

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Influencia de la micorrización sobre la acumulación de metales y estrés oxidativo de *Salix caprea* cultivada en un suelo contaminado



Rocío Abín Rueda

Área de Fisiología Vegetal

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas

Julio/2014



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Resumen

Los metales pesados constituyen un contaminante con graves repercusiones para la salud humana y ambiental. Por ello, se han desarrollado en los últimos años técnicas biológicas menos agresivas con el medio ambiente como la fitorremediación, es decir la utilización de plantas para la descontaminación de suelos. Sin embargo, esta técnica está limitada por la disponibilidad de los contaminantes del suelo para las plantas. Actualmente se estudia la posibilidad de incrementar la capacidad de absorción de las plantas mediante la simbiosis con hongos micorrícicos. En este trabajo se ha estudiado la influencia de la micorrización de *Salix caprea* sobre el crecimiento y acumulación de metales pesados, así como otros parámetros relacionados con el estrés oxidativo para evaluar su potencial en fitorremediación.

La micorrización de *S. caprea* con *Paxillus ammoniavirescens* favoreció el crecimiento de las plantas jóvenes y la acumulación de metales en las plantas adultas. Los metales pesados del suelo provocaron una disminución del contenido en clorofilas así como un incremento de la peroxidación lipídica y el contenido en H₂O₂. Este aumento de especies reactivas del oxígeno desencadenó diferentes respuestas antioxidantes mostrando que las plantas adultas no micorrizadas utilizan preferentemente la vía de la guaiacol peroxidasa en la detoxificación de H₂O₂ mientras que las adultas micorrizadas usarían la catalasa como vía de detoxificación.

Abstract

Heavy metals are serious pollutants with severe repercussions on environmental and human health. Because of this, lately, phytoremediation, plant use for soil decontamination has been developed as an efficient and low cost system. However it's limited by pollutant bioavailability. Currently, it's been studied the possibility of improving plant aptitude for phytoremediation by symbiosis with mycorrhizal fungi. In this work, we studied the influence of *Salix caprea* mycorrhization on growth and metal accumulation and we also studied oxidative stress related parameters. The aim of this work is evaluate phytoremediation potential of *S. caprea*.

Mycorrhization with *Paxillus ammoniavirescens* improved *Salix caprea* growth in young plants and metal accumulation in adult ones. Heavy metal accumulation decrease chlorophyll content and also increased lipid peroxidation and H₂O₂ content. Oxygen reactive species modified antioxidant responses, no mycorrhizal adult plants use guaiacol peroxidase while micorrhized ones use catalase.

Abreviaturas

- ANOVA: Análisis de la varianza
- APX: Ascorbato peroxidasa
- BOPA: Boletín Oficial del Principado de Asturias
- CAT: Catalasa
- DTT: Ditiotreitól
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- EPA: US Environmental Protection Agency
- F_0 : Fluorescencia inicial
- F_m : Fluorescencia máxima
- F_v : Fluorescencia variable
- F_v/F_m : Índice de eficiencia fotosintética
- GPOD: Guaiacol peroxidasa
- ICP-MS: Espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inducido
- MDA: Malondialdehído
- MMN: Medio Melin-Norkrans
- SC-W: Clon W de *Salix caprea*
- SOD: Superóxido dismutasa
- PAM: Planta adulta micorrizada
- PANM: Planta adulta no micorrizada
- PF: Peso fresco
- PJM: Planta juvenil micorrizada
- PJNM: Planta juvenil no micorrizada
- PS: Peso seco
- ROS: Especies reactivas del oxígeno
- WPM: Woody Plant Medium

Índice

1. Introducción.....	1
2. Material y Métodos.....	5
2.1. Cultivo de plantas.....	5
2.1.1. Micropropagación.....	5
2.1.2. Micorrización.....	5
2.1.3. Aclimatación.....	6
2.2. Cultivo de plantas en campo.....	6
2.3. Parámetros de crecimiento.....	7
2.4. Contenido en metales pesados en plantas y suelo.....	7
2.5. Eficiencia fotosintética y análisis de pigmentos.....	8
2.6. Contenido de H ₂ O ₂ y peroxidación de lípidos.....	8
2.7. Determinación de la actividad enzimática.....	9
2.8. Análisis estadístico.....	10
3. Resultados y discusión.....	11
3.1. Contenido en metales del suelo experimental.....	11
3.2. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de <i>S. caprea</i>	11
3.3. Efecto de la micorrización sobre la acumulación de metales de <i>S. caprea</i>	12
3.4. Contenido en pigmentos y eficiencia fotosintética.....	14
3.5. Peroxidación lipídica y contenido en H ₂ O ₂	15
3.6. Actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo.....	15
4. Conclusiones.....	18
5. Bibliografía.....	19

1. Introducción

En los últimos años, con el desarrollo industrial y el aumento de actividades asociadas, se ha producido un gran aumento en la emisión de metales pesados al ambiente, y por consiguiente, el aumento de la concentración de éstos en el suelo. Estos elementos se encuentran de manera natural en la corteza terrestre y algunos son esenciales en concentraciones pequeñas pero tóxicos cuando su presencia aumenta teniendo efecto negativo en distintos grupos de seres vivos incluyendo los seres humanos.

El término de metales pesados hace referencia a los metales con peso atómico mayor al del hierro (55,85 g/mol), pero se utiliza una acepción más ambigua de esta expresión ya que en este mismo grupo se incluyen metales como el manganeso o el cromo que tienen un peso menor e incluso elementos que no son estrictamente metales, como el arsénico.

La EPA (US Environmental Protection Agency) incluye algunos de estos elementos como el antimonio, arsénico, berilio, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y zinc como contaminantes prioritarios.

Debido a la preocupación por la salud humana y medioambiental, en las últimas décadas se han incluidos en los planes gubernamentales la gestión de residuos, como en la Directiva 2004/35/CE que obliga a los estados miembros de la Comunidad Europea a la elaboración y diseño de una estrategia nacional de recuperación de suelos contaminados, lo que se adapta al marco nacional en el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, donde se refieren a suelo contaminado cuando *“sus características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comporte un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente y así se haya declarado mediante resolución expresa.”*

Con el fin de solventar estos problemas medioambientales se han desarrollado tecnologías para la descontaminación de suelos, entre las que se incluyen algunas de carácter biológico como la fitorremediación.

