



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Trabajo Final de la carrera Ingeniería Agronómica

“EFECTO DEL ACIDO SALICILICO SOBRE PLANTAS DE PIMIENTO (*CAPSICUM ANNUUM*) MICORRIZADAS, EN PRESENCIA DE METALES PESADOS EN EL SUELO.”

Trabajo Final conjunto de las Alumnas:

Alumnas:	Bernardo, Valeria.	Collado, Florencia.
DNI:	35.234.343	34.958.992
Legajo N°:	26376/2	26153/8
e-mail:	mve.bernardo@hotmail.com	florenciacollado_60@hotmail.com
Teléfono:	1166443461	2910470651
Directora:	Ing. Agr. MSc María Cecilia Arango	
Codirectora:	Ing. Ftal. MSc Marcela F. Ruscitti	

La Plata, 8 de Junio de 2016.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Toxicidad por metales pesados (MP) en las plantas.....	6
Acido salicílico.....	9
Importancia de las micorrizas vesículo-arbusculares.....	10
Hipótesis	14
Objetivo general	15
Objetivos particulares:.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Parámetros determinados:	17
RESULTADOS Y DISCUSION	22
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

Los metales pesados pueden acumularse en el suelo como consecuencia de la acción antrópica o debido a factores naturales afectando el crecimiento de las plantas. La simbiosis que se establece entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares ha demostrado mejorar la tolerancia de las plantas a distintas situaciones de estrés, entre las que se destacan la toxicidad por metales pesados, constituyéndose en una herramienta potencial para el manejo de plantas cultivadas bajo estas condiciones. También se ha reportado que el ácido salicílico (AS), regulador de crecimiento vegetal, incrementa la productividad de cultivos hortícolas.

Se estudió el efecto del AS en situaciones de estrés por cobre en plantas de pimiento no micorrizadas y micorrizadas con *Funneliformis mosseae*. Se evaluaron las siguientes concentraciones de cobre: 0; 0,1 y 1 mM ($\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en plantas asperjadas con 0; 200 y 500 μM de AS. Se determinó % de micorrización, % de viabilidad, altura, peso seco, área foliar, conductividad relativa de las membranas celulares (CR), contenido de malonildialdehído (MDA), prolina y proteínas de hoja y raíz, y clorofila. Los datos se analizaron por ANOVA. Tanto la altura como el peso seco y el área foliar disminuyeron al aumentar la concentración de Cu y las plantas inoculadas fueron superiores a las no inoculadas en todos estos parámetros. La CR de las raíces alcanzó valores próximos al 12%, mientras que en hojas con la mayor concentración de cobre en la solución, la CR alcanzó valores del 26%, en comparación con el control, evidenciando mayor daño en las membranas. Las plantas micorrizadas presentaron menor concentración de MDA que las no micorrizadas, tanto en hojas como raíces. El contenido de proteínas fue mayor en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. Se comprobó que el contenido de proteínas disminuyó frente al estrés por cobre tanto en hojas como raíces. El AS mostró respuestas variables según el parámetro analizado, habiendo una mayor respuesta en parámetros morfológicos.

INTRODUCCIÓN

Argentina es el principal productor de pimiento en Sudamérica, ocupando una superficie que varía año a año de 3000 a 6000 has. La producción se extiende desde la provincia de Jujuy hasta Río Negro. Las principales zonas productoras de pimiento para consumo en fresco, tanto al aire libre como en invernadero, son Buenos Aires, Salta y Corrientes (Del Pino, 2016).

El Cinturón Hortícola de La Plata (CHLP), localizado en la periferia de la ciudad de La Plata, constituye el área productiva más importante del Cinturón Verde Bonaerense con el 46,15% de la superficie productiva total y el 25,15% de la superficie hortícola total de la Provincia de Buenos Aires. El 100% de la producción en el Partido tiene como destino el consumo en fresco, abasteciendo de hortalizas frescas al área metropolitana comprendida por más de 13 millones de habitantes (INDEC, 2010). El pimiento, ocupa el tercer lugar de la superficie plantada en el CHLP con 177,604 has y una producción aproximada de 9.535,242 tn, después de la lechuga y el tomate (Del Pino, 2016).

En el CHLP el 40% de la superficie se destina a cultivos protegidos (invernaderos) y el resto está ocupado por cultivos a campo. En general, las unidades de producción tienen una superficie media de 5,1 ha y se llaman "Quintas" (Stavisky, 2010; García, 2012).

Capsicum annuum L. conocido en Argentina como "Morrón", pertenece a la familia Solanáceas. Es una planta herbácea, perenne, de cultivo generalmente anual y porte variable, entre los 0,5 metros (en determinadas variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 m (híbridos cultivados en invernadero). Tiene un sistema radicular pivotante y profundo que puede llegar hasta 1,2 m y provisto de un número elevado de raíces adventicias superficiales. El patrón de crecimiento es simpodial que se mantiene mientras las condiciones ambientales lo permitan. El fruto es una baya hueca y semicartilaginosa, de color forma y tamaño diversos (Del Pino, 2016).



Foto 1: Plantas de *Capsicum annuum* L. en invernadero.
(Fuente: <http://www.ahernseeds.com>)

Los suelos más adecuados para su cultivo son profundos, con buen drenaje y pH 7. Es medianamente tolerante a la salinidad: a partir de 2,5 ms/cm de CE ocurren importantes pérdidas de rendimiento (Berrios Ugarte et al., 2007).

Con respecto a la ecofisiología, la germinación se produce entre 20-25 °C. El crecimiento vegetativo posee temperatura base de 10°C y demanda entre un 50-70% de humedad relativa. La inducción floral es por suma térmica y la diferenciación responde a la amplitud térmica (Del Pino, 2016).

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

Las plantas están sujetas a numerosos estreses ambientales que afectan el metabolismo, el crecimiento y el rendimiento. Los estreses en general pueden inducir distintos efectos sobre las plantas dependiendo de su duración y severidad, del genotipo y

estado de desarrollo del cultivo (Beltrano et al., 2003). La adaptación a situaciones de estrés involucra cambios bioquímicos y fisiológicos que son el resultado de la interacción del ambiente con los genes, modificando su expresión. Un estrés biótico o abiótico activa una cascada de eventos tales como una reducción en el crecimiento celular, inhibición en la síntesis proteica y la represión y/o activación de la actividad enzimática. La respuesta presente en todos los niveles es la inducción de la expresión de genes específicos, cuyos productos son esenciales para la modulación de la respuesta (Marmioli et al., 1993).

Toxicidad por metales pesados (MP) en las plantas

En los suelos pueden encontrarse concentraciones anormales de MP debido a factores naturales o antropogénicos. Las causas naturales pueden ser debidas a la actividad volcánica, procesos de formación de suelos, erosión de rocas, etc. Las causas antropogénicas se asocian principalmente a la actividad industrial y la actividad agropecuaria. Los suelos agrícolas en muchas partes del mundo están ligera a moderadamente contaminados por metales pesados como Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Plomo (Pb) y Arsénico (As), como consecuencia del uso prolongado de fertilizantes fosfatados, fungicidas, lodos de aguas residuales, residuos industriales y las prácticas de riego inapropiadas, generando una situación de estrés en las plantas cultivadas (Schwartz et al., 2003).

La toxicidad de los MP depende de la concentración, el estado de oxidación y la persistencia. Un elemento que en concentraciones traza es indispensable para los seres vivos, en altas concentraciones se convierten en un elemento tóxico. La concentración de un elemento está directamente relacionada con la persistencia del mismo, definiéndose a la misma como el tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica. Una de las características más relevantes de los MP es su tendencia a

bioacumularse, ya que no son biodegradables, lo que los transforma en peligrosos debido a su efecto sobre los organismos (Navarro Aviñó et al, 2007).

Entre los principales daños que pueden causar los MP se pueden mencionar:

1) inhibición de la actividad de las proteínas por alteración de la estructura de las mismas,

2) desplazamiento de elementos esenciales para el metabolismo generando deficiencias,

3) acción catalítica sobre los sistemas enzimáticos que generan moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) e inducen el estrés oxidativo, el cual provoca:

- Inactivación de proteínas y enzimas, fundamentalmente por la oxidación de los grupos sulfidrilos, que resulta en la formación de puentes disulfuro que provocan cambios conformacionales en la proteína, que se vuelve inactiva.

- Peroxidación de lípidos de membranas, conduciendo esto a la ruptura y con ello a la aparición de subproductos de las cadenas hidrocarbonadas (Demiral and Türkan, 2005).

- Oxidación de las cadenas de ADN, que pueden resultar en alteraciones como mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos y transformaciones celulares.

El Cu, es uno de los metales pesados más relevantes que afecta los suelos agrícolas, ya que está presente en la formulación de muchos fertilizantes y productos fitosanitarios (fungicidas), además, este elemento tiende a acumularse en los horizontes superficiales de los suelos (Kabata-Pendias, 2011).

El Cu es un micronutriente esencial de las plantas que es requerido como cofactor de enzimas vegetales, desarrollando un papel importante en diferentes procesos fisiológicos

claves como la respiración, la fotosíntesis, la reducción y fijación del nitrógeno, el metabolismo de las proteínas y de la pared celular. Participa también en el control de la permeabilidad del xilema; la regulación de la producción de DNA y RNA, y en reacciones de óxido-reducción, por lo que su deficiencia afecta al crecimiento y la reproducción de la planta (Kabata-Pendias, 2011). Sin embargo, se convierte en un metal tóxico cuando se encuentra en los tejidos en concentraciones más altas a las necesarias para el crecimiento vegetal ($>30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Este elemento promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en forma enzimática y no enzimática (a través de la reacción de Fenton), las cuales pueden causar la oxidación de proteínas y lípidos, alterar la integridad de las membranas, la fotosíntesis, el crecimiento e inducir la muerte celular (León Morales and Sepúlveda Jiménez, 2012).

El exceso de cobre puede producir efectos tóxicos sobre las plantas, inhibiendo el crecimiento de la parte aérea y de la raíz, causando clorosis de hojas e incrementando la liberación de electrolitos de las células por daño a las membranas celulares (Lidon and Henriques, 1992; Murphy and Taiz, 1997). Este metal tiende a acumularse en la raíz, con baja traslocación a la parte aérea provocando alteraciones en el crecimiento y la morfología de la raíz (Marschner, 1995). La sensibilidad de las plantas a los metales no depende solamente de la concentración sino también del estado de desarrollo de la planta al ser expuesta al mismo (Liu et al., 2005).

Debido a sus características de óxido-reducción, el cobre cataliza la formación de ROS provocando la oxidación de componentes celulares. Los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) producidos pueden iniciar la peroxidación de lípidos, modificando la estructura de las membranas celulares (Maksymiec et al., 1994). La peroxidación de lípidos producida por la presencia de estos radicales es una señal de la presencia de sustancias tóxicas en el medio. El último producto de la peroxidación lipídica es el malondialdehído o malonildialdehído (MDA). Entonces el incremento de MDA es un indicador de estrés

fisiológico y daño de las membranas celulares (Quariti et al., 1997). Numerosos estudios informan que los niveles de MDA se incrementan en plantas expuestas a tratamientos con MP (Ozounidou, 1994; Yurekli and Porgali, 2006). La síntesis de clorofila también es alterada por altas concentraciones de Cu, ya sea inhibiendo directamente una ruta enzimática o porque modifican la absorción de un nutriente importante. Altas concentraciones de Cu, Co, Pb y Cd causan una disminución en el contenido de clorofila y de proteínas en las plantas (Yurekli and Porgali, 2006).

