

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
POSTGRADO EN BOTÁNICA  
TESIS DOCTORAL**



Influencia de las micorrizas arbusculares sobre el crecimiento y  
respuesta a la sequía de *Piscidia carthagenensis* Jacq.:  
Implicaciones en la recuperación de un bosque seco de la península  
de Macanao, Isla de Margarita.

Tesis Doctoral presentada ante la ilustre Universidad  
Central de Venezuela por la Lic. Carolina G. Kalinhoff R.  
para optar al título de Doctor en Ciencias, Mención  
Botánica.

Tutoras: Dra. Alicia J. Cáceres S.  
Dra. Rosa Urich

**Caracas, Marzo de 2012**

## Resumen de la tesis doctoral titulada:

*Influencia de las micorrizas arbusculares sobre el crecimiento y respuesta a la sequía de *Piscidia carthagenensis* Jacq.: Implicaciones en la recuperación de un bosque seco de la península de Macanao, Isla de Margarita.*

*Arbuscular mycorrhizal influences on *Piscidia carthagenensis* Jacq. growth and drought response: Implications for recovery of dry forest from the Macanao peninsula, Margarita Island.*

Se ha propuesto que el uso de inoculos nativos mixtos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), podría constituir una estrategia favorable para aumentar el crecimiento sobrevivencia y la resistencia a la sequía de plantas nativas para la restauración de ecosistemas degradados y que es importante tomar en cuenta los suelos de los cuales provienen dichos HMA, ya que el suelo impone una fuerte presión de selección sobre la respuesta de la planta a la simbiosis. En este contexto se evaluó el crecimiento, relaciones hídricas, intercambio de gases y sobrevivencia de *Piscidia carthagenensis* ante diferentes combinaciones suelo-inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), en condiciones de invernadero y de campo, y sus implicaciones en la restauración de un bosque seco de la península de Macanao, Isla de Margarita.

En un primer ensayo de vivero de 112 días de duración, se utilizaron suelos provenientes de un matorral xerófito (Mat), de un arbustal de 20 años (Va) y de un pastizal de dos años (Da), para establecer plántulas sin micorrizas (control estéril, C), inoculadas con el inóculo foráneo *Acaulospora lacunosa* (L) y con los inóculos nativos concentrados del Matorral (M), de un arbustal de veinte años (V) y de un pastizal de dos años (D). En los suelos sucesionales (Va y Da), se observó una mayor biomasa total, tasa relativa de crecimiento (TRC) y tasa de asimilación neta (TAN) en plantas inoculadas que en plantas control. El uso de los inóculos nativos M, V y D produjo los mayores incrementos en altura, diámetro y TRC que el inóculo foráneo, y los inóculos V y D colonizaron con mayor rapidez las raíces que los inóculos M y L. En el suelo Mat el incremento en biomasa total, TRC y TAN de las plantas inoculadas respecto a las plantas control fue de menor magnitud que los suelos sucesionales y la colonización micorrízica fue significativamente más lenta, con porcentajes de arbusculos más bajos con todos los inóculos.

En un segundo ensayo de vivero de 140 días de duración utilizando solamente suelo estéril del pastizal de dos años como sustrato de siembra, los mismos inóculos de HMA, y dos condiciones de humedad del suelo (riego y sequía), se observó que la colonización micorrízica con los inóculos nativos tuvo una importante influencia en las relaciones hídricas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de sequía, ya que hubo ajuste osmótico y un aumento en el potencial de turgencia foliar respecto a la condición de riego. Se observó además una mayor conductancia hidráulica radical en plantas inoculadas que en las plantas control. El inóculo del matorral xerófito reunió algunos atributos que podrían significar una mayor compatibilidad funcional con *P. carthagenensis*, como un mayor porcentaje de arbusculos, mayor relación vástago/raíz en ambas condiciones de humedad del suelo, y mayores valores de potencial hídrico y de fotosíntesis bajo condiciones de sequía.

En un tercer ensayo de campo, realizado con los mismos inóculos de HMA pero cultivando las plantas en los suelos Mat, Va y Da sin esterilizar, se establecieron plantas de cinco meses de edad con las diferentes combinaciones suelo-inóculo en una localidad recién perturbada por la minería. Y se determinó el crecimiento, intercambio gaseoso, relaciones hídricas y sobrevivencia en tres periodos consecutivos, lluvia (a los 9 meses de siembra en campo), sequía (a los 11 meses) y recuperación de la sequía (a los 17 meses). Las diferencias en altura y diámetro del tallo fueron mínimas durante los periodos de lluvia y sequía, no así durante la recuperación, cuando las plantas inoculadas con M exhibieron los mayores valores de altura. Durante la sequía se observó una disminución de tasa de fotosíntesis instantánea en todos los tratamientos, respecto a los valores reportados en lluvia. Durante la recuperación de la sequía las plantas inoculadas exhibieron mayores valores de fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y eficiencia de uso de agua que las plantas no inoculadas. El porcentaje de sobrevivencia fue significativamente mayor en plantas previamente cultivadas en el suelo Da e inoculadas con HMA nativos (88-90%), seguido por las cultivadas con el inóculo foráneo (78%) y por las no inoculadas (43%). Estos resultados apoyan las tendencias observadas por otros autores sobre el uso preferencial de inóculos nativos mixtos de HMA en lugar de inóculos foráneos para el mejor desempeño de las plantas hospederas a largo plazo en ambientes semiáridos. Se concluye que el uso de HMA nativos es beneficioso y recomendado para mejorar los atributos morfológicos, fisiológicos y la sobrevivencia de *P. carthagenensis* en suelos perturbados por la minería y que los efectos positivos de la inoculación se mantienen en el tiempo, incluso después de un periodo prolongado de sequía en campo en árboles adultos.

Palabras clave: Hongos micorrízicos arbusculares, inóculo nativo, simbiosis, déficit hídrico.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, native inoculum, symbiosis, water deficit.

## AGRADECIMIENTOS

A mi esposo Víctor Romero por su amor, apoyo moral, técnico e intelectual durante cada una de las etapas de realización de esta tesis.

A mis Padres Luisa Rojas de Kalinhoff y Américo Kalinhoff por su consejo de hacer lo que más amara en la vida, y por animarme incansablemente a continuar mis estudios de doctorado.

A mi hermana, Alexandra Kalinhoff por decir que si a todos los favores que le pedí, aunque ello significara dejar todo a un lado, y a mi hermano Felix Kalinhoff por inspirarme con su perseverancia a pesar de las limitaciones.

A Maritza Corrales de Romero y a Berta Hernández de Corrales “Mima” por su cariño, sus consejos de vida, y por estar siempre pendientes de mi.

A mi querida casa que vence las sombras, Universidad Central de Venezuela.

A mis profesoras tutoras, las Dras. Alicia Cáceres y Rosa Urich, por dirigir esta tesis y guiarme durante todo mi plan de formación en el postgrado.

Al maravilloso equipo de “asistentes de campo cinco estrellas” que me di el lujo de tener: Alicia Cáceres, Rosa Urich, Wilmer Tezara, Ilsa Coronel y Oranys Marín, todos doctores y profesores. Gracias por estar presentes y apoyarme incondicionalmente las veces que los necesité.

A la Dra. Ana Herrera por sus invaluable comentarios a todos mis manuscritos.

A la Dra. Gisela Cuenca (IVIC) por transmitirme su gran pasión por las micorrizas arbusculares y por su asesoría en la taxonomía de estos hongos.

Al Dr. Ismael Hernández y a Gabriela Pereira por su ayuda con los análisis de suelos.

A José Manuel Briceño por todo el apoyo logístico prestado en la Isla de Margarita.

A Juan Carlos Salazar, dueño de la arenera La Chica, por permitirnos trabajar en sus instalaciones y por prestarnos su casa para una de nuestras salidas de campo.

A nuestros asistentes de campo, Romel Marín, Pablo Millán y Asnaldo Millán, cordiales amigos de San Francisco de Macanao, sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible.

A las personas que pusieron también su grano de arena en el campo: La Dra. Marta Francisco (IVIC), las Licenciadas Gabriela Pereira, Eleinis Ávila, y mi gran amiga Zamira Hasmi.

A mis queridas estudiantes Karla Cáceres por su apoyo en campo y por realizar los cortes de hoja de *Piscidia carthagenensis*, e Inés Aguirre por su ayuda en el procesamiento de muestras.

A mis compañeras del postgrado y amigas, Pauline Arrindell, Melvin Maiquetía, Amalia Brito, Yamilet Lira y Alejandra Zamora por todo su apoyo y cariño.

A la Universidad de Oriente UDO, núcleo Boca de Río, Isla de Margarita, por alojarnos en sus instalaciones.

Al FONACIT por otorgarme una beca del Plan de Desarrollo de Talento Humano de Alto Nivel (BID-FONACIT II) 2005-2008, para realizar mi doctorado.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico CDCH-UCV, por otorgarme una Beca de Excelencia Académica (2008-2011), que me permitió culminar mi doctorado y adquirir experiencia docente.

A la Iniciativa de especies Amenazadas IEA de PROVITA, por el financiamiento parcial que hizo posible la realización del experimento de campo (contrato de donación N° 2009-09).