La fitorremediación, definida como el uso de plantas para retirar contaminantes del ambiente, ha sido impulsada durante las últimas décadas debido a que supone un remedio de bajo coste a un problema medioambiental además de aportar otros servicios como mantenimiento de la actividad biológica y estructura del suelo sin generar más impacto y considerándose así un proceso “amigable con el medio ambiente”.

Este trabajo se centra en el ámbito de la fitoextracción, proceso por el que las plantas retiran metales del suelo acumulándolos en su parte aérea, pero se han identificado también otros tipos de fitorremediación como la fitodegradación, la rizofiltración, la fitoestabilización y la fitovolatilización.

En el caso de la fitoextracción, encontramos limitaciones como el gran tiempo requerido ya que se requerirían más de 100 años para eliminar los metales completamente (Vangrosveld et al., 2009) pero es la manera más efectiva para retirar oligoelementos del suelo.

La tolerancia a metales pesados es definida como la capacidad de una planta para sobrevivir y reproducirse en suelos altamente contaminados y tóxicos para la mayoría de plantas. Éstas tienen mecanismos muy específicos para transportar y acumular metales tóxicos porque sus propiedades químicas simulan a aquellas de los minerales esenciales (Tangahu et al., 2011) y por tanto las plantas no los discriminan bien. Sin embargo, la tolerancia básica intrínseca a la mayoría de plantas no soluciona el problema cuando las concentraciones en el suelo aumentan (Clemens, 2001).

Los metales pesados inducen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden provocar daños e inactivación de componentes celulares. En condiciones normales son metabolizadas por la célula, pero cuando se rompe el equilibrio este fenómeno es conocido como estrés oxidativo y afecta a lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN.

Uno de los procesos afectados es la fotosíntesis debido a la oxidación de componentes tilacoidales y daños en los fotosistemas (Lawlor, 2002). Las membranas también son dañadas produciéndose la peroxidación de lípidos. Como respuesta, las plantas poseen un sistema antioxidativo formado, entre otros, por enzimas que eliminan los radicales libres impidiendo que estos inhiban otros mecanismos celulares.

En este grupo de enzimas encontramos peroxidasas como la guaiacol peroxidasa (GPOD) o la ascorbato peroxidasa (APX) cuya función es disminuir el contenido en H_2O_2 utilizando distintos donadores en condiciones de estrés oxidativo y en condiciones normales (Mourato et al., 2012). Otra enzima es la catalasa (CAT), que rompe el peróxido de hidrógeno formando agua y oxígeno. Y la superóxido dismutasa (SOD) que convierte las moléculas de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno que son agentes menos tóxicos (Bhaduri y Fulekar, 2012).

Debido a todos estos efectos la capacidad de descontaminación de las plantas está limitada por su productividad y por las concentraciones de metales presentes de manera que la planta ideal para estos procesos es aquella con una alta producción de biomasa que pueda tolerar y a

la vez acumular los contaminantes. A pesar de que existen plantas hiperacumuladoras parece existir un antagonismo entre hiperacumulación y producción de biomasa, de tal manera que la combinación parece imposible. Por ello, se toma como alternativa el uso de plantas no acumuladoras pero de gran biomasa cuya capacidad para la extracción puede ser incrementada mediante programas de selección y/o mediante manipulación genética. A este segundo grupo pertenece la especie sobre la que se centra este trabajo, *Salix caprea*, perteneciente a un género cuya potencialidad para su uso en la fitoextracción ha sido descrita por Pulford y Watson en 2001 y que se caracteriza por tener grandes productores de biomasa, hasta 10-15 toneladas de peso seco por hectárea y año (Riddell-Black, 1993) a la vez que gran variabilidad genética, sugerido por el gran número de variedades e híbridos encontrados (Sommerville, 1992).

Según evidencias crecientes la eficiencia en la extracción de metales también puede ser aumentada por la interacción entre planta y microorganismos de la rizosfera (Shilev et al., 2001). En la naturaleza, se pueden encontrar asociaciones simbióticas mutualistas entre los hongos del suelo y las raíces de plantas superiores llamadas micorrizas. Cuando colonizan la corteza y tejidos epidérmicos, y forman la red de Hartig, se denominan ectomicorrizas. Los hongos se benefician con el suministro de fuentes carbonadas procedentes de la planta, mientras que ésta se beneficia por una mayor cobertura de suelo a nivel de raíces facilitada por los hongos que aumenta la capacidad de absorción de nutrientes minerales. *Salix* se asocia con este tipo de organismos y la colonización puede alcanzar hasta más del 80% de las raíces (Heijden van der et al., 1999).

Muchos hongos ectomicorrícicos muestran una alta tolerancia a la presencia de metales pesados que difiere según la cepa y el metal. Se han sugerido varios mecanismos de tolerancia como cambios en las propiedades de la pared celular, secuestro de metales en la vacuola o mediante agentes quelantes en el citoplasma (Jentschke et al., 2000). También se ha sugerido que utilizarían mecanismos similares para reducir la toma de metales de la planta hospedadora teniendo como resultado que las plantas colonizadas por estos hongos tendrían tolerancia a una mayor concentración de los tóxicos lo que fomentaría que puedan sobrevivir en suelos contaminados.

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la micorrización sobre el crecimiento y la acumulación de metales pesados en *Salix caprea* cuando se cultiva en un suelo contaminado con metales pesados con el fin de estudiar su idoneidad en fitorremediación. Sus respuestas se caracterizarán mediante parámetros fisiológicos y bioquímicos.

Este objetivo podemos desglosarlo en los siguientes apartados:

- 1- Análisis del contenido en metales pesados del suelo.
- 2- Respuesta de *S. caprea* en la parcela experimental: Los estudios de este objetivo van dirigidos a estudiar el crecimiento y la acumulación de metales pesados en las plantas micorrizadas y no micorrizadas para evaluar su potencial de fitorremediación. También estudiaremos las respuestas fisiológicas relacionadas con la fotosíntesis y el contenido en pigmentos de las plantas.
- 3- Influencia de la micorrización sobre el estrés oxidativo de *S. caprea*: en este apartado estudiaremos cómo afecta la micorrización al estrés oxidativo causado por la presencia de metales pesados en el suelo. También estudiaremos las respuestas antioxidativas de las plantas y si la micorrización mejora la tolerancia a este tipo de estrés.