Ácido salicílico

Las plantas tienen la capacidad de activar su sistema de defensa ante diversas situaciones de estrés, la Resistencia Sistémica Adquirida puede ser inducida por agentes bióticos (patógenos atenuados) o abióticos (compuestos químicos) y se asocia al incremento de la concentración de ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico, AS). El AS es un regulador endógeno del crecimiento de naturaleza fenólica, que participa en la regulación de numerosos procesos fisiológicos en las plantas (El-Khalla et al., 2009) y en sus mecanismos de defensa frente a un estrés biótico y abiótico (Shahba et al., 2010). Se lo encuentra en los tejidos en forma libre o en forma conjugada, al estado de glicósidos, ésteres, amidas y ácidos dihidroxibenzoicos. Se encuentra de forma natural en las plantas, juega un papel importante en cuanto al crecimiento y tolerancia al estrés, además de participar como parte de las señales internas que regulan la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos y plagas, y agentes abióticos (Guzmán-Téllez et al., 2011).

Diversos estudios han determinado la capacidad del AS en producir efectos protectores en las plantas sometidas a diferentes estreses abióticos, tales como calor, bajas temperaturas, salinidad, y metales pesados (Gunes et al., 2007; Chávez-Suarez et al., 2012).

Numerosos trabajos dan cuenta del efecto positivo del AS sobre la respuesta a metales pesados (Drazic and Mihailovic, 2005; Metwally et al., 2003). La función protectora del AS incluye principalmente la regulación del estrés oxidativo generado como consecuencia de la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados en el suelo (Metwally et al., 2003). Actúa como un regulador sobre el balance oxido/reducción de las células vegetales, induce respuestas adaptativas, fisiológicas y morfológicas en las plantas. Participa en la actividad de las catalasas y otras enzimas encargadas de controlar la oxidasa de las mitocondrias (Raskin, 1992). La aplicación exógena de AS podría proporcionar protección contra varios tipos de estreses tales como temperatura alta o baja, metales pesados, etc. Aunque el AS también puede causar estrés oxidativo en las plantas, parcialmente a través de la acumulación de peróxido de hidrógeno, los resultados publicados hasta el momento muestran que el tratamiento preliminar de las plantas con bajas concentraciones de AS podría tener un efecto de aclimatación, causando mayor tolerancia hacia la mayoría de los tipos de estreses abióticos, debido principalmente a una mejora en la capacidad antioxidante. El efecto de la aplicación exógena de AS depende de numerosos factores tales como la especie y la etapa de desarrollo de la planta, el modo de aplicación, la concentración de AS, y de su nivel endógeno en la planta. Los resultados recientes muestran que la aplicación exógena de AS reduce efectos moderados de estrés, pero a su vez, los factores de estrés abiótico pueden alterar los niveles endógenos de AS en las células vegetales (Horvath et al., 2007).

Importancia de micorrizas vesículo-arbusculares

La gran mayoría de las plantas captan los nutrientes por medio de interacciones que establecen con los microorganismos que viven en la rizosfera, especialmente con aquellos que se han denominado simbioses. De estos simbioses de la raíz, los hongos

formadores de micorrizas arbusculares (HMA), son las asociaciones más comunes que se establecen con la mayoría de las especies de plantas, y probablemente son, en abundancia, las más importantes (Sarabia Ochoa et al., 2010).

La micorrización es una interacción entre especies de hongos del orden Glomales y las raíces de la mayoría de las plantas. Esta estrategia evolutiva se conoce desde hace más de un siglo, aunque en las últimas décadas se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la horticultura, la agricultura y las forestaciones, para las que hay evidencias sobre su eficiencia (Pawlowska and Charvat, 2004; Ruscitti et al., 2011). Estos hongos son simbiontes obligados de las plantas superiores (Barea, 1991). La simbiosis facilita la captación de fósforo, un nutriente limitante en la mayoría de los suelos. También influye directa o indirectamente en la absorción de otros iones minerales (Nitrógeno (N), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn)). Promueven un mayor crecimiento de las plantas especialmente en aquellos suelos donde estos nutrientes son escasos. El hongo por su parte, depende completamente de la planta para obtener los carbohidratos que requiere para su desarrollo (Sarabia Ochoa et al., 2010). La importancia ecológica de las micorrizas arbusculares está avalada por su presencia en más del 95% de las especies vegetales. Entre las plantas que forman este tipo de asociaciones se encuentran la mayoría de las leguminosas herbáceas y muchas leñosas, los cereales, los frutales y la gran mayoría de los cultivos hortícolas (Quilambo, 2003).

Entre otras ventajas de esta asociación en los sistemas suelo-planta se ha estudiado la inducción de una mayor tolerancia/resistencia frente a distintos estreses bióticos y abióticos. Las micorrizas pueden conferir tolerancia a patógenos a través de diferentes mecanismos de acción (Linderman, 1992), entre los que se encuentran el micoparasitismo, la lisis enzimática, la antibiosis, la competencia por espacio o por nutrientes, y la inducción de resistencia en la planta. También se ha investigado el

incremento de la tolerancia de las plantas micorrizadas al estrés hídrico, salino, por deficiencia de nutrientes, exceso de metales pesados y sustancias fitotóxicas (Ruscitti et al., 2011; Kaya et al., 2009; Beltrano et al., 2013). Se ha descrito además que las micorrizas confieren tolerancia a pesticidas (Ocampo, 1993), herbicidas (Beltrano et al., 2013), o residuos de la industria petrolera (Cabello, 1997).

Los HMA también son utilizados para procesos de biorremediación ya que éstos pueden inmovilizar metales que pueden dañar a las plantas.

El proceso de colonización comienza con la germinación de las esporas que se encuentran en el suelo o en las raíces de las plantas, las que desarrollan uno o varios tubos germinativos formando el micelio externo, que se extiende hasta encontrar la raíz para colonizarla (Giovannetti et al., 1993). Cuando una hifa alcanza la superficie de la raíz forma una estructura llamada apresorio, producto de la ramificación y engrosamiento de la pared celular de la hifa. Luego la hifa penetra en la raíz de la planta. El proceso de colonización continúa con la formación de hifas intercelulares que colonizan la corteza radical, dando lugar a las estructuras características de esta simbiosis que son los arbusculos, ramificaciones dicotómicas repetidas de hifas intracelulares. Estas estructuras son las encargadas del intercambio bidireccional de nutrientes y carbono entre el hongo y la planta (Smith and Read, 1997). Junto al desarrollo del hongo dentro de la raíz se produce una proliferación de hifas en el suelo lo que constituye el micelio externo o extraradical fundamental para la adquisición de agua y nutrientes por la plantas, ya que permite explorar microhábitats del suelo inaccesibles para las raíces (Barea, 2000).

Algunos hongos micorrícicos producen también vesículas, estructuras que tienen como función el almacenamiento de sustancias, especialmente lípidos. Se forman en los extremos de las hifas inter o intracelularmente a medida que progresa la infección (Bécard

and Pfeffer, 1993). Algunas vesículas pueden transformarse en esporas para su propagación (Nasim, 2010).

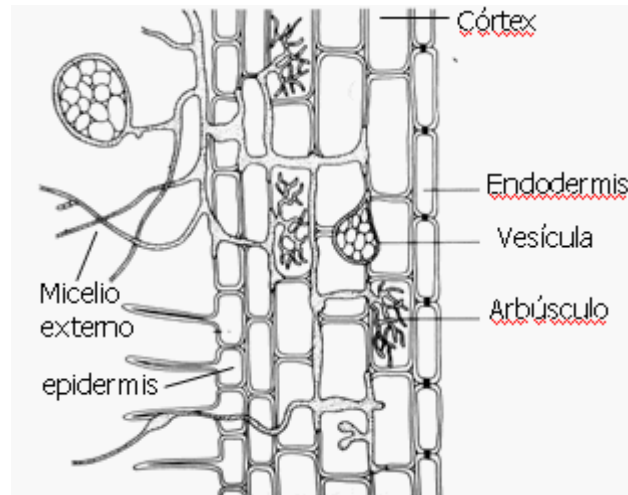


Figura 1. Micorrizas arbusculares en un corte longitudinal en raíz. (Imagen de Mauser, 1988).

La participación de las micorrizas en el metabolismo de los metales pesados ha sido propuesta como un mecanismo que incrementa la tolerancia de las plantas, en algunos casos los MP pueden ser absorbidos por las hifas de los hongos y transportados hacia la planta huésped (fitoextracción), en otros casos los hongos contribuyen a inmovilizarlos en el suelo (fitoestabilización) (Gaur and Adholeya, 2004).

La fitoextracción consiste en transferir los MP a las raíces o partes aéreas de las plantas con alta capacidad de almacenamiento. En general, estas plantas se caracterizan por la gran producción de biomasa. Consecuentemente, la remoción de grandes cantidades de biomasa conlleva la remoción de MP con la cosecha, que se puede utilizar para producir energía o almacenarse como materia seca reduciendo así su volumen (Kramer, 2005; Peuke and Rennenberg, 2005).

La fitoestabilización previene la difusión de los MP en el suelo, lo que es el resultado de la inmovilización que ejercen las raíces y los microorganismos. Las especies vegetales tolerantes a MP con extensos sistemas radicales previenen la difusión y además contribuyen a la fitoestabilización (Gaur and Adholeya, 2004).

Los HMA también contribuyen a la inmovilización de los MP en el suelo, empleando estrategias similares a las de su hospedante, es decir, inmovilizan los MP excretando compuestos como la glomalina, los adsorben a las paredes celulares fúngicas o los ligan a quelantes dentro del hongo (Gaur and Adholeya, 2004). La glomalina es una glicoproteína producida y liberada por el hongo que inmoviliza los MP en el suelo (Gonzalez-Chavez et al., 2004). Las hifas de los hongos tolerantes a MP tienen más afinidad a los metales que las células vegetales (Joner et al., 2000), por eso es probable que los metales queden inmovilizados dentro del hongo.

Con respecto a la importancia de la micorriza en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, se ha comprobado que esta simbiosis tienen un efecto benéfico, ya que inmoviliza los metales en la raíz, reduciendo su traslocación a la parte aérea de la planta y, en consecuencia, el flujo de metales a la cadena trófica (Barea et al., 1995; Leyval et al., 1995; Del Val et al., 1999; Pawlowska et al., 2000).

Hipótesis

La presencia de metales pesados (Cu) en el suelo afecta el crecimiento de las plantas de pimiento cultivadas. El establecimiento de la simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares reduce el efecto perjudicial de los MP en las plantas y la aplicación de ácido salicílico (AS) aumenta la tolerancia de las plantas de pimiento micorrizadas y no micorrizadas a los MP presentes en el suelo.

Objetivo general

Estudiar el efecto de la micorrización y las aplicaciones de AS en plantas de pimiento creciendo con elevadas concentraciones de cobre en el suelo, de modo de promover la utilización de técnicas amigables con el medio ambiente, con el objeto de crear nuevos paradigmas tecnológicos basados en la sustentabilidad de los sistemas productivos.

Objetivos particulares:

- Evaluar el crecimiento de plantas de pimiento en presencia de distintas concentraciones de cobre y determinar las respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.
- Evaluar la presencia y viabilidad de los hongos micorrícicos arbusculares en suelos con elevadas concentraciones de cobre.
- Cuantificar el efecto de la simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares en plantas de pimiento cultivadas en presencia de elevadas concentraciones de cobre, en base a parámetros morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares.
- Evaluar la respuesta de plantas micorrizadas y no micorrizadas a las aplicaciones exógenas de AS para morigerar el efecto perjudicial de elevadas concentraciones de cobre.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en condiciones de invernáculo en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP).

