

# Parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento inoculadas con *Funneliformis mosseae* en condiciones de hidroponía y con altas concentraciones de cobre

Ruscitti, Marcela<sup>1,2,4</sup>; Cecilia Arango<sup>1</sup>; Sebastián Garita<sup>1</sup>; Valeria Bernardo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-CONICET) diagonal 113 N°495 FCAyF, UNLP, La Plata, Argentina;

<sup>2</sup>ECANA – UNNOBA Roque Saenz Peña 456 Junín, Argentina; <sup>3</sup>Comisión de Investigaciones Científicas CICBA calle 526 entre 10 y 11, La Plata, Argentina; <sup>4</sup>marcelaruscitti@gmail.com

Ruscitti, Marcela; Cecilia Arango; Sebastián Garita; Valeria Bernardo (2019) Parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas de pimiento inoculadas con *Funneliformis mosseae* en condiciones de hidroponía y con altas concentraciones de cobre. Rev. Fac. Agron. Vol 118 (1): 85-97.

La incorporación de metales pesados al medio como modo de contaminación por el uso de fertilizantes y plaguicidas es una de las problemáticas que más preocupan a las organizaciones vinculadas al monitoreo del ambiente. El cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento vegetal, pero en elevadas concentraciones es tóxico. Las micorrizas arbusculares, participan activamente en el metabolismo de los metales pesados, aumentando la tolerancia de las plantas que crecen en sitios contaminados. Se evaluaron las respuestas morfológicas y fisiológicas de plantas de pimiento inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular *Funneliformis mosseae* en concentraciones crecientes de cobre en un cultivo hidropónico. Se realizaron mediciones morfológicas (peso seco, área foliar), fisiológicas (conductancia y resistencia estomática, índice de verdor, temperatura de hoja, conductividad relativa de membranas celulares) y bioquímicas (patrón proteico, contenido de malondialdehído). Las plantas inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular toleraron una concentración mayor de cobre que las no inoculadas y esta concentración varió según el parámetro analizado. En general, en las plantas micorrizadas se observó un aumento del umbral de tolerancia al cobre.

**Palabras clave:** metales pesados, hongos micorrízicos arbusculares, *Capsicum annuum*

Ruscitti, Marcela; Cecilia Arango; Sebastián Garita; Valeria Bernardo (2019) Morphological and physiological parameters of pepper plants inoculated with *Funneliformis mosseae* under hydroponic conditions and with high copper concentrations. Rev. Fac. Agron. Vol 118 (1): 85-97.

Industrialization and agricultural activity, through the use of fertilizers and pesticides, have caused severe environmental pollution. The heavy metals incorporation is one of the problems that most concern organizations linked to environmental monitoring. Copper is an essential micronutrient for plant growth but in high concentrations it is toxic. Arbuscular mycorrhizae actively participate in the heavy metals metabolism, increasing the tolerance of plants growing in contaminated sites. The morphological and physiological responses of pepper plants inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* in increasing concentrations of copper in a hydroponic culture were evaluated. Morphological measurements (dry weight, foliar area), physiological measurements (stomatal conductance and resistance, greenness index, leaf temperature, relative conductivity of cell membranes) and biochemical (protein pattern, content of malondialdehyde) were made. The growth of the non-inoculated or inoculated pepper plants showed a decrease with the increase of the copper concentration in the medium. The plants inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus could withstand a higher concentration of copper than the non-inoculated ones and this concentration varied according to the parameter analyzed. In general, in mycorrhized plants an increase in the tolerance threshold to copper was observed.

**Key words:** heavy metals, arbuscular mycorrhizal fungi, *Capsicum annuum*

<https://doi.org/10.24215/16699513e009>

<https://revistas.unlp.edu.ar/revagro>

Recibido: 19/08/2018

Aceptado: 12/04/2019

Disponibile on line: 01/07/2019

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

## INTRODUCCIÓN

Ciertas prácticas de la agricultura moderna como el sobrepastoreo, la fertilización y la deforestación, son algunas de las causas de la erosión, acidificación, contaminación, salinización, desequilibrio de nutrientes y compactación del suelo (Lal, 2001). Tal como sucede con la agricultura rural, la agricultura urbana y periurbana implica riesgos para la salud de la población si no es manejada apropiadamente (Giuffré et al., 2005). Existen riesgos de enfermedades asociadas con la reutilización de desechos urbanos y aguas residuales, otras de transmisión vectorial, las asociadas con la utilización de agroquímicos y, por último, las asociadas a la contaminación de suelo y agua con concentraciones nocivas de algunos elementos y compuestos químicos, como hidrocarburos policíclicos aromáticos y metales pesados (MP) (Lock & De Zeeuw, 2000). La relación entre la agricultura urbana y la seguridad alimentaria es un concepto fundamental a tener en cuenta en la gestión municipal, ya que involucra aspectos económicos, sociales y ambientales (Cabannes & Dubbeling, 2001). Estudios recientes han demostrado que la contaminación por metales pesados es un aspecto importante de la degradación ecológica (Baldantoni et al., 2004). Si bien se asocia principalmente a la actividad industrial, la actividad agropecuaria a través del uso de fertilizantes y plaguicidas, introduce en el ambiente cantidades importantes de MP como Zn, Mn, Cu y Pb.

Los procesos de contaminación de los suelos como consecuencia del actual modelo productivo intensivo, seguirán afectando y perjudicando a los ecosistemas, tanto en la actualidad como en el futuro, ya que, los metales pesados son elementos persistentes en el suelo que no se biodegradan, ya que, en general, no participan en funciones metabólicas específicas de los seres vivos (Abollino et al., 2002, Olivares Rieumont et al., 2013). Las plantas absorben los metales pesados desde el suelo de forma pasiva con el flujo masal de agua, o por transporte a través de la membrana plasmática de las células de la raíz. La combinación de pH bajo y elevada concentración de metales en el suelo resulta en una alta absorción por parte de las plantas (Thornton, 1999). Ésto representa una amenaza potencial para el hombre, ya que la acumulación de MP en las plantas es su principal vía de entrada en la cadena alimentaria (McLaughlin et al., 1999).

El cobre es considerado un micronutriente esencial para las plantas, y juega un rol importante en la asimilación de CO<sub>2</sub> y la síntesis de ATP. El cobre está asociado con enzimas y proteínas involucradas en reacciones redox (Cu<sup>+1</sup> / Cu<sup>+2</sup>) como la plastocianina, una proteína cloroplástica involucrada en el transporte electrónico que ocurre en la fase lumínica de la fotosíntesis entre el fotosistema II y el fotosistema I, y enzimas como la citocromo oxidasa involucrada en la cadena transportadora de electrones en la respiración aeróbica que ocurre en las crestas mitocondriales (Yadav, 2010). Por otra parte, es el componente del complejo enzimático fenolasa, que oxida fenoles y se relaciona con la biosíntesis de lignina, ya que forma algunos de sus precursores (Azcón-Bieto & Talón, 2000). El receptor de etileno ETR1, una proteína transmembranal, requiere la unión de cobre para su