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivo General.....	12
3.2. Objetivos Específicos.....	12
4. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	14
5. MATERIAL VEGETAL.....	18
6. MÉTODOS GENERALES.....	20
6.1. Determinaciones morfométricas y de biomasa.....	20
6.2. Cuantificación de la colonización por hongos micorrízicos arbusculares en raíces.....	21
6.3. Índice de respuesta micorrízica (IRM).....	22
6.4. Relaciones hídricas.....	23
6.5. Intercambio gaseoso.....	25
6.6. Análisis bioquímico en hojas.....	25
6.7. Elaboración de inóculos mixtos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	26
6.8. Aislamiento y conteo de esporas de HMA.....	26
6.9. Riqueza de HMA.....	27
6.10. Número más probable de propágulos infectivos (NMP).....	27
6.11. Análisis de suelos y hojas.....	28
7. CAPÍTULO I. Respuesta diferencial de crecimiento y dinámica de colonización micorrízica en <i>Piscidia carthagenensis</i> Jacq. ante diferentes combinaciones suelo-inóculo provenientes de un mosaico sucesional de matorral xerófito.....	29
7.1. Introducción.....	30

7.2. Materiales y Métodos.....	32
7.3. Resultados.....	37
7.3.1. Análisis de suelos del mosaico sucesional.....	37
7.3.2. Descripción de inóculos de HMA del mosaico sucesional.....	37
7.3.3. Ensayo de crecimiento y dinámica de colonización micorrízica.....	45
7.4. Discusión.....	59
7.5. Conclusiones.....	73
8. CAPÍTULO II. Influencia de las micorrizas arbusculares nativas de un mosaico sucesional de matorral xerófito sobre el crecimiento, estatus hídrico e intercambio gaseoso de <i>Piscidia carthagenensis</i> Jacq. bajo condiciones de sequía.....	76
8.1. Introducción.....	77
8.2. Materiales y Métodos.....	81
8.3. Resultados.....	85
8.3.1. Crecimiento.....	85
8.3.2. Relaciones hídricas.....	89
8.3.3. Intercambio gaseoso.....	92
8.3.4. Proteínas solubles y clorofilas totales.....	98
8.3.5. Colonización micorrízica y biomasa de nódulos.....	98
8.3.6. Anatomía foliar de <i>P. carthagenensis</i> .....	102
8.4. Discusión.....	105
8.5. Conclusiones.....	117
9. CAPÍTULO III. Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares sobre el crecimiento, sobrevivencia, fotosíntesis y relaciones hídricas de <i>Piscidia carthagenensis</i> Jacq. en una localidad de bosque seco perturbado por la minería....	120
9.1. Introducción.....	121
9.2. Materiales y Métodos.....	124
9.3. Resultados.....	131
9.3.1. Colonización micorrízica al momento de la siembra.....	131
9.3.2. Intercambio gaseoso al momento de la siembra.....	131
9.3.3. Altura y diámetro de las plantas desde el momento de la siembra hasta los 17 meses de crecimiento.....	134
9.3.4. Sobreviviencia a ls 4, 9 y 17 meses de crecimiento.....	138
9.3.5. Intercambio gaseoso en las temporadas de lluvia y sequía.....	141
9.3.6. Relaciones hídricas en las temporadas de lluvia y sequía.....	146
9.3.7. Intercambio gaseoso en el segundo período de lluvias.....	148
9.3.8. Relaciones hídricas en el segundo periodo de lluvias.....	150

9.4. Discusión.....	152
9.5. Conclusiones.....	160
10. ANEXOS.....	162
11. BIBLIOGRAFÍA.....	166

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Tratamientos derivados del diseño experimental completamente aleatorizado, formado por una combinación factorial de tres tipos de suelo (estériles) y cinco condiciones de inoculación.....	35
2. Características de los suelos del matorral, parcela sucesional de veinte años (arbustal) y de la parcela sucesional de dos años (pastizal).....	38
3. Densidad de esporas y número más probable de propágulos infectivos de los inóculos utilizados en los experimentos.....	39
4. Listado de morfotipos de <i>Glomeromycorta</i> presentes en los inóculos producidos con los suelos provenientes de matorral, de la parcela sucesional de 20 años y de la parcela sucesional de dos años.....	40
5. Parámetros morfométricos de <i>P. carthagenensis</i> a las 14 semanas de crecimiento en tres suelos combinados con cinco condiciones de inoculación.....	46
6. Colonización por micorrizas arbusculares (CMA), índice de respuesta micorrízica (IRM) y peso seco de nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno (Nódulos), a las 14 semanas de crecimiento en tres suelos combinados con cinco condiciones de inoculación.....	58
7. Tratamientos derivados del diseño experimental completamente aleatorizado, formado por una combinación factorial de dos condiciones de humedad y seis condiciones de inoculación.....	82
8. Altura, diámetro, área foliar (AF) y área foliar específica (AFE) de plantas de <i>P. carthagenensis</i> bajo condiciones de riego y sequía.....	86
9. Biomasa de plantas de <i>P. carthagenensis</i> bajo condiciones de riego y sequía.....	88
10. Potencial osmótico a máxima turgencia, ajuste osmótico, y conductancia hidráulica radical expresada por unidad de peso seco de raíces finas y por unidad de área foliar en plantas de <i>P. carthagenensis</i> bajo condiciones de riego y sequía.....	93

11. Proteínas solubles totales (PST) y clorofilas totales de plantas de <i>P. carthagenensis</i> bajo condiciones de riego y sequía.....	99
12. Colonización por micorrizas arbusculares (MA), índice de respuesta micorrízica (IRM), biomasa de nódulos y relación entre el peso seco de nódulos y el peso seco de las plantas, bajo condiciones de riego y sequía.....	100
13. Tratamientos derivados de la combinación de tres tipos de suelo no estériles y cinco condiciones de inoculación del experimento de campo.....	124
14. Cronograma de siembra, riego y secuencia de periodos de lluvia, sequía y de pérdida y recuperación de hojas durante el experimento de campo.....	128
15. Colonización por micorrizas arbusculares (CMA), arbúsculos, vesículas e hifas, al momento de la siembra en campo (t=0).....	132
16. Intercambio gaseoso al momento de la siembra (t=0).....	133
17. Altura de las plantas (cm) desde el momento de la siembra (t=0) y a los 4, 9, 11 y 17 meses de crecimiento en campo.....	135
18. Diámetro basal del tallo (mm) desde el momento de la siembra (t=0) y a los 4, 9, 11 y 17 meses de crecimiento en campo.....	137

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Localidades del mosaico sucesional Matorral-arbustal-pastizal.....	17
2. Algunos morfotipos de HMA presentes en los inóculos del mosaico sucesional de matorral xerófito no perturbado-localidad sucesional de veinte años-localidad sucesional de dos años. Para el morfotipo Gigasporaceae 2, se muestra un detalle del bulbo suspensor (400X)...	42
3. Algunos morfotipos de HMA presentes en los inóculos del mosaico sucesional de matorral xerófito no perturbado-localidad sucesional de veinte años-localidad sucesional de dos años. Para <i>Sclerocistys sinuosa</i> se muestra un detalle del peridio compuesto por hifas de pared gruesa dispuestas en forma compacta cubriendo el esporocarpio (400X).....	43
4. Algunos morfotipos de HMA presentes en los inóculos del mosaico sucesional de matorral xerófito no perturbado-localidad sucesional de veinte años-localidad sucesional de dos años.....	44
5. Biomasa (peso seco) de <i>P. carthagenensis</i> a las 14 semanas de crecimiento en los suelos del Matorral (Mat), parcela sucesional de 20 años (Va) y parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (control), y con inóculo del matorral (M), de la parcela de 20 años (V), de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de <i>A. lacunosa</i> (L).....	49
6. Tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN) y tasa de producción de área foliar (TAF) en los suelos del Matorral (Mat), parcela sucesional de 20 años (Va) y parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (control), y con inóculo del matorral (M), de la parcela de 20 años (V), de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de <i>A. lacunosa</i> (L).....	51
7. Dinámica de colonización por micorrizas arbusculares a los 30, 60 y 112 días de siembra en los suelos provenientes del Matorral (Suelo Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Suelo Va) y de la parcela sucesional de dos años (Suelo Da).....	52