Condiciones de cultivo: las semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. Almuden fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en speedings de 250 cm³ de capacidad por celda, con una

mezcla tinalizada de perlita-vermiculita-arena (1:1:1). A la mitad de las celdas se le incorporó inóculo de *Funneliformis mosseae* (FM) y a la otra mitad inóculo inactivado (NM), para generar las mismas condiciones experimentales. Periódicamente las plantas fueron regadas con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland and Arnold, 1950).

Preparación del inóculo: se utilizó inoculante micorrícico producido a partir de cepas de *Funneliformis mosseae*, seleccionadas por su adaptación a altas concentraciones de metales pesados (Colección Instituto Spegazzini, UNLP). La propagación de las mismas se realizó utilizando como planta trampa trébol blanco (*Trifolium repens*), que se cultivó en un sustrato compuesto por perlita-vermiculita-arena (1:1:1), previamente tinalizado (100°C durante 1 hora por día, tres días consecutivos), en cámaras de crecimiento (25 +/- 2 °C, fotoperíodo de 16 horas y 350 $\mu\text{moles. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) durante 60 días.

Tratamientos realizados: cuando las plantas presentaron dos hojas expandidas (40 DDS) se comenzó con los tratamientos de ácido salicílico (AS), por aspersión hasta llegar al punto de goteo en la superficie de las hojas, una vez por semana. Las concentraciones utilizadas fueron 0 μM , 200 μM y 500 μM . Se preparó una solución madre de concentración 10 mM de AS, de la cual se tomaron 7mL para la concentración de 200 μM y 17,5 mL para la concentración de 500 μM , llevando a 350 mL con agua destilada más el agregado de Tween 20 como emulsionante.

Los tratamientos de Cu fueron 0, 0,1 y 1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Para ello se preparó una solución madre de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ de concentración 250 mM.

A los 60 días después de la siembra, se comenzó con los tratamientos de Cu incorporando 0 y 0,1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ para inducir el estrés, y luego se subió la concentración del metal a 1 mM. Se regó una vez por semana con solución nutritiva y las correspondientes soluciones de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.

De esta forma quedaron definidos los siguientes tratamientos:

A- Plantas no inoculadas (control)

1- Cultivadas con 0 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Asperjadas con 0 μM , 200 μM y 500 μM de ácido salicílico

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

Asperjadas con 0 μM , 200 μM y 500 μM de ácido salicílico

3- Cultivadas con 1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Asperjadas con 0 μM , 200 μM y 500 μM de ácido salicílico

B- Plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae*

1-Cultivadas con 0 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Asperjadas con 0 μM , 200 μM y 500 μM de ácido salicílico

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

Asperjadas con 0 μM , 200 μM y 500 μM de ácido salicílico

3- Cultivadas con 1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Asperjadas con 0 μM , 200 μM y 500 μM de ácido salicílico

Parámetros determinados:

▪ A partir de los 80 días después de la siembra (DDS) se midió semanalmente la altura de las plantas y el índice de verdor con un medidor Minolta SPAD.

▪ A los 80 DDS y al final del ensayo (110 DDS) se determinó el peso seco por planta (PS), mediante secado en estufa a 80°C hasta peso constante y área foliar mediante un scanner y un software para análisis de imágenes.

▪ A los 80 y 110 DDS se tomaron muestras para determinar los siguientes parámetros

- **Estimación del contenido de clorofila**

El contenido de clorofila y carotenoides se determinó a partir de un disco de hoja de 0,5 cm de diámetro. Se utilizó N, N-Dimetilformamida como solvente de extracción, determinando la absorbancia de la solución a las longitudes de onda 647, 664 y 480 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 A. El cálculo del contenido de pigmentos se realizó de acuerdo a Wellburn (1994) con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 12 \times \text{Ab } 663.8 - 3.11 \times \text{Ab } 646.8$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 20.78 \times \text{Ab } 646, - 4.88 \times \text{Ab } 663.8$$

$$\text{C total a+b } (\mu\text{g cm}^{-2}) = 17.67 \times \text{Ab } 646.8 + 7.12 \times \text{Ab } 663.8$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g cm}^{-2}) = (1000 \times \text{Ab } 480 - 1.12 \text{ Ca} - 34.07 \text{ Cb}) / 245$$

- **Micorrización. Tinción de raíces micorrizadas**

Se seleccionaron en forma aleatoria fracciones de raíces no lignificadas y se procedió a clarificar y teñir según la técnica de Phillips and Hayman (1970). Las raíces se aclararon con KOH al 10% (p/v) (10 min., 100°C). Luego se lavaron tres veces con agua y se aplicó una solución de HCl 0,1N (5 min. a T^a ambiente). Finalmente se tiñeron con azul de tripán (5 min. a 95°C). El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los hongos micorrícicos arbusculares. Luego las raíces se conservaron en una solución de lacto-fenol.

Fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1cm de longitud, se montaron en portaobjetos añadiendo gotas de ácido láctico y se cubrieron con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, cada una de 10 fragmentos de raíz.

De cada muestra se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas). En los campos positivos se tuvo en cuenta el tipo de estructuras (arbusculos, vesículas, hifas) presente dentro de la raíz. El porcentaje de micorrización (M%) se calculó como la proporción de raíces infectadas sobre el número total de fragmentos de raíz observados, calculando también el porcentaje de arbusculos (% Ar) y vesículas (%V).

- **Viabilidad micorrícica (%SDH)**

La determinación de la viabilidad de las estructuras fúngicas se determinó a los 80 DDS, evaluando la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (% SDH), basada en el porcentaje de micorrización, de acuerdo al procedimiento descrito por Smith and Gianinazzi-Pearson (1990). Las raíces se colocaron en una solución 0,2 M de Tris-HCL, pH 7; 2,5 M de succinato de sodio.6H₂O; 5 mM de MgCl₂ y 4 mg/mL de nitroblue tetrazolium. Los fragmentos de raíces se tiñeron en oscuridad durante 18 hs a temperatura ambiente, y luego se aclararon con una solución de hidrato de cloral al 75%. Finalmente se tiñeron con una solución de fucsina-ácida al 0,01% en ácido láctico durante 8 min a 90 °C. Los fragmentos de raíces teñidos con fucsina-ácida, se dispusieron en portaobjetos de la misma manera que aquellos teñidos con azul de tripán, y se cuantificó el % de raíces que presentaban actividad observándose las estructuras viables del hongo, coloreadas de azul.

- **Dependencia micorrícica (DM)**

Se estimó de acuerdo a Plenchette et al., (1983). Este índice permite evaluar la eficiencia de la micorrización en la producción de biomasa, al relacionar el peso seco total de las plantas micorrizadas y no micorrizadas de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$MD = \frac{\text{PS de las plantas micorrizadas} - \text{PS de las plantas no micorrizadas}}{\text{PS de las plantas micorrizadas}} \times 100$$

PS de las plantas micorrizadas

- **Conductividad relativa de las membranas celulares de hojas y raíces**

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

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

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

- **Contenido de malonildialdehído (MDA)**

Se evaluó según el método de Heath and Packer (1968), como un indicador de la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. Se tomaron 200 mg de peso

fresco de hoja y raíz, y se maceraron con 1 mL de ácido tricloroacético al 0,1%, luego se centrifugaron. A 1 mL de sobrenadante se le agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1 %, se centrifugó y al sobrenadante se le agregó 1 ml del reactivo TCA-BHT-TBA (TCA 20%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,37% y butilhidroxitolueno (BHT) 0,01 g) seguidamente, los tubos se incubaron durante 30 minutos a 95°C. Pasado este período, se introdujeron en un baño de hielo para enfriarlos y detener la reacción y luego se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Finalmente, se separó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 UV/V. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de $155\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$:

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

- **Contenido de proteínas solubles**

El contenido de proteínas solubles se determinó a partir de 200 mg de la última hoja expandida o igual peso de raíz, de acuerdo al método de Bradford (1976). Los tejidos se homogeneizaron en un mortero con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1% a pH 7,5) a 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 20 μl del sobrenadante y se le agregó 1 ml del reactivo Bradford (Azul Brillante de CoomassieG-250 0,021% (p/v) etanol 4,7% (p/v) y ácido fosfórico 8,5% (p/v)) se agitó en vórtex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectuó empleando una curva patrón preparada con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, SiFMA Chemical Co).

- **Contenido de prolina**

Según el método de Bates et al., (1973), para la determinación de prolina se homogeneizaron 100 mg de material fresco de hoja y de raíz con 2 ml de una solución al 3 % de ácido sulfosalicílico. El homogeneizado se centrifugó a 12000 g por 15 minutos. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se lo hizo reaccionar con 1 ml del reactivo Ninhidrina ácida y 1 ml de ácido acético glacial en un tubo de 15 ml, en baño maría a 100°C durante una hora. Al cabo de ese lapso la reacción se interrumpió enfriando el tubo rápidamente. A la mezcla reaccionante anterior se le agregó 2 ml de tolueno y se agitó durante 15 a 20 segundos en vórtex. Se dejaron separar las fases y se tomó la fase acuosa conteniendo el cromóforo tolueno-prolina y se leyó la absorbancia a 520 nm usando tolueno como blanco.

Se calculó el contenido de prolina por unidad de peso fresco según:

$$\mu\text{moles prolina.g-1PF} = [(\mu\text{g prolina/ml} \times \text{ml tolueno})/115.5 \mu\text{g}/\mu\text{moles}] / [(g \text{ PF})/5]$$

- **Análisis estadístico**

El ensayo se realizó siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado, con tres repeticiones. Los datos se analizaron por ANOVA y las medias se compararon usando LSD ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

La actividad industrial, la minería o el uso continuo de fungicidas con base de cobre llevan a una acumulación en exceso de este metal en el suelo. Con el objetivo de ayudar a reducir estos inconvenientes, se vienen buscando y desarrollando tecnologías que sean más amigables con la naturaleza y así poder reducir la contaminación del medio ambiente. Las asociaciones de plantas con los microorganismos del suelo, donde se incluyen los hongos micorrícicos arbusculares, pueden modificar la respuesta a un estrés

por metales pesados, aumentando la tolerancia ante un suelo contaminado por los mismos (Göhre and Paszkowski, 2006). También se ha estudiado el rol del ácido salicílico en respuesta a estreses bióticos y abióticos, entre los que se incluyen los metales pesados.

- **Determinación del % de micorrización, viabilidad micorrícica y dependencia micorrícica**

En la primera extracción, realizada a los 80 días después de la siembra (DDS) se cuantifico el porcentaje de raíces colonizadas por el hongo micorrícico inoculado, con azul de tripán, siendo este valor superior al 77% en todos los tratamientos; sin diferencias significativas con el cobre ni con la concentración de AS. Se observó una disminución de la viabilidad de los hongos micorrícicos, evaluada a través de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, a medida que aumento la concentración de Cu en la solución, no existiendo esta misma respuesta en cuanto al aumento de la concentración de AS (Tabla 1). Esto indica que altas concentraciones de cobre en el suelo afectan la viabilidad del hongo micorrícico.

Tabla 1: Porcentaje de micorrización (%M) y viabilidad micorrícica (% SDH) en los diferentes tratamientos de Cu y AS determinado a los 80 DDT.