funcionamiento (Rodríguez et al., 1999). Este metal, junto con el zinc es un cofactor de dos de las siete superóxido dismutasas (CDS1, CDS2) descritas en *Arabidopsis* (Bowler et al., 1992). Rara vez las plantas presentan deficiencias de cobre, principalmente debido a que éste se encuentra disponible en baja concentración en la mayoría de los suelos. El síntoma inicial de una deficiencia de cobre es la producción de hojas de color verde oscuro, las cuales pueden presentar manchas necróticas. Estas manchas aparecen primero en la punta de las hojas jóvenes y luego se extienden hacia la base y los márgenes. Las hojas pueden abarquillarse o presentar malformaciones y en caso de deficiencias extremas pueden abscisionar prematuramente (Taiz & Zeiger, 2006). Sin embargo, el cobre en cantidades excesivas, se vuelve tóxico ya que interfiere con los procesos fotosintéticos y respiratorios, la síntesis de proteínas y el desarrollo de organelas vegetales (Upadhyay & Panda, 2009). Específicamente, el exceso de cobre puede causar clorosis, inhibición del crecimiento de la raíz, estrés oxidativo y daño a la permeabilidad de las membranas plasmáticas, lo que lleva a la liberación de iones. El estrés oxidativo provoca la peroxidación de lípidos de las membranas, conduciendo a la aparición de malondialdehído (MDA), uno de los subproductos de la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, utilizado como indicador de estrés oxidativo (Martínez-Trujillo et al., 2009; Bouazizi et al., 2010; Ghaderian & Ravandi, 2012). El efecto tóxico del cobre afecta fundamentalmente el crecimiento y la morfología de la raíz, ya que este metal, tiende a acumularse en la misma con baja traslocación a la parte aérea (Marschner, 1995), sin embargo, en plantas de pimiento, creciendo con elevadas concentraciones de este metal, se observó una gran traslocación a la parte aérea (Ruscitti et al., 2017). El daño provocado en las raíces en respuesta al exceso de cobre provoca una menor absorción de agua y nutrientes, alterando el estado hídrico de la planta, que se refleja en una disminución de la conductancia estomática (Taiz & Zeiger, 2006). La inhibición del crecimiento de la raíz por altas concentraciones de MP fue reportado por Martínez-Trujillo et al. (2009) y Ortiz-Castro et al. (2007), evidenciado por la disminución del índice mitótico.

Algunos microorganismos benéficos para las plantas que habitan el suelo, como los hongos formadores de micorrizas arbusculares, participan activamente en el metabolismo de los MP en el suelo, aumentando la tolerancia de las plantas que crecen en sitios contaminados (Ruscitti et al., 2017). La importancia ecológica de las micorrizas arbusculares está avalada por su presencia en más del 95% de las especies vegetales (Quilambo, 2003, Ruscitti et al., 2011; Beltrano et al., 2013a; Beltrano et al., 2013b). En esta asociación la planta aporta compuestos carbonados para la nutrición del hongo, y el hongo contribuye aumentando la absorción de agua y nutrientes del suelo (Gange et al., 1999), jugando un papel clave en el reciclaje de nutrientes en el ecosistema (Smith & Read, 1997).

La planta micorrizada presenta diversas ventajas, entre ellas se ha estudiado la inducción de una mayor tolerancia/resistencia frente a distintos estreses bióticos

y abióticos (Snijders, 1994; Dassi *et al.*, 1998; Ruscitti *et al.*, 2011; Beltrano *et al.*, 2013b). La micorrización disminuye significativamente el efecto detrimental de la salinidad (Ruscitti *et al.*, 2007) y también puede conferir tolerancia a patógenos del suelo, ya sea por competencia por los sitios de colonización (Linderman, 1992) o por activar mecanismos de defensa en la planta huésped (Cordier *et al.*, 1996). También se ha investigado el incremento de la tolerancia de las plantas al estrés hídrico, por deficiencia de nutrientes, exceso de metales pesados y sustancias fitotóxicas (Barea *et al.*, 2005; Kaya *et al.*, 2009; Manoharan *et al.*, 2010; Ruscitti *et al.*, 2011, 2017; Beltrano *et al.*, 2013a). Se ha descrito además que las micorrizas confieren tolerancia a pesticidas (Ocampo, 1993), herbicidas (Ocampo & Barea, 1982; Beltrano *et al.*, 2013a) o residuos de la industria petrolera (Cabello, 1997).

Los metales pesados pueden ser absorbidos por las hifas del hongo y transportados a la planta. Se han descrito casos en que las plantas micorrizadas muestran un aumento en la absorción y en el transporte raíz – tallo de MP (fitoextracción), mientras que en otros casos, el hongo contribuye a la inmovilización de los MP en el suelo (fitoestabilización) (Gaur & Adholeya, 2004; Khan, 2005). El resultado de la colonización micorrízica sobre la detoxificación de los suelos contaminados depende de la combinación planta – hongo – MP y está influenciado por las condiciones del suelo (Orlowska *et al.*, 2005). Ruscitti *et al.* (2017) demostraron que la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares incrementó la tolerancia de las plantas de pimiento al exceso de cobre en el suelo, evidenciado por una mayor actividad fotosintética y en consecuencia mayor crecimiento.

En base a todo lo expuesto, es claro que la contaminación por cobre producida por las actividades antrópicas afecta el normal crecimiento de las plantas, generando alteraciones a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico. El objetivo del trabajo fue evaluar las respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular *Funneliformis mosseae* y expuestas a concentraciones crecientes de cobre en un sistema hidropónico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y condiciones de cultivo

El ensayo se realizó en condiciones controladas de temperatura (16°C a 26°C) en el invernáculo del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), La Plata, Argentina (34° 52' S; 57° 58' W) bajo fotoperíodo natural, entre los meses de agosto y diciembre. Las semillas de pimiento *Capsicum annuum* L. 'California Wonder 300' fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, y lavadas tres veces con agua estéril. Se colocó una semilla por celda en bandejas plásticas (speedling) de 72 celdas y 55 cc de capacidad individual, sobre una mezcla tinalizada de tierra-arena (1:1). A la mitad de las celdas se le incorporó 20% de inóculo de *Funneliformis mosseae* (FM) y a la otra mitad, a modo de control, la misma cantidad de inóculo inactivado por tinalización (NI), para generar las mismas condiciones experimentales.

El hongo micorrízico arbuscular utilizado *Funneliformis mosseae* ((T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schuessler 2010)) corresponde al aislamiento SB1, de la Colección del Instituto Spegazzini, UNLP. Se multiplicó en terrinas, utilizando como sustrato una mezcla estéril de arena:perlita:vermiculita (1:1:1 v/v) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) como planta trampa. Este inóculo estaba constituido por una mezcla de sustrato, hifas y fragmentos de raíces de trébol (*Trifolium repens* L.) micorrizadas en un 90%, y una densidad de esporas de 60 esporas g<sup>-1</sup> de sustrato seco. Cuarenta días después de la siembra, cuando las plantas de pimiento inoculadas alcanzaron 50% de micorrización, determinado según la técnica de Trouvelot *et al.* (1986), se extrajeron de las bandejas, se lavaron las raíces y se pasaron a condiciones de hidroponía en potes de plásticos de 5 litros de capacidad aireados periódicamente y con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). Se realizó el cultivo en hidroponía para poder estudiar el efecto del cobre sin la interferencia del sustrato que actúa como amortiguador. Una semana después se agregaron las distintas soluciones de cobre, según se detalla a continuación.

### Tratamientos realizados

La solución nutritiva de Hoagland se suplementó con concentraciones de Cu crecientes, hasta 1000 µM, concentración a partir de la cual se afecta la viabilidad de las estructuras del hongo micorrízico (Ruscitti, 2017), quedando definidos los siguientes tratamientos:

A- Plantas no inoculadas (NI) y B- Plantas inoculadas con *F. mosseae* (FM)

Cultivadas con 0, 10, 50, 100, 200 y 1000 µM de CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O.