2. Material y métodos:

2.1 Cultivo de plantas:

2.1.1. Micropropagación:

Las plantas utilizadas proceden del clon SC-W de *Salix caprea*, seleccionado debido a su mayor poder acumulativo en arsénico respecto a otros clones ensayados siendo capaz de acumular hasta 160 mg de arsénico por Kg de peso seco de hojas. La selección de los clones se realizó a partir de semillas esterilizadas e introducidas en cultivo *in vitro*. Una vez germinadas y desarrolladas las plántulas, se tomaron segmentos apicales, se sometieron a distintas concentraciones de arsénico y se seleccionó el clon que más arsénico acumulaba y mejor crecimiento presentaba.

Las plantas se micropropagaron en un medio Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1980) indicado para plantas leñosas al que se añadió sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (7 g L^{-1}). El pH se ajustó a 5,7 y las plantas se mantuvieron durante 45 días en una cámara de cultivo con una temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

2.1.2. Micorrización:

La mitad de las plantas fue micorrizada de manera controlada al mes de su micropropagación con el hongo ectomicorrícico *Paxillus ammoniavirescens* aislado en un terreno contaminado con metales pesados. Este hongo fue seleccionado por su gran capacidad para formar micorrizas y tolerar la presencia de metales pesados. El crecimiento del hongo se realizó en un medio Melin-Norkrans (MMN) (Marx, 1969) a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

La micorrización se llevó a cabo en tubos de vidrio, de 295 mm de longitud y 40 mm de diámetro, inoculando dos fragmentos de micelio de *Paxillus ammoniavirescens* junto a las raíces de *S. caprea* en medio WPM. El tiempo de micorrización fue de 18 días.

2.1.3. Aclimatación:

Las plantas fueron aclimatadas para asegurar su supervivencia debido a la baja adaptación que tienen recién salidas de las condiciones *in vitro*.

Para ello fueron sometidos a una disminución gradual de la humedad (95-65 %) en un túnel de niebla. Al tercer día, se traspasaron a un sustrato estéril en recipientes individuales de 4,5 x 4,5 x 17 cm, de turba y perlita en proporción 1:1 (v/v) humedecidas con agua. Pasada la primera semana se sacaron del túnel de niebla a invernadero durante otros 7 días y al exterior los 7 días posteriores para que se fortalecieran antes de la plantación en terreno contaminado.

2.2. Cultivo de plantas en campo

Las plantas de *Salix caprea* se colocaron en una parcela de suelo contaminado de la factoría de Nitrastur. Se utilizaron dos tipos de plantas de *S. caprea*: unas procedentes de cultivo *in vitro* y aclimatadas que llamamos plantas juveniles, micorrizadas (PJM) y no micorrizadas (PJNM) y otras que llevaban 9 meses en parcela y que llamamos adultas, micorrizadas (PAM) y no micorrizadas (PANM).

Nitrastur es un complejo industrial situado en el concejo de Langreo (Asturias) con más de 200.000 m². Fue cerrado en el año 1997 y estaba dedicado a la producción de nitratos. En esta gran superficie los suelos están altamente contaminados aún en la actualidad con gran contenido en metales pesados.

La parcela habilitada en la que se realizó la plantación tiene 600 m², y las plantas se repartieron en cuatro subparcelas de 3x4 m distribuidas de forma aleatoria.

En cada una de las subparcelas se pusieron 18 plantas con una separación entre ellas de 40 cm (Fig. 1). El área de plantación de cada subparcela se mantiene a 1 m de separación de los márgenes habiendo por tanto 2 m entre los individuos plantados en parcelas contiguas para evitar interferencias.

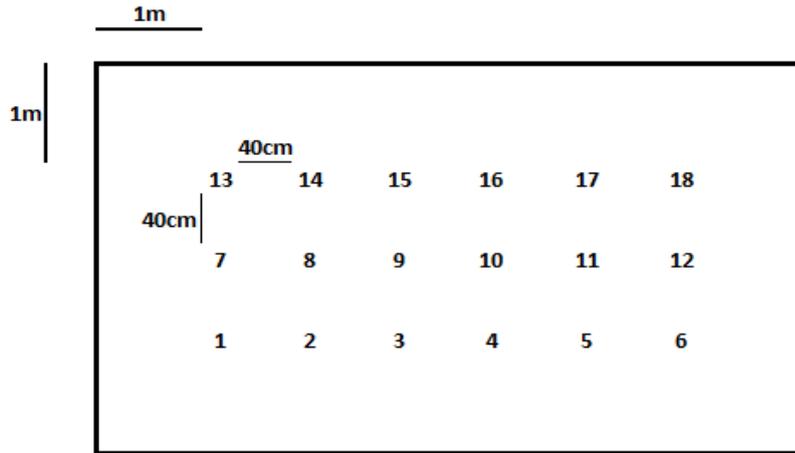


Fig. 1. Distribución de las plantas en la subparcela

2.3. Parámetros de crecimiento:

Al inicio de la plantación y a los 3 y 9 meses se midió la longitud del tallo y el diámetro. Con el fin de reducir al mínimo la variabilidad que existe en el desarrollo de los clones, los resultados se expresan según los siguientes índices:

- Índice caulinar: $(Longitud_{\text{tallo final}} - Longitud_{\text{tallo inicial}}) / (Longitud_{\text{tallo inicial}})$
- Índice de diámetro: $(Diámetro_{\text{tallo inicial}} - Diámetro_{\text{tallo final}}) / (Diámetro_{\text{tallo inicial}})$

2.4. Contenido de metales pesados en plantas y suelo.

El contenido en metales pesados de las plantas se cuantificó tras el lavado de las muestras con agua del grifo, seguido de 3 baños de 5 minutos cada uno en agua destilada para eliminar restos de metales en la superficie. Tras esto se secaron con papel de filtro y se introdujeron en una estufa a 35 °C durante 72 h.