Cu mM	AS μM	% SDH	% M
	0 AS	88aA	95aA
0 Cu	200 AS	75aA	87aA
	500 AS	66aA	77aA
	0 AS	55aB	82aA
0,1 Cu	200 AS	48aB	78aA
	500 AS	56aA	85aA
	0 AS	55aB	81aA
1 Cu	200 AS	56aB	90aA
	500 AS	67aA	96aA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de AS para cada concentración de Cu. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos de Cu para cada concentración de AS.

En la segunda extracción a los 110 DDS, se cuantificó el porcentaje de las distintas estructuras del hongo (arbúsculos, vesículas, hifas) presentes dentro de la raíz. Se observó una disminución significativa de estas estructuras con el aumento de la concentración de Cu. El porcentaje de hifas disminuyó un 51% con 0,1 mM de Cu y 77% con 1 mM de Cu con respecto al control. Lo mismo sucedió con el porcentaje de arbúsculos, donde las plantas sometidas a estrés con 0,1 y 1mM de Cu redujeron este porcentaje en un 40% y 96% respectivamente, con respecto al control sin Cu. También hubo una disminución del porcentaje de vesículas, pero de menor magnitud siendo de un 7% y 20% menor en las plantas con 0,1 y 1 mM de Cu respectivamente con respecto al control. Estos datos coinciden con lo expuesto por Ruscitti et al., (2011) quienes revelaron la sensibilidad a la toxicidad con Cr mediante la reducción de la formación de arbúsculos, seguido de la reducción de la formación de vesículas, mientras que la formación de hifas

se vio menos afectada (Tabla 2). En cuanto a la viabilidad, determinada por la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, se presentó una merma importante en las plantas sometidas a estrés por Cu con respecto al control. En los tratamientos con 0,1 mM de Cu la viabilidad de las estructuras fue un 74% menor que las presentes en las plantas sin Cu y en los tratamientos con 1mM fue un 88% menor (Foto 2).

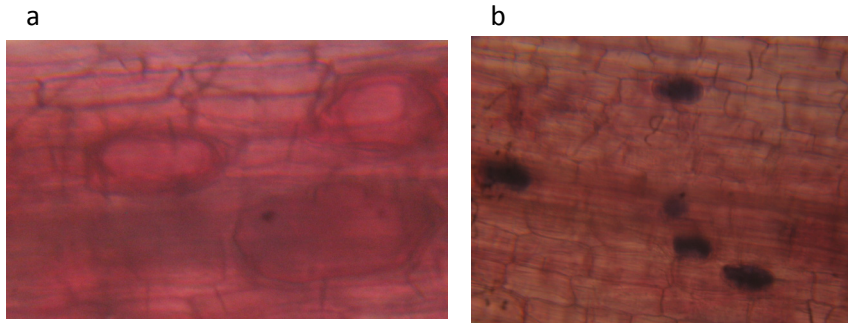


Foto 2. Raíces de pimiento micorrizadas teñidas con Fucsina ácida y NBT. a) Vesículas inactiva, b) Vesículas activas.

Tabla 2: Porcentaje de hifas (H), arbusculos (% Ar), vesículas (%V), viabilidad micorrícica (% SDH) y dependencia micorrícica en plantas micorrizadas, en los diferentes tratamientos de Cu y AS, determinada a los 110 DDT.

Cu mM	AS µM	% H	% AR	% V	%SDH	%DM
0 Cu	0 AS	62aA	28aA	80aA	90aA	-
0 Cu	200 AS	44aA	5bA	70aA	81aA	-
0 Cu	500 AS	34aA	20aA	85aA	87aA	-
0,1 Cu	0 AS	20aB	20aA	78aA	19aB	6,2bA
0,1 Cu	200 AS	27aAB	6bA	68aA	13aB	38,6aB
0,1 Cu	500 AS	22aA	6bB	73aAB	35bB	50,3aA
1 Cu	0 AS	5aB	0aB	61aA	14aB	0,06bB
1 Cu	200 AS	12aB	2aA	66aA	9aB	78,4aA
1 Cu	500 AS	7aB	0aB	60aB	8aC	65,3aA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de AS para cada concentración de Cu. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos de Cu para cada concentración de AS.

Entre las dos determinaciones realizadas se pudo observar una reducción del % de micorrización en los tratamientos sometidos a estrés con Cu. Estos resultados han sido reportados por diversos autores (Marques et al., 2007; Andrade et al., 2008). Según Jamal et al., (2002), la colonización micorrícica a menudo es reducida en suelos contaminados por metales pesados. Varios metales pesados son fungitóxicos, razón por la cual reducen la germinación de las esporas, el crecimiento micelial y, consecuentemente, la colonización micorrícica. No obstante, Hildebrandt et al., (1999) no hallaron una disminución significativa en la colonización micorrícica de plantas creciendo en suelos contaminados, siendo incluso en algunos casos mayor. Estas variaciones probablemente dependan de las especies de hongos y de las plantas hospedantes involucradas, como así también de las propiedades del suelo. Joner and Leyval (2001) afirmaron que los HMA pueden subsistir en suelos altamente contaminados con metales pesados.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos afirmar que el pimiento es una especie micotrófica, con alto porcentaje de micorrización con el inóculo utilizado en este trabajo, *Funneliformis mosseae*. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente, donde la micorrización fue también elevada (Ruscitti et al., 2011; Rabie, 2005).

Evaluación de parámetros morfológicos

- Altura de las plantas

Las plantas control presentaron mayor altura, representada por un valor de incremento diario superior, en comparación con aquellos tratamientos en donde se les indujo estrés con la adición de Cu al sustrato. Las plantas micorrizadas presentaron mayor altura que aquellas no micorrizadas en los tratamientos con Cu. En los tratamientos con 0,1 mM y 1 mM de Cu las plantas micorrizadas aumentaron su altura significativamente con respecto a las no micorrizadas cuando fueron asperjadas con AS. En las plantas no micorrizadas no se observaron diferencias significativas para las distintas concentraciones de AS utilizadas, mientras que en las micorrizadas se observó que las plantas sometidas a 1 mM de Cu y asperjadas con 200 y 500 μ M de AS presentaron un incremento diario de 112 y 125 % superior, con respecto a las que no recibieron AS respectivamente (Figura 2).

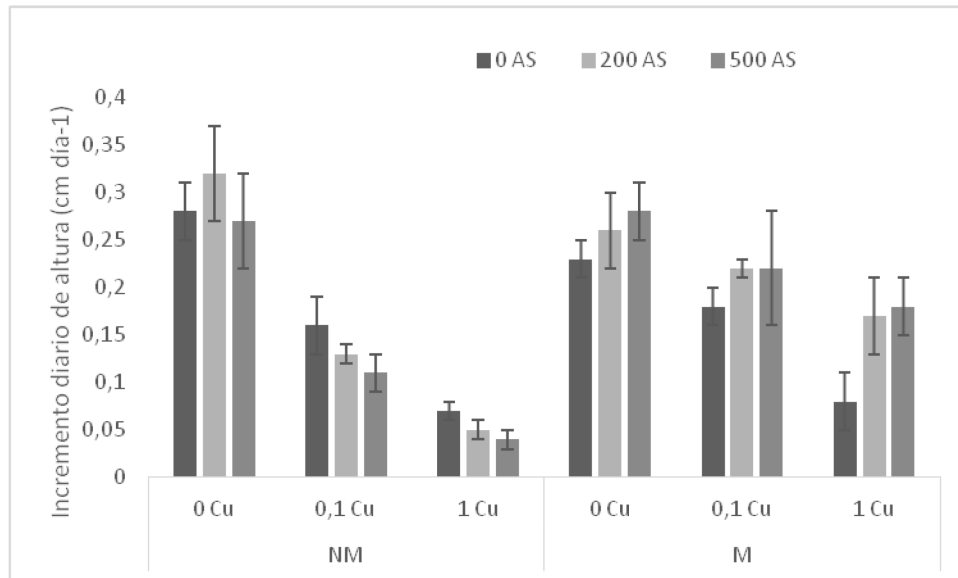


Figura 2. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el incremento diario de altura entre la primer y última medición en plantas de pimienta inoculadas (M) y no inoculadas (NM). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu.; 0 AS: 0 μ M AS; 200 AS: 200 μ M AS; 500 AS: 500 μ M AS.

En el análisis de varianza, en las plantas NM se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con Cu, mientras que no hubo diferencias significativas entre las distintas dosis AS aplicadas. Las plantas micorrizadas también presentaron diferencias significativas en los tratamientos con Cu y a su vez, solo las plantas sometidas a 1mM de Cu presentaron diferencias entre los distintos tratamientos con AS, siendo mayor la altura de aquellas plantas asperjadas con 200 y 500 μ M de AS. Con 0 mM de Cu no hubo diferencias significativas entre plantas micorrizadas y no micorrizadas.

Estos resultados concuerdan con distintos ensayos realizados por otros autores en donde la altura y otros parámetros de crecimiento se vieron afectadas por la presencia de metales pesados en el suelo, siendo menor el efecto del estrés en plantas que fueron inoculadas con micorrizas (Ruscitti et al., 2011). Esta mayor tolerancia a metales pesados puede estar relacionada a que las micorrizas aumentan la absorción y la acumulación de MP en las raíces evitando su traslocación hacia la parte aérea. El aumento de la

tolerancia de las plantas micorrizadas hacia los MP se observó en diferentes especies, como el maíz, la cebada y el centeno (Hildebrandt et al., 1999; Gaur and Adholeya, 2004).

- **Peso seco**

En el análisis de varianza de la primera extracción sin cobre se observó que no existieron diferencias significativas en el peso seco entre plantas micorrizadas y no micorrizadas, y entre las concentraciones de AS, por lo cual no se muestran datos.

En la segunda extracción realizada a los 110 DDS, con la máxima concentración del metal, el peso seco total disminuyó tanto en las plantas no micorrizadas como en las micorrizadas, respecto del control libre de Cu. Hubo una disminución del peso del 80% en las plantas no micorrizadas y alrededor del 20% en las micorrizadas, respecto a los testigos.

También se pudo observar que en los tratamientos de 1mM de Cu, las plantas asperjadas con 500 μ M de AS incrementaron significativamente el peso seco con respecto a las testigos sin AS (Figura 3).

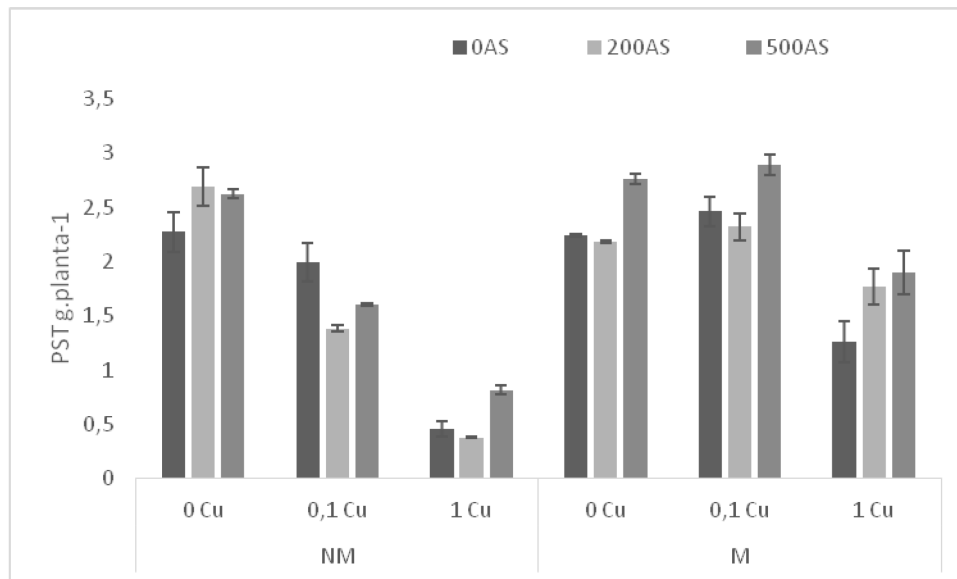


Figura 3. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el peso seco (PS) de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μ M AS; 200 AS: 200 μ M AS; 500 AS: 500 μ M AS.

