

EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD Y LA GENOTOXICIDAD DE SUELOS AGRÍCOLAS DE ZONAS CON ACTIVIDADES MINERAS DE COBRE DE LA CUENCA DEL RÍO ACONCAGUA (CHILE CENTRAL)

Yenny OLIVARES¹, Hernán GAETE^{1*} y Alexander NEAMAN²

¹ Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Ambientales, Universidad de Valparaíso. Avenida Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso, Chile

² Escuela de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Calle San Francisco S/N, La Palma, Quillota, Chile

*Autor para correspondencia: hernan.gaete@uv.cl

(Recibido septiembre 2014; aceptado febrero 2015)

Palabras clave: genotoxicidad, micronúcleos, índice mitótico, *Vicia faba*

RESUMEN

Los suelos agrícolas de la cuenca del río Aconcagua, en zonas cercanas a centros mineros se caracterizan por tener altas concentraciones de cobre. Esto puede ser un riesgo para los organismos expuestos. Los estudios de toxicidad en organismos vegetales que se asientan sobre estos suelos son pocos, no se sabe si pudieran provocarles efectos de genotoxicidad. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la fitotoxicidad y la genotoxicidad de los suelos agrícolas cercanos a centros mineros en la cuenca del río Aconcagua (Chile central). Para ello, las semillas de *Vicia faba* fueron expuestas a extractos de cuatro suelos contaminados por 144 h. Al final de los experimentos se determinó el porcentaje de germinación, el crecimiento de la raíz, la frecuencia de micronúcleos y el índice mitótico de dichas semillas. Los suelos con las mayores concentraciones de cobre total fueron el 2 y el 3, con 7658 y 789 mg/kg, respectivamente. Los resultados muestran una inhibición significativa en la germinación de las semillas en el suelo 3. El mayor porcentaje de inhibición del índice mitótico fue en los suelos 2 y 4, se observó una relación significativa entre este parámetro y las concentraciones de cobre solubles en los suelos ($R^2 = 0.67$, $p < 0.05$). Los suelos 2 y 3 con concentraciones altas de cobre provocan genotoxicidad y podrían ser un riesgo para el crecimiento de diversas especies de plantas en estos suelos.

Key words: genotoxicity, micronuclei, mitotic index, *Vicia faba*

ABSTRACT

The agricultural soils of the Aconcagua river basin in zones near to mining centers are characterized by having high copper concentrations. This is a risk for terrestrial organisms like plants. The studies of toxicity in plants on these kind of soils are few. We still do not know if these soils can provoke genotoxicity in plants. According to this, the aim of this investigation was to evaluate the genotoxicity and phytotoxicity of agricultural soils near to mining centers in the Aconcagua river basin (central Chile). In order to do this, *Vicia faba* seeds were exposed to extracts of contaminated soils by

144 h. At the end of the experiments, the germination percentage, root growth, micronuclei frequency and mitotic index of the seeds were determined. The soils with the higher concentrations of total copper were 2 and 3, with 7658 y 789 mg/kg respectively. Significant inhibition in the germination percentage in the soil 3 was observed. The higher percentage of inhibition in the mitotic index was in soils 2 and 4. A significative relationship between this parameter and the soluble copper concentration in soils was observed ($R^2 = 0.67$, $p < 0.05$). Soils 2 and 3, which have high copper concentrations, are genotoxic and they would be a risk to plants growing in these kind of soils.

INTRODUCCIÓN

Los suelos cercanos a fuentes de contaminación como fundiciones y centrales termoeléctricas a carbón se caracterizan por presentar altos niveles de metales (Ávila *et al.* 2007). Las plantas están entre los organismos que pueden ser afectados por dicha contaminación de suelos. Los metales adsorbidos a través de los sistemas radicales pueden bioacumularse en hojas, tallos y raíces. Estos agentes pueden afectar su reproducción, crecimiento, sobrevivencia y también provocar daño genético (Abaye *et al.* 2005, Staykova *et al.* 2005, Ginocchio *et al.* 2006, Díaz *et al.* 2008).

