

Evaluación de la tolerancia al cobre de dos poblaciones de *Oenothera picensis* Phil. subsp. *picensis* (Onagraceae)

Assessment of copper tolerance of two populations of *Oenothera picensis* Phil. subsp. *picensis* (Onagraceae)

ISABEL GONZÁLEZ¹ & ALEXANDER NEAMAN^{2*}

¹Centro Regional de Innovación Hortofrutícola de Valparaíso-CERES, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

²Área del Medio Ambiente, Escuela de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile.

*alexander.neaman@ucv.cl

RESUMEN

Oenothera picensis Phil. subsp. *picensis* puede crecer en suelos contaminados por cobre proveniente de una fundición de metal en Chile central, y presenta características que la hacen candidata para procesos de fitorremediación. Para conocer la tolerancia real y capacidad de extracción de cobre, y si ello ocurre sólo en la población expuesta, se realizaron ensayos hidropónicos utilizando dos poblaciones de *O. picensis*, provenientes de los sectores Los Maitenes y Maitencillo, áreas con concentraciones altas y normales de Cu en el suelo, respectivamente. Las plantas fueron expuestas a concentraciones de cobre entre 0 y 0,16 mM en la solución, por un período de 1 mes. Las plantas mostraron síntomas de toxicidad a una concentración de 0,04 mM de Cu en la solución, sin diferencias significativas en la tolerancia de ambas poblaciones. Las concentraciones de cobre foliar observadas en *O. picensis* alcanzaron un máximo de 1660 ± 857 mg kg⁻¹, en el tratamiento de 0,16 mM de Cu en la solución. Sin embargo, en este tratamiento, la planta presentó severos síntomas de toxicidad. Por lo tanto, no es posible clasificarla como una especie hiperacumuladora.

PALABRAS CLAVE: Hidroponía, toxicidad, fundición de cobre, parámetros de crecimiento, especie sensible.

ABSTRACT

Oenothera picensis Phil. subsp. *picensis* can grow in soils that have been contaminated with copper from the metal smelting industry in central Chile, presenting characteristics that make it a candidate for phytoremediation processes. In order to know the real tolerance and capacity for copper extraction and to identify whether this characteristic is present solely in the exposed population, a hydroponic test was carried out using two populations of *O. picensis*, originated from Los Maitenes and Maitencillo, areas with high and normal Cu concentrations in the soil, respectively. The plants were exposed to copper concentration in solution between 0 and 0.16 mM, for one month. The plants presented symptoms of toxicity at 0.04 mM of Cu in the solution, without significant differences in the tolerance of both populations. The shoot copper concentrations observed in *O. picensis* reached the maximum of 1660 ± 857 mg kg⁻¹, in the treatment of 0.16 mM of Cu in the solution. However, in this treatment, the plant presented severe toxicity symptoms. Thus, it is not possible to classify it as a hyperaccumulating species.

KEYWORDS: Hydroponic, toxicity, copper smelter, growth parameters, sensitive specie.

INTRODUCCIÓN

Los suelos del Valle de Puchuncaví, en la zona costera de Chile central, han sido expuestos a las emanaciones provenientes del Complejo Industrial Ventanas desde 1964 (Folchi 2006). Actualmente, en los sitios aledaños al complejo industrial, los suelos son ácidos, están severamente erosionados y contienen altas concentraciones de metales (cobre, zinc, plomo y cadmio) y metaloides (arsénico)

(González & Berqvist 1986a, González & Ite 1992, Ginocchio *et al.* 2004). Estos sitios presentan baja riqueza de especies, cobertura vegetal evidentemente disminuida y pobre banco de semillas, en comparación con sitios no contaminados del Valle de Puchuncaví (Ginocchio 2000).

En los sitios ácidos y metalíferos, solamente son capaces de sobrevivir y reproducirse aquellas especies y poblaciones vegetales que presentan resistencia a las condiciones adversas del suelo (MacNair 1993, Whiting *et al.* 2002). Es probable

por lo tanto, que dentro de la diversidad observada en sitios metalíferos, algunas de estas especies pertenezcan al grupo de las metalófitas, es decir resisten la toxicidad mediante diversos mecanismos celulares (Whiting *et al.* 2004). Existen tres categorías dentro de este grupo de plantas, las metalófitas obligadas, endémicas de los sitios metalíferos (generalmente vetas de mineral) con una distribución geográfica restringida (Baker & Brooks 1989); las “metalófitas facultativas” desarrolladas sólo en presencia de un metal específico en el suelo, y las pseudometalófitas, cuya tolerancia no depende de la presencia del metal (Baker *et al.* 2010).

La fitorremediación es una técnica que utiliza el cultivo de plantas metalófitas *in situ* para remover los metales del suelo (fitoextracción) o estabilizarlos en éste (fitoestabilización). González *et al.* (2008) realizaron una prospección de especies potencialmente metalófitas para ser utilizadas en procesos de fitorremediación de cobre en el sector Los Maitenes, 3 km al oriente del Complejo Industrial Ventanas, localidad identificada como una de las más afectadas por la actividad del Complejo Industrial (Bruno 1992, De Gregori *et al.* 2000). La prospección permitió identificar 22 especies, entre ellas destacó *Oenothera picensis* Phil. subsp. *picensis* (tratada como *Oenothera affinis* por González *et al.* 2008; en adelante referida como *Oenothera picensis*) por la mayor concentración de cobre acumulado en su biomasa aérea, con un promedio de $614 \pm 4,6 \text{ mg kg}^{-1}$. La especie es una hierba perenne, nativa, con alta producción de biomasa, resistente a la sequía y muy fácil de propagar (Matthei 1995); debido a estas características, tiene potencial para ser usada en procesos a gran escala de fitoextracción de cobre desde el suelo. Para comprobar la real tolerancia y capacidad de acumulación de cobre en condiciones controladas, los ensayos hidropónicos surgen como una herramienta eficiente debido a que permiten un control efectivo de la disponibilidad de metales, además de resultados rápidos y precisos (Giri & Patel 2012).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la tolerancia al cobre y la capacidad de acumulación de Cu en dos poblaciones de *Oenothera picensis*, la primera situada en un sitio expuesto históricamente a contaminación cúprica