A continuación se trituraron en mortero con nitrógeno líquido y se sometieron a una digestión ácida con 3 mL de HNO₃ concentrado altamente purificado en un horno microondas durante 6 min a 240 W hasta conseguir el licuado total de la muestra (Montaser, 1998). Se realizaron dos diluciones sucesivas de 1:20 y 1:10 con agua desionizada (Milli-Q 185 plus system, 18 mΩ cm⁻¹

resistividad) a las que se añadieron 10 $\mu\text{g Rh Kg}^{-1}$ disuelto en HNO_3 concentrado que fue utilizado como estándar interno.

El análisis de metales pesados fue realizado en un espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inducido (ICP-MS) tipo cuadrupolo (HP-7500c) donde la muestra líquida pasó por nebulización a través de un canal central de plasma que se encuentra altamente ionizado y a una temperatura elevada. Ahí fue desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada. Los iones formados fueron extraídos del canal central por un cono de extracción, y separados en función de su relación masa/carga, llegando a un detector donde generaron un pulso eléctrico que se filtró, moduló y cuantificó. Los metales medidos fueron Fe, Cu, As, Cd, Pb, Zn y Hg.

El análisis de metales del suelo se realizó tras el cribado con un tamiz de 2 mm y una vez secadas las muestras se procesaron de igual forma que las muestras vegetales.

2.5. Eficiencia fotosintética y análisis de pigmentos:

La eficiencia fotosintética se estudia mediante el análisis de la fluorescencia variable (Fv), que se define como la diferencia entre la fluorescencia inicial y la fluorescencia máxima obtenida al iluminar material mantenido en oscuridad. Se realizó con un fluorímetro portátil modelo OS1-FL (opti-sciences) que se aplicó *in situ* en la segunda hoja expandida después de mantener ésta en oscuridad durante 20 minutos con el fin de obtener la fluorescencia inicial (F_0). Tras esto se aplicó un pulso de luz hasta la saturación para obtener la fluorescencia máxima (F_m).

La extracción y cuantificación de pigmentos se realizó con 100 mg de hoja fresca triturada en N_2 líquido a la que se añadieron 2 ml de acetona al 80% (Fernández et al., 2013). Se realizaron diluciones 1:2 y 1:4 con acetona al 80 % para poder medir su absorbancia a 663, 646 y 470 nm en un espectrofotómetro Spectra MRTM. El contenido en pigmentos se cuantificó según las fórmulas de Lichtenthaler y Wellburn (1983).

2.6. Contenido de H_2O_2 y peroxidación de lípidos:

El contenido en H_2O_2 de las hojas fue medido según Singh et al. (2006). 250 mg de hojas frescas fueron homogeneizados con 2 ml de ácido tricloroacético al 0,1 % y centrifugado a 12.000 g durante 15 minutos. A una alícuota de 50 μl de sobrenadante se le añadió 50 μl de

tampón fosfato 100 mM (pH 7,6) y 100 μ l de KI. La absorbancia se midió a 390 nm y es expresada como μ g H₂O₂ g⁻¹ peso fresco.

La peroxidación de lípidos fue evaluada midiendo la formación de malondialdehído (MDA) (Demiral and Turkan, 2005). La extracción de MDA se realizó usando 300 mg de hojas frescas homogeneizadas con 2,5 ml de ácido tricloroacético al 0,1 % y centrifugando a 10.000 g durante 15 min. A una alícuota de 0,25 ml de sobrenadante se le añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 20 % y ácido tiobarbitúrico al 0,5 %. La mezcla fue calentada a 95 °C durante 30 min seguido de un enfriamiento rápido en baño de hielo. Después se centrifugó a 10.000 g durante 15 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm y 600 nm ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El contenido en MDA es expresado como nmol g⁻¹ peso fresco.

2.7. Determinación de la actividad enzimática:

Para analizar los enzimas antioxidativos todos los pasos fueron llevados a cabo en cámara fría a 4 °C (Martins et al., 2010). La extracción se realizó mediante la homogeneización de 300 mg de hojas frescas con 2 ml de una disolución tamponadora Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) que contenía 3 mM ditioneitol (DTT), 1mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,2 % triton X-100 y 2 % (p/p) polivinilpolipirrolidona insoluble. Se centrifugó a 10.000 g durante 30 min. Para la determinación de la ascorbato peroxidasa (APX) la extracción se realizó a partir de 150 mg de hoja fresca y se añadieron 10 mM de ascorbato a los extractos.

La actividad de la guaiacol peroxidasa (GPOD) se determinó siguiendo el método descrito por Martins et al. (2010) usando una reacción que contiene 54 mM de 2-metoxifenol y 12,5 mM de H₂O₂ en tampón de acetato de sodio 200 mM (pH 6,0). La actividad enzimática fue definida mediante el consumo de 1 μ mol de guaiacol min⁻¹ cm⁻³ a temperatura ambiente usando un coeficiente de absorbancia para el tetraguaiacol de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

La actividad de la APX se midió en una reacción que contiene 1 mM de ácido ascórbico, 0,1mM de EDTA y 2,5 mM H₂O₂ en tampón fosfato 100 mM (pH 7,6) siguiendo el descenso de absorbancia a 290 nm (Martins et al., 2010). La actividad enzimática fue definida por la consumición de 1 μ mol de ascorbato min⁻¹ cm⁻³ usando un coeficiente de absorbancia de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

La actividad de la catalasa (CAT) se determinó siguiendo el método de Martins et al. (2010) que mide la disminución de la absorbancia a 240 nm durante dos minutos en una solución que contiene 30 mM de H₂O₂ en tampón fosfato 100 mM (pH 7,6). Y que define la actividad por el consumo de 1 μmol de H₂O₂ min⁻¹ cm⁻³ usando un coeficiente de absorbancia de 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹.

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se determinó según Martins et al. (2010) midiendo el aumento en la absorbancia a 550 nm durante dos minutos en un solución que contenía 0,5 mM de xantina, 0,05 mM citocromo C-férrico, 0,1 mM EDTA, y xantina oxidasa en tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7,6). La actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para inhibir la reducción del 50 % del ferricitocromo-c min⁻¹.

Todas las medidas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro modelo Spectra MRTM.

2.8. Análisis estadístico:

Para los ensayos, se tomaron medidas de 3 plantas por tratamiento para la eficiencia fotosintética, y de 18 para los parámetros de crecimiento. Los análisis químicos se realizaron a partir de 3 muestras biológicas de cada tratamiento. Los datos fueron analizados utilizando SigmaPlot 12.0 y se realizaron test ANOVA de un factor con un nivel de significancia de 0.05.