Tradicionalmente la exposición a estos agentes químicos se evalúa a través de la determinación de su concentración total en suelos. Sin embargo, este método no permite evaluar su biodisponibilidad y posterior efecto sobre los organismos establecidos en estos ambientes (Ginocchio y Narváez 2002). Existen diversas formas de evaluar el efecto de los agentes químicos sobre la biota en suelos, entre ellos está la genotoxicidad. Para la evaluación de este daño en plantas se han desarrollado diferentes bioensayos, entre los cuales destaca la prueba de micronúcleos (MN) en *Vicia faba* (Citterio *et al.* 2002, Hajjouji *et al.* 2007). Dicha prueba consiste en la observación de las células meristemáticas en interfase, en las que se monitorean posibles daños genéticos por contaminantes ambientales. El ensayo ha sido validado por el Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP) y por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA). Ha demostrado ser un sistema versátil para evaluar daño citogenético en plantas, es de fácil manejo y de mantenimiento relativamente económico. Además, cabe destacar que la utilización de plantas superiores en estos ensayos es fundamental en la evaluación del riesgo genotóxico de suelos (Citterio *et al.* 2002).

La cuenca del río Aconcagua es una de las más importantes áreas agrícolas de Chile, al mismo tiempo es una de las principales zonas de minería del cobre.

Los suelos agrícolas cercanos a estas actividades se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de cobre (De Gregori *et al.* 2003, Badilla-Ohlbaum *et al.* 2009) y existen antecedentes sobre la toxicidad de estos suelos en lombrices (Ávila *et al.* 2007, Gaete *et al.* 2010, Cataldo *et al.* 2011). No obstante, los estudios de toxicidad en vegetales son escasos (Pinochet *et al.* 1999) y en particular, no existen estudios genotóxicos en esta zona de estudio. Por lo anterior en esta investigación se evaluó la genotoxicidad y la fitotoxicidad de suelos agrícolas contaminados con cobre sobre *Vicia faba*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suelo fueron tomadas de cinco sitios cercanos a actividades mineras de cobre en la cuenca del río Aconcagua, Región de Valparaíso, Chile (Fig. 1).

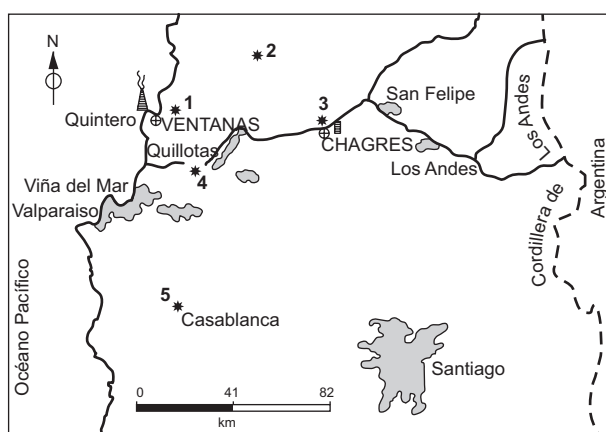


Fig. 1. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo. 1) Los Maitenes, Puchuncaví, 2) El Soldado, Nogales, 3) Catemu, Chagres, 4) Relave mina Navío, Quillota y 5) Casablanca. Las muestras de suelo se tomaron hasta una profundidad de 20 cm después de haber removido la vegetación. Fueron transportadas en bolsas de plástico al laboratorio para su caracterización fisicoquímica y bioensayos de genotoxicidad.

Se determinó la concentración total y biodisponible del cobre mediante espectrofotometría de absorción atómica. Además se determinó el pH, la conductividad eléctrica y la materia orgánica según Sadzawka *et al.* (2004). La preparación de los extractos de suelos se realizó de acuerdo con Steinkellner *et al.* (1998). Se pesaron 500 g de suelo seco y se les agregó 500 mL de agua destilada, se dejaron reposar por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se volvieron a añadir 500 mL de agua destilada para nuevamente agitar y dejar reposar por 24 h más. Finalmente la mezcla fue filtrada con un embudo Büchner y una bomba de vacío.