del Complejo Industrial Ventanas y otra proveniente de un sitio no expuesto a dicha contaminación. Además, se determinaron los límites de tolerancia y acumulación de cobre en tejidos aéreos, para evaluar la utilidad de la especie para procesos de fitoextracción.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se obtuvieron semillas de *Oenothera picensis* en dos sitios del valle de Puchuncaví: (1) Los Maitenes ($32^{\circ}51'54,7'' \text{ S}$; $71^{\circ}25'46,2'' \text{ O}$) a 2 km al oriente del Complejo Industrial Ventanas, un sitio altamente contaminado por cobre (González & Berqvist 1986b, Bruno 1992, De Gregori *et al.* 2000) y (2) Maitencillo ($32^{\circ}40'27,1'' \text{ S}$; $71^{\circ}25'35,8'' \text{ O}$), a 11 km al norte del Complejo Industrial, no afectado por contaminación cúprica (Mueña *et al.* 2010). Se recolectaron semillas de 5 individuos por sitio, las cuales fueron homogeneizadas.

Las semillas de ambas poblaciones fueron germinadas en un sustrato de perlita/mulch 1:1 en bandejas de poliestireno, bajo iluminación natural a través de ventanales de vidrio de exposición norte, con temperaturas máxima/mínima de $7/24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y una radiación fotosintéticamente activa con un máximo de $1.100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS DE ORIGEN

Para comprobar la diferencia en la contaminación cúprica de cada sitio, se realizó una caracterización de suelos (Tabla I), tomando 10 muestras de aproximadamente 0,6 kg compuestas de 3 submuestras de 0,2 kg, en cada uno de los sitios de los cuales se recolectaron las semillas, en transectos de aproximadamente 1 km en Maitencillo y Los Maitenes. Se determinó la concentración total de Cu mediante espectrofotometría de absorción atómica (GBC, model 902) luego de la digestión del suelo con ácidos nítrico y perclórico (Verlinden 1982). Para el aseguramiento de calidad se utilizó una muestra de referencia certificada (GRX-2) obtenida del *United States Geological Survey*.

TABLA I. Caracterización físico-química de los suelos superficiales donde fueron recolectadas las poblaciones estudiadas de *Oenothera picensis*.

TABLE I. Physico-chemical characteristics of the topsoils where studied populations of *Oenothera picensis* were collected.

VARIABLE	UNIDAD	LOS MAITENES	MAITENCILLO
Cu total	mg kg ⁻¹	652±120	85±13
Cu soluble	mg kg ⁻¹	27±18	0,01±0,04
pH		4,7±0,3	6,3±0,2
pCu ²⁺		4,7±0,9	8,0±0,6
Materia orgánica	%	2,3±0,1	2,1±0,4
Textura		Arenoso franca	Arenosa

Las concentraciones de Cu soluble, pCu^{+2} y pH se determinaron en soluciones de KNO_3 (relación 1:2,5 suelo/agua) (Stuckey *et al.* 2009). El valor de pCu^{+2} ($pCu^{+2} = -\log[Cu^{+2}]$, donde $[Cu^{+2}]$ es la actividad del ión libre Cu^{+2}) se determinó mediante un electrodo selectivo del ión Cu^{+2} (Orion 96-29 ionplus). El electrodo fue calibrado usando soluciones tampón de ácido iminodiacético (Rachou *et al.* 2007). La concentración de Cu soluble se determinó por espectrofotometría de absorción atómica.

ENSAYO HIDROPÓNICO

Se realizó un ensayo hidropónico sometiendo las plantas de las dos poblaciones de *Oenothera picensis* a crecientes concentraciones de cobre. Para los ensayos se utilizó agua potable por los grandes volúmenes requeridos, que superaban la capacidad del equipo de osmosis. Una vez que las plántulas de *O. picensis* desarrollaron 4 hojas, fueron lavadas cuidadosamente con agua potable para remover las partículas del sustrato y transferidas a recipientes plásticos de 6 L que contenían solución Hoagland modificada para evitar sobresaturación y precipitación del Cu. Para esto, en primer lugar, se determinaron las concentraciones macronutrientes y micronutrientes en agua potable según los métodos de Sadsawka (2006), posteriormente se agregaron soluciones estándares de iones en cantidad tal para alcanzar las concentraciones indicadas en la solución Hoagland tradicional. En segundo lugar, cada vez que se cambió la solución nutritiva, se adicionó HNO_3 0,6 M a cada recipiente, para ajustar el pH a 5,0. La solución Hoagland se cambió en cada recipiente cada 3 días y se mantuvo aireada continuamente utilizando una bomba de aire para acuario (con un flujo de aire de $1,8 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) y difusores de aire.

Luego del ajuste del pH, las concentraciones finales de iones en los recipientes fueron: K^+ 2,13 mM; NO_3^- 2,4 mM; NH_4^+ 0,88 mM; PO_4^{3-} 0,4 mM; Na^+ 1,06 mM; Ca^{+2} 0,49 mM; Mg^{+2} 0,36 mM; SO_4^{2-} 0,4 mM; Fe^{+2} 0,031 mM; Mn^{+2} 0,0033 mM; BO_3^{3-} 0,012 mM; Zn^{+2} 0,002 mM; Cu^{+2} 0,0013 mM; MoO_4^{2-} 0,0002 mM. Según Kopittke *et al.* (2010), la presencia de al menos Ca y B en la solución es necesaria para la legitimidad de los ensayos hidropónicos.

Luego de una semana de adaptación, se aplicaron diferentes concentraciones de solución madre de $CuSO_4$ (pentahidratado) 1 M. En este ensayo se utilizaron 5 niveles de concentración: 0; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 mM de Cu, agregando 0,24; 0,48; 0,72 y 0,96 mL de la solución madre a los recipientes de 6 L, respectivamente. Estas concentraciones de Cu corresponden a valores de pCu^{+2} de 6,1; 4,6; 4,3; 4,1 y 4,0, respectivamente (calculado por Visual MINTEQ 3.0).

