greater heights, stem diameters and number of leaves in M⁺ sunflower plants. The heights and stem diameters were smaller in soils 2 and 3, which

Cuadro 2. Comparación del efecto de los tratamientos M⁺ y M⁻ en las variables de crecimiento en girasol.
Table 2. Comparison of effects by M⁺ and M⁻ treatments on the growth variables in sunflower.

Tratamientos		Cu total en suelos, mg kg ⁻¹		
		Suelo 1 (382)	Suelo 2 (7678)	Suelo 3 (730)
Altura planta, cm				
	Inoculado	32 ± 6*	18 ± 4*	28 ± 5*
	No inoculado	20 ± 8	13 ± 1	20 ± 5
Diámetro tallo, mm				
	Inoculado	3.8 ± 0.5*	2.6 ± 0.2*	2.7 ± 0.2*
	No inoculado	2.5 ± 0.2	2.0 ± 0.04	2.1 ± 0.1
Número de hojas				
	Inoculado	10 ± 1*	9 ± 1*	10 ± 1*
	No inoculado	6 ± 1	5 ± 1	5 ± 1
Biomasa seca aérea, g				
	Inoculado	1.3 ± 0.2*	0.86 ± 0.09*	0.94 ± 0.09*
	No inoculado	0.58 ± 0.05	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2
Biomasa seca radicular, g				
	Inoculado	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.02
	No inoculado	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.04	0.05 ± 0.01

* $p \leq 0.05$ diferencias significativas entre tratamientos M⁺ y M⁻ (ANDEVA). Media ± DE ❖ * $p \leq 0.05$ significant differences between M⁺ and M⁻ treatments (ANOVA). Mean ± SD.

Las concentraciones de Cu total en los tejidos de girasol variaron de 174 a 697 mg kg⁻¹ (Cuadro 3), lo que corresponde a concentraciones excesivas y tóxicas para cultivos agrícolas porque los intervalos permitidos de Cu en tejido vegetal para su normal crecimiento y desarrollo son 5 a 20 mg kg⁻¹ (Adriano, 2001). Las plantas de girasol M⁺ presentaron la acumulación mayor de Cu y es similar a lo reportado por Novoa *et al.* (2010), quienes indican absorciones mayores de Cu en plantas de alfalfa inoculadas con MA del género *Glomus* spp. El análisis de los resultados sugiere que las MA favorecen la absorción de Cu por el girasol y además disminuyen su paso al tejido aéreo fitoestabilizando el metal. Esta respuesta se puede atribuir a la función de la simbiosis micorrízica, porque las MA tienen como primera barrera dos mecanismos para hacer frente a las concentraciones altas de Cu: 1) su exudado denominado glomalina (proteína producida por las MA) relacionada directamente con la concentración de Cu en el suelo porque esta proteína se acumula en mayor cantidad en ambientes con concentraciones de Cu altas y, además, ayudaría a atrapar los metales en la raíz en 28 %; y 2) su pared celular (quitina) cargada negativamente, la cual adsorbe los metales en su superficie por diferencia de carga, restringiendo el movimiento del metal al tejido aéreo (Cornejo *et al.*, 2008).

could be due to the fact that these soils presented the highest concentrations of Cu (Table 2), since according to Peralta *et al.* (2004) Cu affects the metabolism of plants causing lower growth. The dry aerial and root biomass was higher ($p \leq 0.05$) in M⁺ treatments (Table 2), which is similar to what was found by Novoa *et al.* (2010) who indicate that the dry aerial and root biomass was higher in alfalfa with AM from the *Glomus* spp. genus. Sunflower plants in soil 1 presented the greatest growth and the lowest concentration of P (17.1 mg kg⁻¹) (Table 1), which could help in the growth because the addition of low quantities of P is compatible and even complementary with the AMs in stimulating the growth of plants (Saggin and Siqueria, 1996).

The total Cu concentrations in sunflower tissues varied from 174 to 697 mg kg⁻¹ (Table 3), which corresponds to excessive and toxic concentrations for agricultural crops, because the Cu intervals allowed in plant tissues for their normal growth and development are 5 to 20 mg kg⁻¹ (Adriano, 2001). Sunflower plants with M⁺ presented the highest accumulation of Cu, which is similar to that reported by Novoa *et al.* (2010), who indicate higher absorptions of Cu in alfalfa plants inoculated with AM from the *Glomus* spp. genus. The analysis of results suggests that the AMs favor the absorption of Cu by the sunflower and in addition decrease their

Cuadro 3. Comparación de la concentración de Cu en tejidos de girasol con tratamientos M⁺ y M⁻ en los suelos.

Table 3. Comparison of Cu concentration in sunflower tissues with M⁺ and M⁻ treatments in the soils.

Tratamientos		Cu total en suelos, mg kg ⁻¹		
		Suelo 1 (382)	Suelo 2 (7678)	Suelo 3 (730)
Cu en girasol				
Aéreo				
	Inoculado	44 ± 6*	24 ± 6*	56 ± 9*
	No inoculado	9 ± 8	6 ± 3	53 ± 6
Radicular				
	Inoculado	241 ± 31*	270 ± 9	641 ± 138*
	No inoculado	165 ± 21	230 ± 81	513 ± 60
Total				
	Inoculado	285 ± 21*	294 ± 16*	697 ± 68*
	No inoculado	174 ± 15	236 ± 48	566 ± 39

* $p \leq 0.05$ diferencias significativas entre tratamientos M⁺ y M⁻ (ANDEVA). Media ± DE ♦ $p \leq 0.05$ significant differences between M⁺ and M⁻ treatments (ANOVA). Mean ± SD.