8.	Dinámica de colonización por arbusculos a los 30, 60 y 112 días de siembra en los suelos provenientes del Matorral (Suelo Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Suelo Va) y de la parcela sucesional de dos años (Suelo Da).....	55
9.	Dinámica de colonización por vesículas a los 30, 60 y 112 días de siembra en los suelos provenientes del Matorral (Suelo Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Suelo Va) y de la parcela sucesional de dos años (Suelo Da).....	56
10.	Potencia hídrico ( $\Psi$ ), potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) y contenido relativo de agua (CRA) en plantas de <i>P. carthagenensis</i> bajo condiciones de riego y sequía.....	90
11.	Intercambio gaseoso de plantas de <i>P. carthagenensis</i> bajo condiciones de riego, sequía y riego en vivero.....	94
12.	Relación entre tasa de fotosíntesis instantánea (A) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) de plantas de <i>P. carthagenensis</i> sujetas a riego (símbolos negros), sequía (símbolos grises) y re-irrigación (símbolos blancos).....	97
13.	Descripción anatómica foliar de <i>P. carthagenensis</i> .....	103
14.	Diseño de siembra en campo mostrando la orientación de los bloques lineales.....	125
15.	Aspectos generales del proceso de siembra.....	127
16.	Aspecto de las plantas en el período de lluvia (a-b), sequía (c-d) y recuperación de la sequía (e-f).....	139
17.	Sobrevivencia de las plantas a los 4, 9 y 17 meses de crecimiento en una localidad perturbada.....	140
18.	Diferencias en tamaño de una planta no inoculada previamente cultivada en suelo no estéril del matorral (Mat-NI), y otra previamente cultivada en suelo no estéril de la parcela sucesional de dos años inoculada con inóculo del matorral (Da-M).....	142
19.	MANOVA de tres vías, resultado para la tasa de fotosíntesis instantánea (A) y la tasa de transpiración (E).....	143
20.	MANOVA de tres vías, resultado para la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la concentración intercelular de $CO_2$ ( $C_i$ ).....	145
21.	MANOVA de tres vías, resultado para el potencial hídrico ( $\Psi$ ) y el potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ).....	147
22.	Intercambio gaseoso en el segundo periodo de lluvias. Fotosíntesis instantánea (A), transpiración (E), conductancia estomática ( $g_s$ ), concentración intercelular de $CO_2$ ( $C_i$ ) y eficiencia de uso de agua (EUA).....	149

**23.** Relaciones hídricas en el segundo periodo de lluvias. Potencial hídrico ( $\Psi$ ), potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) y contenido de agua foliar (CAF).....151

## 1. Introducción General

Los bosques secos representan más del 40% de los bosques tropicales del mundo, y en comparación con los bosques húmedos están sujetos a perturbaciones antrópicas más intensas y extensas (Murphy & Lugo, 1986). Aunque estos ecosistemas son los más apreciados para los asentamientos humanos y la explotación de sus recursos, existe muy poca información acerca de su regeneración (Sanchez-Azofeifa *et al.* 2005). Los patrones de precipitación altamente estacional de los bosques secos tropicales generan condiciones abióticas más extremas y variables que en los bosques húmedos, generando un gran estrés durante el proceso de sucesión (Ceccon *et al.* 2006). En la actualidad, los bosques secos tropicales se encuentran entre los más amenazados y en mayor riesgo de pérdida de biodiversidad por desertificación (Rao & Tak 2002).

En Venezuela los bosques secos son categorizados como bosques deciduos, que incluyen comunidades arbóreas con cierto grado de caducifolia, afectados por un periodo relativamente prolongado de sequía (de 3 a 6 meses) en el cual al menos un 75% de los individuos arbóreos pierde su follaje (Huber & Alarcón, 1988; González, 2003). Se distribuyen principalmente al norte del país ocupando un 3,2% de su superficie, y gran parte de su extensión ha sido transformada por la agricultura, la ganadería y los urbanismos (Fajardo *et al.* 2005), posicionándolos en la categoría de riesgo de eliminación más alto (en peligro o en peligro crítico), de acuerdo a los criterios establecidos en el Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela (Oliveira-Miranda *et al.* 2010).

En la Península de Macanao, ubicada al oeste de la Isla de Margarita, la explotación de minas de arena que se lleva a cabo desde 1976 hasta la actualidad (Sanz, 2004), ha alterado radicalmente la matriz suelo-vegetación, tanto en el sector norte como en el sector sur de la península (González, 2007). La extracción de los fondos arenosos de las márgenes de las quebradas intermitentes elimina los bosques y matorrales asociados, los cuales representan las comunidades vegetales de mayor complejidad y riqueza de especies de las áreas bajas de Macanao (González, 2007).

Uno de los factores principales que determina el tipo de vegetación y la composición de especies en ecosistemas secos es la baja precipitación. En este contexto, la pérdida de los mecanismos de retención de agua de los suelos produce fuertes limitaciones hídricas, que conjuntamente con la acumulación de sales y mayor riesgo de erosión limitan la regeneración de la vegetación, especialmente después de una perturbación antrópica de gran impacto, como la minería (Maass, 1995, Rao & Tak 2002, Cummings *et al.* 2005). De igual forma, la rehabilitación de la calidad de los suelos afectados por la minería depende del establecimiento de una cobertura vegetal que mejore las propiedades físicas, químicas y biológicas de los mismos (Bradshaw, 1987). Así, la falta de información sobre la biología y ecología de plantas nativas de las localidades afectadas y de sus adaptaciones al estrés hídrico por sequía limitan su uso en programas de reforestación (Gebrekirstos *et al.* 2006).

El papel de las interacciones entre microorganismos del suelo y las raíces de las plantas ha adquirido un interés creciente en las últimas décadas debido a

su importancia para el crecimiento, sobrevivencia y éxito reproductivo de las plantas (Reynolds *et al.* 2003; Bever, 2003). Sin embargo, la reducción o ausencia de simbiontes fúngicos clave en suelos perturbados, tales como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), limita el potencial para el re-establecimiento de la vegetación nativa, especialmente en regiones áridas y semiáridas (Querejeta *et al.* 2006).

Los HMA (Phylum Glomeromycota, Schüßler *et al.* 2001), se encuentran ampliamente distribuidos en todos los hábitats y climas terrestres formando la asociación micorrízica más antigua (Pirozynsky, 1981). El descubrimiento de fósiles de pequeñas plantas del devónico tardío, reveló la existencia de hifas y esporas semejantes a las que desarrollan estos hongos en la actualidad (Kenrick & Crane, 1997; Remy *et al.* 1994). Estas observaciones pioneras fueron posteriormente corroboradas sobre la base de evidencias morfológicas y moleculares, según las cuales las micorrizas arbusculares (MA) co-evolucionaron con las plantas desde que estas hacían su transición a un medio terrestre inhóspito para los sistemas radicales primitivos, hace aproximadamente 400 millones de años, formando parte de los sistemas radicales de las plantas vasculares actuales (Honrubia, 2009; Brundrett, 2002; Simon *et al.* 1993).

El desarrollo del ciclo de vida de las MA, desde la germinación de una espora hasta la formación de una red de micelio en el suelo (micelio externo), involucra una serie de eventos que comienzan con la germinación de la espora y la formación de un micelio pre-simbiótico, inducidos por la hormona estrigolactona exudada por las raíces de las plantas (Besserer *et al.* 2006).

Simultáneamente el hongo produce moléculas de señalización que activan los genes de las plantas relacionados con la simbiosis, denominadas colectivamente factores micorrízicos (factores *Myc*), y forma un tipo especial de apresorio (hifopodio) en la superficie de la raíz, donde previamente ha comenzado la formación de un aparato de pre-penetración hifal (PPA) que prepara el ambiente intracelular de la raíz y predetermina la ruta de crecimiento fúngico (Parniske, 2008). Posteriormente una hifa se extiende desde el hifopodio y es guiada por el PPA a través de la corteza para ramificarse lateralmente a lo largo de la raíz, vía apoplasmática y formar estructuras ramificadas características llamadas arbusculos, que son considerados como el sitio principal de intercambio de nutrientes entre ambos simbioses (Harrison, 2005).

Luego de la formación de arbusculos, en algunos grupos de HMA se forman estructuras globulares especializadas denominadas vesículas, las cuales almacenan lípidos y nutrientes (principalmente fósforo, Olsson *et al.* 2011), y también tienen el potencial de propagar el hongo a partir de fragmentos de raíz colonizada (Biermann & Linderman, 1983). El ciclo de vida del hongo culmina con el crecimiento del micelio externo desde la raíz colonizada hacia el suelo, y la producción de nuevas esporas (Giovannetti *et al.* 2010). Debido a su dependencia de las plantas para completar su ciclo de vida y producir la próxima generación de esporas, los HMA son considerados biótrofos obligados (Parniske, 2008).

Las plantas en simbiosis con las MA incrementan su capacidad para incorporar nutrientes poco móviles del suelo, tales como fósforo, nitrógeno, zinc

y cobre (Jakobsen *et al.* 1992, Smith & Read, 1997, Govindarajulu *et al.* 2005), mientras el hongo obtiene compuestos derivados del carbono producidos por la planta (Brundrett, 1996). Las delgadas hifas (2-5  $\mu\text{m}$  de diámetro) se extienden desde la raíz colonizada de la planta formando el micelio externo del hongo. Estas hifas pueden acceder a espacios intersticiales del suelo que son inaccesibles para los pelos radicales, los cuales poseen un diámetro mucho mayor (de 10 a 20  $\mu\text{m}$ ), incorporando agua y nutrientes que de otra manera no estarían disponibles para las raíces de las plantas (Ruiz-Lozano & Azcón, 1995). Además se ha propuesto que las MA protegen a las plantas de patógenos radicales (Wehner *et al.* 2010) y aumentan su sobrevivencia bajo condiciones abióticas estresantes, como el déficit hídrico por sequía (Augé 2001; Caravaca *et al.* 2003a; Porcel & Ruiz-Lozano, 2004).