Una vez transcurridas 48 h desde la aplicación de los tratamientos, se tomaron muestras (25 mL) en los recipientes con la mayor concentración de cobre, se filtraron utilizando papel filtro N° 2 y se determinó las concentraciones de Cu, P, Fe y Ca en la solución según los métodos de Sadsawka

(2006), asegurando así que la solución no estuviera sobresaturada.

El sistema hidropónico consistió de tres recipientes para cada concentración de cobre. En cada recipiente se dispusieron tres individuos de cada población, soportados en planchas de poliestireno. Los recipientes, dispuestos al azar, fueron cambiados de posición una vez a la semana, para eliminar el efecto de las variaciones de luz.

El ensayo se realizó durante el mes de junio de 2011, con un fotoperíodo de 10 h y una temperatura mínima/máxima de 17/25 °C, desarrollándose en una sala con iluminación natural a través de ventanales de vidrio con exposición norte con un máximo de radiación fotosintéticamente activa con un máximo de $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La duración del ensayo fue de un mes. Antes de desmontar el ensayo, en cada hoja se determinó el porcentaje de su superficie con clorosis (0, 25, 50, 75 y 100%), en base a un examen visual.

ANÁLISIS DE TEJIDOS

Al finalizar el ensayo se determinó la concentración de cobre en los tejidos aéreos y en raíces de las plantas, así como la biomasa de estos tejidos, separando los tejidos aéreos de las raíces. El material vegetal fue cuidadosamente lavado en el siguiente orden: agua potable, HCl 0,01 M, agua desionizada, EDTA 0,05 M, agua desionizada (Steubing 1982). El material vegetal fue secado en una estufa a 60 °C por 48 h y triturado en un molino de acero inoxidable (IKA, modelo A11 Basic), previa determinación de su biomasa. El material vegetal fue calcinado en una mufla (Vulcan, modelo A-550) a 500 °C para posteriormente agregar ácido clorhídrico, calentar en placa hasta ebullición, enfriar y filtrar (Sadzawka *et al.* 2007). El cobre en la solución obtenida fue determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica. En el caso de que un individuo no presentara suficiente biomasa para ser analizado independientemente, se hizo una muestra compuesta con los individuos de un mismo recipiente.

Para comprobar la exactitud y precisión del método, se llevaron a cabo análisis de dos muestras de referencia: 1570a (espinaca) y 1573a (tomate) del *National Institute of Standards and Technology*. La diferencia entre los valores obtenidos y los de referencia fue menor al 5% en ambas muestras.

ANÁLISIS DE DATOS

Al concluir el ensayo se realizaron los siguientes cálculos: (1) La relación concentración de Cu en tejidos aéreos/concentración de Cu en raíz (en adelante Cu_{ia}/Cu_r). Este valor permite evaluar la tasa de translocación de cobre desde la raíz hacia los tejidos aéreos y con ello vislumbrar si la tolerancia se basa en la exclusión o en la acumulación. (2) Extracción total de cobre por la planta, se calculó multiplicando la concentración de cobre en los tejidos aéreos por la biomasa aérea producida, en cada individuo.

Se aplicó análisis ANDEVA (Análisis de Varianza) y prueba de Tukey al 95% de confianza para determinar diferencias significativas entre las poblaciones y entre los tratamientos (ANDEVA de dos vías) con respecto a las variables respuesta: porcentaje de clorosis, biomasa aérea, biomasa radical, concentración de cobre en tejidos aéreos, concentración de cobre en raíces y extracción total de cobre por la planta. Se utilizó el programa Software Minitab 15 para Windows.

RESULTADOS

EFFECTOS DE LAS CONCENTRACIONES DE COBRE EN LA SOLUCIÓN SOBRE EL DESARROLLO DE LA PLANTA

La concentración de cobre en la solución tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de clorosis, la biomasa aérea y la biomasa radical ($P < 0,001$ en los tres casos, Tabla II). La concentración menor de cobre en solución

(0,04 mM) indujo clorosis y disminuyó significativamente la biomasa aérea y radical, en relación al control (Fig. 1 A, B y C). Sin embargo, a mayores concentraciones de cobre en la solución, no hubo diferencias significativas entre las concentraciones respecto a estas tres variables respuesta. Tampoco hubo diferencias significativas entre las poblaciones de ambos sitios respecto al porcentaje de clorosis y la biomasa aérea o radical (Tabla II).

CONCENTRACIÓN DE COBRE EN TEJIDOS AÉREOS Y EN RAÍCES

La concentración de cobre en la solución afectó significativamente la concentración de cobre en los tejidos aéreos y en las raíces ($P < 0,001$, Tabla II). A mayor concentración de cobre en la solución, se observó una mayor concentración de cobre en los tejidos aéreos y en las raíces, en ambas poblaciones (Fig. 1D y 1E). No hubo diferencias entre las poblaciones respecto de estas variables (Tabla II). Frente a la mayor concentración de cobre en la solución evaluada (0,16 mM), se determinó una concentración de

TABLA II. ANDEVA para las variables clorosis, biomasa, concentración de cobre en tejidos aéreos y raíces de *Oenothera picensis*, y extracción total de Cu por la especie.

TABLE II. ANOVA for variables of chlorosis, biomass, copper concentration in aboveground tissues and roots of *Oenothera picensis*, and total Cu extraction by the species.

	GRADOS DE LIBERTAD	F	PROBABILIDAD (p)
Clorosis			
Concentración de Cu (A)	4	17,93	<0,05
Origen plántulas (B)	1	2,83	0,96
A*B	4	0,16	0,10
Biomasa aérea			
Concentración de Cu (A)	4	17,53	<0,05
Origen plántulas (B)	1	0,67	0,41
A*B	4	0,70	0,59
Biomasa radical			
Concentración de Cu (A)	4	23,64	<0,05
Origen plántulas (B)	1	0,21	0,65
A*B	4	0,05	0,97
Concentración de Cu en tejidos aéreos			
Concentración de Cu (A)	4	9,02	<0,05
Origen plántulas (B)	1	1,17	0,29
A*B	4	2,57	0,06
Concentración de Cu en raíces			
Concentración de Cu (A)	4	62,99	<0,05
Origen plántulas (B)	1	2,97	0,1
A*B	4	0,84	0,51
Extracción total			
Concentración de Cu (A)	4	5,19	<0,05
Origen plántulas (B)	1	0,73	0,40
A*B	4	1,48	0,23

cobre en los tejidos aéreos de $1660 \pm 857 \text{ mg kg}^{-1}$ y en raíces de $14.082 \pm 4.050 \text{ mg kg}^{-1}$, sin embargo en las plantas se evidenció signos de toxicidad.