### Parámetros medidos

#### Parámetros fisiológicos

A las veinticuatro horas de agregar las distintas concentraciones de cobre, se determinó el índice mitótico mediante el recuento de células en mitosis de los ápices radicales, con el objetivo de inferir el efecto del cobre en el crecimiento de las raíces. Los meristemas radicales de diez plantas por tratamiento se colocaron en una caja de Petri sobre papel de filtro embebido en 8- hidroxiquilona (0,02% v/v) durante 3 horas. Posteriormente, las raíces se lavaron tres veces con agua destilada durante cinco minutos cada uno. Luego el material se fijó colocándolo en tubos con solución de Carnoy (etanol : acetato, 3:1), cada dos horas, se realizó el recambio de la solución, en tres oportunidades. Finalmente, el material se conservó a 4°C hasta la realización de los preparados. En ese momento, las raicillas se llevaron a baños secuenciales de agua destilada durante cinco minutos en cada uno, en tres oportunidades, a fin de extraer el fijador. A continuación se procedió a realizar la digestión de las paredes celulares con HCl (1N) en estufa a 45°C durante 30 minutos. Finalmente, los ápices radicales se tiñeron con aceto-orceína durante cinco minutos y se montaron en el portaobjeto realizando la técnica de "squash" (Sass, 1958). El índice mitótico (IM), expresado como porcentaje, se determinó contando el número de células en mitosis sobre el número total de células por ápice. Las observaciones se realizaron en

un microscopio óptico Carl Zeiss Photomicroscope II (Oberkochen, Germany).

Catorce días después del agregado de cobre, se determinó la conductancia estomática, la resistencia estomática y la temperatura de hoja, mediante la utilización de un Porómetro Decagon SC-1. Las mediciones se realizaron entre las 16 y las 18 horas, en el sector medio de la planta, en la porción media de la última hoja completamente expandida y no senescente, se midieron 8 plantas por tratamiento. También se determinó el Índice de verdor con un medidor SPAD-502 Minolta, en el tercio medio de la última hoja expandida.

La conductividad relativa (CR) de membranas celulares se realizó a partir de 200 mg de material fresco de hojas y 200 mg de raíz de cada una de las 8 plantas por tratamiento, según el método de Lutts *et al.* (1996), 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.

#### Parámetros bioquímicos

A los 30 días de iniciados los tratamientos, se realizó una toma de muestras para la determinación del contenido de malondialdehído (MDA: producto de la peroxidación lipídica como consecuencia del daño de las membranas celulares) en 200 mg de tejidos frescos de la última hoja completamente expandida y 200 mg de raíz, por la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) descrita por Heath & Packer (1968).

El análisis cualitativo de la composición proteica se realizó mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE), de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Para la extracción de proteínas se tomaron 250 mg de muestras de hoja y 250 mg de muestra de raíz, de cada una de las 8 plantas por tratamiento. Esta técnica permite separar en forma simultánea distintas fracciones proteicas. El peso molecular de las distintas bandas se estimó utilizando un patrón de Peso Molecular, LMW calibration kit for SDS Electrophoresis, Pharmacia. Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba vertical HOEFLER SE 600 con una fuente de poder EPS 1001. Los geles obtenidos se analizaron por densitometría utilizando programas de análisis de imágenes (Syngene Analyzer e Image J).

#### Parámetros morfológicos

Terminado el ensayo se determinó el área foliar con un medidor de área foliar Li 3000, LICOR, Lincoln, NE, USA y el peso seco de las plantas, luego de secar el material en estufa a 80°C hasta peso constante.

#### Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, en un factorial 6 x 2, con seis concentraciones de cobre y dos niveles de micorrización. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). El número de repeticiones (n) fue cuatro por tratamiento y 8 plántulas por repetición.

## RESULTADOS

#### Parámetros fisiológicos

El índice mitótico, expresado como el porcentaje de células en mitosis sobre el total de células observadas, disminuyó al aumentar la concentración de Cu en la solución. Comparando los tratamientos realizados, se observó que el valor de este índice con 1000  $\mu\text{M}$  de Cu disminuyó un 95% en las plantas no inoculadas y 88 % en las inoculadas comparado con 0  $\mu\text{M}$  de Cu. También se observó que las plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae* en 0 y 10  $\mu\text{M}$  de Cu presentaron, valores de índice mitótico significativamente más bajos que las plantas sin inocular (tabla 1). Los bajos valores de índice mitótico en las concentraciones más altas de cobre, explican la baja tasa de crecimiento de las raíces.

Tabla 1. Índice mitótico promedio de plantas de pimiento inoculadas y sin inoculación con *Funneliformis mosseae*, a las 24 horas del agregado de concentraciones crecientes de cobre a la solución nutritiva. M: micorrización, Cu ( $\mu\text{M}$ ): Concentraciones crecientes de Cu, M x Cu: interacción entre la micorrización y las concentraciones crecientes de Cu. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en la columna, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas en la fila ( $p < 0,05$ ).

| Cu ( $\mu\text{M}$ ) | Índice mitótico (%) |                              |
|----------------------|---------------------|------------------------------|
|                      | No inoculado        | <i>Funneliformis mosseae</i> |
| 0                    | 5,0 a A             | 3,4 a B                      |
| 10                   | 3,7 b A             | 1,9 b B                      |
| 50                   | 1,8 bc A            | 2,1 b A                      |
| 100                  | 1,3 c A             | 1,3 c A                      |
| 200                  | 1,1 c A             | 0,7 d A                      |
| 1000                 | 0,2 d A             | 0,4 d A                      |
| M                    |                     | < 0,001                      |
| Cu                   |                     | < 0,001                      |
| M x Cu               |                     | < 0,001                      |

La determinación de la conductancia y resistencia estomática indica el estado hídrico de la planta ante una situación de estrés, como la presencia de altas concentraciones de Cu en el medio de crecimiento (Taiz & Zeiger, 2006).

La conductancia estomática fue mayor en las plantas inoculadas con el hongo. En ausencia de cobre la micorrización aumentó la conductancia estomática un 57%. Este parámetro disminuyó al aumentar la concentración de cobre en la solución, a partir de 100  $\mu\text{M}$ , en las plantas micorrizadas la disminución fue de 44% mientras que en las no micorrizadas fue de 36% (figura 1A). Esta respuesta puede relacionarse con el daño que produce el metal en las raíces, disminuyendo la absorción de agua y nutrientes de la solución. Ante un balance hídrico desfavorable, una de las primeras respuestas de las plantas es el cierre estomático, o disminución de la conductancia estomática, con el objetivo de reducir la transpiración, lo que indicaría que

la micorrización atenúa el desbalance hídrico provocado por el Cu, (Ruscitti, 2017) al mantener los estomas abiertos, favoreciendo la producción de biomasa. Todo esto fue confirmado por la resistencia estomática, que es la inversa de la conductancia, y mostró el mismo comportamiento (figura 1B). Según el análisis de varianza la conductancia estomática presentó diferencias significativas con la micorrización, las concentraciones de cobre y la interacción de ambos factores. Mientras que para la resistencia estomática presentó diferencias sólo para la micorrización y el cobre, pero no se observaron interacciones entre los factores.

La temperatura de la hoja sufrió un aumento gradual con el aumento de la concentración de cobre. En las plantas no inoculadas se observó un aumento significativo de la temperatura a partir de la presencia de cobre en concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y con concentraciones similares o superiores a 200  $\mu\text{M}$ . En las plantas micorrizadas el aumento de temperatura de las hojas se observó a partir de concentraciones de

cobre de 100  $\mu\text{M}$ . El aumento de la temperatura está directamente relacionado con el aumento de la resistencia estomática y esto se debe al efecto refrigerante que ejerce la transpiración en las plantas (figura 2A) (Taiz & Zeiger, 2006)

Cuando aumentó el cobre en el medio, el índice de verdor (SPAD) disminuyó tanto en las plantas micorrizadas como no micorrizadas. En las no inoculadas se observó una disminución significativa a partir de 50  $\mu\text{M}$ , respecto al tratamiento sin cobre; mientras que en las inoculadas con el hongo micorrízico esa reducción se observó a partir de una concentración de 100  $\mu\text{M}$  y fue del 32%. En todas las concentraciones de cobre ensayadas las plantas inoculadas con *F. mosseae* presentaron mayores índices de verdor que las plantas no inoculadas, aunque las diferencias no fueron significativas (figura 2B). Sin embargo, el análisis estadístico mostró diferencias significativas al modificarse las concentraciones de cobre y con la interacción micorrización:cobre.