Para determinar la fitotoxicidad y la genotoxicidad se realizaron los siguientes procedimientos: Primero se seleccionaron semillas de *Vicia faba* de igual tamaño y aspecto para luego sumergirlas en un recipiente con agua corriente para estimular su germinación (Castillo 2004). Posteriormente por cada tratamiento (cinco extractos de suelo, un testigo negativo con agua potable y un testigo positivo con As_2O_3 a 10 mg/L) se consideraron 10 repeticiones con una semilla cada una, las que se depositaron en cajas de Petri con algodón embebido con 5 mL de extractos de suelos (Huillan *et al.* 2007). Para registrar la tasa de germinación, las semillas se mantuvieron por un periodo de tres días en oscuridad a 21 ± 2 °C. Para determinar la longitud de las raíces de las semillas que germinaron se utilizó una regla de material flexible dado la curvatura que presentan en esta etapa de crecimiento. Posteriormente las raíces se sumergieron directamente en los extractos y testigos mencionados por otros tres días a temperatura ambiente. Para los análisis del índice mitótico (IM) y frecuencia de micronúcleos (MN), las raíces fueron fijadas con etanol-ácido acético en una proporción de 3:1 en oscuridad a 4 °C durante 18 h. Después fueron rehidratadas con etanol al 70 % a 4 °C, luego hidrolizadas con HCl 5N por 6 min a 60 °C y teñidas con orceína acética al 1 % por 45 min. Se aplicó la técnica de aplastamiento en monocapa para evitar la sobre posición de las células al momento de la observación al microscopio óptico según Prieto-García *et al.* (2006).

Se examinaron 1000 células por raíz obtenida en cada tratamiento (Huillan *et al.* 2007). La identificación de los MN se realizó según los criterios utilizados por Koppe (2002). La frecuencia de MN se obtuvo a partir de la fórmula utilizada por Palma (2005), donde se registró el número de células con MN y se dividió por el número total de células contadas multiplicado por 100. El IM se determinó de acuerdo con Díaz *et al.* (2008) y Manier *et al.* (2009).

El porcentaje de germinación se calculó según Njoku *et al.* (2008) dividiendo el número de semillas germinadas por el número de semillas expuestas multiplicado por 100.

Para el análisis estadístico se realizaron correlaciones de Pearson y un análisis de varianza de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según de Gregori *et al.* (2003), las concentraciones de cobre total en suelos que están sobre los 100 mg/kg se consideran críticas. En este estudio, los suelos 1, 2, 3 y 5 sobrepasan este valor (**Cuadro I**). Dichos suelos corresponden a la Fundición Chagres, al Relave El Navío, al Puchuncaví y a El Soldado, respectivamente y se caracterizan por ser zonas en las que se generan residuos que contienen metales como el cobre, entre otros (**Fig. 1**). Las concentraciones de cobre totales y solubles fueron similares a las reportadas por Novoa *et al.* (2010). Además, las concentraciones de cobre total en el suelo 3 coinciden con estudios de González *et al.* (2008), lo que se explicaría por las emisiones de la chimenea y depósitos de escoria de la Fundición Ventanas (González e Ite 1992).

El pH, la conductividad eléctrica y la materia orgánica son factores que afectan el grado de solubilización de los metales o la capacidad reguladora del suelo y en consecuencia su biodisponibilidad. Por lo anterior es importante tomar en cuenta estos factores ya que los vegetales utilizados en este tipo de investigaciones se ven afectados por ellos (**Cuadro I**).