La relación $\text{Cu}_{\text{ta}}/\text{Cu}_{\text{r}}$ varió en el intervalo de 0,1 a 0,14, siendo estadísticamente similar entre las poblaciones provenientes de ambos sitios y entre las concentraciones de cobre en la solución ($P > 0,05$, datos no mostrados).

EXTRACCIÓN TOTAL DE COBRE

La concentración de cobre en la solución afectó significativamente la extracción total de Cu ($P < 0,005$, Tabla II). A mayor concentración de cobre en la solución, se observó una mayor extracción total de cobre por las plantas (Fig. 1F). No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ambos sitios respecto de la extracción total de cobre por las plantas (Tabla II). Para la mayor concentración de cobre en la solución evaluada (0,16 mM), la extracción total de cobre por *O. picensis* fue de $34 \pm 23 \text{ mg planta}^{-1}$.

DISCUSIÓN

ENSAYOS HIDRÓPÓNICOS

El ajuste de pH a la solución Hoagland se realizó para evitar la precipitación de compuestos que ocurría con el pH neutro de la solución, principalmente al adicionar las soluciones de CuSO_4 . Al observar esta situación, se realizó el cálculo de los índices de saturación de compuestos, utilizando el software Visual MINTEQ 3.0 (Gustafsson 2013). El software demostró que el pH de la solución debe ser $\leq 5,0$ para evitar la sobresaturación de la solución respecto a los compuestos de Cu, Fe, Mn y P. El pH 5,0 es similar al reportado en los suelos de Los Maitenes (Mueña *et al.* 2010, Goecke *et al.* 2011), asemejándose al escenario real para el desarrollo de la plantas. Según Kopittke *et al.* (2010), el control del pH en la solución, tal como se realizó en el presente ensayo, se considera un factor relevante para la correcta interpretación de los resultados de los ensayos hidropónicos.

En relación a los niveles de concentraciones de Cu utilizadas, Kopittke *et al.* (2010), indica que un ensayo hidropónico debe contener al menos 4 concentraciones del metal a evaluar, incluyendo el testigo, por lo que se considera que el número (5) de niveles utilizado en este ensayo fue adecuado. Los valores máximos y mínimos de concentraciones utilizados para los ensayos hidropónicos se establecieron tomando como base investigaciones internacionales (Tabla III), pero considerando que en la investigación se postula que *Oenothera picensis* es una especie tolerante. Por esto, se usaron concentraciones relativamente altas y levemente mayores a las encontradas en terreno, con el objeto de testear la tolerancia máxima de la especie. El rango de pCu^{+2} encontrado en terreno va de 5 a 9, mientras que el rango utilizado en este ensayo va de 4 a 6 (el valor de pCu^{+2} es inversamente proporcional a la

actividad del ion Cu^{+2} en la solución).

Respecto a los intervalos de concentraciones de Cu utilizadas, un análisis de las concentraciones de Cu utilizadas por varios autores (Tabla III) permitió concluir que no existe un consenso respecto al intervalo de concentraciones de cobre que se debe utilizar en ensayos hidropónicos, existiendo una alta variabilidad. El intervalo (0,04 mM) utilizado entre las concentraciones se estableció en base a investigaciones en otras especies (Ali *et al.* 2002, Borghi *et al.* 2007).

La duración del ensayo se decidió considerando que el objetivo fue determinar la tolerancia al cobre de la especie y su máxima capacidad de acumulación. Si bien la tolerancia puede determinarse en pocos días (7-12 días) evaluando los síntomas de toxicidad, la evaluación de la acumulación requiere más tiempo. Al respecto, Ebbs & Kochian (1998), Kuzovkina *et al.* (2004) y Lou *et al.* (2004) realizaron ensayos hidropónicos de aproximadamente un mes, para determinar la tolerancia al Cu, Cd y/o Zn y extracción de estos metales por diferentes especies vegetales (Tabla III). Asimismo los autores (González *et al.* 2008) identifican el fin del estado vegetativo como el punto de mayor extracción de Cu.

CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS DE ORIGEN DE LAS POBLACIONES

Las características químicas de los suelos de Los Maitenes, principalmente las concentraciones de cobre total y soluble, pCu^{+2} y pH (Tabla I), evidencian el impacto del complejo industrial. La concentración de cobre soluble es alta en comparación con otros suelos contaminados con cobre de la región ($0,47 \text{ mg kg}^{-1}$ en el valle de Catemu) (Ávila *et al.* 2007, Ávila *et al.* 2009) y con el suelo de Maitencillo (Tabla I). El valor de pCu^{+2} en el suelo de Los Maitenes es bajo, es decir, la actividad del ion Cu^{+2} es alta, en relación a otros lugares contaminados por cobre de la región (por ejemplo pCu^{+2} de 7,9 en el valle de Catemu, Ávila *et al.* 2007, Ávila *et al.* 2009) y al suelo de Maitencillo (Tabla I). El Cu^{+2} corresponde a la fracción más tóxica de cobre en el suelo (Sauvé *et al.* 1997); por lo tanto, una alta actividad implica mayor toxicidad. En consecuencia, puede afirmarse que la disponibilidad de Cu en Los Maitenes es alta.

Para los fines de la presente investigación, los suelos de ambos sectores son comparables debido a que tienen textura y contenido similar de materia orgánica (Tabla I). Ambos suelos corresponden a paleodunas estabilizadas (Cosio *et al.* 2007) y fueron clasificados como Entisoles (Soil Survey Staff 2003).