Mediante la acción coordinada de mecanismos bioquímicos y fisiológicos las MA intervienen tanto en la evasión como en la tolerancia a la sequía de sus plantas hospederas (Augé *et al.* 2007). Desde el punto de vista bioquímico, se ha evidenciado el incremento en la protección contra el estrés oxidativo (Goicoechea *et al.* 2005), variaciones en la expresión de las aquaporinas (Porcel *et al.* 2006) y la regulación estomática a través de señales hormonales (Duan *et al.* 1996; Goicoechea *et al.* 1997). Mientras que desde el enfoque fisiológico se han reportado incrementos en la conductancia hidráulica radical (Kyllo *et al.* 2003), mejoramiento de la eficiencia de uso de agua (Querejeta *et al.* 2003) y un mayor ajuste osmótico (Wu & Xia, 2006), en plantas sometidas a estrés hídrico por sequía.

Aunque algunos autores sugieren que el efecto positivo de las MA sobre las relaciones hídricas de las plantas es una consecuencia del mejoramiento nutricional (Safir *et al.* 1972; Al-Karaki *et al.* 2004; Smith *et al.* 2010), se ha demostrado que algunos de los efectos bioquímicos y fisiológicos de las MA pueden ser independientes de las diferencias en biomasa y concentración de nutrientes en los tejidos (Augé, 2001, Augé *et al.* 2007).

Las plantas colonizadas con MA pueden mostrar variaciones en las relaciones hídricas respecto a plantas no colonizadas cuando el tamaño y el estado nutricional de las plantas de ambos tratamientos se mantienen iguales (Levy & Krikun, 1980; Augé *et al.* 1987a; Bethlenfalvay *et al.* 1988). Utilizando este criterio experimental, se ha observado que las plantas colonizadas frecuentemente resisten mejor la sequía que las plantas no colonizadas (Augé & Moore, 2005), y que este efecto muchas veces depende de las combinaciones planta-hongo utilizadas (Augé, 2001; Augé *et al.* 2007; Subramanian *et al.* 2006). En particular los HMA nativos de ambientes semiáridos incorporan agua y nutrientes más eficientemente en suelos secos, confiriéndole a la planta una mayor resistencia a la sequía (Ruiz-Lozano & Azcón, 1995; Marulanda *et al.* 2003; Porcel & Ruiz-Lozano, 2004). Diferentes especies de MA modulan diferencialmente la tasa fotosintética, la conductancia estomática y la eficiencia de uso de agua (EUA) de sus plantas hospederas bajo déficit hídrico (Augé, 2001).

La colonización MA puede aumentar, disminuir o mantener constante la EUA dependiendo de la composición de HMA del inóculo utilizado y de la

estrategia de uso de agua de la planta (Querejeta *et al.* 2006). Estas diferencias en la respuesta de las distintas especies de plantas ante la composición de especies micorrízicas presentes en un inóculo, resaltan la marcada diversidad funcional de la simbiosis micorrízica, lo cual debe ser tomado en cuenta en pruebas experimentales de invernadero y de campo (Smith *et al.* 2010).

Una alta diversidad funcional referida como una alta variabilidad en el efecto simbiótico de diferentes combinaciones de HMA sobre una determinada planta hospedera (Smith *et al.* 2004; Avio *et al.* 2006), viene determinada por las diferencias en la tasa de colonización micorrízica (Graham & Abbott, 2000), por la relación entre la ganancia potencial de carbono y el costo de la asociación simbiótica (Johnson *et al.* 1997) y por las diferencias en el desarrollo y la eficiencia de incorporación de nutrientes del micelio externo de los distintos géneros de HMA (Dodd *et al.* 2000). Esta diversidad funcional deriva en una mayor o menor compatibilidad funcional o eficiencia simbiótica, que se define como la cantidad de carbono ganado por la planta a través de la respuesta de crecimiento, menos el carbono invertido para el mantenimiento del hongo micorrízico (Tinker *et al.* 1994).

Aunque la eficiencia simbiótica es un complejo de respuestas tanto de la planta como del hongo, esta suele ser expresada en términos de crecimiento (tasa relativa de crecimiento, relación vástago/raíz) y/o incrementos en el contenido de nutrientes de la planta, principalmente fósforo (Ruiz-Lozano & Azcón, 2000). El índice de respuesta micorrízica (IRM) que determina el grado en el cual una planta se beneficia de la presencia de las MA comparado a

cuando esta asociación está ausente, es frecuentemente utilizado para comparar la eficiencia simbiótica de distintos inóculos (Plenchette *et al.* 1983). Este índice fue creado originalmente para medir la dependencia relativa de las plantas a las MA, pero según Janos (2007) la dependencia micorrízica es la magnitud de la incapacidad de una planta de crecer y sobrevivir sin micorrizas aún incrementando la fertilidad del suelo, y debe determinarse midiendo los efectos en un rango de fertilidad del suelo (especialmente de fósforo disponible) sobre el crecimiento de la planta sin micorrizas. Esta distinción hace que la respuesta y la dependencia micorrízica sean atributos separables de la simbiosis MA (Janos, 2007).

Las estructuras de propagación de HMA (esporas, micelio, raíces, fragmentos de raíz, u otro material orgánico colonizado por el hongo) presentes en una unidad de vegetación o localidad, constituyen el inóculo nativo de esa localidad (Brundrett & Abbott, 1995), y su manejo, reproducción y uso en tecnologías apropiadas de inoculación micorrízica de plantas nativas, son estrategias utilizadas exitosamente en la restauración y rehabilitación de áreas perturbadas de diferentes regiones áridas y semiáridas del mundo, y en muchos casos son un pre-requisito para asegurar el éxito del trasplante y la sobrevivencia de las plántulas en campo (Herrera *et al.* 1993; Palenzuela *et al.* 2002; Caravaca *et al.* 2003b; Allen *et al.* 2005; Barea *et al.* 2011).

Diversos factores ambientales tales como; la humedad, temperatura, presencia de especies hospederas, proporciones de arena, fluctuaciones de pH (Muthukumar & Udayan, 2000), cambios en la concentración de fósforo y de

materia orgánica en el suelo (Allsopp & Stock, 1994); pueden afectar la distribución del inóculo nativo de HMA e influenciar el número de asociaciones MA formadas, alterando de esta manera la capacidad infectiva de los suelos (Tommerup, 1992), además de imponer una fuerte presión selectiva sobre las poblaciones de HMA (Helgason & Fitter, 2009). Así la elección de aislados fúngicos adaptados al suelo donde estos serán introducidos, es un aspecto clave para el éxito de programas de inoculación micorrízica (Herrera-Peraza *et al.* 2010).

Aunque resulta esencial entender cómo los HMA interactúan con árboles nativos capaces de desarrollarse en zonas profundamente alteradas por actividades antrópicas, cuyas características garanticen su sobrevivencia bajo condiciones ambientales adversas tales como la sequía, altas temperaturas, compactación, salinidad y déficit o exceso de nutrientes en los suelos (Meli, 2003), en Venezuela no existen reportes regionales que involucren el efecto de comunidades nativas o autóctonas de HMA, sobre el crecimiento y la respuesta a la sequía de plantas nativas con uso potencial en estrategias de rehabilitación y restauración de áreas afectadas por la explotación minera. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares sobre el crecimiento, la resistencia a la sequía y sobrevivencia de la leguminosa arbórea *Piscidia carthagenensis*, utilizando HMA provenientes de un mosaico sucesional de matorral xerófito y de un HMA foráneo.

## 2. Hipótesis

En este trabajo se plantean las siguientes hipótesis:

**2.1.** El uso de inoculos nativos mixtos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) produce los mayores incrementos en el crecimiento, la sobrevivencia y la respuesta a la sequía de árboles nativos promisorios para la restauración de bosques secos, en comparación con inóculos foráneos. Si este fuese el caso, se espera encontrar que atributos morfológicos y fisiológicos de la leguminosa arbórea *Piscidia carthagenensis*, como altura, diámetro del tallo, biomasa, tasa relativa de crecimiento, intercambio gaseoso y relaciones hídricas, se vean favorecidos en mayor magnitud al inocularla con HMA provenientes del mosaico sucesional de matorral xerófito en el cual crece naturalmente éste árbol, que al inocularla con el inóculo foráneo *Acaulospora lacunosa*, y que los beneficios de dichos inóculos se mantengan bajo condiciones de sequía.

**2.2.** Dado que los cambios en la textura, pH, materia orgánica y nutrientes del suelo imponen una fuerte presión selectiva sobre las poblaciones de HMA y sobre la respuesta de las plantas a la simbiosis micorrízica, y que la elección de aislados fúngicos adaptados al suelo donde estos serán introducidos es un aspecto clave para el éxito de programas de inoculación micorrízica, se espera que la eficiencia simbiótica de los diferentes inóculos nativos de HMA (provenientes del matorral xerófito, de un arbustal de veinte años y de pastizal de dos años) sea mayor al cultivar e inocular las plantas en el tipo de suelo del cual proviene cada inóculo.