CUADRO I. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SUELOS

Suelos	Cobre total (mg/kg)	Cobre soluble (mg/kg)	pH	Conductividad eléctrica (µs/cm)	Materia orgánica (% masa seca)
4	31.7	3.7	6.6	122	7.7
1	382	5	7.8	226	4.9
5	452	4.4	7.7	707	5.7
3	789	5.95	5.8	170	3.0
2	7658	19	6.3	1578	2.2

Los suelos 1 y 5 son considerados alcalinos y los suelos 2, 3 y 4 ligeramente ácidos. Los suelos 1, 4 y 5 presentan altas concentraciones de materia orgánica en comparación con los suelos 2 y 3. La conductividad eléctrica es mayor en los suelos 1, 3 y 4 en comparación con el 2 y el 5.

En relación con el porcentaje de germinación de las semillas expuestas a los extractos (**Fig. 2**), el suelo 3 presentó el menor porcentaje comparado con el testigo negativo en más de un 50 %. Esto podría deberse al bajo contenido de materia orgánica y pH, que aumentarían la biodisponibilidad del cobre en el extracto. Sin embargo, la variación de este parámetro no fue significativa entre los suelos 1, 2, 4 y 5 y el testigo positivo, pero sí hubo diferencias significativas entre todos los suelos y el testigo negativo. Esto sugiere que el parámetro de porcentaje de germinación es sensible a la presencia de agentes químicos solubles en el extracto. Lo que difiere con lo señalado por Iannacone y Alvarino (2005), quienes lo consideran un parámetro menos sensible que el crecimiento de raíces y además multifactorial. La diferencia de resultados con el presente estudio puede deberse a la variabilidad interespecífica entre plantas ya que Iannacone y Alvarino utilizaron otras especies: *Allium cepa*, *Beta vulgaris*, *Oriza sativa* y *Raphanus sativa* sobre las que determinaron la toxicidad de mercurio, plomo y cobre.

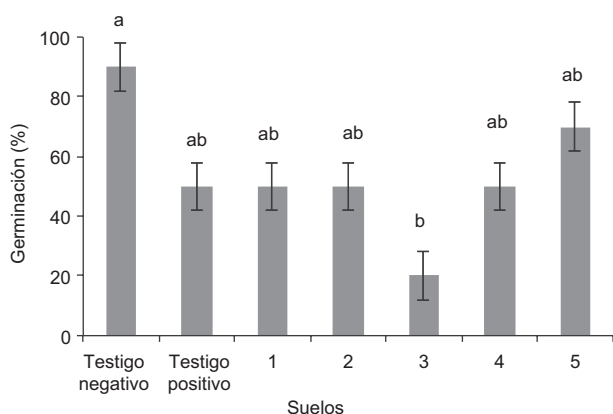


Fig. 2. Porcentaje de germinación de semillas de *Vicia faba* expuestas a los extractos de suelos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos

Respecto a la longitud de las raíces (**Fig. 3**) se observaron diferencias significativas entre el testigo negativo y los suelos 2 y 4. Estos suelos presentaron las raíces con menor crecimiento en comparación con el resto de los tratamientos. En particular el suelo 2

tiene la mayor concentración de cobre soluble, lo que podría explicar el menor crecimiento de sus raíces. En un estudio donde se expusieron tomates y cebadas a altas concentraciones de cobre en suelos disminuyó el crecimiento de las raíces en los brotes de cebada (Rooney *et al.* 2006, Prieto-Méndez *et al.* 2009). Por otra parte, Ginocchio y Narváez (2002) expusieron plantas de *Noticastrum sericeum* a un sustrato líquido con soluciones de cobre y obtuvieron una inhibición en el crecimiento de las raíces primarias, lo que es similar a lo ocurrido en el suelo 2 de este estudio.