Rabie (2005) determinó, en ensayos de trigo y poroto colorado micorrizados con *Glomus mosseae* y expuestos a cobre, que la simbiosis disminuía el efecto negativo del cobre sobre el peso. Novoa and Palma (2010) obtuvo resultados similares a los del presente estudio utilizando plantas de alfalfa como huésped, inoculadas con *Glomus spp.* En un trabajo similar López-Bucio et al., (2003) encontraron que, si bien los HMA no tuvieron un efecto protector hacia el Cr en el tamaño de la raíz, ésta fue más robusta, con mayor número de raíces laterales, lo que se reflejó en un mayor peso seco. Se ha reportado que en condiciones de estrés las raíces en vez de aumentar su longitud se vuelven más ramificadas y de mayor biomasa, lo que les permite tener una mejora en su capacidad de absorción y tolerancia al estrés.

Es posible que los altos porcentajes de colonización por HMA encontrados en este trabajo en las plantas de pimiento hayan sido un factor importante en los efectos

benéficos que permitieron proteger a las plantas del efecto del Cu, logrando una mejor supervivencia y un mayor crecimiento.

- **Área foliar**

El análisis de varianza de área foliar en la primera extracción sin cobre no mostró diferencias significativas en las plantas micorrizadas y las concentraciones de AS por lo que no se muestran datos.

En la última extracción se pudo observar mayor área foliar en las plantas micorrizadas en comparación con las no micorrizadas, siendo significativamente superior en el tratamiento de 1mM Cu, donde las plantas micorrizadas presentaron más del doble (153cm^2) del área foliar de las no micorrizadas (67 cm^2). Se observó el efecto del Cu sobre la disminución del área foliar en comparación con el control, siendo 60% menor en plantas no micorrizadas, y 49% menor en plantas inoculadas. Esto concuerda con lo experimentado por diversos autores (Lidon and Henriques, 1992; Murphy and Taiz, 1997) que comprobaron que el exceso de cobre produce efectos tóxicos sobre las plantas, inhibiendo el crecimiento de la parte aérea. Las plantas micorrizadas mostraron una respuesta positiva a la aplicación de AS, siendo más evidente en 1 mM de Cu (Figura 4).

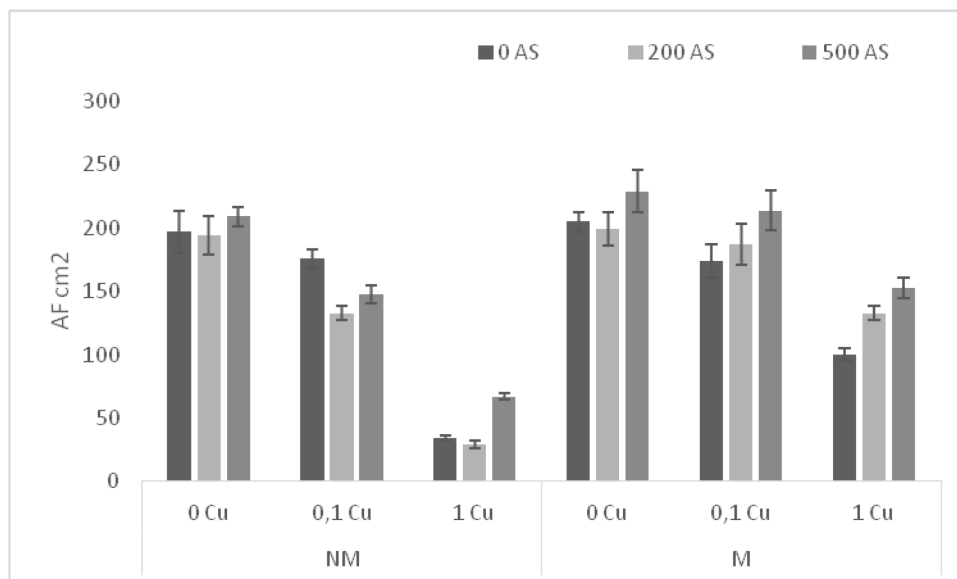


Figura 4. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el área foliar (AF) de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μ M AS; 200 AS: 200 μ M AS; 500 AS: 500 μ M AS.

Estos resultados se condicen con Guzman Tellez et al., (2011) quienes aseguran que en ausencia de estrés el efecto del ácido salicílico dependerá de la concentración con que se aplique y de la especie vegetal, encontrándose en ocasiones ausencia de efectos como sucede en los tratamientos testigos. En general, el uso de AS en forma de aspersión foliar muestra beneficios sobre el crecimiento de las partes aéreas de las plantas en situaciones en que ocurre algún factor causante de estrés.

- Tasa de crecimiento relativo (TCR) (g / día)

No se observaron diferencias significativas en la TCR entre plantas micorrizadas y no micorrizadas cuando crecieron sin Cu en el sustrato, mientras que las inoculadas superaron en forma significativa a la no inoculadas con 0,1 y 1mM de Cu. A su vez las plantas asperjadas con concentraciones de 200 y 500 μ M de AS mostraron mayor tasa de crecimiento relativo en las plantas inoculadas con *F. mosseae* (Figura 5).

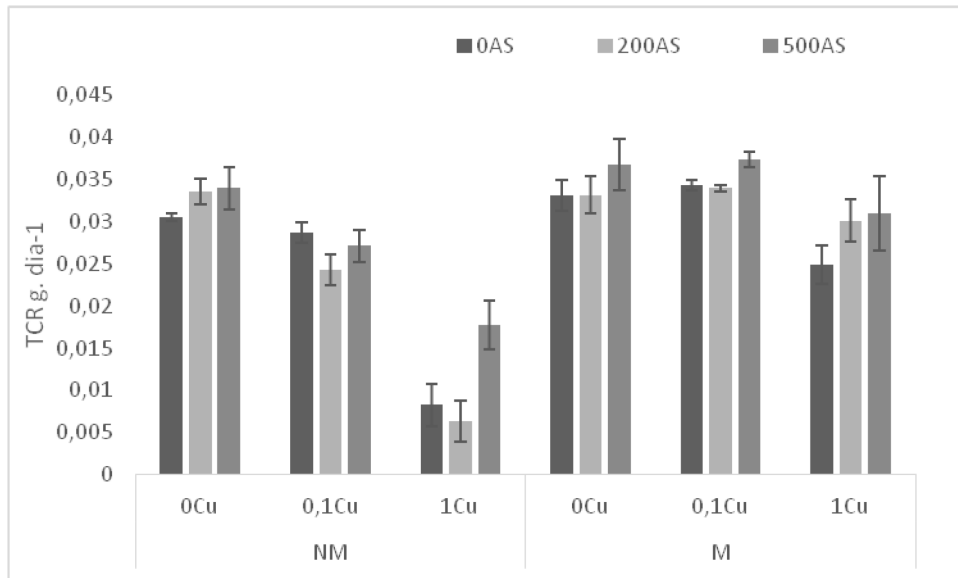


Figura 5. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre la tasa de crecimiento relativo de plantas de pimiento no inoculadas (NM) e inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μ M AS; 200 AS: 200 μ M AS; 500 AS: 500 μ M AS).

El cobre es un micronutriente, pero al aumentar su concentración, se torna fitotóxico (Demirevska-Kepova et al., 2004; Vaillant et al., 2005). Los resultados de los parámetros morfológicos evaluados concuerdan con los de Ruscitti et al., (2011) en ensayos efectuados con pimiento y cromo.

La reducción del crecimiento de plantas sometidas a un estrés por metales pesados ha sido relacionada al daño de las estructuras moleculares y supramoleculares y cambios fisiológicos debido a un estrés oxidativo (Lombardi and Sebastiani, 2005).

- **Clorofila**

Para evaluar de manera indirecta cambios en la actividad fisiológica de las plantas sometidas a estrés, se determinó el índice de verdor utilizando un medidor SPAD marca

Minolta y el contenido de clorofila. La coloración de las hojas se relaciona directamente con su cantidad de clorofila y de nitrógeno.

El análisis de la varianza, que permite discriminar el efecto de cada factor y las interacciones entre ellos, mostró diferencias significativas en la micorrización y en la interacción de micorrizas x concentración de Cu de las plantas muestreadas a los 80 DDS. Se pudo observar un mayor contenido de clorofila en las plantas micorrizadas, no habiendo diferencias en los tratamientos de Cu y AS (Figura 6).

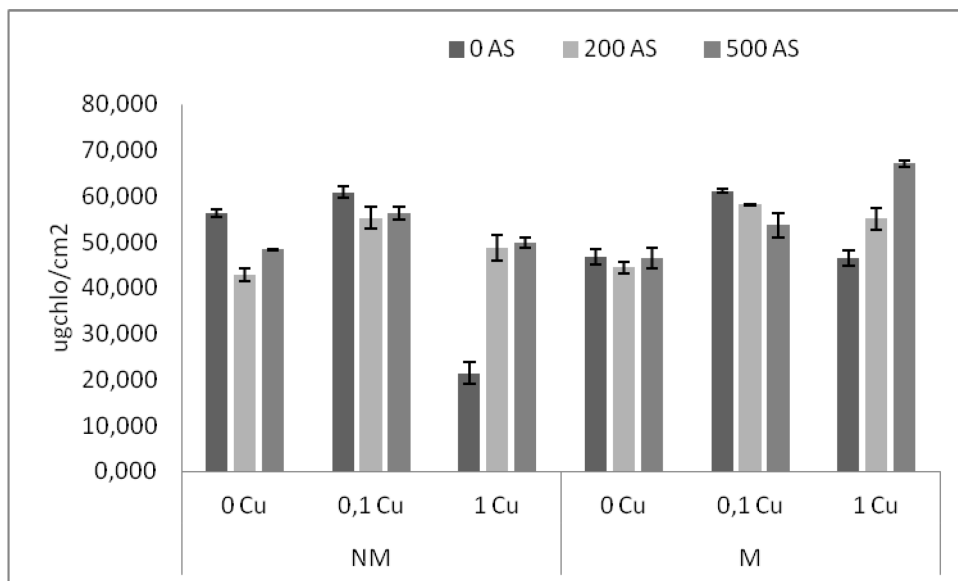


Figura 6. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el índice de verdor, medido con SPAD, de plantas de pimiento no inoculadas (NM) e inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 µM AS; 200 AS: 200 µM AS; 500 AS: 500 µM AS

En la extracción realizada a los 110 DDS el análisis de varianza del índice de verdor mostro diferencias significativas en los tres tratamientos, y en la interacción micorrización x cobre, y micorrización x AS.

En la Figura 7, se observa que hubo un mayor índice de verdor asociado, al contenido de clorofila, en las plantas micorrizadas. A su vez, se visualiza que en condiciones de estrés con Cu, las plantas micorrizadas presentaron un mayor contenido de clorofila que las no micorrizadas.

Los resultados de la influencia del AS con este parámetro, no coinciden con lo que describe Popova et al., (2003); Singh and Usha (2003), quienes observaron que frente a condiciones de estrés, aquellas plantas que fueron asperjadas con AS mostraron un mayor contenido de clorofila frente a las no tratadas.