**2.3.** Considerando que la reintroducción de un inóculo nativo diverso en localidades perturbadas es uno de los principales objetivos en proyectos de restauración con propósitos de conservación, y que un inóculo de HMA con una alta riqueza de especies favorece una mayor diversidad de respuestas potenciales sobre una planta hospedera determinada, se espera que debido a su mayor riqueza de especies, el inóculo proveniente del matorral xerófito sea más eficiente a largo plazo que los inóculos provenientes de las localidades sucesionales en mejorar los atributos morfológicos, fisiológicos y la sobrevivencia de árboles de *P. carthagenensis*, durante tres periodos naturales consecutivos de lluvia, sequía y recuperación de la sequía en una localidad fuertemente perturbada por la minería en la Península de Macanao

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares provenientes de una localidad no perturbada (matorral xerófito), de localidades sucesionales de distintos tiempos de abandono después de la extracción de arena, y de un inóculo micorrízico foráneo (*Acaulospora lacunosa*) sobre el crecimiento, la resistencia a la sequía y sobrevivencia de la leguminosa arbórea *Piscidia carthagenensis* en condiciones de invernadero y de campo.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Elaborar y caracterizar los inóculos de hongos micorrízicos arbusculares nativos, utilizando suelo proveniente de tres localidades de un mosaico sucesional (Matorral no perturbado, localidad de 20 años y localidad de dos años después de la explotación arenera).

Evaluar el efecto de los suelos e inóculos provenientes del mosaico sucesional de matorral xerófito, y de *A. lacunosa*, sobre el crecimiento y la dinámica de la colonización micorrízica de plantas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de invernadero.

Evaluar el efecto del déficit hídrico sobre las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso de plantas de *P. carthagenensis* inoculadas con los inóculos micorrízicos nativos y con el inóculo foráneo, en un suelo perturbado, bajo condiciones de invernadero.

Evaluar el crecimiento, supervivencia, relaciones hídricas e intercambio gaseoso de plantas de *P. carthagenensis* previamente cultivadas con diferentes combinaciones suelo-inóculo provenientes del mosaico sucesional de matorral xerófito y posteriormente plantadas en un área perturbada por la explotación arenosa.

#### 4. Descripción del área de estudio.

La Península de Macanao es un núcleo montañoso rodeado de planos costeros que tiene una extensión de 331 Km<sup>2</sup>, se encuentra al sur de la isla de Margarita (10°56' - 11°06' N; 64°10' - 64°25' O) y se une a ella a través del istmo de La Restinga. El núcleo montañoso central de Macanao, tiene una orientación este-oeste respecto a la isla, alcanza la máxima altura en el Cerro Macanao (750 m) y alberga una gran extensión de bosques asociados a cursos de agua intermitentes, los cuales son el hábitat de muchas especies animales, algunas de las cuales se encuentran en la categoría de riesgo de extinción “en peligro”, como es el caso de la cotorra cabeciamarilla (*Amazona barbadensis*), o “en peligro crítico” como en el caso del venado margariteño (*Odocoileus margaritae*), principalmente por la destrucción de estos bosques por la actividad minera (Rodríguez & Rojas-Suarez, 2008).

La precipitación promedio anual varía de 326 a 522 mm con distribución estacional a lo largo del año. Hay un máximo de precipitación en agosto y otro secundario hacia fines del año. La época de sequía se extiende de enero a junio. También existe una marcada variación interanual en la precipitación, con años extremadamente secos (precipitación media 214 mm) y años con alta pluviosidad (precipitación media 1164 mm) (Sanz, 2001). La temperatura para las zonas bajas es prácticamente constante a lo largo del año con un promedio anual de 27,4 °C, según registros de los últimos 50 años de la estación meteorológica San Francisco de Macanao (11° 01' 30" N, 64° 17' 26" O, altitud

88 m), con una media máxima de 28,3 °C en el mes de mayo y la media mínima de 26,1 °C registrada en el mes de enero (Sanz, 2004).

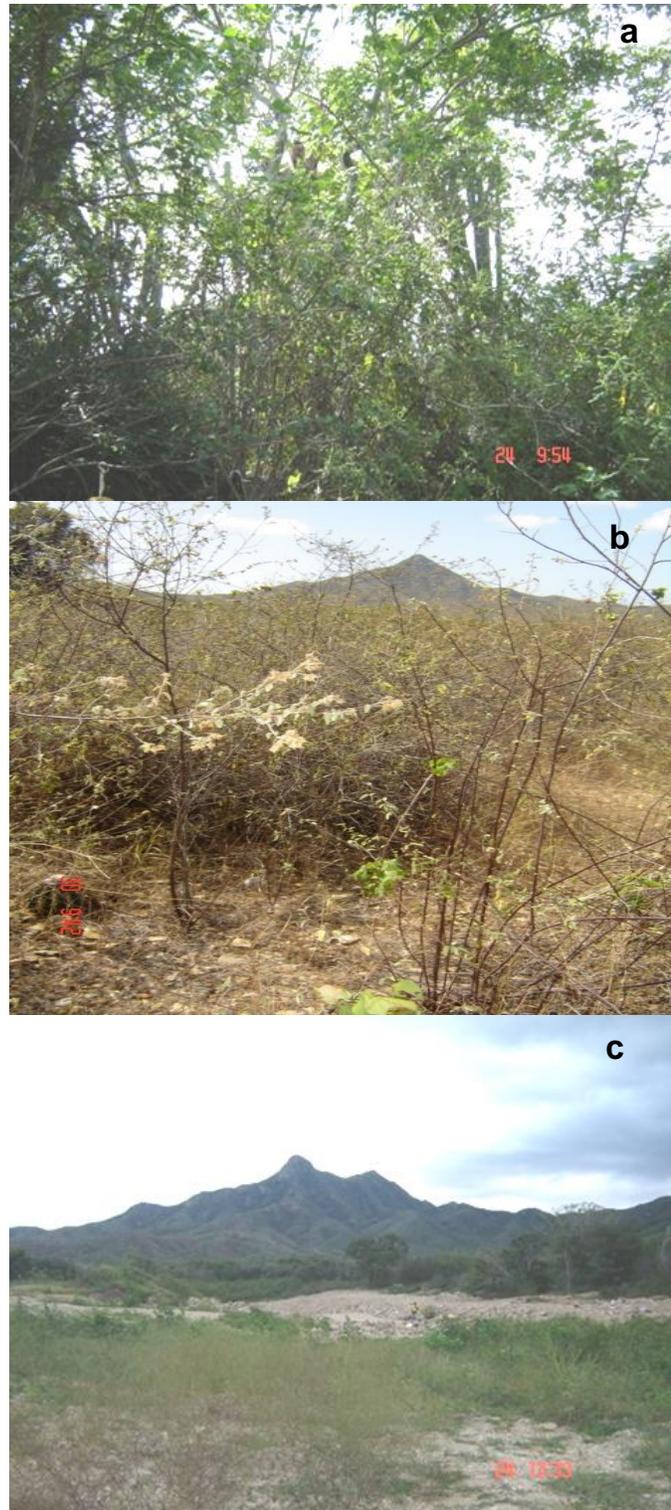
La arenera La Chica ubicada en la Península de Macanao tiene una extensión de 30 ha aproximadamente y está ubicada en las inmediaciones de la Quebrada La Chica (11°01'19"-11°04'09" N; 64°16'36"-64°15'08" O). Después de la extracción de arena y posterior abandono de las localidades afectadas por la explotación, el proceso de recuperación de la vegetación es muy lento, debido a la eliminación del banco de propágulos del suelo y al clima árido y semiárido de Macanao (González, 2007). El mosaico sucesional formado fue descrito por Fajardo, 2007, y comprende localidades entre  $\leq 1$  y  $\geq 20$  años de antigüedad, que pueden variar desde herbazales y pastizales ralos hasta comunidades leñosas, cuya complejidad florística y estructural está limitada principalmente por la distancia de la fuente de semillas y por el largo periodo de sequía, producido por la alta variación interanual de la precipitación en la región.

Los suelos y e inóculos de HMA utilizados en este estudio provienen de un Matorral xerófito poco perturbado que corresponde al ecosistema presente antes de la extracción de arena (ecosistema de referencia), y de dos localidades sucesionales del mosaico formado después de dicha perturbación: sucesión tardía (parcela sucesional de 20 años) y sucesión temprana (parcela sucesional de dos años, Figura 1). Las especies con mayor índice de valor de importancia ( $14 < IVI < 45$ ) en cada localidad de estudio se indican a continuación (Fajardo, 2007):

Matorral Xerófito: Comunidad vegetal madura, dominada por las especies *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae), *Lonchocarpus punctatus*, *Lonchocarpus* sp. (Fabaceae), *Beureria cumanensis* (Boraginaceae), *Subpilocereus repandus*, *Acanthocereus tetragonus*, *Stenocereus griceus* (Cactaceae) y *Bromelia humilis* (Bromeliaceae). Los matorrales o arbustales espinosos, conformados por cactáceas, arbustos y árboles bajos (usualmente < 5 m de alto), la mayoría provistos de espinas (Huber & Alarcón, 1988), predominan en las zonas bajas adyacentes a los bosques deciduos, y son las formaciones vegetales con la mayor extensión afectada por la minería en Macanao. Por esta razón fue considerado en este trabajo como ecosistema de referencia.