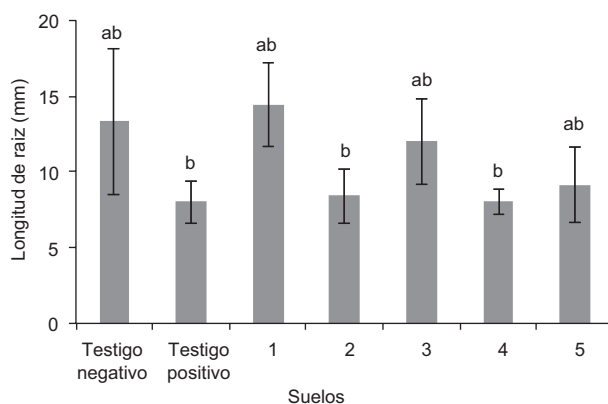


Fig. 3. Longitud de la raíz de semillas de *Vicia faba* expuestas a los extractos de suelos. Letras distintas muestras diferencias significativas

En el suelo 4 se observa la menor longitud de la raíz, a pesar de que es el que presenta la menor concentración de cobre soluble. Esto se podría deber a la presencia de otros agentes químicos que inhiben el crecimiento como otros metales traza asociados a la minería del cobre que no fueron medidos en este estudio. Los suelos 1, 3 y 5 no presentaron diferencias significativas en el crecimiento de las raíces al compararse con el testigo negativo, pero sí se observaron diferencias con el testigo positivo.

En cuanto al IM hubo diferencias significativas entre los suelos 2, 4 y 5 (**Fig. 4**) con respecto al testigo positivo incluso en menos de un 50 %. En relación con el testigo negativo hubo diferencias significativas respecto a los suelos 1, 3 y 5. Según Manier *et al.* (2009) se considera que el cobre presente en los extractos de los suelos genera un efecto tóxico sobre las raíces primarias de *Vicia faba*. En un estudio realizado por Yildiz *et al.* (2009) se produjo una inhibición significativa en el IM de plantas de *Allium cepa* a las 24 y 48 h de exposición a soluciones de cloruro de cobre y cloruro de cobalto, respectivamente. Los suelos 1 y 3 presentaron valores mayores respecto a este parámetro,

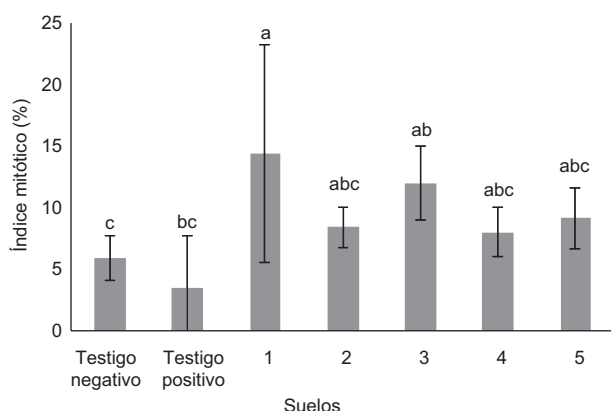


Fig. 4. Índice mitótico en raíces de *Vicia faba* expuestas a los extractos de suelos. Letras distintas muestran diferencias significativas

por lo que se considera que las raíces de estas plantas se vieron menos afectadas por las concentraciones de cobre en los extractos de los suelos.

En la **figura 5** se presentan las frecuencias de MN encontrados por efecto de la exposición a suelos contaminados con cobre. Los suelos 2 y 3 con las mayores concentraciones de cobre soluble fueron los que presentaron también las mayores frecuencias de MN. Por otra parte los suelos 1 y 4 con las menores concentraciones de cobre soluble fueron los que obtuvieron una menor frecuencia de MN. En un estudio realizado por Souguir *et al.* (2008) la frecuencia de MN resultó proporcional a la presencia de sulfato de cobre adicionado a cultivos hidropónicos de *Vicia faba* y *Pisum sativum*. Por ello el cobre podría ser considerado como inductor de efectos clastogénicos en estos bioensayos. Dichos efectos son producidos principalmente por la afinidad de los metales hacia los grupos tiol, lo que provoca desórdenes tanto en el