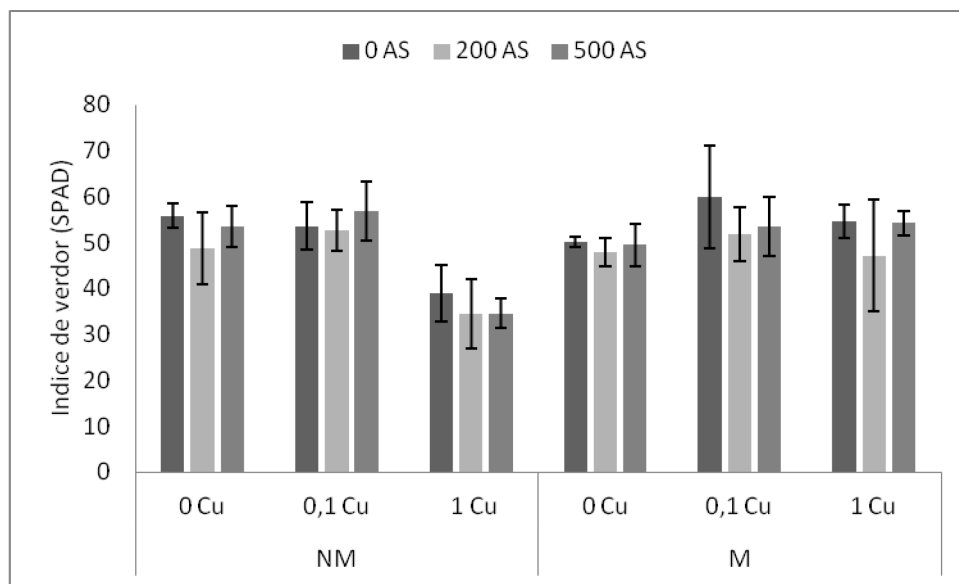


Figura 7. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el índice de verdor, medido con SPAD, de plantas de pimiento no inoculadas (NM) e inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μM AS; 200 AS: 200 μM AS; 500 AS: 500 μM AS.

Nuestros resultados coinciden con Yurekli and Porgali (2006) quienes encontraron que la síntesis de clorofila es alterada por altas concentraciones de Cu, como se observó en las plantas no micorrizadas con 1mM de Cu. Esto puede ser el resultado de la inhibición de una enzima de su ruta biosintética o por la modificación de la absorción de

un nutriente importante (Fe). El Cu, Co, Pb y Cd causan una disminución en el contenido de clorofila y de proteínas en las plantas.

También se ha encontrado que el contenido de clorofila y las proteínas se redujeron con el aumento de la concentración de Cr (Ruscitti et al., 2011). Mientras tanto, el efecto moderador de los HMA, como una posible expresión de la acción protectora contra el estrés por metales pesados, fue mayor en las más altas concentraciones de Cr, evitando la degradación tanto de clorofila como de proteínas, de acuerdo con Ruscitti et al., (2011). Abdul Razak (1985) determinó una disminución de la actividad fotosintética y en la síntesis de clorofila por la acumulación de metales pesados.

- **Determinación contenido de malondialdehído (MDA)**

Durante la primera extracción, frente al estrés causado por Cu, no se observaron diferencias entre los tratamientos micorrizados y no micorrizados, observándose variabilidad en la respuesta de los distintos tratamientos frente a la aplicación exógena de AS.

El análisis de varianza de la segunda extracción indica que hay diferencias significativas en la cantidad de MDA en hojas con respecto a los tratamientos de Cu y AS, no habiendo diferencias significativas entre plantas NM y M, mientras que si se encontraron diferencias significativas en la interacción entre las tres variables (Figura 8). Con 0,1mM de Cu las plantas M y asperjadas con AS superaron en un 33% a las que no recibieron AS.

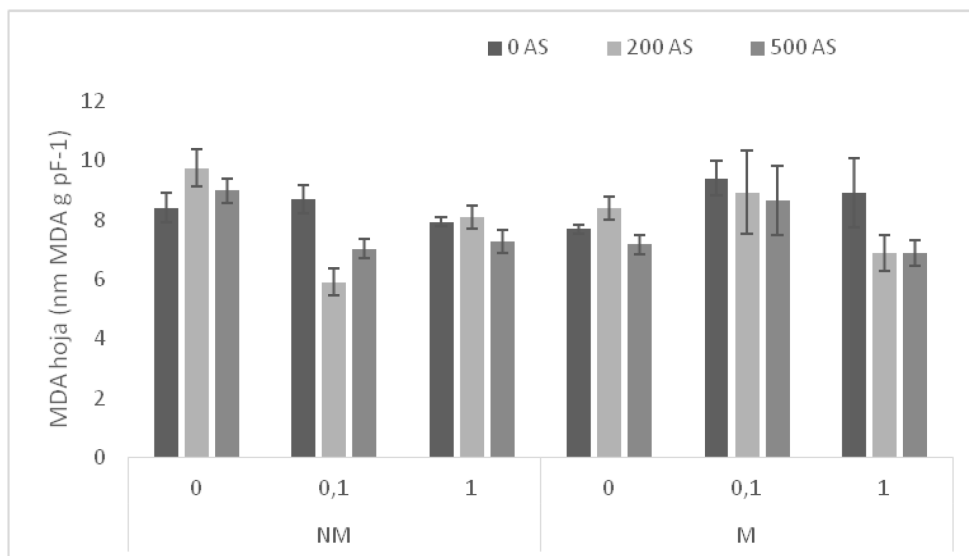


Figura 8. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el contenido de MDA de hojas de plantas de pimienta no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μM AS; 200 AS: 200 μM AS; 500 AS: 500 μM AS.

La concentración de MDA es un indicador del estrés oxidativo (Garita, 2011). En la Figura 9 se puede observar un aumento de los valores de MDA en raíces en plantas sometidas a estrés con respecto al control, tanto en las NM como en las M, lo que sugiere un efecto de estrés oxidativo del Cu, que aumenta la actividad de enzimas lipoxigenasas, que catalizan la peroxidación de lípidos tal como lo encontrado por Ahmad et al., (2010). Además numerosos estudios informan que los niveles de MDA se incrementan en plantas expuestas a tratamientos con MP (Ozounidou, 1994; Yurekli and Porgali, 2006).

La producción de ROS como consecuencia de un estrés por concentraciones tóxicas de Cu puede dañar las membranas tilacoidales y alterar el transporte de electrones (Lombardi and Sebastiani, 2005).

Las micorrizas introdujeron diferencias significativas en los niveles de MDA en hoja. Los tratamientos micorrizados mantuvieron menor concentración de MDA que los no inoculados.

En cuanto al AS, los resultados concuerdan con autores (Metwally et al., 2003) que describieron la función protectora del AS en la regulación del estrés oxidativo, generado como consecuencia de la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados en el suelo.

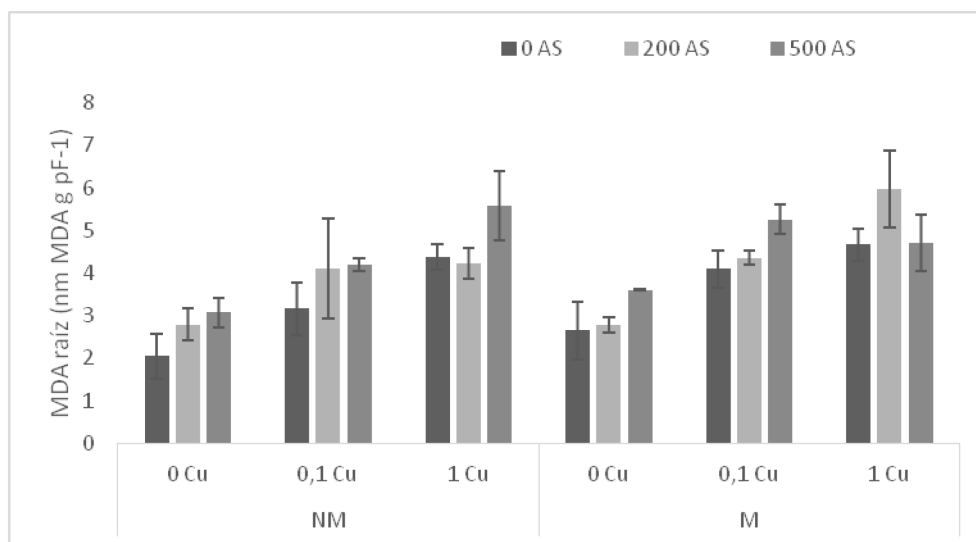


Figura 9. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el contenido de MDA de raíces de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μ M AS; 200 AS: 200 μ M AS; 500 AS: 500 μ M AS.

- Prolina

No se muestran datos porque no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica que ni el cobre ni el AS indujeron un ajuste osmótico.

- Conductividad relativa de hojas (CRH) y raíces (CRR)

La CRR mostró diferencias significativas entre las plantas NM y las inoculadas, como así también entre los tratamientos con Cu, no habiendo diferencias significativas para los tratamientos con AS. Las dos concentraciones de Cu aumentaron significativamente la

CRR en comparación con el tratamiento sin Cu. Las plantas inoculadas mostraron valores significativamente inferiores con 0,1 mM con respecto a la NM. No obstante los valores de CR de raíces fueron bajos, no superando el 15%, lo que indicaría que el daño de raíces no fue significativo (Figura 10).

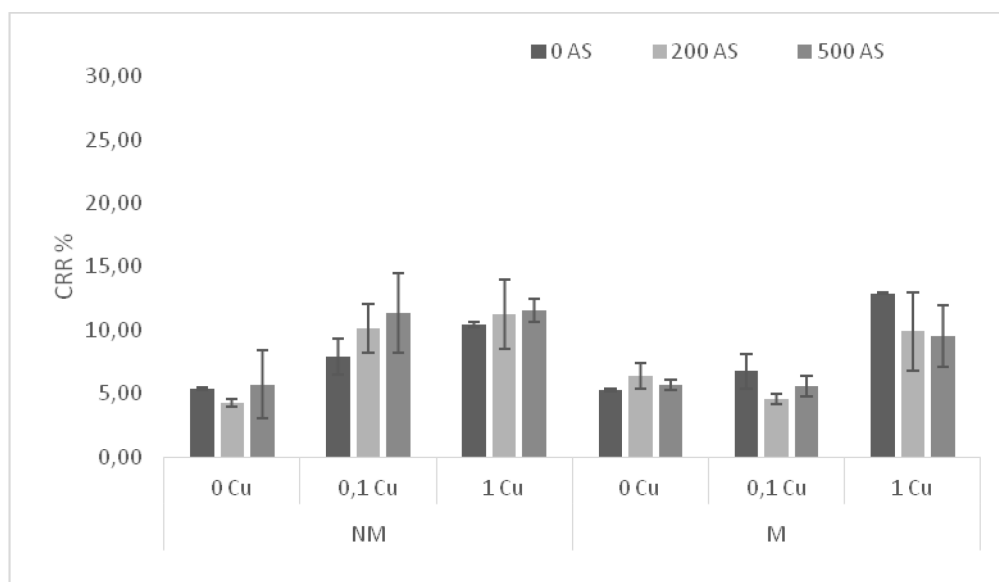


Figura 10. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre la conductividad relativa de raíces (CRR) de plantas de pimienta no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μ M AS; 200 AS: 200 μ M AS; 500 AS: 500 μ M AS.

La permeabilidad selectiva de las membranas celulares puede verse afectada por diversos factores ambientales y situaciones de estrés, alterando la integridad celular y la capacidad de retención de sustancias intracelulares (Beltrano et al., 2013).