3. Resultados y discusión.

3.1. Contenido en metales del suelo experimental

En primer lugar se realizó un análisis del contenido de metales del suelo en el que se iban a cultivar las plantas. Este análisis mostró que tiene un alto contenido en Fe, Cu, Zn, As, Cd, Hg y Pb (Tabla 1) y en todos los casos supera ampliamente los niveles de referencia fijados por el Principado de Asturias (BOPA 21 de Abril de 2014). Los metales que se encuentran en concentraciones más altas son el Fe y Pb alcanzando niveles de 513218 mg Fe Kg⁻¹ PS en la subparcela 33 o de más de 10900mg Pb Kg⁻¹ PS en la subparcela 16 (Tabla 1).

El pH, bastante ácido en general, también varió bastante en las diferentes subparcelas oscilando entre 3,7 y 6,7 (Tabla 1). El pH es un factor importante ya que condiciona la disponibilidad de los metales en el suelo para las plantas. En general, la movilidad de los metales aumenta con la acidez del suelo (Kabata-Pendias, 2010) aunque en el caso del arsénico las formas más móviles se encuentran a pH entre 7 - 9.5 y las del mercurio entre 4 y 5.

Tabla 1. Contenido de metales pesados (mg Kg⁻¹ PS de suelo) y pH del suelo. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas a p<0,05. En la tabla también se expresan los valores de referencia fijados por el Principado de Asturias para un suelo destinado a “otros usos”.

Nº parcela	pH	Concentración de metales pesados (mg Kg ⁻¹ PS de suelo)						
		Fe	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Pb
27	5,55	459910 ab	1852 b	3902 a	852 b	9 bc	19 b	8129 b
33	3,7	513218 a	2299 a	3814 a	1808 ab	12 a	66 a	10726 ab
16	4,19	293641 c	1220 c	1888 b	2480 a	6 c	6 c	10925 a
8	6,70	393821 b	1858 b	3435 a	1750 ab	9 b	9 c	10266 ab
Nivel de referencia P. Asturias		-	55	455	40	2	1	70

3.2. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de *Salix caprea*.

Entre los efectos tóxicos de los metales pesados destaca la inhibición del crecimiento (Milone et al., 2003), sin embargo en la bibliografía se describe que la micorrización puede reducir este efecto (Gadd, 2007). Berry (1982) utilizó hongos ectomicorrícicos para fomentar el crecimiento

de pinos en presencia de metales pesados y Fernández et al. (2008) incrementaron por medio de la micorrización el crecimiento de *Betula celtiberica* en presencia de Cd.

Los resultados de nuestro estudio concuerdan con estos autores ya que las plantas jóvenes micorrizadas presentaron mayor longitud y diámetro que las no micorrizadas (Fig. 2). El crecimiento en longitud de las plantas jóvenes (3 meses) micorrizadas (PJM) (Fig. 2) es un 70% mayor que las no micorrizadas de su misma edad (PJNM). También se observa en el caso del crecimiento en diámetro, que las plantas jóvenes micorrizadas superan en un 40% el crecimiento de aquellas sin micorrizar. Sin embargo, en las plantas adultas no se observan diferencias entre micorrizadas y no micorrizadas.

Parece que las plantas jóvenes una vez puestas en la tierra contaminada muestran un crecimiento más rápido que las adultas, sin embargo, si nos fijamos en el diámetro del tallo, este índice es mayor en las adultas, tanto micorrizadas (PAM) como no micorrizadas (PANM), donde los procesos de lignificación y suberificación están más desarrollados (Taiz y Zeiger, 2010)

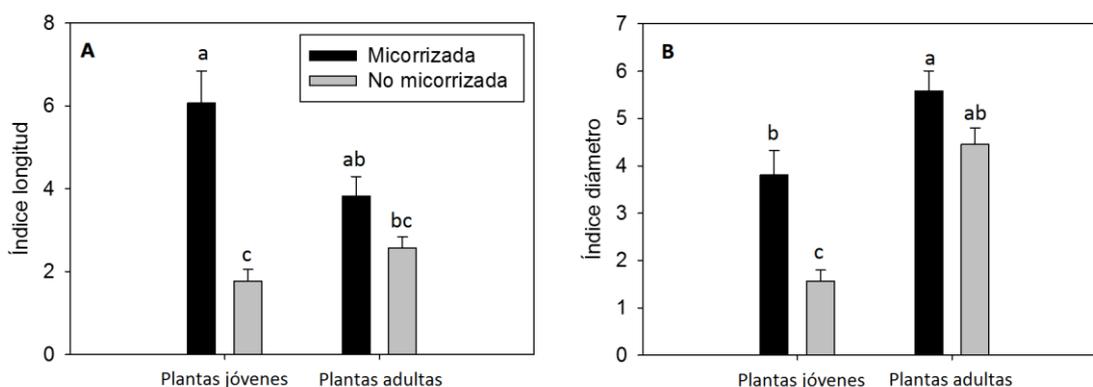


Fig 2. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento en longitud (A) y diámetro (B) de *Salix caprea* a los 3 y 9 meses de cultivo en terreno contaminado con metales pesados. Diferentes letras indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

3.3. Efecto de la micorrización sobre la acumulación de metales de *S. caprea*

Los análisis revelaron que las PJNM acumulan más metales que las PJM (Tabla 2) mientras que en el caso de las plantas adultas acumulan más las PAM. Los metales que alcanzan una concentración más alta en las hojas y que superan los límites establecidos por White y Brown (2010) como tóxicos son el Zn, el Cd y el Pb que se acumulan en mayor concentración en las plantas adultas micorrizadas (Tabla 2). En las plantas jóvenes, la concentración que alcanza

niveles más altos es la del Zn en las PJNM. La cantidad de arsénico es baja en todos los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de metales pesados (mg Kg^{-1} PS hoja) en hojas de plantas jóvenes y adultas, micorrizadas y no micorrizadas de *Salix caprea*. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0,05$. En la tabla también se expresan los límites de toxicidad establecidos por White and Brown (2010). PJM, planta joven micorrizada; PJNM, planta joven no micorrizada; PAM, planta adulta micorrizada; PANM, planta adulta no micorrizada.