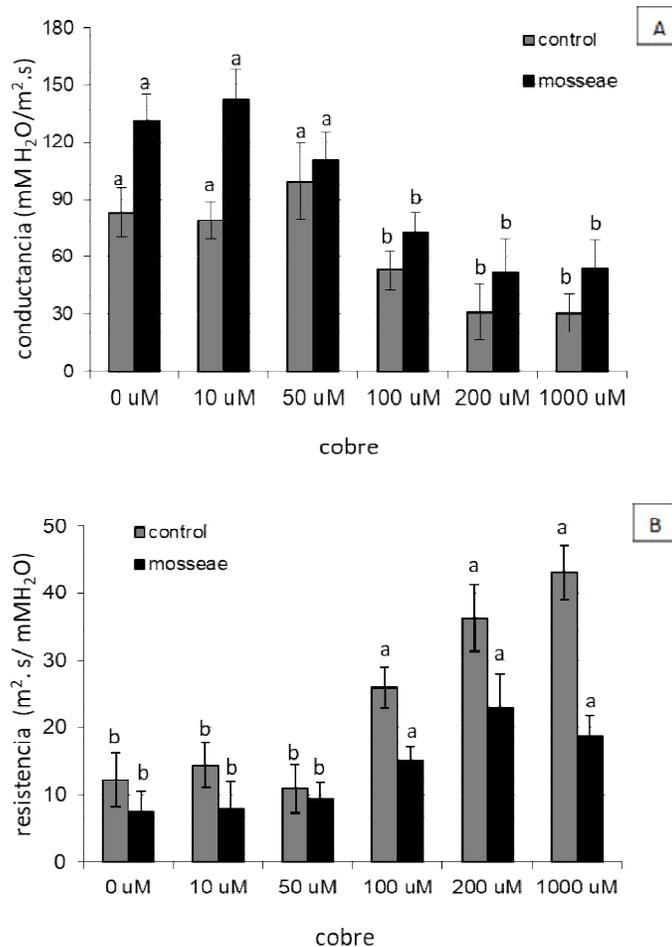


Figura 1. Valores medios de conductancia (A) y resistencia estomática (B) de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre y su correspondiente error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre para cada tratamiento de inoculación ( $p < 0,05$ ).

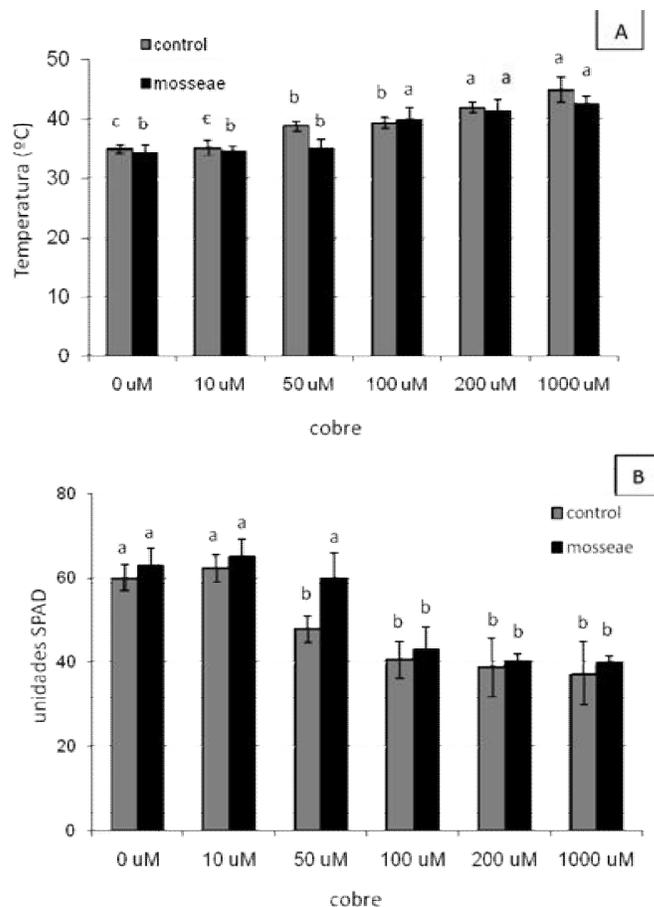


Figura 2. Valores medios de Temperatura de hoja (A) e Índice de verdor (B) de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre para cada tratamiento de inoculación ( $p < 0,05$ ).

La conductividad relativa de la raíz, como indicador de daño de las membranas celulares, aumentó al aumentar las concentraciones de cobre. En todos los casos, este parámetro, fue mayor en las plantas no inoculadas, donde hubo un aumento significativo del orden del 75% a partir de 50  $\mu\text{M}$ . En las inoculadas con *Funneliformis mosseae* ese aumento se produjo a partir de 100  $\mu\text{M}$  y fue de 48%. Las plantas no inoculadas alcanzaron valores mayores al 50%, mientras que las inoculadas no alcanzaron 40%, en la máxima concentración de cobre, lo que indicaría que la micorrización atenuó el daño en las membranas de la raíz (tabla 2). Lo que estaría confirmando los resultados encontrados en la peroxidación de los lípidos de membrana. La conductividad relativa de las hojas de las plantas de pimienta fue baja y no se modificó con la concentración de cobre ni con la micorrización, alcanzando valores inferiores al 15% (tabla 2). El análisis de varianza para la conductividad relativa, mostró que en raíz, las diferencias significativas están dadas por la micorrización, el cobre y la interacción de ambos, en hoja no se observaron diferencias significativas y, según los valores alcanzados, no se puede aseverar que las membranas celulares hayan

sido dañadas por acción del cobre.

#### Parámetros bioquímicos

La determinación de malondialdehído en tejidos de la raíz presentó valores bajos y no mostró diferencias significativas con las distintas concentraciones de cobre ni con la inoculación (tabla 3). El MDA determinado en las hojas presentó valores superiores a los encontrados en la raíz. El aumento del contenido de MDA fue de 37% respecto al control en las plantas no inoculadas; mientras que en las plantas inoculadas se observó una diferencia significativa a partir de 50  $\mu\text{M}$  de Cu. En las plantas micorrizadas cultivadas en presencia de 100, 200 y 1000  $\mu\text{M}$  de cobre, se observó un incremento significativo de los valores de MDA en hojas.

El modelo proteico de la hoja fue modificado por la alta concentración de Cu y por la micorrización. El aumento en la concentración de Cu provocó una modificación del perfil proteico comprendido entre los 94 y 67 kDa, ya que a partir de 200  $\mu\text{M}$  de Cu se observó un polipéptido de aproximadamente 73 kDa, que sería el resultado de la inoculación y la exposición al metal pesado ya que estas bandas no están presentes en las plantas no inoculadas (figura 3).

Tabla 2. Datos promedios de conductividad relativa de raíz (CR raíz), conductividad relativa de hojas (CR hoja), de plantas de pimienta no inoculadas (NI) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (FM), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, M: micorrización, Cu ( $\mu\text{M}$ ): Concentraciones crecientes de Cu, M x Cu: interacción entre la micorrización y las concentraciones crecientes de Cu, ns: no significativo. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en la columna, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas en la fila ( $p < 0,05$ ).

| Cu ( $\mu\text{M}$ ) | CR raíz (%) |          | CR hoja (%) |          |
|----------------------|-------------|----------|-------------|----------|
|                      | NI          | FM       | NI          | FM       |
| 0                    | 23,80 bA    | 19,98 bB | 12,14 aA    | 6,43 aA  |
| 10                   | 22,12 bA    | 16,86 bB | 12,02 aA    | 9,17 aA  |
| 50                   | 41,77 aA    | 15,44 bB | 11,00 aA    | 8,88 aA  |
| 100                  | 46,68 aA    | 29,66 aB | 11,13 aA    | 11,09 aA |
| 200                  | 46,89 aA    | 31,30 aB | 11,47 aA    | 11,41 aA |
| 1000                 | 52,42 aA    | 39,42 aB | 11,24 aA    | 10,08 aA |
| M                    | < 0,001     |          | ns          |          |
| Cu                   | < 0,001     |          | ns          |          |
| M x Cu               | < 0,001     |          | ns          |          |