En cuanto a la CRH, las plantas micorrizadas presentaron valores inferiores a las NM en todos los tratamientos de Cu, observándose una interacción significativa entre micorrización, Cu y AS. Con 0,1 Mm Cu la CRH disminuyó significativamente con la aplicación de AS (Figura 11).

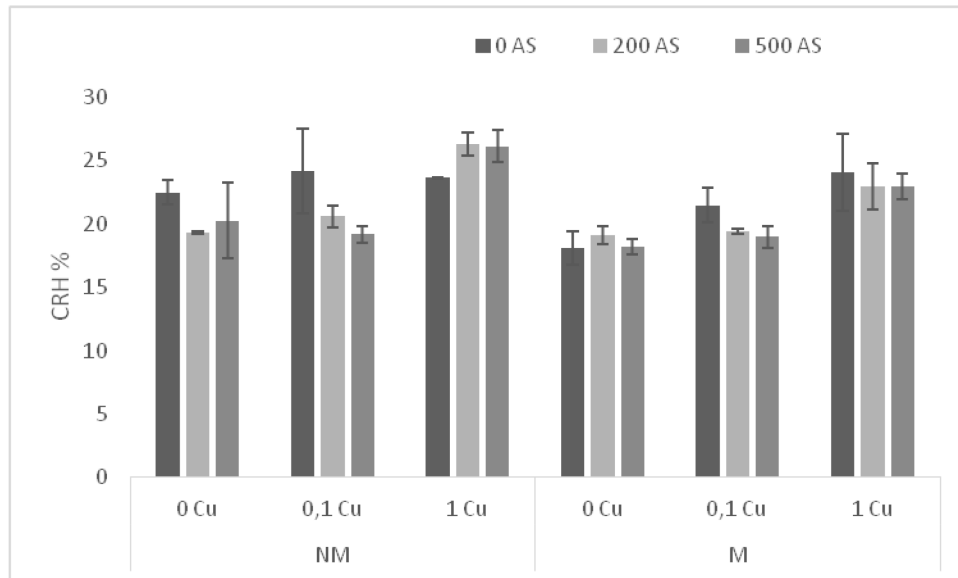


Figura 11. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre la conductividad relativa de hojas (CRH) de plantas de pimienta no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 μ M AS; 200 AS: 200 μ M AS; 500 AS: 500 μ M AS.

En contraste de lo sucedido con la CRR, en hojas, con la mayor concentración de cobre en solución, la CR alcanzó valores del 26%, evidenciando un mayor daño en las membranas.

Según Ruscitti et al., (2011) ensayando con cromo como metal pesado en las mismas condiciones, la CR en hoja, en cambio, no se modificó.

La simbiosis con hongos micorrícicos ejerció un efecto protector de la integridad de las membranas celulares de raíces y hojas coincidiendo con otros autores que mostraron que las plantas de pimienta bajo estrés salino inoculadas con HMA tuvieron una menor permeabilidad de la membrana que las plantas de pimienta no inoculadas (Kaya et al., 2009).

- Proteínas

En la extracción realizada a los 110 DDS, se pudo observar como el contenido de proteínas foliares fue mayor en plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas. A su vez se comprobó que disminuyó frente al estrés por cobre (Figura 12). Esto concuerda con Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi (1995); Andrade et al., (2008), que reportaron mayores niveles de proteínas foliares en las plantas micorrizadas.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en todos los tratamientos y en las interacciones entre los factores y en la triple interacción micorrización x AS x Cu.

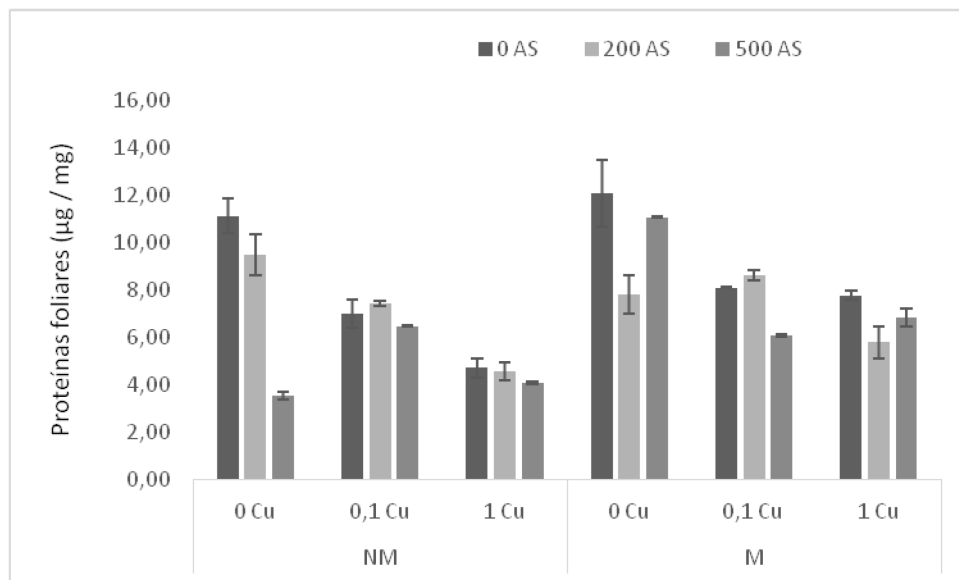


Figura 12. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el contenido de proteínas foliares de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 µM AS; 200 AS: 200 µM AS; 500 AS: 500 µM AS.

En el caso de las proteínas de raíces, se pudo notar una mayor diferencia entre plantas inoculadas y no inoculadas, presentando estas últimas un menor contenido de proteínas, las cuales se vieron afectadas por las mayores concentraciones de Cu (Figura 13).

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en los tratamientos de micorrización y de Cu, además en la interacción entre estos dos factores. No hubo diferencias significativas en AS y en las interacciones en donde interviene este factor, demostrando que el AS no tuvo inferencias en el contenido de proteínas en las raíces.

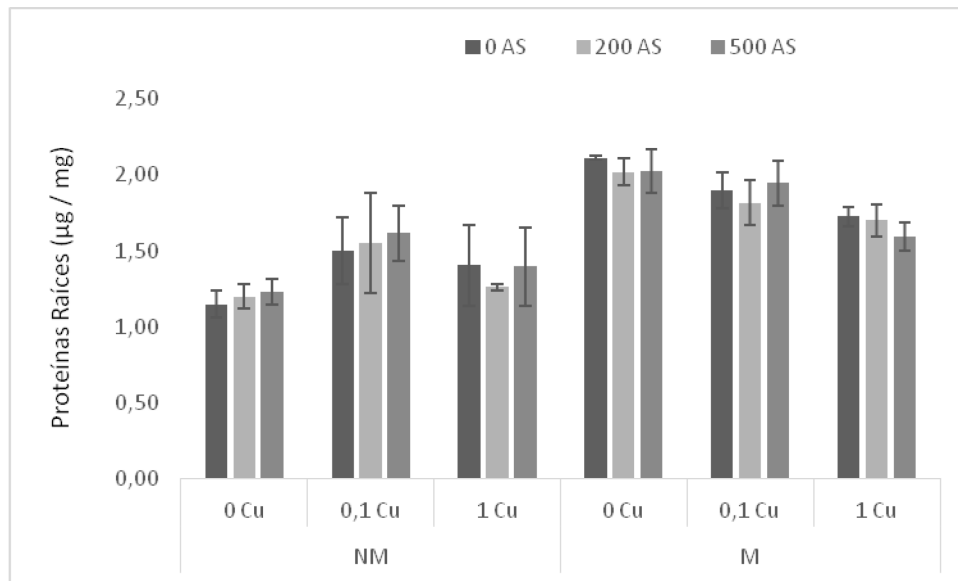


Figura 13. Efecto de distintas concentraciones de Cu y AS sobre el contenido de proteínas de raíces de plantas de pimiento no inoculadas (NM) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (M). Referencias: 0 Cu: 0 mM Cu; 0,1 Cu: 0,1 mM Cu; 1 Cu: 1 mM Cu. 0 AS: 0 µM AS; 200 AS: 200 µM AS; 500 AS: 500 µM AS.

El aumento en el contenido de proteínas de las plantas de pimiento micorrizadas, puede ser debido a que la micorrización, estimula la síntesis de proteínas de novo (Barker et al., 1998) o a una alteración en la expresión de genes (Wyss et al., 1990). Hildebrandt et al., (2007), determinaron que la inducción de genes que codifican proteínas involucradas potencialmente en la tolerancia a metales pesados en las plantas micorrizadas podría ser un factor que contribuya a mejorar la tolerancia. También se han reportados similares resultados en trigo bajo estrés con cadmio inoculado con *Glomus intraradices*, en donde hubo mayores valores de azúcar y proteínas en comparación con

las plantas no inoculadas a medida que aumentaba la concentración de Cd (Jamalabad and Khara 2008).

CONCLUSIONES

- El aumento de la concentración de Cu en el suelo:
 - Disminuyó la colonización de las raíces de plantas de pimiento.
 - Redujo la altura de las plantas, el área foliar y el peso seco.
 - Incrementó la liberación de electrolitos, aumentando la conductividad relativa de las membranas lo que indicaría un daño en las membranas celulares.
 - Aumentó los valores de MDA en las plantas.
 - Disminuyó el contenido de clorofila y proteínas con el estrés por Cu.
- La micorrización aumentó la tolerancia de las plantas de pimiento a altas concentraciones de Cu en el suelo.
 - Las plantas micorrizadas obtuvieron mayor altura, área foliar y peso seco que las no micorrizadas.
 - El contenido de proteínas y clorofila fue mayor.
 - Se obtuvieron menores valores de conductividad relativa y MDA.
- Los resultados obtenidos indican que la aspersión de AS en bajas concentraciones puede inducir mecanismos de tolerancia a un estrés abiótico como el provocado por metales pesados.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten reconocer la importancia de la inoculación con HMA para moderar los efectos adversos causados por las altas concentraciones de Cu en el suelo, mejorando el desarrollo y supervivencia de los cultivos agrícolas de interés comercial, a fin de lograr un uso más eficiente de los recursos sobre

la base de la sustentabilidad del sistema. Asimismo, el empleo del ácido salicílico como inductor de mecanismos naturales de defensa de las plantas, contribuye también a generar un paquete tecnológico que permita al productor incorporar una práctica que fije como objetivo no solo el beneficio productivo sino también el uso sustentable de los recursos de un agroecosistema.