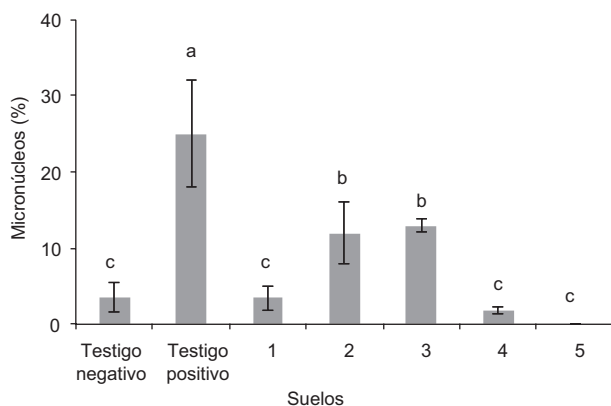


Fig. 5. Frecuencia de micronúcleos en raíces de *Vicia faba* expuestas a extractos de suelos. Letras distintas muestran diferencias significativas.

aparato mitótico (Kranner y Colville 2011) como en los cromosomas. Estos desórdenes se ven reflejados a nivel celular como MN, fragmentos y puentes en anafase (Souguir *et al.* 2008).

En cuanto al suelo 5 no se observó presencia de MN, lo que podría deberse a la baja concentración de cobre soluble y al alto porcentaje de materia orgánica presente en este suelo. Este último factor resulta con mayor relevancia en la determinación de la biodisponibilidad del cobre en los suelos debido a la formación de complejos que persisten por largos periodos de tiempo disminuyendo la fracción disponible para las plantas (Reichman 2002). No obstante se observaron MN en el testigo negativo con el cual no hubo diferencias significativas. Lo cual habla de un bajo nivel basal de MN.

Las células meristemáticas pueden ser afectadas por agentes genotóxicos y manifestar alteraciones en la mitosis que son irreversibles (**Fig. 6**). Los daños producidos en el ADN, además pueden ser explicados por el aumento de especies reactivas del oxígeno y formación de radicales libres durante el tiempo de exposición de las raíces a los extractos de suelos (Rucinska *et al.* 2004).

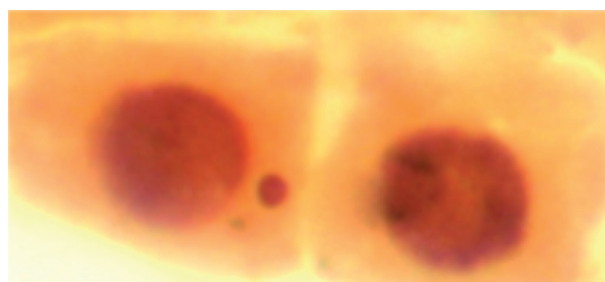


Fig. 6. Célula con micronúcleo (MN)

En cuanto a las relaciones entre las variables respuesta y los parámetros físicoquímicos de los suelos, sólo se encontró una relación significativa entre el IM y la concentración de cobre soluble, lo cual indicaría que la respuesta podría estar determinada por las interacciones entre los parámetros como el pH y la materia orgánica (**Cuadro II**).

CONCLUSIONES

Algunos de los suelos estudiados presentaron genotoxicidad, lo que generó un incremento de MN en *V. faba*. No se encontraron relaciones significativas entre las concentraciones de metales y la respuesta de *V. faba*, excepto entre el cobre soluble y el IM. Esto sugiere la necesidad del uso de herramientas

CUADRO II. REGRESIÓN LINEAL ENTRE LAS VARIABLES RESPUESTA Y LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS SUELOS