Tabla 3. Malondialdehído de raíz (MDA raíz), malondialdehído de hojas (MDA hoja) de plantas de pimienta no inoculadas (NI) o inoculadas con *Funneliformis mosseae* (FM), cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre. M: micorrización, Cu ( $\mu\text{M}$ ): Concentraciones crecientes de Cu, M x Cu: interacción entre la micorrización y las concentraciones crecientes de Cu, ns: no significativo. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en la columna, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas en la fila ( $p < 0,05$ ).

| Cu ( $\mu\text{M}$ ) | MDA raíz<br>( $\text{nmol g}^{-1}$ PF) |         | MDA hoja<br>( $\text{nmol g}^{-1}$ PF) |          |
|----------------------|--|---------|--|----------|
|                      | NI                                     | FM      | NI                                     | FM       |
| 0                    | 4,68 aA                                | 4,04 aA | 9,68 bA                                | 8,11 bA  |
| 10                   | 4,83 aA                                | 5,09 aA | 9,59 bA                                | 9,88 bA  |
| 50                   | 4,62 aA                                | 5,23 aA | 9,73 bA                                | 9,72 bA  |
| 100                  | 4,46 aA                                | 5,05 aA | 9,15 bA                                | 12,41 aA |
| 200                  | 4,82 aA                                | 4,96 aA | 10,29 bA                               | 12,18 aA |
| 1000                 | 5,66 aA                                | 5,24 aA | 13,34 aA                               | 14,01 aA |
| M                    | ns                                     |         | ns                                     |          |
| Cu                   | ns                                     |         | ns                                     |          |
| M x Cu               | ns                                     |         | < 0,05                                 |          |

En las raíces, con el aumento en la concentración de cobre se observó una disminución en el contenido de proteínas, evidenciado por una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a los polipéptidos de alto peso molecular. El patrón proteico de la raíz también fue modificado por el Cu y la micorrización, observándose en las plantas micorrizadas un polipéptido de aproximadamente 112 kDa (figura 4).

#### Parámetros morfológicos

El área foliar de las plantas de pimienta cultivadas en hidroponía, disminuyó al aumentar la concentración de cobre. En las plantas no inoculadas se observó una disminución significativa de 44% a partir de 50  $\mu\text{M}$  y una caída aún mayor, 79%, en las plantas cultivadas en presencia de 1000  $\mu\text{M}$  de Cu. En las plantas micorrizadas también se produjo una reducción del área

a partir de 50  $\mu\text{M}$  de 51% y de 74% en 1000  $\mu\text{M}$ . En todos los tratamientos las plantas micorrizadas mostraron mayor área foliar que las no inoculadas (figura 5A). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el área foliar para micorrización, el cobre y la interacción de ambos factores, demostrando que la micorrización atenúa el efecto tóxico del metal en el área foliar.

El peso seco de las plantas cultivadas en hidroponía, disminuyó con el agregado del cobre en la solución, aunque las diferencias fueron significativas a partir de 200  $\mu\text{M}$ , tanto en las plantas inoculadas como en las no inoculadas, en las plantas micorrizadas disminuyó 51% y en las no inoculadas 60% (figura 5B). En todas las concentraciones estudiadas, las plantas inoculadas mostraron una mejor respuesta. Según el análisis de varianza las diferencias significativas en el peso seco se observaron con el aumento de la concentración de cobre en la solución.

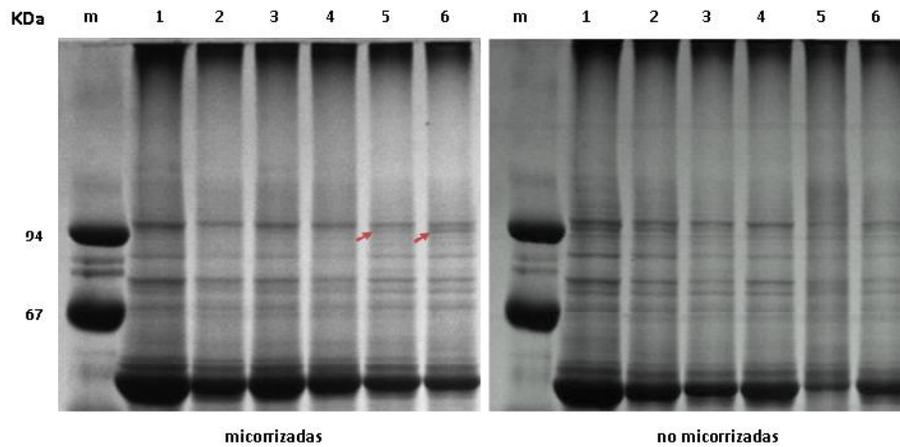


Figura 3. Patrón proteico de hojas de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0  $\mu\text{M}$ , 2: 10  $\mu\text{M}$ , 3: 50  $\mu\text{M}$ , 4: 100  $\mu\text{M}$ , 5: 200  $\mu\text{M}$  y 6: 1000  $\mu\text{M}$  de Cu. La flecha indica el polipéptido de 73 KDa.

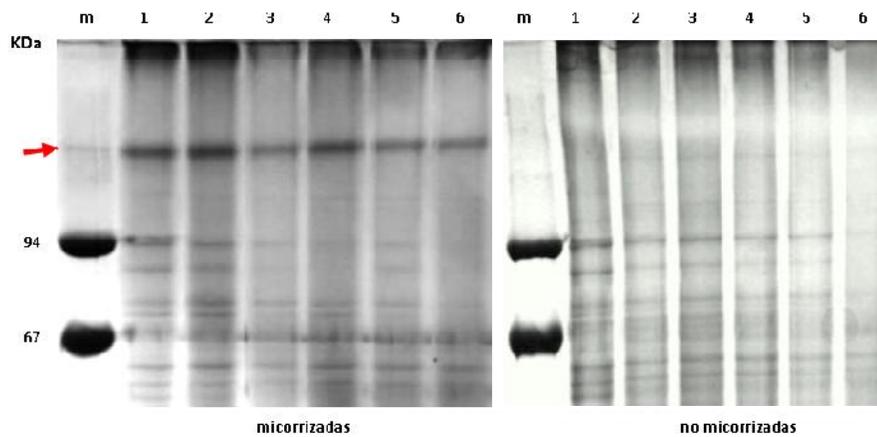


Figura 4. Patrón proteico de raíces de plantas de pimienta no inoculadas o inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre, mediante SDS-PAGE, m: marcador de peso molecular, 1: 0  $\mu\text{M}$ , 2: 10  $\mu\text{M}$ , 3: 50  $\mu\text{M}$ , 4: 100  $\mu\text{M}$ , 5: 200  $\mu\text{M}$  y 6: 1000  $\mu\text{M}$  de Cu. La flecha indica el polipéptido de 112 KDa.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo concuerdan con los reportados por Ronco *et al.* (2008) quienes observaron en plantas de pimienta que la inoculación con *Glomus mosseae* disminuyó el índice mitótico en todos los tratamientos, con diferentes concentraciones del herbicida glifosato. A mayor concentración del herbicida, correspondió un menor índice mitótico, de la misma manera en este trabajo se encontró que el índice mitótico disminuyó al aumentar el estrés por cobre. Fusconi *et al.* (1999), también reportaron que la micorrización con *G. mosseae* afectó la actividad mitótica de las células meristemáticas, de la misma manera que la observada en este trabajo. Según los estudios realizados por Martínez-Trujillo *et al.* (2009) la actividad mitótica de la raíz primaria de *Arabidopsis* no

fue afectada por concentraciones de cobre en el orden de 0 hasta 65  $\mu\text{M}$ , mientras que la actividad se perdió en presencia de 80 y 90  $\mu\text{M}$ . En las raíces laterales la respuesta fue similar, lo que sugiere que si bien el crecimiento es afectado por la presencia del cobre, éste continúa y no se detiene por completo. El mismo autor describió que el crecimiento de la raíz primaria se inhibe gradualmente conforme se aumenta la concentración de cobre, inhibiéndose completamente con 90  $\mu\text{M}$ . Elizarrarás (2005) y Ortiz-Castro *et al.* (2007) demostraron que el aluminio y el cromo, en concentraciones mínimas actúan inhibiendo el crecimiento de la raíz principal de las plantas, incrementando el desarrollo de raíces laterales. Esta estrategia posiblemente le permite a las plantas aumentar la superficie del sistema radical y de esta manera mantener la tasa de absorción de nutrientes.