De esta manera, el productor puede aprovechar las ventajas de los HMA en los cultivos mediante técnicas sencillas con inoculantes comerciales, que pueden ser aplicados al sustrato o junto con el agua de riego en la siembra en la plantinera o a campo, o inmediatamente después del trasplante. También es posible la adquisición directa de plantines inoculados. En cuanto al AS, es un producto natural y de bajo costo comercial, que puede ser fácilmente asperjado o pulverizado por el productor. Generalmente se encuentra en forma sólida, y de esta manera el productor puede realizar las diluciones necesarias, obteniendo las concentraciones deseadas para la aplicación, las cuales se recomiendan sean menores a 1 mM. La aplicación se aconseja realizarla en horas de menor insolación, como en las primeras horas de la mañana para obtener mejores resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Razak, V.** 1985. Physiological and biochemical aspects of metal tolerance in *Arachis hypogea*. PhD thesis. L. MPhil, Tirupati AP, Sri Venkateswara University, AP, India.
- Ahmad, P; Jaleel, CA; Sharma, S.** 2010. Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline-metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. *Russian Journal of Plant Physiology*. 57:509-517.
- Andrade, A; Parada Dias da Silveira, Jorge, RA; Ferreira de Abreu, M.** 2008. Cadmium Accumulation in Sunflower Plants Influenced by Arbuscular Mycorrhiza. *International Journal of Phytoremediation*. 10:1-13.
- Barea, JM.** 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Adv Soil Sci* 15:1-40.
- Barea, JM.** 2000. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: Toutant JP, Balazs E, Galante E, Lynch JM, Schepers JS, Werner D & Werry PA (Eds) *Biological Resource Management: Connecting Science and Policy* (OECD). INRA, Editions and Springer.pp: 110-125.
- Barker, SJ; Stummer, B; Gao, L; Dispain, I; O'Connor, PJ; Smith, SE.** 1998. *The Plant Journal*. 15:791-797.
- Bates, LS; Waldren, RP; Tease, ID.** 1973. Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant Soil*. 85: 107-129.
- Bécard, G; Pfeffer, PE.** 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174: 62-68.
- Beltrano, J; Ronco, MG; Salerno, MI; Ruscitti, M; Peluso, O.** 2003. Respuesta de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) micorrizadas en situaciones de déficit hídrico y de rehidratación del suelo. *Revista de Ciencia y Tecnología* 8:1-7.
- Beltrano, J; Ruscitti, M; Arango, C; Ronco, M.** 2013. Changes in the accumulation of shikimic acid in mycorrhized *Capsicum annuum* L. grown with application of glyphosate and phosphorus. *Theor. Exp. Plant Physiol*. 25:125-136.
- Beltrano, J; Ruscitti, M; Arango, C; Ronco, M.** 2013. Effects of arbuscular mycorrhiza inoculation on plant growth, biological and physiological parameters and mineral nutrition in pepper grown under different salinity and p levels. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13:123-141.
- Berrios Ugarte, ME; Belmar, CA; Holwerda, HT.** 2007. Cropkitguía de manejo de nutrición vegetal de especialidad pimienta. *SQM The Worldwide Business Formula*, 33-36.

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

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

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

Catalogo de variedades pimiento. Disponible en <http://www.ahernseeds.com/es/products/cannon/>.

Chavez Suarez, L; Alvarez Fonseca, A; Ramirez Fernandez, R. 2012. Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *cultrop* [online]. 2012, vol.33, n.3.

Del Pino, M. 2016. Guía didáctica: cultivo y manejo del pimiento. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. Curso de Horticultura y Floricultura. pp 1-6.

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

Demiral, T; Türkan, İ. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.*, 53:247-257

Demirevska-Kepova, K; Simova-Stoilova, L; Stoyanova, Z; Holzer, R; Feller, U. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environ Exp Bot* 52, 253–266.

Drazic, G; Mihailovic, N. 2005. Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Sci.* 168, 511–517.

El-Khalla, SM; Hathout, TA; El Raheim, A; Ahsour, A; Abd-Almalik, A; Brassinolide. 2009. Salicylic acid induced antioxidant enzymes, hormonal balance and protein profile of maize plants grown under salt stress. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences.* 5(4): 391-402. 2009.

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

Garita, SA. 2011. Micorrizas vesículo-arbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en tomate. Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. pp 50.

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

Gianinazzi-Pearson, V; Gianinazzi, S. 1995. Proteins and Protein Activities in Endomycorrhizal Symbioses. *Mycorrhiza*. Chapter 22: 251-266.

Giovannetti, M; Sbrans, C; Avio, L; Citerinesi, AS; Logi, C. 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*. 125:587-593.

Göhre, V; Paszkowski, U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*. 123: 1115-1122.

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

Gunes, A; Inal, A; Alpaslan, M; Eraslan, F; Guneri Bagsi, E; Cicek, N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zeamays L.*), grown under salinity. *J. Plant Physiol*. 164: 728–736.

Guzmán-Téllez, E; Díaz-Montenegro, A; Benavides-Mendoza. 2011. Concentration of salicylic acid in tomato leaves after foliar aspersions of this compound. *Am. J. Plant Sci*. 5(13): 2048-2056.

Heath, RL; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125, 189–198.

Hildebrandt, U; Bothe, H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. 68(1): 139-146.

Hildebrandt, U; Kaldorf, M; Bothe, H. 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Physiol*. 154: 709-717.

Hoagland, DR; Arnold, DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347.

Horvath, E; Szalai, G; Janda, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 290-300.

INDEC. 2010. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010.

Jamal, A; Ayub, N; Usman, M; Khan, AG. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soya bean and lentil. *International Journal of Phytoremed*. 4 (39): 205-221.

Jamalabad, KH; Khara, J. 2008. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus intraradices* on some growth and physiological parameters in wheat (cv.AZAR2) plants under cadmium toxicity. *Irani. J. Biol*. 21:216-230.

Joner, EJ; Briones, R; Leyval, C. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226:227–234.

Joner, E; Leyval, C. 2001. Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils*. 33:351-357.

Kabata-Pendias, A. 2001. Trace elements in soils and plants, 3rd edn. CRC, USA.

Kaya, C; Ashraf, M; Sonmez, O; Aydemir, S; Levent Tuna, A; Ali Cullu, M. 2009. The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae*. 121:1-6.

Kramer, U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol* 16:133–141.

León Morales, JM; Sepúlveda-Jiménez, G. 2012. El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas. *Interciencia* 37:805-811.

Leyval, C; Singh, BR; Joner, EJ. 1995. Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some Norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water Air Soil Pollut.* 84: 203–216.

Lidon, FC; Henriques, FS. 1992. Copper toxicity in rice: diagnostic criteria and effect on tissue Mn and Fe. *Soil Sci* 154:130–135.

Linderman, RG. 1992. Vesicular-arbuscular mycorr- on the presence of arbuscular mycorrhizal spores in a hizeae and soil microbial interactions. In *Mycorr- swedish long-term field experiment*. Swedish J. agric. hizeae in sustainable agriculture. Ed. G.J. Bethlen- Res. 24:157-164. falvay and R. G. Linderman. Madison, Wisconsin, USA. ASA Special Publication Number 54. p. 45- ROJAS, I.M.

Liu, X; Zhang, S; Shan, X; Zhu, YG. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination seedling growth and amyolytic activity of wheat. *Chemosphere* 61, 293–301.

Lombardi, L; Sebastiani, L. 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sci* 168, 797–802.

López-Bucio, JA; Cruz-Ramírez; Herrera-Estrella, L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280-287.

Lutts, S; Kinet, JM; Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L) cultivars differin in salinity resistance, *Ann. Bot.* 78:389-398.

Maksymiec, W; Russa, R; Urbanik-Sypniewska, T; Baszynski, T. 1994. Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. *Physiol. Plant.* 91: 715-721.

Marques, APGC; Oliveira RS, Samardjieva, KA; Pissarra, J; Rangel, AOSS; Castro, PML. 2007. *Solanum nigrum* grown in contaminated soil: effect of arbuscular mycorrhizal fungi on zinc accumulation and histolocalisation. *Environ. Pollut.* 145:691–699.

- Marmioli, N; Pavesi, A; Di Cola, G; Hartings, H; Raho, G; Conte, MR; Perrotta, C.** 1993. Identification, characterization and analysis of cDNA and genomic sequences encoding two different small heat shock proteins in *Hordeum vulgare* L. *Genome* 36: 1111-1119.
- Marschner, H.** 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Mauseth, JD.** 1988. Plant anatomy. Benjamin/Cumming. Menlo Park.
- Metwally, A; Finkemeier, I; Georgi, M; Dietz, KJ.** 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132, 272–281.
- Murphy, A; Taiz, L.** 1997. Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 Arabidopsis ecotypes. *New Phytol* 136:211–222.
- Navarro Aviñó, JP; Aguilar Alonso, I; López-Moya, JR.** 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas, Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente.* 2007/2.
- Nasim, G.** 2010. The role of arbuscular mycorrhizae in inducing resistance to drought and salinity stress in crops. In: Ashraf, M., M. Ozturk, and M.S.A. Ahmad (Eds.). *Plant Adaptation and Phytoremediation.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 119-141.
- Novoa, MD; Palma, S.** 2010. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus spp.* inoculation on alfalfa growth In soils with copper. *Chilean Journal of Agricultural Research,* 259-265.
- Ocampo, JA.** 1993. Influence of pesticides on VA mycorrhizal. In: *Pesticide–plant pathogen interactions in crop production: beneficial and deleterious effects,* CRC Press, Boca Raton, FL. (Altman, J. ed). pp 214-226.
- Ozounidou, G.** 1994. Root growth and pigment composition in relationship to element uptake in *Silene compacta* plants treated with copper. *Journal of Plant Nutrition.* 17: 933–943.
- Pawlowska, TE; Chaney, RL; Chin, M; Charvat, I.** 2000. Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal-contaminated landfill *Applied and Environmental Microbiology,* 66 pp. 2526–2530
- Pawlowska, TE; Charvat, I.** 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 70:6643–6649.
- Peuke, AD; Rennenberg, H.** 2005. Phytoremediation. *EMBO Rep* 6:497–501.
- Phillips, JM and Hayman, DS.** 1970. Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:159-161.

Plenchette, C; Fortin, JA; Furlan, V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil* 70:199-209.

Popova, L; Ananieva, E; Hristova, V; Christov, K; Georgieva, K; Alexieva, V; Stoinova, Z. 2003. Salicylic acid–and methyl jasmonate–induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Bulg. J. Plant Physiol.* 21: 133–152.

Quariti, O; Boussama, N; Zarrouk, M; Cherif, A; Ghorbal, MH. 1997. Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry* 45: 1343–1350.

Quilambo, OA. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal simbiosis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp 539-546.

Rabie, GH. 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal of Biotechnology*, 332-345.

Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439–463.

Ruscitti, M; Arango, M; Ronco, M; Beltrano, J. 2011. Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Braz. J. Plant Physiol.*, 23, 15-25.

Sarabia Ochoa, M; Madrigal Pedraza, R; Martínez Trujillo, M; Carreón Abud, Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones, *Biologicas*, [online]. Vol. 12, Art. # 1.

Schwartz, C; Echevarría, G; Morel, JL. 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil.* 249: 27-35.

Shahba, Z; Baghizadeh, A; Yosefi, M. 2010. The salicylic acid effect on the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) germination, growth and photosynthetic pigment under salinity stress (NaCl). *Journal of Stress Physiology and Biochemistry.* Vol. 6 Núm. 3, 4–16.

Singh, B; Usha, K. 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, v. 39, n. 2, pp. 137-141.

Smith, SE and Read, DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edn. Academic Press, San Diego and London. 605 pp.

Smith, SE; Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Phosphate Uptake and Arbuscular Activity in Mycorrhizal *Allium cepa*L.: Effects of Photon Irradiance and Phosphate Nutrition *Australian Journal of Plant Physiology* 17:177–188.

Souza Casadinho, OJ; Bocero, SL. 2008. Agrotóxicos: condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica.* 9:87:101.

Stavisky, A. 2010. Situación actual de la plasticultura en Argentina. En XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. Rosario: Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO).

Vaillant, N; Monnet, F; Hitmi, A; Sallanon, H; Coudret, A. 2005. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59, 1005–1013.

Wellburn, AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as Total carotenoids, using various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *J. Plant. Phys.* Vol. 144:307-313.

Wyss, P; Mellor, RB; Wiemken, A. 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta*. 182: 22-26.

Yurekli, F; Porgali, ZB. 2006. The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48/2: 7–13.