CONCLUSIONES

El crecimiento mayor, en términos de altura y biomasa, y la acumulación de cobre hacen al girasol, en asociación con MA del género *Glomus* spp., una especie potencial para la recuperación de suelos contaminados con Cu.

AGRADECIMIENTOS

A Patricia Díaz G. del Laboratorio de Química Ambiental del Departamento de Química y Bioquímica por el apoyo analítico. Al Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales CIGREN de la Universidad de Valparaíso y al Proyecto FONDECYT N° 11080235.

LITERATURA CITADA

- Adriano, D. C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. 866 p.
- Ávila, G., H. Gaete, M. E. Hidalgo, y A. Neaman. 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *eisenia foetida*. Quim. Nova 33 (3): 566-570.
- Chen, B., Y. Zhu, J. Duan, X. Xiao, and S. Smith. 2007. Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. Environ. Poll. 147: 374-380.
- Christie, P., X. Li, and B. Chen. 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. Plant Soil 261: 209-217.
- Cornejo, P., S. Meier, y F. Borie. 2008. Utilización de hongos micorrízicos arbusculares como alternativa para la recuperación de suelos contaminados por actividad minera. Gestión Ambiental 16: 13-26.
- Davies, F. T., R. Puryear, D. Jeffrey, J. Newton, N. Egilla, and G. Saraiva. 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Physiol. 158 (6): 777-786.
- De Gregori, I., E. Fuentes, M. Rojas, H. Pinochet, and M. Potin-Gautier. 2003. Monitoring of copper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. J. Environ. Monitor. 5: 287-295.
- Ginocchio, R., and A. Baker. 2004. Metallophytes in Latin America: A remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. Rev. Chil. Hist. Nat. 77: 185-194.
- Ginocchio, R., y J. Narváez. 2002. Importancia de la forma química y la matriz del sustrato en la toxicidad por el cobre en *Noticastrum sericeum* (Less.) Less. ex Phil. Rev. Chil. Hist. Nat. 75 (3): 603-612.
- Giovanetti, M., and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-500.

passage to the aerial tissue, phytostabilizing the metal. This response can be attributed to the function of the mycorrhizal symbiosis, because the AMs have as the first barrier two mechanisms to face the high concentrations of Cu: 1) their exudate called glomalin (protein produced by the AMs) directly related to the Cu concentration in the soil because this protein accumulates in higher quantities in environments with high Cu concentrations and, in addition, it would help trap the metals in the roots in 28 %; and 2) their negatively charged cell wall (chitin), which adsorbs metals on its surface, because of difference in charge, restricting the movement of metal to the aerial tissue (Cornejo *et al.*, 2008).

CONCLUSIONS

The greatest growth, in terms of height and biomass, and the accumulation of copper make sunflower, in association with AM from the *Glomus* spp. genus, a potential species for the recuperation of soils contaminated with Cu.

—End of the English version—



- Jackson, M. L. 1964. Análisis Químico de Suelos. Ediciones Omega, Barcelona, España. 633 p.
- Kabata-Pendias, A. S., and H. Pendias. 2000. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Ann Arbor, Michigan. 432 p.
- Lasat, M. 2000. The use of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil. American Association for the Advancement of Science, Environmental Science and Engineering Fellow, Washington, D.C., USA. 33 p.
- Leyval, C., E. Joner, and C. K. Del Val. 2002. Potencial of arbuscular mycorrhiza for bioremediation. Mycorrhiza 7 (2): 175-186.
- Lindsay, W. L., and W. A. Norvell. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci. Soc. Amer. J. 42: 421-428.
- Novoa, D., S. Palma, and H. Gaete. 2010. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi *glomus* spp. inoculation on alfalfa growth in soils with copper. Chilean J. Agric. Res. 70 (2): 259-265.
- Peralta, J., G. De la Rosa, J. González, and J. Gardea. 2004. Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. Adv. Environ. Res. 8: 679-685.
- Phillips, J. M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 58-161.
- Pollard, J. A., K. D. Powell, F. A. Harper, and J. A. C. Smith. 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. Critical Rev. Plant Sci. 21: 539-566.

- Sadzawka, A., M. A. Carrasco, R. Demanet, H. Flores, R. Grez, M. L. Mora, y A. Neaman. 2007. Métodos de análisis de tejidos vegetales. Segunda Edición. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Acta N° 40, Santiago de Chile. 13 p.
- Sadzawka, A., M. A. Carrasco, R. Grez, M. L. Mora, H. Flores, y A. Neaman. 2006. Métodos de Análisis de Suelos Recomendados para los Suelos de Chile. Santiago: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (INIA. Serie actas, 34). 164 p.
- Sadzawka, A., M. Carrasco, R. Grez, y M.L. Mora. 2005. Métodos de análisis de compost. Santiago Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias Centro Regional de Investigación La Platina. Vol. Serie Actas INIA N° 30. 142 p.
- Saggin Júnior, O. J., y J. O. Siqueira. 1996. Micorrizas arbusculares emcafeeiro. *In*: Siqueira, J. O. (ed). Avançosem Fundamentos e Aplicação de Micorrizas. Lavras: Universidade Federal de Lavras. pp: 203-254.
- Sánchez, P. 1976. Properties and Management of Soil in the Tropic. John Wiley and Sons. New York. 220 p.
- Sheldrick, B. H., and C. Wang. 1993. Soil sampling and methods of analysis. *In*: Carter, M. (ed). Particle Size Distribution. Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA. pp: 499-511.
- Soil Survey Staff (Washington, USA). 1999. Soil Taxonomy: A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys. Washington: U.S. Dept. of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. 869 p.
- Vázquez, A. A. 1997. Guía para interpretar el análisis químico del agua y suelo. Segunda edición. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 29 p.