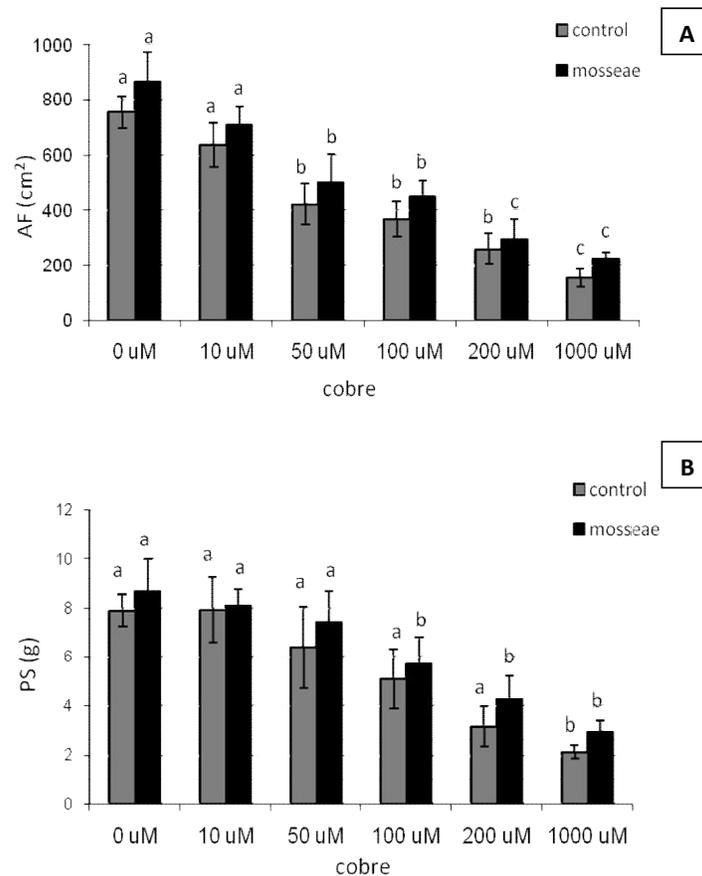


Figura 5. Valores medios de Área foliar (A) y Peso seco (B) de plantas de pimienta no inoculadas e inoculadas con *Funneliformis mosseae*, cultivadas en presencia de distintas concentraciones de cobre y su correspondiente error estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de cobre para cada tratamiento de inoculación ( $p < 0,05$ ).

Alteraciones similares han sido reportadas en plántulas de maíz sumergidas en una solución suplementada con 50  $\mu\text{M}$  de aluminio (Doncheva *et al.*, 2005).

Jonak *et al.* (2004) trabajando con alfalfa expuesta a altas concentraciones de cadmio y cobre, observaron que la detoxificación de los metales pesados estuvo relacionada a cambios en la expresión de genes, síntesis de péptidos y proteínas quinasas. Estos autores encontraron cuatro quinasas que se activan rápidamente por efecto del cobre, mientras que las mismas proteínas también son inducidas por el cadmio, aunque esta respuesta es más lenta. Zhang *et al.* (2009) encontraron resultados similares en arroz, en donde las elevadas concentraciones de cobre no sólo inhibieron la germinación de las semillas, además indujeron la síntesis de proteínas de bajo peso molecular, las que aparentemente estarían involucradas en mecanismos de tolerancia y respuesta a la toxicidad al cobre. En este trabajo, se observaron cambios en la expresión del patrón proteico en relación a la presencia del cobre y de la micorrización. Los polipéptidos sintetizados en los tejidos foliares de las plantas micorrizadas estarían relacionados con mecanismos de detoxificación y tolerancia al cobre. En situaciones de estrés por cromo, Ruscitti *et al.* (2011) reportaron una

disminución en el contenido de proteínas foliares con el aumento de la concentración del metal en el sustrato. John *et al.* (2012) encontraron también una disminución del contenido de proteínas solubles en presencia de metales pesados en *Brassica juncea* L. La modificación del patrón proteico debido a la presencia de Cu y la micorrización, observado en este trabajo sugiere que la inoculación con HMA contribuiría a que las plantas toleren concentraciones superiores del metal, evidenciado por los parámetros morfológicos y fisiológicos analizados. Varios autores han observado en plantas micorrizadas diferencias en el patrón de expresión de proteínas en respuesta a los MP (Ouziad *et al.*, 2005; Hildebrandt *et al.*, 2007) o bajo otros estreses abióticos (Sannazzaro *et al.*, 2007). Birhane *et al.* (2012) encontraron que las plantas que conservaron más agua en situación de estrés mantuvieron los estomas abiertos durante un período de tiempo más prolongado, lo que condujo a un incremento de la asimilación neta, coincidiendo con Yano-Melo *et al.* (1999) Vinit-Dunand *et al.* (2002) y Wu & Xia (2006). La simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares genera condiciones que conducen a un mejor estado hídrico de la planta, que resulta en una mayor conductancia estomática respecto

de las plantas no micorrizadas, lo que coincide con los resultados encontrados en este trabajo. Querejeta *et al.* (2003) encontraron que el uso de hongos micorrícicos provocó un aumento en la conductancia estomática en una especie de crecimiento lento como *Olea europaea ssp. sylvestris* pero no así en una especie de crecimiento rápido como *Rhamnus lycioides*. Por otro lado, Davies *et al.* (2002) trabajando con girasol observaron que el cromo afectó negativamente la conductancia estomática, resultado similar al encontrado en las plantas de pimiento cuando se expusieron al cobre en este trabajo.

Nuestros resultados coinciden con los reportados por Yurekli & Porgali (2006) quienes observaron que el contenido de clorofila disminuyó con la presencia de 100  $\mu\text{M}$  de cobre en el medio. No obstante, Ruscitti *et al.* (2017), no encontraron diferencias en el contenido de clorofila a, b y carotenoides con el incremento de cobre en el suelo. Sin embargo, Bernardo *et al.* (2018) observaron un mayor índice de verdor asociado a las plantas de pimiento micorrizadas en altas concentraciones de Cu en el suelo y en coincidencia con este trabajo el índice de verdor disminuye al aumentar la concentración del metal.

Los resultados de este trabajo muestran que el cobre afectó la integridad de las membranas celulares, lo que se puso en evidencia por la liberación de electrolitos, que fue significativamente mayor en las plantas no inoculadas que en las inoculadas y en las raíces más que en las hojas, en coincidencia con los resultados reportados por Ruscitti *et al.* (2011), en plantas cultivadas en presencia de concentraciones tóxicas de cromo en el suelo. Resultados similares se observaron en plantas de maíz sometidas a concentraciones elevadas de Cd (Krantev *et al.*, 2008). En el caso del cobre, los iones  $\text{Cu}^{2+}$  pueden interactuar con los grupos S y N en las proteínas celulares, que de esta manera podrían alterar los canales iónicos de las membranas, lo cual promovería un alto flujo de iones de las células (Bačkor *et al.*, 2007). En coincidencia con nuestros resultados, Ruscitti *et al.* (2017) observaron un aumento del daño en las membranas celulares de hojas y raíces, al aumentar el contenido de cobre en el suelo y el efecto protector que ejercen las micorrizas arbusculares en esta situación.