TOLERANCIA AL COBRE DE LAS POBLACIONES DE *OENOTHERA PICENSIS*

La concentración de Cu^{+2} 0,04 mM causó efectos negativos sobre las plantas de *O. picensis* (Tabla II). El análisis de diversos ensayos hidropónicos de tolerancia al cobre por plantas no ha permitido llegar a un consenso para

determinar en qué circunstancias una especie o población es considerada tolerante al cobre o no. Sin embargo, en investigaciones previas (ver Tabla III) se indica que aquellas plantas consideradas tolerantes o indicadoras son capaces de soportar al menos concentraciones de 0,1 mM de Cu. En consecuencia *O. picensis* corresponde a una especie sensible ya que a los 0,04 mM presentó síntomas de toxicidad. Si bien la relación Cu_{ta}/Cu_r fue muy inferior a 1 en ambas poblaciones, lo que demuestra que la planta se comporta como excluyente (Chipeng *et al.* 2010), restringiendo la translocación desde las raíces a los tejidos aéreos, la especie no fue capaz de tolerar las altas concentraciones de cobre en el medio.

Según los resultados obtenidos y la definición de Baker *et al.* (2010), *Oenothera picensis* debería ser considerada como una especie “acompañante no tolerante”. Estas especies, al estar en suelos metalíferos presentan poco vigor, son comúnmente anuales y persisten poco tiempo en el sitio (a largo plazo). Sin embargo, González *et al.* (2008)

señalan que la población de *O. picensis* presente en Los Maitenes es al menos bianual—dado que se pudo observar vestigios de temporadas anteriores en los individuos— con una considerable producción de biomasa (30 a 170 g de masa seca en estado de inicio de floración) en relación a otras especies encontradas en el sitio, y ha sido registrada en el sitio desde el año 1997 (Ginocchio 1997).

Una probable explicación de este comportamiento podría deberse a que el cobre no es el principal factor limitante que afecta la composición de la comunidad vegetal en Los Maitenes. En efecto, Ginocchio (2000) indica que el nitrógeno presente en el suelo explica un 13% de la variación en la abundancia de las comunidades vegetales evaluadas a lo largo de un transecto de 5,5 km hacia el SSE desde el complejo industrial. Mientras que el pH del suelo explicaría un 10% de la variación en la abundancia y el Cu extractable sólo un 7%.

Por otro lado, los sitios donde se obtuvieron las

TABLA III. Síntesis de resultados de ensayos hidropónicos que evalúan el efecto del cobre sobre el desarrollo de especies. Cu* = concentración de Cu en la solución a la cual se observan los primeros síntomas de toxicidad (mM), Cu** = intervalo de concentraciones evaluadas en el ensayo (mM). ¹Proveniente de sitio contaminado; ²Proveniente de sitio no contaminado; ³En comparación a otra población de la misma especie.

TABLE III. Summary of results of hydroponic tests that evaluate the effect of copper on the development of species. Cu* = copper concentration in the solution that produces the first toxicity symptoms (mM), Cu** = concentration range evaluated in the test (mM). ¹From a contaminated site; ²From a non-contaminated site; ³In comparison with other population of the same species.

AUTOR	ESPECIE	VARIABLE	Cu*	Cu**	DURACIÓN DEL EXPERIMENTO (DÍAS)	CATEGORÍA DE TOLERANCIA
Lou <i>et al.</i> (2004)	<i>Elsholtzia haichowensis</i>		0,3	0,01-0,5	6	Tolerante
Borghì <i>et al.</i> (2007)	<i>Populus × euramericana</i> clone <i>Adda</i>	Biomasa radical	0,1	0,004-0,1	15-35	Tolerante
Quian <i>et al.</i> (2005)	<i>Elsholtzia haichowensis</i>		0,1	0,0032-0,1	14	Tolerante
Wenshan <i>et al.</i> (2007)	<i>Rumex japonicus</i> ¹		0,1	0,025-0,1	14	Tolerante ³
Borghì <i>et al.</i> (2007)	<i>Populus × euramericana</i> clone <i>Adda</i>		0,1	0,025-0,075	80	Tolerante
Lou <i>et al.</i> (2004)	<i>Elsholtzia haichowensis</i>	Biomasa aérea	0,5	0,01-0,5	6	Tolerante
Ali <i>et al.</i> (2002)	<i>Phragmites australis</i>		0,08	0,008-0,16	15	Tolerante
Ali <i>et al.</i> (2002)	<i>Zea mays</i>		0,008	0,008-0,16	15	No tolerante
Wenshan <i>et al.</i> (2007)	<i>Rumex japonicus</i> ²		0,025	0,025-0,1	14	No tolerante ³
Ali <i>et al.</i> (2002)	<i>Phragmites australis</i>		>0,16	0,008-0,16	15	Tolerante
Ali <i>et al.</i> (2002)	<i>Zea mays</i>	Clorosis	0,08	0,008-0,16	15	No tolerante
Schiavon <i>et al.</i> (2007)	<i>Arabidopsis thaliana</i> accesiones Columbia		0,04	0,04-0,05	14	No tolerante

poblaciones de *Oenothera picensis* son zonas áridas, con un régimen histórico anual de precipitaciones de 300 mm y que ha disminuido significativamente en la última década, llegando a valores de 140-180 mm en las zonas costeras en

los años 2011-2012 (SEREMI de Agricultura, 2013), con una disponibilidad real de metales en el suelo reducida y, por lo tanto, una baja exposición a los efectos tóxicos. Además, se debe considerar que en condiciones reales