Parcela sucesional de 20 años: Comunidad sucesional tardía, con una fisionomía correspondiente a arbustal, dominada por las especies *Melochia tomentosa* (IVI=80) (Sterculiaceae), *Abutilon umbellatum*, *Cienfuegosia heterophylla*, *Bastardia viscosa* y *Gossypium hirsutum* (Malvaceae), *Canavalia brasiliensis* (Fabaceae), *Cassia emarginata* y *Caesalpinia coriaria* (Caesalpinaceae), *Opuntia wentiana* y *Melocactus curvispinus* (Cactaceae).

Parcela sucesional de dos años: Comunidad sucesional temprana con una fisionomía correspondiente a pastizal, dominada por plantas herbáceas como *Rhynchelytrum repens* (Poaceae) y *Cenchrus ciliaris* (Poaceae) en menor abundancia se encuentran *Canavalia brasiliensis* (Fabaceae) y *Heliotropium angiospermum* (Boraginaceae).



**Figura 1.** Localidades del mosaico sucesional Matorral-arbustal-pastizal. a) Matorral xerófito, b) Arbustal de veinte años. c) Pastizal de dos años.

## 5. Material Vegetal

*Piscidia* es un género de leguminosas ampliamente distribuido en el Neotrópico, principalmente en bosques secos (Rudd, 1969). Como su nombre lo indica, es uno de los géneros de plantas conocidos como veneno para peces o “barbasco” utilizados ancestralmente para la pesca. Todas las especies de *Piscidia* son leñosas e inermes, pueden ser plantas bajas o desarrollarse hasta los 20 m de altura, su corteza es áspera y grisácea, sus hojas son alternas e imparipinnadas, y sus frutos alados e indehiscentes (Rudd, 1969).

Algunas especies del género *Piscidia* son consideradas plantas multipropósito en América Central y América del sur. En la Península de Yucatán, México *P. piscipula* es apreciada en la apicultura por su largo periodo de floración (4 meses), es forrajera, sus hojas se usan como sedante y para trastornos respiratorios, su madera es de buena calidad y es reproducida en viveros para su posterior uso en programas de reforestación con fines de restauración ecológica y urbana (Flora representativa de Yucatán, 2007). Además es considerada una de las especies promisorias para su uso en barbechos mejorados debido a su mayor capacidad de sobrevivencia, mayor capacidad de producir leña y por favorecer el crecimiento del maíz (Ayala-Sánchez *et al.* 2007). En el Ecuador (provincia de Loja), *P. carthagenensis* se encuentra entre las especies más apreciadas por su madera para la construcción (Aguirre & Lars, 2005).

*Piscidia carthagenensis* Jacq. es una especie de amplia distribución que se encuentra desde el Sur de Florida, pasando por el desierto de Sonora en

México, Centro América, el Caribe (Cuba, Puerto Rico, Islas Vírgenes), hasta Sur América (Venezuela, Colombia, Perú y Ecuador) (<http://www.tropicos.org>, 2010). En Venezuela, se ha reportado en los Estados Anzoátegui, Aragua, Bolívar, Cojedes, Delta Amacuro, Distrito Capital, Falcón, Guárico, Miranda, Monagas, Nueva Esparta y Portuguesa (Hokche *et al.* 2008).

Desde tiempos de Linneo, esta especie ha sido incorrectamente determinada en Venezuela como *Piscidia piscipula* (Rudd, 1969). Tal es el caso de la referencia de la “Flora de la Isla de Margarita” (Hoyos, 1985), cuyas muestras provenientes de la Península de Macanao y depositadas en el Herbario Nacional de Venezuela (VEN), fueron recientemente revisadas y determinadas como *P. carthagenensis*. Las evidencias taxonómicas utilizadas para determinar dichas muestras fueron: La presencia de flores de 13-18 mm de largo, generalmente más de 15 mm de largo, frutos con estípites de 6-20 mm de largo y foliolos glabros o subglabros en el haz (S. Nozawa, curador VEN, comunicación personal).

En la Península de Macanao, la mayor abundancia relativa de *P. carthagenensis* se encuentra restringida a comunidades vegetales de galería afectadas por la explotación de arena (González, 2007), y su distribución abarca desde bosques deciduos y matorrales espinosos, hasta localidades intermedias y tardías de la sucesión (6, 10 y 20 años de abandono después de la extracción de arena), en las cuales su IVI < 5 es relativamente bajo (Fajardo, 2007).

Las semillas utilizadas en este estudio fueron recolectadas directamente de ejemplares adultos de *P. carthagenensis*, ubicados en la arenera La Chica.

En todos los ensayos realizados, las semillas fueron embebidas en agua corriente durante tres días y puestas a germinar en arena estéril durante 15-20 días antes de utilizarlas en cada experimento.

## 6. Métodos Generales

### 6.1. *Determinaciones morfométricas y de biomasa*

**6.1.1. *Altura y diámetro:*** Se registró la altura y el diámetro basal utilizando una cinta métrica y un vernier, respectivamente en plantas de invernadero. En el experimento de campo se utilizó una vara calibrada para medir la altura y una cinta métrica para medir los diámetros en árboles.

**6.1.2. *Área foliar (AF):*** Se determinó gravimétricamente con réplicas de papel milimetrado de todas las hojas de cada réplica.

**6.1.3. *Área foliar específica (AFE):*** Se calculó mediante la relación entre el área foliar de discos de hoja de área conocida y su peso seco, según la siguiente ecuación:

$$AFE = \text{área foliar disco} / \text{peso seco disco (cm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)}$$

**6.1.4. *Tasa relativa de crecimiento (TRC):*** La tasa de producción de materia seca por unidad de peso seco inicial de la planta, se estimó para cada intervalo de tiempo  $t_2-t_1$  transcurrido entre dos cosechas sucesivas a través de la expresión matemática de Hunt (1982):

$$TRC = (\ln PS_2 - \ln PS_1) / (t_2 - t_1)$$

Donde  $PS_1$  es el peso seco acumulado por la planta en el primer muestreo,  $PS_2$  es el peso seco acumulado en el segundo muestreo y  $t$  el tiempo en días.

#### **6.1.5. Tasa de asimilación neta (TAN) y tasa de producción de área**

**foliar (TAF):** La tasa de producción de materia seca por unidad de área foliar (TAN), se estimó despejándola de la ecuación de TRC (Evans, 1972):

$$TRC = TAN \times TAF$$

donde TAF es el área foliar que la planta desarrolla por unidad de biomasa total de la planta, y se determina como:

$$TAF = RBF \times AFE$$

donde RBF es la relación: biomasa foliar / biomasa total de la planta, y AFE es el área foliar específica (IV.1.3).

**6.1.6. Biomasa:** Se determinó la biomasa seca de las plantas, separándolas en tallos, hojas, y raíces y en algunos casos la fracción de raíces se separó en raíz principal (pivotante) y raíces finas. Estas fracciones se llevaron a peso constante en una estufa a 60 °C, y se calculó la relación vástago raíz (V/R) en función del peso seco. Los nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno fueron separados de la raíz de todos los tratamientos y llevados a peso constante en estufa a 60 °C. La biomasa de nódulos fue expresada en función del peso seco total de la planta (g/g).

## **6.2. Cuantificación de la colonización por hongos micorrízicos arbusculares en raíces**

La colonización micorrízica se determinó mediante el clareado con KOH al 10%, acidificación con HCl al 10% y tinción con azul de tripán (Phillips & Hayman, 1970). Las raíces teñidas se evaluaron al microscopio óptico para cuantificar la presencia o ausencia de estructuras fúngicas por el método de Mc. Gonigle *et al.* (1990). Para ello se realizaron observaciones sistemáticas de cada muestra al microscopio óptico (200X) hasta completar 100 campos de observación por muestra.

La presencia o ausencia de cada estructura micorrízica (arbúsculos, vesículas o hifas) fue evaluada en cada campo de manera independiente. Los resultados se expresaron en porcentaje, a través de las siguientes fórmulas:

$$\%MA = [(N^{\circ} \text{ de campos infectados} - \text{NNF}) / (N^{\circ} \text{ de campos observados})] * 100$$

donde %MA es el porcentaje de colonización por micorrizas arbusculares y NNF es el número de campos no infectados. El porcentaje de colonización por arbúsculos (%A) se calculó como:

$$\%A = (N^{\circ} \text{ de campos con arbúsculos}) / (N^{\circ} \text{ de campos observados}) * 100$$

Para determinar el porcentaje de colonización por vesículas enrollados e hifas solas, se utilizó la misma relación de colonización que para los arbúsculos.

## **6.3. Índice de Respuesta Micorrízica (IRM)**

El índice de respuesta micorrízica se define como el grado en el cual una planta se beneficia de la inoculación con HMA comparado a cuando esta

asociación está ausente (en un tratamiento control en suelo estéril), y se determina como:

$$\text{IRM} = [\text{PS (M)} - \text{PS (NM)} / \text{PS (M)}] * 100$$

donde PS (M) es el peso seco de la planta micorrizada y PS (NM) es el peso seco de la planta no micorrizada (Plenchette *et al.* 1983). Un valor de de  $\text{IRM} > 0$ , indica que la planta se beneficia de la simbiosis, mientras que un valor de  $\text{IRM} < 0$  indica que la inoculación reduce el crecimiento de la planta. De manera similar, si una planta posee un  $\text{IRM} = 100\%$  indica que la planta es completamente dependiente de los HMA.