Los resultados de este trabajo son similares a los reportados por Muradoglu *et al.* (2015), que encontraron en frutilla que la concentración de MDA en las hojas fue mayor que en la raíz cuando las plantas se cultivaron en presencia de Cd. Esto indica que en las raíces de pimiento y frutilla, los metales pesados no provocan alteraciones en la membrana de las células de la raíz. En contraposición, Yurekli & Porgali (2006) determinaron en poroto que el incremento en la peroxidación de los lípidos después del tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de cobre fue significativo en raíz, pero no en tallos y hojas.

Mirlean *et al.* (2007) trabajando con plantas de vid cultivadas en presencia de altas concentraciones de cobre, observaron una disminución en el peso seco y área foliar, sugiriendo que algunos procesos metabólicos podrían ser afectados por las altas concentraciones del metal. Malekzadeh *et al.* (2007) observaron también que plantas de tomate inoculadas con hongos micorrícicos, acumularon más materia seca

y tuvieron mayor área foliar que las plantas no micorrizadas en presencia de metales pesados, de igual forma que nuestros resultados, indicando que la micorrización promueve el crecimiento de las plantas en esta situación. En plantas de pimiento creciendo en suelo con el agregado de cobre, Ruscitti *et al.* (2017) observaron una disminución del crecimiento de las plantas a medida que aumentaba la concentración del metal y lo atribuyeron a la menor tasa de fotosíntesis registrada. Malekzadeh *et al.* (2007) adjudicaron la respuesta a una menor traslocación de los metales pesados hacia los tallos y a la acumulación de estos en las estructuras fúngicas representando una barrera biológica que podría proteger a la planta, en coincidencia con Joner *et al.* (2000) que encontraron altas concentraciones de metales pesados en el micelio de *Glomus*, lo que indicaría que los HMA inmovilizarían los metales pesados.

## CONCLUSIONES

La contaminación de los suelos agrícolas por metales pesados es un proceso que afecta no sólo los suelos de numerosas áreas del planeta, sino también la calidad de los alimentos cosechados, al trasladar dichos metales hacia los órganos comestibles.

En este trabajo, en plantas cultivadas en condiciones de hidroponía, el cobre afectó el crecimiento en moderadas y altas concentraciones. Las plantas cultivadas en presencia de cobre redujeron la conductancia estomática y el cierre de estomas, disminuyendo la transpiración de las plantas. El aumento de la temperatura, alteró la capacidad de disipar el calor por las hojas. Las plantas expuestas a Cu mostraron inhibición del crecimiento, evidenciado por la reducción de los valores de índice mitótico. La expresión de las proteínas de las plantas de pimiento se alteró en presencia de cobre en el medio, manifestada por el desarrollo de perfiles proteicos diferentes. Las plantas inoculadas con *F. mosseae* creciendo en altas concentraciones de Cu, presentaron mayor conductancia estomática que las no inoculadas, por lo que se concluye que la micorrización actúa atenuando el efecto del cobre sobre el desbalance hídrico de los plantas de pimiento, las que mostraron un mayor crecimiento y producción de biomasa. El índice de verdor, disminuyó ante la presencia de concentraciones crecientes de cobre en el suelo, efecto que no fue modificado por la micorrización. El cobre alteró la funcionalidad de las membranas celulares de la raíz afectando las proteínas y la conductividad relativa de membrana. Todas estas alteraciones fisiológicas observadas en las plantas de pimiento sometidas a estrés por cobre, se reflejaron también en la disminución del crecimiento, determinado por el área foliar y el peso seco. La inoculación con hongos micorrícicos arbusculares representaría una estrategia viable para mitigar los daños provocados por el Cu en el suelo.

Los ensayos en condiciones de hidroponía, permitieron estudiar el efecto directo del cobre en las plantas, sin la interferencia del suelo que ejerce un efecto amortiguador al adsorber el metal a sus partículas. Futuros estudios en condiciones reales de producción

nos permitirán aseverar la veracidad de estos resultados y extrapolarlos a diferentes situaciones.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Laura Wahnan (CONICET) por su colaboración en las tareas de laboratorio. Este trabajo se realizó con subsidio de la UNLP.

### BIBLIOGRAFÍA

**Abollino O., Aceto M., Malandrino M., Mentaste E., Sarzanini C. & R. Barberis.** 2002. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environ. Pollution* 119-127.

**Azcón-Bieto, J. & M. Talón.** 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 522 pág. McGraw Hill. Interamericana.

**Bačkor, M.P., M. Vácz, J. Barták, A. Budová & Dzubaj.** 2007. Uptake, photosynthetic characteristics and membrane lipid peroxidation levels in the lichen photobiont *Trebouxia erici* exposed to copper and cadmium. *Bryologist* 110: 100-107.

**Baldantoni, D., A. Alfani, P. Di Tommasi, G. Bartoli & A.V. De San to.** 2004. Assessment of macro and microelement accumulation capability of two aquatic plants. *Environ Pollution* 130(2):149-56.

**Barea, J.M., R. Azcón & C. Azcón-Aguilar.** 2005. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot F, Varna S, eds. *Micro-organisms in soils: roles in genesis and functions*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag 195-212.

**Beltrano, J., M.F. Ruscitti, M.C. Arango & M.G. Ronco.** 2013a. Changes in the accumulation of shikimic acid in mycorrhized *Capsicum annuum* L. grown with application of glyphosate and phosphorus. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 25: 125-136.

**Beltrano, J., M. Ruscitti, M.C. Arango & M. Ronco.** 2013b. 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.

**Bernardo, V., F. Collado, C. Arango, S. Garita & M. Ruscitti,** 2018. La inoculación con hongos micorrícicos y la aplicación de ácido salicílico aumentan la tolerancia a cobre en plantas de pimiento. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNR*, (31), 007-016.

**Birhane, E., F.J. Sterck, M. Fetene, F. Bongers & T.W. Kuyper.** 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* 169(4): 895-904.

**Bouazizi, H., H. Jouili, A. Geitmann & E.E.I. Ferjani.** 2010. Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotop. Environ. Safe* 73: 1304-1308.

**Bowler, C., W. Van Camp, M. Van Montagu & D. Inzé.** 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.

**Cabannes, Y. & M. Dubbeling.** 2001. Food security, urban agriculture and urban management. UMP-LAC/UNCHS-HABITAT/IPES New York. City Farmer, Canada's Office of Urban Agriculture.

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

**Cordier, C., S. Gianinazzi & V. Gianinazzi-Pearson.** 1996. Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotiana* var. parasitica related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil* 185: 223-232.

**Dassi, B., E. Dumas-Gaudot & S. Gianinazzi.** 1998. *Physiol & Molec Plant Pathol* 52:167-183.

**Davies, F.T., J.D. Puryear, R.J. Newton, J.N. Egilla & J.A.S. Grossi.** 2002. Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J. Plant Nutrition* 25: 2389-2407.

**Doncheva, S., M. Amenós, Ch. Poschenrieder & J. Barceló.** 2005. Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56: 1213-1220.

**Elizarrarás, S.M.** 2005. Efecto del aluminio en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Tesis profesional de Biólogo. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

**Fusconi, A., E. Gnani, A. Trotta & G. Berta.** 1999. Apical meristems of tomato roots and their modifications induced by arbuscular mycorrhizal and soilborne pathogenic fungi. *New Phytologist* 142, 505-516.

**Gange, A., E. Bower & V. Brown.** 1999. Positive effects of an arbuscular mycorrhizal fungus on aphid life history traits. *Oecologia* 120: 123-131.

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

**Ghaderian, S.M. & A.A.G. Ravandi.** 2012. Accumulation of copper and other heavy metals by plants growing on Sarcheshmeh copper mining area, Iran. *Journal of Geochemical Exploration* 123, 25-32.