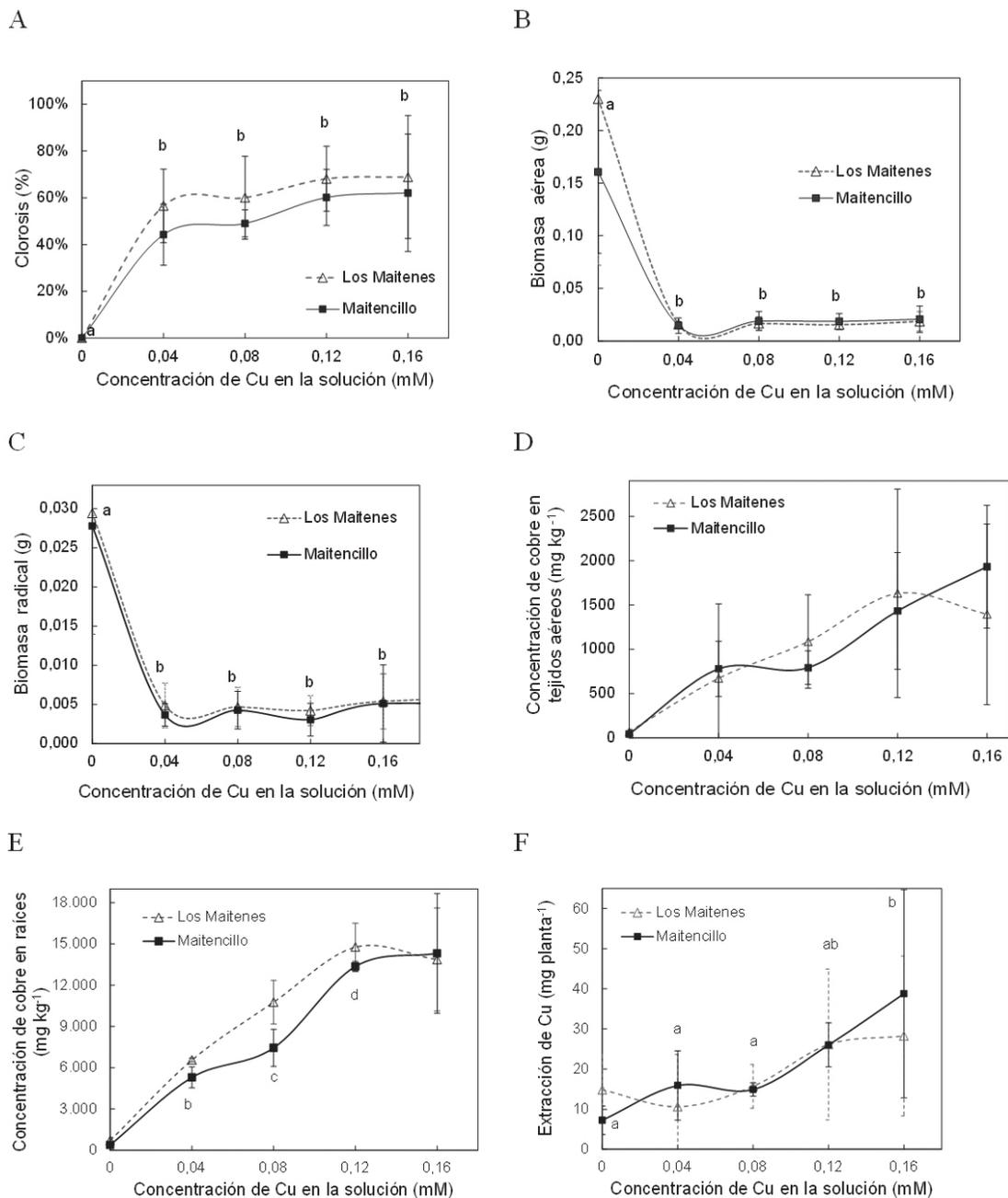


FIGURA 1. Efecto de la concentración de cobre en la solución sobre la clorosis (A), producción de biomasa aérea (B), producción de biomasa radical (C), concentración de cobre en tejidos aérea (D), concentración de cobre en raíces (E), y extracción total de cobre (F), en dos poblaciones de *Oenothera picensis*. Se indica la media y la desviación estándar para cada concentración de Cu. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones de Cu. No hubo diferencias significativas entre las poblaciones ($P>0,05$).

FIGURE 1. Effect of copper concentration in the solution on the chlorosis (A), aboveground biomass production (B), root biomass production (C), copper concentration in aboveground biomass (D), copper concentration in roots (E) and total copper extraction (F), in two populations of *Oenothera picensis*. The mean and standard deviation are indicated for each concentration of Cu. Different letters indicate significant differences between different concentrations of Cu. There were no significant differences between populations ($P>0.05$).

las plantas cuentan con una diversidad microbiológica en el suelo, que no se reproduce en los ensayos hidropónicos. Si bien en sitios contaminados es esperable que la diversidad de microorganismos del suelo esté disminuida respecto a un suelo normal (De Val *et al.*, 1999), en estos sitios se ha comprobado que son capaces de sobrevivir ciertos tipos de hongos arbusculares micorrízicos (HAM). Se ha comprobado que ciertos HAM pueden interactuar con plantas en ambientes extremos, mejorando su sobrevivencia (Carvalho *et al.*, 2006). En la zona de Los Maitenes, Cornejo *et al.* (2008) estudiaron la presencia de HAM en 4 especies; si bien la presencia de hongos micorrízicos fue escasa en la mayoría de las especies estudiadas (entre 100 y 200 esporas/g), en *Oenothera affinis* la presencia fue significativamente mayor (600 esporas/g de suelo) predominando el género *Glomus*. Ensayos posteriores realizados por Meier *et al.* (2011), adicionando estas micorrizas nativas a suelos contaminados, demostraron que las plantas micorrizadas sobrevivieron a concentraciones de Cu total de 500 mg kg⁻¹ en comparación a las plantas sin micorrizas o con micorrizas de suelos no contaminados, las cuales no sobrevivieron a estas concentraciones de cobre.

DIFERENCIAS ENTRE LAS POBLACIONES

Las poblaciones de *Oenothera picensis* provenientes de Los Maitenes y Maitencillo no mostraron diferencias significativas respecto a las variables de clorosis, producción de biomasa aérea o radical, tampoco sus relaciones Cu_a/Cu_r fueron diferentes (Tabla III). Esto indica que no hubo diferencias en el grado de tolerancia a la concentración de Cu entre ambas poblaciones, de esta forma el Cu no es el principal elemento limitante para el crecimiento de las plantas en el sector de Los Maitenes. La aparición de posibles adaptaciones en esta población debe ser evaluada mediante un estudio especializado.