Tratamiento	Nº subparcela	Concentración de metales pesados (mg Kg^{-1} PS hoja)						
		Fe	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Pb
PJM	27	74,95±0,95b	16,5±0,06a	506,99±8,12c	1,5±0,05c	5,74±0,33c	0,08±0,01a	9,07±2,3c
PJNM	33	254,17±18,74a	15,8±0,12b	875,82±8,13b	4,39±0,07a	6,78±0,11b	0,1±0,02a	20,06±1,16b
PAM	16	72,30±0,33b	11,08±0,16d	1151,91±16,78a	3,03±0,06b	13,19±0,26a	0,1 ±0,01a	61,41±1,2a
PANM	8	73,00±2,24b	13,34±0,09c	468,43±2,91c	1,45±0,04c	5,39 ± 0,10c	0,12±0,02a	12,53±2,18bc
Rango de toxicidad		>500	15-30	100-300	1-20	5-10	2-5	10-20

El pH es el factor más importante dentro de las propiedades del suelo a la hora de condicionar la movilidad de los metales y por tanto su disponibilidad (Zhao et al., 2010). Concretamente, el Zn, Cd y Pb aumentan enormemente su disponibilidad con el descenso del pH (Sukreeyapongse et al., 2002) esto concuerda con el hecho de que las subparcelas 33 y 16 contengan las plantas que acumularon más metales ya que son las de pH más bajo. Sin embargo, según este criterio, las plantas de la subparcela 33, que tiene un pH inferior al de la 16, deberían tener un contenido en metales mayor, cosa que no ocurre. Es aquí cuando entra en juego la influencia de la micorrización a la hora de acumular metales por la planta. Diversos autores han estudiado el incremento en la acumulación de metales en las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas (Colpaert y Vanassche, 1992; Fernández et al., 2006) y observaron que las plantas micorrizadas, aun estando a un pH ligeramente superior (y por tanto con los metales menos disponibles), presentaban una acumulación mayor que aquellas no micorrizadas y a un pH inferior.

En nuestro caso podemos afirmar que la micorrización mejora la tolerancia a los metales pesados en las plantas jóvenes ya que aumenta la longitud y diámetro del tallo. Aunque algunos autores (Gadd, 2007; Langer et al., 2012) proponen que las plantas micorrizadas acumularían menos metales en sus tejidos debido a que éstos se acumularían en las paredes

de las células del hongo y, por tanto, no pasarían a la planta, en nuestro caso los resultados son contrarios ya que las PAM absorben más metales que las PANM, lo cual podría estar relacionado con las especies de planta y hongo utilizadas (Fernández et al., 2008).

3.4. Contenido en pigmentos y eficiencia fotosintética.

Las PJM tienen un contenido de clorofila a y clorofilas totales mayor al resto de plantas analizadas, y las PAM presentan el contenido más bajo (Tabla 3). En el caso de la clorofila b, los niveles son similares en todos los casos.

Estos resultados parecen estar relacionados con la concentración de metales en las plantas ya que las que más metales acumulan son las que menos clorofila presentan. Parece existir una relación inversa entre la acumulación de metales y el contenido de clorofila que podría deberse a la alteración de la biosíntesis de clorofilas por parte de los metales como ya ha sido descrito por otros autores (Fernández et al., 2013; Gill et al., 2012; Sharma et al., 2010).

En el contenido en carotenos, no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ni tampoco en la eficiencia fotosintética, Fv/Fm. Ésta es un indicador de estrés que da idea del grado de adaptación de la planta a las condiciones de cultivo. En nuestro caso, las plantas sufren cierto estrés ya que los niveles de este parámetro son inferiores al valor óptimo 0,83 (Maxwell y Johnson, 2000).

Tabla 3. Contenido en pigmentos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PF hoja) y eficiencia fotosintética en *S. caprea* micorrizada y no micorrizada cultivadas en un suelo contaminado con metales pesados. Diferentes letras en la misma fila indica diferencias significativas a $p<0,05$. PJNM, planta joven no micorrizada; PAM, planta adulta micorrizada; PANM, planta adulta no micorrizada

Tratamiento	Concentración de pigmentos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PF)				Fv/Fm
	Clorofila a	Clorofila b	Cl. totales	Carotenos	
PJM	206,97±1,82a	71,57±0,36a	285,20±2,22a	100,46±0,80a	0,72±0,02a
PJNM	189,39±8,64ab	67,34±5,37a	252,41±17,56ab	92,94±5,95a	0,71±0,01a
PAM	175,00±0,99c	62,91±0,36a	238,14±6,47b	91,63±2,26a	0,69±0,02a
PANM	183,34±10,9bc	71,78±3,64a	276,73±22ab	99,64±8,99a	0,71±0,01a

3.5. Peroxidación lipídica y contenido en H₂O₂.

El análisis del contenido en MDA (Tabla 4), indicador del nivel de peroxidación lipídica, y del contenido en H₂O₂ fue más alto en las plantas PAM (Tabla 4) que son las que más metales acumularon. Entre las plantas jóvenes no se observan diferencias entre las micorrizadas y no micorrizadas mientras que en las plantas adultas los valores más altos corresponden a las micorrizadas (Tabla 4).

Tabla 4. Peroxidación lipídica (contenido en MDA, nmol g⁻¹ PF de hoja) y contenido de H₂O₂ (μg g⁻¹ PF hoja) en plantas jóvenes y adultas de *S. caprea* micorrizada y no micorrizada. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas a p<0,05.