#### **6.4. Relaciones Hídricas**

**6.4.1. Contenido de agua en el tallo (CAT):** Se determinó únicamente en plantas irrigadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{CAT} = \text{PF tallo} - \text{PS tallo} / \text{PF tallo}$$

donde PF y PS son el peso fresco y el peso seco respectivamente (Borchert, 1994).

**6.4.2. Potencial hídrico ( $\Psi$ ):** Se determinó con una cámara de presión PMS 200 (PMS Instruments Inc., Corvallis, OR).

**6.4.3. Potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) y potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ):** El  $\Psi_s$  se midió en fragmentos de hoja congelados y descongelados, con un psicrómetro de punto de rocío HR-33T (Wescor Inc. USA), en la misma hoja a la que se les midió previamente el potencial hídrico. El potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) se calculó como:

$$\Psi_t = \Psi - \Psi_s$$

#### 6.4.4. **Contenido relativo de agua foliar (CRA) y contenido de agua**

**foliar (CAF):** Para determinar el CRA tomaron discos de hojas de área conocida a los que se les determinó el peso fresco (PF) y el peso turgente (PT) después de ponerlos en agua durante 3-4 horas a 4 °C. Luego se colocaron todos los discos en la estufa a 60 °C durante 48 horas para obtener el peso seco (PS). El CRA se calculó a través de la relación:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS})$$

El contenido de agua foliar (CAF) se determinó como:

$$\text{CAF} = (\text{PF} - \text{PS}) / \text{PF}$$

**6.4.5. Potencial osmótico a máxima turgencia ( $\Psi_s^{100}$ ):** se determinó de acuerdo a la expresión:

$$\Psi_s^{100} = \Psi_s \times \text{CRA} / 100$$

**6.4.6. Ajuste osmótico ( $\Delta\Psi^{100}$ ):** Se calculó como la diferencia del  $\Psi_s^{100}$  en riego y en sequía de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta\Psi^{100} = \Psi_s^{100}\text{riego} - \Psi_s^{100}\text{sequía}$$

**6.4.7. Conductancia Hidráulica Radical ( $K_r$ ):** Cada planta fue colocada en agua corriente durante 20 minutos para eliminar el exceso de suelo. Luego la planta se colocó en una bolsa plástica con las raíces sumergidas en agua corriente dentro de la cámara de presión de

Scholander y se cortó el tallo, dejando expuesta una porción de 6 cm por fuera de la tapa de la cámara, donde se fijó un tubo de plástico para colectar el líquido exudado. El flujo se estabilizó durante 10 minutos a 0,5 MPa, antes de comenzar a recolectar el exudado del tallo en tubos eppendorf previamente pesados. El volumen del exudado fue determinado gravimétricamente cada 5 minutos a dos valores de presión (0.5 y 0.8 MPa) y expresado como flujo en  $\text{mg s}^{-1}$  (Huxman *et al.* 1999). La  $K_r$  fue estimada como la pendiente de la relación lineal generada entre el flujo y las presiones aplicadas (Fiscus, 1983), y estandarizada por el peso seco de la raíz fina ( $K_{rRF}$ ) y por el área foliar ( $K_{rAF}$ ).

### **6.5. Intercambio Gaseoso**

Las tasas instantáneas de fotosíntesis (A), transpiración (E), conductancia estomática ( $g_s$ ) y concentración intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), fueron medidas en la segunda hoja completamente expandida, utilizando un analizador infrarrojo de gases portátil marca Analytical Development Co. (ADC) modelo LCA-4, conectado a su respectiva cámara de asimilación con sensores de humedad, temperatura y densidad de flujo fotónico (DFF). Con los valores obtenidos de las medidas instantáneas de A y E, se calculó la eficiencia de uso de agua ( $\text{EUA} = A/E$ ).

### **6.6. Análisis bioquímicos en hojas**

**6.6.1. Contenido de clorofilas:** Las clorofilas se determinaron por extracción de los pigmentos en muestras congeladas de hoja con un

área de 2,85 cm<sup>2</sup>. Después de descongelar la muestra, los pigmentos se extrajeron en un mL de acetona al 80 % y 0,1 mg de carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) a 4 °C. El volumen del sobrenadante se llevó a 3 mL y el contenido de clorofilas totales fue determinado en alícuotas de 1 mL por absorbancia a 663 nm y 645 nm (Bruisma, 1963).

**6.6.2. Contenido de proteínas solubles totales (PST):** Se determinó siguiendo el protocolo propuesto por Bradford (1976) a partir de extractos obtenidos por maceración en frío (0-4 °C) de discos de hojas en un buffer de extracción (100 mM Bicina-NAOH pH 8; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM mercaptoetanol; 40mM fluoruro de fenilmetilsulfonil y PVP), El extracto se centrifugó en tubos eppendorf a 10000 rpm durante 3 min. El contenido de PST se determinó mezclando 100 µL del sobrenadante con 400 µL de agua y 500 µL del reactivo Bradford, y la absorbancia fue medida a 595 nm luego de 5 min (Bradford, 1976). Se realizó una curva de calibración usando albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones (0 - 40 µg). Las concentraciones de PST se expresaron en g m<sup>-2</sup>.

### **6.7. Elaboración de inóculos mixtos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)**

En macetas con suelo fresco de cada localidad, se cultivaron plantas de *Vigna luteola*, leguminosa herbácea altamente micotrófica (Hernández *et al.* 2000), para obtener cultivos mixtos de HMA (“potes trampa”) (Bever, 1994).

Luego de seis meses de cultivo se eliminó la parte aérea de las plantas y se conservaron las raíces como parte del inóculo. La mezcla de suelo, raíces infectadas y esporas de HMA, obtenida en cada tipo de suelo fue utilizada como inóculos de HMA en todos los experimentos.

### **6.8. Aislamiento y conteo de esporas de HMA**

Las esporas se aislaron a partir de 5 g de cada inóculo por triplicado, según el método de tamizado húmedo, decantado y centrifugación en sacarosa (Sieverding, 1991). Se contaron únicamente las esporas vivas (enteras y con contenido lipídico) con una lupa estereoscópica (40X). Los resultados se expresaron en N<sup>o</sup> de esporas 100 g<sup>-1</sup> de suelo seco.

### **6.9. Riqueza de HMA**

Se realizó una lista de las especies de HMA, mediante un estudio de la morfología de las esporas presentes en cada inóculo, en el laboratorio de suelos del Centro de Ecología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, a cargo de la Dra. Gisela Cuenca. Los caracteres diagnósticos utilizados para separar los diferentes tipos morfológicos de esporas (morfortipos) fueron principalmente el tamaño, el tipo y número de paredes, el color en agua y en el medio de montaje (polivinil-alcohol), presencia o ausencia de reacción al Melzer (yodo-yoduro de potasio-hidrato cloral), por tinción marrón-rojiza ante la presencia de dextrinas, y otros criterios como el tipo de ornamentación, hifas o cicatrices en caso de estar presentes. Para la determinación de los morfortipos se utilizaron las listas y descripciones originales de especies de Glomeromycota

de Schenck & Pérez (1990) y otras descripciones en continua actualización disponibles en línea:

[http://www.lrz-muenchen.de/~shuessler/amphylo/amphylo\\_species.html](http://www.lrz-muenchen.de/~shuessler/amphylo/amphylo_species.html)

[http:// www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/](http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/)

### **6.10. Número más probable de propágulos infectivos (NMP)**

De acuerdo al método de Porter (1979) modificado por Sieverding (1991), se realizaron diluciones seriadas de suelo no estéril de cada localidad, con el mismo suelo previamente esterilizado, y se sembraron plántulas de la especie micotrófica *Vigna luteola* (Hernández *et al.*, 2000). A las seis semanas se cosecharon la totalidad de las plantas y se tomó en cuenta como colonización micorrízica positiva la presencia de al menos un punto de entrada en la corteza radical. El cálculo del potencial micorrízico o número más probable de propágulos (NMP) se realizó según las fórmulas señaladas por Sieverding (1991).

### **6.11. Análisis de suelos**

La materia orgánica se determinó por el método de Walkley & Black (Jackson, 1976) y el nitrógeno total por el método micro-Kjeldahl. El fósforo disponible fue determinado por el método de extracción en  $\text{FNH}_4$  y HCl (Bray & Kurtz, 1945) y el fósforo total se realizó por el método de Olsen (1954), con ambos extractos medidos de acuerdo al método de molibdato-ácido ascórbico (Murphy & Riley, 1962). La textura se determinó por el método de Bouyoucos (1936), y el pH en agua por el método potenciométrico (Jackson, 1976).