ACUMULACIÓN DE COBRE EN BIOMASA AÉREA

Las máximas concentraciones de cobre en tejidos aéreos determinadas en esta investigación superaron los 1.000 mg kg⁻¹ (Fig. 1D). Sin embargo la planta presentó severos síntomas de toxicidad, inhibiéndose en más de un 50% la producción de biomasa aérea y radical (Fig. 1B y 1C) y causando clorosis en más del 50% de la superficie foliar (Fig. 1A). Una planta hiperacumuladora es aquella capaz de acumular más de 1.000 mg kg⁻¹ de Cu, Cd, Cr, Pb, Ni o Co, sin mostrar síntomas de toxicidad (Lasat 2000; Whiting *et al.* 2002). En consecuencia, esto reafirma la conclusión de que *Oenothera picensis* no se puede considerar una planta tolerante/hiperacumuladora, sino que es más bien una especie sensible.

BIBLIOGRAFÍA

- ALI, N., P. BERNAL & M. ATER. 2002. Tolerance and bioaccumulation of copper on *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil* 239(1): 103-111.
- ÁVILA, G., H. GAETE, M. MORALES & A. NEAMAN. 2007. Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42(3): 435-441.
- ÁVILA, G., H. GAETE, S. SAUVÉ & A. NEAMAN. 2009. Organic matter reduces copper toxicity for the earthworm *Eisenia foetida* in soils from mining areas in central Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(2): 252-259.
- BAKER, A. & R. BROOKS. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1(2): 81-108.
- BAKER, A., W.H. ERNST, A. VAN DER ENT, F. MALAISSE & R. GINOCCHIO. 2010. Metallophytes: the unique biological resource, its ecology and conservational status in Europe, central Africa and Latin America. In: L. Batty & K. Hallberg (eds.), *Ecology of Industrial Pollution*, 349 pp. Cambridge University Press, New York, USA.
- BAKER, A., S.N. WHITING & D. RICHARDS. 2002. Metallophytes: a unique biodiversity resource "owned" by the mining industry. 9th New Phytologist Symposium Heavy Metal and Plants. University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- BORGHI, M., R. TONGNETTI, G. MONTEFORTI & L. SEBASTIANI. 2007. Responses of *Populus x euramericana* (*P. deltoides* x *P. nigra*) clone *Adda* to increasing copper concentration. *Environmental and Experimental Botany* 61(1): 66-73.
- BRUNO, C. 1992. El viento y el relieve como factores geográficos determinantes en la dispersión de contaminantes derivados de los procesos productivos del cobre (comuna de Puchuncaví, V Región). Tesis. Magíster en Asentamientos Humanos y Medio Ambiente. Facultad de Arquitectura, Diseño y Estudios Urbanos, Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 103 pp.
- CARVALHO, L., I. CAÇADOR & M. MARTINIS-LOUÇÃO. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium*. *Plant and Soil* 285(1-2): 161-169.
- CHIPENG, F., C. HERMANS, G. COLINET, M.-P. FAUCON, M. NGONGO, P. MEERTS & N. VERBRUGGEN. 2010. Copper tolerance in the cuprophyte *Haumaniastrum katangense* (S. Moore) P.A. Duvign. & Plancke. *Plant and Soil* 328(1-2): 235-244.
- COSIO, F., M. NEGRÓN, J. GASTÓ & G. VILLATE. 2007. Distritos y Sitios de la Provincia Templada Secoestival Nubosa o Valparaíso: secano de la costa. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* 7(1): 38-61.
- DE GREGORI, I., G. LOBOS, S. LOBOS, H. PINOCHET, M. POTIN-GAUTIER & M. ASTRUC. 2000. Copper and selenium in rainwater, soils and alfalfa from agricultural ecosystems of Valparaíso Region, Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 45(1): 131-146.
- DE VAL, C., J.M. BAREA & C. AZCÓN-AGUILAR. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus population in heavy metal contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2): 718-723.