Tratamiento	Concentración MDA (nmol g ⁻¹ PF)	Contenido en H ₂ O ₂ (μg g ⁻¹ PF)
PJM	7,37 ± 1,18b	2,94 ± 0,47b
PJNM	8,36 ± 0,45b	3,34 ± 0,18b
PAM	10,02 ± 0,5a	4,01 ± 0,21a
PANM	8,35 ± 0,13b	3,34 ± 0,05b

3.6. Actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo.

Los metales pesados inducen respuestas antioxidativas en las plantas que tienen como objetivo reducir el daño celular limitando la presencia de ROS. Entre estas respuestas podemos destacar la actividad de diversas enzimas antioxidativas como la guaiacol peroxidasa (GPOD). En nuestro trabajo, se observan diferencias en la actividad de GPOD en las PAM y PANM alcanzando una reducción del 50% en las micorrizadas (Fig. 4A). En las plantas jóvenes no se observan estas diferencias. GPOD es una peroxidasa que utiliza guaiacol como donador de electrones y participa en procesos de lignificación, biosíntesis de etileno, defensa, cicatrización de heridas, etc. y tendría un papel importante en la reducción del H₂O₂ para evitarle el daño a la planta aunque el incremento de la actividad GPOD también podría estar relacionado con un incremento en el contenido de fenoles en la planta como también observaron otros autores en respuesta al Cd (Bhaduri y Fulekar, 2012). Otros autores también observaron un aumento en la actividad GPOD en respuesta al Cd en otras especies (Martins et al., 2010; Fernández et al., 2013).

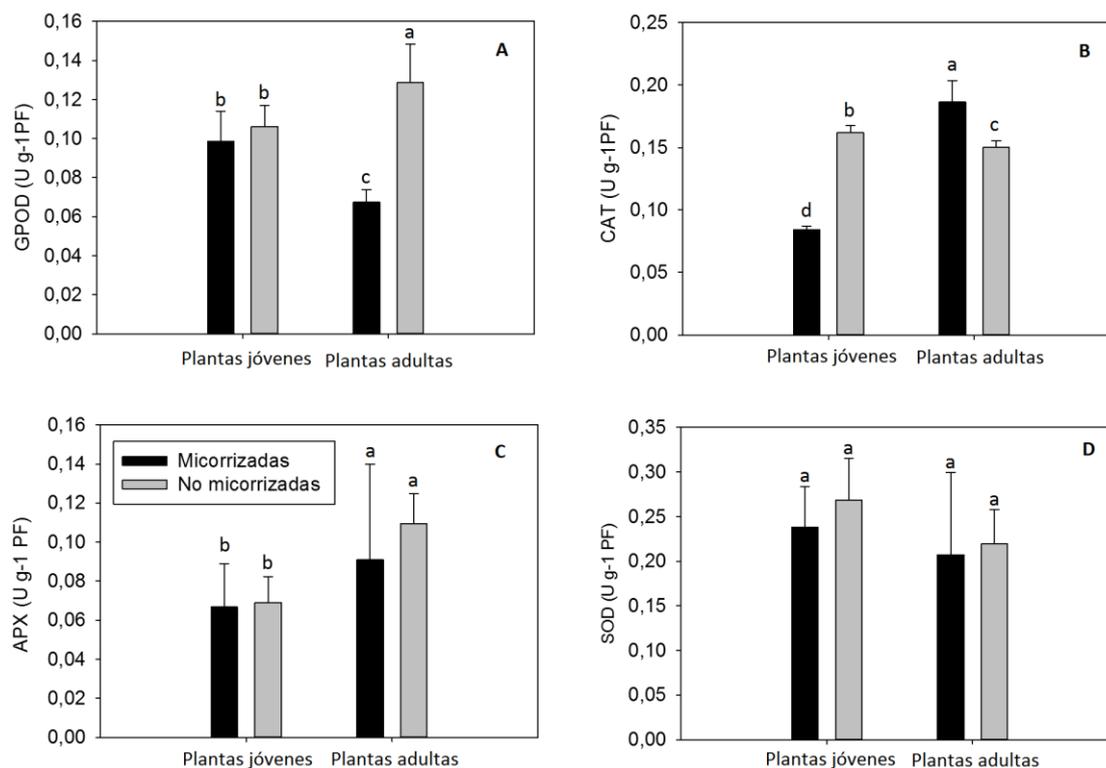


Fig. 4. Actividades enzimáticas (U g⁻¹ PF hoja) de GPOD (A), CAT (B), APX (C) y SOD (D) en hojas de plantas jóvenes y adultas de *S. caprea*, micorrizada y no micorrizada, crecidas en terreno contaminado con metales pesados. Diferentes letras indican diferencias significativas a $p < 0,05$.

En cuanto a la catalasa (CAT) observamos que la actividad más alta la detectamos en las plantas adultas micorrizadas (PAM) mientras que la más baja en las PJM (Fig. 4B). En este caso vemos que las plantas jóvenes y adultas responden diferente, ya que las jóvenes presentan mayor actividad CAT en las no micorrizadas mientras que en las adultas es mayor la actividad en las micorrizadas (Fig. 4B). Esta mayor actividad en las PAM podría estar relacionada con la mayor acumulación de metales y sobre todo con un aumento de su actividad para eliminar o reducir los altos niveles de H₂O₂ que presentan estas plantas. Este enzima utiliza la conversión de H₂O₂ en H₂O y O₂ (Bhaduri y Fulekar, 2012). A la vista de los resultados obtenidos podemos pensar que las plantas PJNM utilizan mayoritariamente la vía CAT para la detoxificación mientras que en plantas adultas, las no micorrizadas utilizan principalmente la GPOD y las micorrizadas la vía de la CAT.

Por otro lado, la actividad ascorbato peroxidasa (APX) es más alta en las plantas adultas que en las jóvenes aunque no se observan diferencias entre micorrizadas y no micorrizadas dentro de la misma edad (Fig. 4C). APX, es una peroxidasa que utiliza ascorbato como sustrato para

eliminar el exceso de H_2O_2 . No hay un consenso claro sobre el papel de los metales pesados en la actividad APX porque mientras que para algunos autores aumenta (Uraguchi et al., 2009) para otros disminuye (Ahmad et al., 2009).

Por último, la actividad superóxido dismutasa (SOD) es similar en todos los tratamientos no observándose diferencias ni entre plantas jóvenes y adultas ni entre micorrizadas y no micorrizadas (Fig. 4D). SOD es un enzima que convierte los radicales superóxidos en agentes menos tóxicos produciendo H_2O_2 que puede ser degradada por los enzimas antioxidativos descritos anteriormente. De hecho, el balance entre las actividades SOD y APX, GPOD y CAT es crucial para determinar los niveles de radicales superóxidos y H_2O_2 (Bhaduri y Fulekar, 2012).