**Giuffré, L., S. Ratto, L. Marbán, J. Schonwald & R. Romaniuk.** 2005. Riesgo por metales pesados en horticultura urbana. *Ciencia del suelo* 23(1), 101-106.

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

**Hildebrandt, U., M. Regvar & H. Bothe.** 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochem* 68:139-146

**Hoagland, D.R. & D.I. Arnon.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347.

**John, R., P. Ahmad, K. Gadgil & S. Sharma.** 2012. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*. 3 (3):65-76.

**Jonak, C., H. Nakagami & H. Hirt.** 2004. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiology* 2004 Oct; 136(2): 3276-3283.

- Joner, E.J., R. Briones & C. Leyval.** 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226:227-234.
- Kaya, C., M. Ashraf, O. Sonmez, S. Aydemir, A. Levent Tuna & M. Ali Cullu.** 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.
- Khan, A.G.** 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biology* 18:355-364.
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. & L. Popova.** 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 165, Issue 9, Pages 920-931.
- Laemmli, U.K.** 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature* 227:680-85.
- Lal, R.** 2001. Soil degradation by erosion. *Land Degradation & Development* 12: 519-539.
- Linderman, R.G.** 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay GJ & Linderman RG (Eds) *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA Spec. Publ., Madison, Wisconsin. pp 45-70.
- Lock, I. & H. de Zeeuw.** 2000. Mitigación de los riesgos para la salud asociados con la agricultura urbana y peri-urbana. Conferencias electrónicas "Agricultura urbana y peri-urbana en la agenda política" FAO y ETC-RUAF, 21de Agosto al 30 de Septiembre del 2000: www.RUAF.org website: www.FAO.org/urbanag.
- Lutts, S., Kinet, J.M. & J. Bouharmont.** 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L) cultivars differ in salinity resistance, *Ann. Botany* 78:389-398.
- Malekzadeh, P., Khara, J. & S. Farshian.** 2007. Copper toxicity influence on antioxidant enzymes activity in tomato plants and role of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum* in the tolerance of toxicity. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (12): 2008-2013.
- Manoharan, P., Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Gomathinayagam, S., Sharma, M.P. & K. Muthuchelian.** 2010. Influence of AM fungi on the growth and physiological status of *Erythrina variegata* Linn. grown under different water stress conditions. *European Journal of Soil Biology* 46:151-156.
- Marschner, H.** 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd edition, Academic Press, London. 889 p
- Martínez-Trujillo, M., Sántiz-Gómez, M., Ortiz – Castro, R. & Y. Carreón – Abud.** 2009. Efecto del cobre en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. *Biológicas (México)* 11: 122-131.
- McLaughlin, M.J., Parker, D.R. & J.M. Clarke.** 1999. Metals and micronutrients—food safety issues, *Field Crops Reserch* 60, 143-163.
- Mirlean, N., Roisenberg, A. & J.O. Chies.** 2007. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environ Pollution* 149:10-17.
- Muradoglu, F., Gundogdu, M., Ercisli, S., Encu, T., Balta, F., Jaafar, H. & M. Zia-UI-Haq.** 2015. Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biological Research* 48:11.
- Ocampo, J.A. & J.M. Barea.** 1982. Depressed metabolic activity of VA mycorrhizal fungi by photosynthesis inhibitor herbicides, p. 267–270. In: S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson, and A. Trouvelot (eds.). *Mycorrhizae, an integral part of plants: Biology and perspectives for their use*. INRA Publ. Colloq., France.
- Ocampo, J.A.** 1993. Influence of pesticides on VA mycorrhizal. p.214-226 In: *Pesticide–plant pathogen interactions in crop production: beneficial and deleterious effects*, CRC Press, Boca Raton, FL.. (Altman, J. ed).
- Olivares Rieumont, S., García Céspedes, D., Lima Cazorla, L., Saborit Sánchez, I., Llizo Casals, A. & P. Pérez Álvares.** 2013. Niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en hortalizas cultivadas en una zona altamente urbanizada de la ciudad de La Habana, Cuba. *Rev. Int. Contam. Ambiental* 29 (4) 285-294.
- Orlowska, E., Ryszka, P., Jurkiewicz, A. & K. Turnau.** 2005. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonization of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. *Geoderma* 129: 92-98.
- Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J. & C. Cervantes.** 2007. Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* 172: 684-691.
- Ouziad, F., Hidebrandt, U., Schmelzer, E. & H. Bothe.** 2005. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J Plant Physiol* 162:634-649.
- Querejeta, J.I., Barea, J.M., Allen, M.F., Caravaca, F. & A. Roldán.** 2003. Differential response of  $\delta^{13}C$  and water use efficiency to arbuscular mycorrhizal infection in two aridland woody plant species. *Oecologia* 135:510-515.
- Quilambo, O.A.** 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp 539-546.
- Rodríguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E. & A. Bleecker.** 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996- 998.
- Ronco, M.G., Ruscitti, M.F., Arango, M.C. & J. Beltrano.** 2008. Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *J. Hort. Sc. Biotech* 83: 497-505.
- Ruscitti, M.** 2017. La micorrización modifica la respuesta de las plantas de pimiento en presencia de cobre en el suelo. Tesis para acceder al título de Doctor, Facultad de Cs. Exactas, UNLP. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60324/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=4&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/60324/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=4&isAllowed=y)
- Ruscitti, M., Arango, M. & J. Beltrano.** 2017. Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 29(1), 37-49.
- Ruscitti, M.F., Arango, M.C., Ronco, M.G. & J. Beltrano.** 2011. Inoculation with mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* or *G. intraradices*- modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in

pepper plants (*Capsicum annum* L.). Brazilian Journal of Plant Physiology 23:15-25

**Ruscitti, M., Ronco, M., Arango, C. & J. Beltrano.** 2007. Respuesta a la salinidad del suelo y la disponibilidad de fósforo en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) inoculadas con *Glomus intraradices*. VI Encuentro nacional científico técnico de biología del suelo, IV Encuentro sobre fijación biológica de nitrógeno. Río Cuarto, Argentina. ISBN 978-950-665-438-2.

**Sannazzaro, A.I., Echeverria, M., Albertó, E.O., Ruiz, O.A. & A.B. Menéndez.** 2007. Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhizal. Plant Physiol Biochem 45:39-46.

**Sass, J.E.** 1958. Botanical Microtechnique. 3rd. Edition. The Iowa State College Press, Ames, IA, USA. 228 pp.

**Smith, S.E. & D.J. Read.** 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, San Diego, CA, USA, 605 pp.

**Snijders, C.** 1994. Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins. Eagan Press, Minn. Pp 37-58.

**Taiz, L. & E. Zeiger.** 2006. Plant physiology. 4th ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, Sunderland

**Thornton, L.** 1999. Bioavailability of trace metals in the food chain. The 2nd International Vetiver Conference, Bangkok, Thailand.

**Trouvelot, A., Kough, J. & V. Gianinazzi-Pearson.** 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds), Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects pp.217-221. INRA-Press, Dijon, France.

Physiological and Genetical Aspects pp.217-221. INRA-Press, Dijon, France.

**Upadhyay, R.K. & S.K. Panda.** 2009. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). Comptes Rendus Biologies 332 (7): 623-632.

**Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sosse, B. & P. Badot.** 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. Plant Science 163: 53-58.

**Wu, Q. & R. Xia.** 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. Journal of Plant Physiology 163: 417-425.

**Yadav, S.K.** 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants / South African Journal of Botany 76, 167-179.

**Yano-Melo, A.M., Maia, L.C., Saggin, J.R., Lima-Filho, J.M. & N.F. Melo.** 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micro propagated banana plantlets. Mycorrhiza 9:119-123.

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

**Zhang, H., Lian, C. & Z. Shen.** 2009. Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. Annals of Botany 103: 923-930.