	Germinación (%)	Longitud de la raíz	MN	IM
Cu soluble	$y = -0.0775x + 10.607$ $R^2 = 0.07$ $p = 0.85$	$y = -0.5027x + 10.83$ $R^2 = 0.08$ $p = 0.98$	$y = 0.5963x + 2.9875$ $R^2 = 0.25$ $p = 0.41$	$y = -5.5414x + 17.24$ $R^2 = 0.67$ $p = 0.04$
Cu total	$y = -22.252x + 2776$ $R^2 = 0.03$ $p = 0.97$	$y = -57.577x + 2066.2$ $R^2 = 0.00$ $p = 0.87$	$y = 339.57x - 357.95$ $R^2 = 0.38$ $p = 0.28$	$y = -1939x + 5365.5$ $R^2 = 0.39$ $p = 0.17$
pH	$y = -0.0695x + 9.52$ $R^2 = 0.31$ $p = 0.12$	$y = -0.5628x + 10.725$ $R^2 = 0.51$ $p = 0.17$	$y = -0.0198x + 5.8111$ $R^2 = 0.00$ $p = 0.09$	$y = -2.1435x + 9.9156$ $R^2 = 0.51$ $p = 0.67$
Conductividad eléctrica	$y = -1.8091x + 566.67$ $R^2 = 0.00$ $p = 0.58$	$y = -24.592x + 686.73$ $R^2 = 0.02$ $p = 0.88$	$y = 42.29x + 229.29$ $R^2 = 0.15$ $p = 0.56$	$y = -426.37x + 1305.7$ $R^2 = 0.48$ $p = 0.19$
Materia orgánica (%)	$y = -0.034x + 5.7867$ $R^2 = 0.08$ $p = 0.44$	$y = -0.4147x + 7.619$ $R^2 = 0.31$ $p = 0.67$	$y = -0.2409x + 5.2717$ $R^2 = 0.23$ $p = 0.054$	$y = -1.5343x + 6.9342$ $R^2 = 0.29$ $p = 0.97$

biológicas para determinar los efectos del suelo sobre las especies vegetales que reciben los residuos contaminados con diversos metales.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto Fondecyt N° 1130041 y a la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso.

REFERENCIAS

- Abaye D.A., Lawlor K., Hirsch P.R. y Brookes P.C. (2005). Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. *Eur. J. Soil Sci.* 56, 93-102.
- Ávila G., Gaete H., Morales M. y Neaman A. (2007). Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42, 435-441.
- Badilla-Ohlbaum R., Ginocchio R., Rodríguez P., Céspedes A., González S., Allen H.E. y Lagos G.E. (2009). Relationship between soil copper content and copper content of selected crop plants in central Chile. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2749-2757.
- Cataldo J., Hidalgo M.E., Neaman A. y Gaete H. (2011). Use of molecular biomarkers in *Eisenia foetida* to assess copper toxicity in agricultural soils affected by mining activities. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 11, 57-70.
- Castillo G. (ed.) (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización,

- intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. 189 pp.
- Citterio S., Aina R., Labra M., Ghiani A., Fumagalli P., Sgorbati S. y Santagostino S. (2002). Soil genotoxicity assessment: a new strategy based on biomolecular tools and plant indicators. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2748-2753.
- De Gregori I., Fuentes E., Rojas M., Pinochet H. y Potin-Gautier M. (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.
- Díaz M., Ronco A. y Pica Y. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L. mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, la experiencia en México (P. Ramírez y A. Mendoza Eds.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México, pp. 33-40.
- Gaete H., Hidalgo M., Neaman A. y Ávila G. (2010). Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quím. Nova.* 33, 566-570.
- Ginocchio R. y Narváez J. (2002). Importancia de la forma química y de la matriz del sustrato en la toxicidad por cobre en *Noticastrum sericeum* (less.) Less. *Ex Phil. Rev. Chil. Hist. Nat.* 75, 603-612.
- Ginocchio R., Sánchez P., De la Fuente L., Camus I., Bustamante E., Urrestarazu P., Torres J. y Rodríguez P. (2006). Agriculture soils spiked with copper minewastes and copper concentrate: implications for