- EBBS, S. & L.V. KOCHIAN. 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental Science & Technology* 32(6): 802-806.
- FOLCHI, M.A. 2006. Historia ambiental de las labores de beneficio en la minería del cobre en Chile, siglos XIX y XX. Tesis. Doctorado en Historia Económica. Departamento de Economía y de Historia Económica, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. 727 pp.
- GINOCCHIO, R. 1997. Aplicabilidad de los modelos de distribución espacio-temporales de la vegetación en ecosistemas sujetos a procesos de contaminación. Tesis. Doctor en Ciencias Biológicas, mención Ecología. Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 209 pp.
- GINOCCHIO, R. 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncaví Valley, Chile. *Chemosphere* 41 (1-2): 15-23.
- GINOCCHIO, R., G. CARVALLO, I. TORO, E. BUSTAMANTE, Y. SILVA & N. SEPÚLVEDA. 2004. Micro-spatial variation of soil metal pollution and plant recruitment near a copper smelter in central Chile. *Environmental Pollution* 127(3): 343-352.
- GIRI, A.K. & R.K. PATEL. 2012. Phytoaccumulation potential and toxicity of arsenic ions by *Eichhornia crassipes* in hydroponic systems. *Bioremediation & Biodegradation* 3: 137 doi:10.4172/2155-6199.1000137.
- GOECKE, P., R. GINOCCHIO, M. MENCH & A. NEAMAN. 2011. Amendments promote the development of *Lolium perenne* in soils affected by historical copper smelting operation. *International Journal of Phytoremediation* 13(6): 552-566.
- GONZÁLEZ, S. & E. BERQVIST. 1986a. El impacto de emisiones de gases y otros productos desde chimeneas de fundiciones de minerales sobre las actividades agropecuarias. *Ambiente y Desarrollo* 2(3): 117-122.
- GONZÁLEZ, S. & E. BERQVIST. 1986b. Evidencias de contaminación con metales pesados en un sector del secano costero de la V Región. *Agricultura Técnica* 46(3): 299-306.
- GONZÁLEZ, S. & R. ITE. 1992. Acumulación metálica en suelos del área bajo influencia de las chimeneas industriales de Ventanas (Provincia de Valparaíso, V Región). *Agricultura Técnica* 50(2): 214-219.
- GONZÁLEZ, I., V. MUENA, M. CISTERNAS & A. NEAMAN. 2008. Acumulación de cobre en una comunidad vegetal afectada por contaminación minera en el valle de Puchuncaví, Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 81(2): 279-291.
- GUSTAFSSON, J. 2011. Visual MINTEQ VERSION 3.0. Department of Land and Water Resources Engineering, Kth Royal Institute of Technology. Estocolmo, Suecia. URL: <http://vminteq.lwr.kth.se/>. Viewed: 2 de junio 2015.
- KOPITKE, P., F. BLAMEY, C. ASHER & N. MENZIES. 2010. Trace metal phytotoxicity in solution culture: A review. *Journal of Experimental Botany* 61(4): 945-954.
- KUZOVKINA, Y., M. KNEE & M. QUIGLEY. 2004. Cadmium and copper uptake and translocation in five willow (*Salix* L.) species. *International Journal of Phytoremediation* 6(3): 269-287.
- LASAT, M. 2000. The Use of Plants for the Removal of Toxic Metals from Contaminated Soil. Environmental Protection Agency, Washington. 33 pp.
- LOU, L.-Q., Z.-G. SHEN & X.-D. LI. 2004. The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany* 51(2): 111-120.
- MACNAIR, M.R., G.H. TILSTONE & S. E. SMITH. 1993. The genetic of metal tolerance and accumulation in vascular plants. *New Phytologist* 124(4): 541-559.
- MATTHEI, O. 1995. Manual de las malezas que crecen en Chile. Alfabetá Impresores, Santiago, Chile. 537 pp.
- MEIER, S., R. AZCÓN, P. CARTES, F. BORIE & P. CORNEJO. 2011. Alleviation of Cu toxicity in *Oenothera picensis* by copper-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and treated agrowaste residue. *Applied Soil Ecology* 48(2): 117-124.
- MINITAB INC. (2009). Minitab 15. Pennsylvania, USA. Disponible: www.minitab.com.
- MUENA, V., I. GONZÁLEZ & A. NEAMAN. 2010. Efectos del encalado y la fertilización nitrogenada sobre el desarrollo de *Oenothera affinis* en un suelo afectado por la minería del cobre. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(2): 102-114.
- QUIAN, M., X. LI & Z. SHEN. 2005. Adaptative copper tolerance in *Elsholtzia haichowensis* involves production of Cu-induced thiol peptides. *Plant Growth Regulation* 47(1): 65-73.
- RACHOU, J., C. GAGNON & S. SAUVÉ. 2007. Use of an ion selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices. *Environmental Chemistry* 4(2): 90-97.
- SADZAWKA, A. 2006. Métodos de análisis de aguas para riego. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile. 332 pp.
- SADZAWKA, A., M.A. CARRASCO, R. DEMANET, H. FLORES, R. GREZ, M.L. MORA & A. NEAMAN. 2007. Métodos de análisis de tejidos vegetales. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile. 139 pp.
- SAUVÉ, S., M.B. MC BRIDE, W.A. NORVELL & W. HENDERSHOT. 1997. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: Effects of copper level, pH and organic matter. *Water, Air and Soil Pollution* 100 (1-2): 133-149.
- SCHIAVON, M., L. ZHANG, S. ABDEL-GHANY, M. PILON, M. MALAGOLI & E. PILON-SMITHS. 2007. Variation in copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* accession Columbia, Landsberg *erecta* and Wassilewskija. *Physiologia Plantarum* 129: 342-350.
- SECRETARÍA MINISTERIAL DE VIVIENDA Y URBANISMO DE LA REGIÓN DE VALPARAÍSO. 2004. Diagnóstico Ambiental a la Modificación al Plan Regulador Intercomunal de Valparaíso en el Área Metropolitana de Valparaíso y Satélite Borde Costero Quintero-Puchuncaví. Corporación Chile Ambiente, Chile. 162 pp.
- SECRETARÍA REGIONAL DE AGRICULTURA REGIÓN DE VALPARAÍSO. 2013. Situación hídrica actual de la Región de Valparaíso. Presentación pública. Quillota, Chile. URL: http://valparaiso.minagri.gob.cl/wp-content/uploads/sites/7/2013/10/2_SEREMI-de-Agricultura_Situacion-Hidrica-Actual-de-la-Region-de-Valparaiso_13-5-13.pdf. Visto: 31 de mayo de 2015.
- SOIL SURVEY STAFF. 2003. Keys to soil taxonomy. United States Department of Agriculture. National Resources Conservation Service, Washington, DC, USA. 332 pp.

- STEBING, L. 1982. Problems of bioindication and the necessity of standardization. In: L. Steubing & H. Jäger (eds.), *Monitoring Air Pollutants by Plants*, pp. 19-27. Dr. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands.
- STUCKEY, J., A. NEAMAN, R. RAVELLA, S. KOMARNEI & C. MARTÍNEZ. 2009. Highly charged swelling mica reduces Cu bioavailability in Cu-contaminated soils. *Environmental Pollution* 157(1): 12-16.
- VERLINDEN, M. 1982. On the acid decomposition of human blood and plasma for the determination of selenium. *Talanta* 29(10): 875-882.
- WENSHAN, K., Z.-T. XIONG, C. SHIJIAN & C. JIANJUNG. 2007. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* population from a copper mine and an uncontaminated field sites. *Environmental and Experimental Botany* 59(1): 59-67.
- WHITING, S.N., R.D. REEVES & A.J.M. BAKER. 2002. Conserving biodiversity: Mining metallophytes and land reclamation. *Mining Environmental Management* 10(2): 11-16.
- WHITING, S.N., R.D. REEVES, D. RICHARDS, M.S. JOHNSON, J.A. COOKE, F. MALAISE, A. PATON, J.A.C. SMITH, J.S. ANGLE, R.L. CHANEY, R. GINOCCHIO, T. JAFFRÉ, R. JOHNS, T. MCINTYRE, O.W. PURVIS, D.E. SALT, H. SCHAT, F.J. ZHAO & A.J.M. BAKER. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Society for Ecological Restoration International* 12(1): 106-116.

Recibido: 06.01.15
Aceptado: 27.08.15