4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La micorrización de *Salix caprea* con *Paxillus ammoniavirescens* favorece el crecimiento de las plantas jóvenes pero no la acumulación de metales. Por otra parte, en las plantas adultas fomenta una mayor acumulación, lo cual es beneficioso para una mayor eficiencia en fitorremediación.
- El pH del suelo influye en la disponibilidad de los metales para las plantas y por tanto en su acumulación siendo un factor clave a tener en cuenta a la hora de diseñar programas de remediación.
- En respuesta al estrés oxidativo provocado por los metales pesados se desencadenan cambios en las actividades enzimáticas antioxidativas. Parece que las plantas adultas no micorrizadas utilizan preferentemente la vía de la GPOD en la detoxificación de H_2O_2 mientras que las adultas micorrizadas usarían la catalasa como vía de detoxificación.

5. Bibliografía

- Ahmad, I., Naeem, M., Khan, N. A., Shamiullah. 2009. Effects of cadmium stress upon activities of antioxidative enzymes, photosynthetic rate, and production of phytochelatins in leaves and chloroplasts of wheat cultivars differing in yield potential. *Photosynthetica*. 47:146-151.
- Berry, C. R., 1982. Survival and growth of pine hybrid seedlings with *Pisolithus* ectomycorrhizae on coal spoils in Alabama and Tennessee. *Journal of Environmental Quality*. 11: 709-715
- Bhaduri, A. M., Fulekar, M. H., 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Environmental Science and Bio/Technology*. 11:55-69
- Boletín Oficial del Principado de Asturias. Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente. Resolución de 20 de marzo de 2014. Nº 91. Niveles genéricos de referencia para metales pesados en suelos del Principado de Asturias.
- Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*. 212:475-486.
- Colpaert, J. V., Vanassche, J. A., 1992. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvertris* L. *New Phytologist*. 123:1063-1072.
- Demiral, T., Turkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53:247-257.
- Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., Tamés, R. S., 2006. Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution*. 152:522-529
- Fernández, R., Bertrand, A., Reis, R., Mourato, M. P., Martins, L. L., González, A., 2013. Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* L. Greuter. *Journal of Hazardous Materials*. 244-245:555-562

- Gadd, G. M., 2007. Geomycology: biochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*. 3:3-49
- Gill, S. S., Khan, N. A., Tuteja, N., 2012. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.) *Plant Science*. 182:122-120
- Heijden van der, E. W., Vries, F. W., Kuyper, T. W., 1999. Mycorrhizal associations of *Salix repens* L. communities in succession of dune ecosystems. I. Above-ground and below-ground views of ectomycorrhizal fungi in relation to soil chemistry. *Canadian Journal of Botany*. 77:1821–1832.
- Jentschke, G., Godbold, D. L., 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiology Plantarum*. 109:107-116
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils. CRC Press. 413.
- Lawlor, D. W. et al., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment*. 25:275-294
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 6th *International Congress on Photosynthesis*. Brussels.
- Lloyd, G., McCown, B.H., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society*. 30: 421-427.
- Martins, L.L., Mourato, M.P., Cardoso, A. I., Pinto, A. P., Mota, A. M., Goncalves, M. L. S., Varennes, A., 2010. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33:1375-1383
- Marx, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*. 59:153-163.
- Maxwell, K., Johnson, G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51:659-668

- Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F., 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 50: 256-276
- Montaser, A., 1998. Inductively Coupled Plasma Source Mass Spectrometry. Wiley-VCH Inc., New York.
- Mourato, M., Reis, R., Martins, L. L., 2012. Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity. En: Montanaro, G., Dichio, B., *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. InTech. Rijeka. 22-44
- Pena, R. et al., 2010. Girdling affects ectomycorrhizal fungal (EMF) diversity and reveals functional differences in EMF community composition in a beech. *Applications of Environmental Microbiology*. 76:1831-1841
- Pulford, I.D., Riddell-Black, D., Stewart, C., 2002. Heavy metal uptake by willow clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *International Journal Phytoremediation*. 4:59– 72.
- Pulford, I.D., Watson, C., 2001. Uptake of chromium by trees: prospects for phytoremediation. *Environmental Geochemistry and Health*. 23:307– 311.
- Riddell-Black, D., 1993. A review of the potential for the use of trees in the rehabilitation of contaminated land. WRc Report CO 3467. Water Research Centre, Medmenham.
- Sharma, R. K., Agrawal, M., Agrawal, S. B., 2010. Physiological, biochemical and growth responses of lady's finger (*Abelmoschus esculentus* L.) plants as affected by Cd contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 84:765-770
- Shilev, S. I., Ruso, J., Puig, A., Benlloch, M., Jorrín, J., Sancho, E., 2001. Rhizospheric bacteria promote sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant growth and tolerance to heavy metals. *Minerva Biotechnology*. 13:37-39.
- Singh, N., Ma, L. Q., Srivastava, M., Rathinasabapathi, B., 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science* 170:274-257
- Sommerville, A. H. C., 1992. Willows in the environment. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B*. 98:215–44.

- Sukreeyapongse, O., Holme, P.E., Strobel, B.W., Panichsakpatana, S., Magid, J., Hansen, H.C.B., 2002. pH-dependent release of cadmium, copper, and lead from natural and sludge-amended soils. *Journal of Environmental Quality*. 31:1901-1909
- Taiz, L., Zeiger, E., 2010. *Plant physiology* (5^a Ed). Sinauer Associates, Inc., Publishers. 690
- Tangahu, B.V. 2011., A Review on heavy metals (As, Pb and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*. 20:31.
- Uraguchi, S., Kiyono, M., Sakamoto, T., Watanabe, I., Kuno, K. 2009. Contributions of apoplastic cadmium accumulation, antioxidative enzymes, and induction of phytochelatins in cadmium tolerance of the cadmium-accumulating cultivar of black oat (*Avena strigosa* Schreb.). *Planta*. 230:267-276.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., and Clijsters, H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environmental Pollution*. 87:51-59.
- White, P. J., Brown, P. H., 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*. 105:1073-1080
- Zhao, K.L., Liu, X.M., Xu, J.M., Selim, H.M., 2010. Heavy metal contaminations in a soil-rice system: identification of spatial dependence in relation to soil properties of paddy fields. *Journal of Hazardous Materials*. 181:778-787.