- copper bioavailability and bioaccumulation. Environ. Toxicol. Chem. 25, 712–718.
- González S. e Ite R. (1992). Acumulación metálica en suelos del área bajo influencia de las chimeneas industriales de Ventanas (Provincia de Valparaíso, Quinta región). Agr. Tec. 52, 214–219.
- González I., Muenia V., Cisternas M. y Neaman A. (2008). Acumulación de cobre en una comunidad vegetal afectada por contaminación minera en el Valle de Puhuncaví, Chile central. Rev. Chil. Hist. Nat. 81, 279–291.
- Hajjouji H.E., Pinelli E., Guiresse M., Merlina G., Revel J-C. y Hafidi M. (2007). Assessment of the genotoxicity of olive mill wastewater (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. Mutat. Res. 634, 25–31.
- Huillan Y., Lihua W. y Lin J. (2007). Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. Sci. Total Environ. 383, 232–236.
- Iannacone J. y Alvarino L. (2005). Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. Agr. Tec. 65, 198–203.
- Koppe C. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutat. Res. 518, 145–150.
- Kranner I. y Colville L. (2011). Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. Environ. Exp. Bot. 72, 93–105.
- Manier N., Deram A., Le Curieux F. y Marzin D. (2009). Comparison between new wild plant *Trifolium repens* and *Vicia faba* on their sensitivity in detecting the genotoxic potential of heavy metal solutions and heavy metal-contaminated soils. Water Air Soil Poll. 202, 343–352.
- Njoku K.L., Akinola M.O. y Oboh B.O. (2008). Germination, survival and growth accessions of *Glycine max* L. (merril) (soybean) and *Lycopersicon esculentum* L. (tomato) in crude oil polluted soil. Res. J. Environ. Toxicol. 2, 77–84.
- Novoa D., Palma S. y Gaete H. (2010). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus* sp. Inoculation on alfalfa growth in soils with copper. Chil. J. Agr. Res. 70, 259–265.
- Palma S. (2005). Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el río Traiguén. Tesis de Licenciatura en Recursos Naturales. Facultad de Ciencias, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile, 130 pp.
- Pinochet H., De Gregori I., Lobos M.G. y Fuentes E. (1999). Selenium and copper in vegetables and fruits grown on long-term impacted soils from Valparaíso region, Chile. B. Environ. Contam. Tox. 63, 327–334.
- Prieto-García F., Lechuga M.A., Méndez-Marzo M., Barado E. y Gaytán J. (2006). Daños tóxicos en tejidos vegetales producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. Cienc. Tecnol. Aliment. 26, 94–97.
- Prieto-Méndez J., González C., Román A. y Prieto-García F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropical and Subtropical Agroecosystems 10, 29–44.
- Reichman M.S. 2002. The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. Australian Minerals and Energy Environment Foundation. Melbourne, Victoria, Australia, 9 pp.
- Rooney C.P., Zhao F.J. y McGrath S.P. (2006). Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. Environ. Toxicol. Chem. 25, 726–732.
- Rucinska R., Sobkowiak R. y Gwozdz E.A. (2004). Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay. Cell. Mol. Biol. Lett. 9, 519–528.
- Sadzawka A., Grez R., Mora M.L., Saavedra N., Carrasco M. A. y Rojas C. (2004). Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación, Sociedad Chilena del Suelo. Chile, 113 pp.
- Souguir D., Ferjani E., Jedoigt G. y Goupil P. (2008). Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. Protoplasma 233, 203–207.
- Staykova T., Ivanova E. y Velcheva I. (2005). Cytogenetic effect of heavy-metal and cyanide in contaminated waters from the region of southwest Bulgaria. J. Cell Mol. Biol. 4, 41–46.
- Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma Ch., Ecker S., Te-Hsiu M., Horak O., Kundi M. y Knasmueller S. (1998). Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. Environ. Mol. Mutagen. 31, 183–191.
- Yildiz M., Hakki Cig-Ercil., Konuk M., Fatih Fidan A. y Hakan T. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere 75, 934–938.