## 7. CAPÍTULO I

**Respuesta diferencial de crecimiento y dinámica de colonización micorrízica en *Piscidia carthagenensis* Jacq. ante diferentes combinaciones suelo-inóculo provenientes de un mosaico sucesional de matorral xerófito.**

### **7.1. Introducción**

La selección de inóculos de HMA adaptados al clima local y a las condiciones del suelo es considerado un aspecto fundamental del éxito de programas de restauración (Dodd & Thomson, 1994). Debido a que los HMA pueden variar su efecto sobre las plantas hospederas en un gradiente de mutualismo-parasitismo dependiendo del balance costo-beneficio del mantenimiento de la simbiosis, es crítico investigar los beneficios potenciales de la reintroducción de HMA para la mejora de la restauración o rehabilitación de la vegetación en áreas degradadas (Zhang *et al.* 2011).

Las leguminosas son componentes importantes de la vegetación leñosa de ecosistemas áridos y semiáridos, con una gran versatilidad en la formación de simbiosis (Sprent & James, 2007), y con una alta dependencia a las micorrizas para prosperar bajo condiciones ambientales estresantes (Herrera *et al.* 1993). Los propágulos de HMA pueden ser escasos en ambientes perturbados, y la inoculación de plántulas de leguminosas silvestres con HMA seleccionados antes de su establecimiento en áreas degradadas mejora significativamente el crecimiento de la planta y la calidad del suelo (Rillig & Mummey, 2006).

El éxito de un inóculo determinado de HMA depende no sólo de la combinación planta-hongo, sino también de las condiciones ambientales, entre las cuales el suelo impone una fuerte presión de selección sobre la respuesta de la planta a la simbiosis (Helgason & Fitter, 2009), por lo que es necesario

evaluar previamente la efectividad de la inoculación en el o los sustratos en los cuales la planta inoculada será introducida (Herrera-Peraza *et al.* 2010).

Los HMA tienen una baja especificidad de hospedero, lo que implica que un HMA en particular puede asociarse con un gran número de especies hospederas, pero a pesar de ello, estos hongos son conocidos por mostrar una amplia variabilidad en su capacidad de incorporar fósforo y otros nutrientes, y de estimular el crecimiento de sus plantas hospederas (Klironomos 2003; Helgason *et al.* 2002; van der Heijden, 2004). En la actualidad es reconocida la importancia del uso de inóculos nativos mixtos (que contengan tres o más especies de HMA) en ensayos de restauración de áreas degradadas, tanto por su mayor adaptación a las condiciones imperantes en el ecosistema, como por la mayor diversidad de respuestas potenciales que varias especies de HMA pueden ejercer sobre una planta hospedera (Barea *et al.* 2011; Allen *et al.* 2005).

En este sentido, en este capítulo se propone que el manejo de las comunidades locales de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) conjuntamente con los suelos de los cuales estos hongos provienen, constituye una estrategia favorable para la selección de combinaciones más adecuadas suelo-inóculo que permitan aumentar el crecimiento en invernadero de plantas de *P. carthagenensis* con fines de restauración de ecosistemas degradados. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los suelos e inóculos provenientes de un mosaico sucesional de matorral xerófito, y del inóculo

foráneo *A. lacunosa*, sobre el crecimiento y la dinámica de la colonización micorrízica de *P. carthagenensis* bajo condiciones de invernadero.

## **7.2. Materiales y Métodos**

### **7.2.1. Descripción de Suelos del Mosaico Sucesional**

A partir de muestras de suelo superficial (hasta 20 cm de profundidad) de los suelos provenientes del matorral y de las parcelas sucesionales de veinte y de dos años, se determinó el fósforo total, nitrógeno total, el pH en agua, el porcentaje de materia orgánica y las proporciones de arena, limo y arcilla (apartado 6.11).

### **7.2.2. Descripción de inóculos HMA del mosaico sucesional**

Se recolectó suelo superficial (hasta 20 centímetros de profundidad) de las dos localidades del mosaico sucesional (de dos y veinte años) y del matorral no perturbado, en época de sequía (Septiembre de 2008). Se elaboraron 10 potes trampa de cada localidad (con dos kg de suelo fresco y *Vigna luteola* como planta hospedera) para obtener inóculos mixtos de HMA (apartado 6.7).

Una vez transcurridos los seis meses de cultivo, se eliminaron los vástagos de la planta hospedera y se homogeneizaron los contenidos de los 10 potes de suelo de cada localidad. Para realizar el conteo de esporas y evaluar la riqueza de HMA (apartados 6.8, 6.9 respectivamente), se tomaron tres muestras de 50 g de cada de inóculo. A partir de otra muestra de cada inóculo se determinó el número más probable de propágulos infectivos (NMP, apartado 6.10). El resto del inóculo fue secado al aire y conservado en bolsas plásticas cerradas a temperatura ambiente (24° C) hasta el mes de marzo de 2009, cuando se iniciaron los experimentos de inoculación en vivero y en campo.

### **7.2.3. Origen y selección del Inóculo Foráneo *Acaulospora lacunosa***

El inóculo foráneo de *Acaulospora lacunosa* utilizado en este estudio forma parte de un cepario de inoculantes de HMA utilizado con fines comerciales y científicos producido en el Laboratorio de Ecología de Suelos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). El número de esporas de este inóculo fue de 6136 esporas 100 g<sup>-1</sup> de suelo seco y no se encontraron morfotipos de esta especie en los inóculos nativos utilizados.

La selección de *A. lacunosa* como inóculo foráneo para ser utilizado en los ensayos de invernadero y de campo, se basó en los resultados de un ensayo previo en el que se evaluó el efecto de este HMA y de un inóculo de *Glomus manihotis* sobre el crecimiento y la conductancia hidráulica radical de *P. carthagenensis*. Ambos inóculos produjeron un incremento significativo y de igual magnitud en la altura, diámetro del tallo y biomasa total respecto a las plantas no inoculadas (control), pero las plantas inoculadas con *A. lacunosa* exhibieron una conductancia hidráulica radical y un porcentaje de colonización micorrízica significativamente mayores que las inoculadas con *G. manihotis* (datos no mostrados).

### **7.2.4. Ensayo de crecimiento y dinámica de la colonización micorrízica**

Este ensayo fue realizado bajo condiciones de invernadero en el Arboretum del Instituto de Biología Experimental de la UCV, ubicado en Caracas

a 1200 m, con una temperatura promedio de 26 °C y una humedad relativa promedio de 65 %.

El experimento estuvo conformado por un total de 15 tratamientos, establecidos por una combinación completamente aleatorizada de tres tipos de suelos y cinco condiciones de inoculación.

Los suelos, provenientes del mosaico sucesional fueron esterilizados con una dosis de 8 kGy de rayos gamma, e identificados con las siguientes abreviaturas: Matorral xerófito (Mat), parcela sucesional de veinte años de abandono (Va) y parcela sucesional de dos años de abandono (Da).

Las condiciones de inoculación fueron las siguientes: Control estéril sin micorrizas (C), plantas inoculadas con el inóculo concentrado de hongos micorrízicos arbusculares provenientes del Matorral Xerófito (M), con el inóculo de la localidad sucesional de veinte años (V), con el inóculo de la localidad sucesional de dos años (D), y plantas inoculadas con *Acaulospora lacunosa* (L). Los tratamientos derivados del diseño experimental se muestran en la Tabla 1. Las plántulas fueron sembradas en bolsas con 600 g del suelo estéril de la localidad correspondiente. Para la inoculación micorrízica se agregaron 50 g de inóculo a cada planta. Las plantas control no fueron inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. Fueron incluidas 15 réplicas de cada tratamiento para un total de 225 plantas.

**Tabla 1.** Tratamientos derivados del diseño experimental completamente aleatorizado, formado por una combinación factorial de tres tipos de suelo (estériles) y cinco condiciones de inoculación. El primer factor tiene tres niveles (suelos de tres etapas sucesionales contrastantes) y el segundo factor tiene 5 niveles (condiciones de inoculación con hongos micorrízicos arbusculares).

Factor Inóculo	Factor Suelo (Estéril)		
	Matorral (Mat)	Parcela sucesional veinte años (Va)	Parcela sucesional dos años (Da)
Control no inoculado (NI)	Mat-NI	Va-NI	Da-NI
Matorral (M)	Mat-M	Va-M	Da-M
Parcela 20 años (V)	Mat-V	Va-V	Da-V
Parcela 2 años (D)	Mat-D	Va-D	Da-D
Acaulospora lacunosa (L)	Mat-L	Va-L	Da-L

A todas las plantas se les agregó 50 ml de una solución de microorganismos proveniente del suelo de siembra correspondiente para garantizar la presencia de otros microorganismos distintos a las micorrizas arbusculares. Para elaborar la solución de microorganismos, se suspendió 1 Kg del suelo fresco sin esterilizar en un L de agua destilada y se filtró a través de un papel Whatman N° 1. El filtrado se diluyó con agua hasta una concentración final de 5 %.

Se realizaron tres cosechas de 5 réplicas por tratamiento, a los 30, 60 y 112 días después de la siembra. En cada cosecha se determinó la colonización micorrízica en raíces (6.2). En la primera y tercera cosecha se determinaron la

biomasa de hojas, tallo y raíz (6.1.6), el área foliar total por planta (6.1.2) y el área foliar específica (AFE, apartado 6.1.3), para posteriormente calcular la tasa relativa de crecimiento (TRC, apartado 6.1.4), la tasa de asimilación neta (TAN, apartado 6.1.5) y la tasa de producción de área foliar (TAF, apartado 6.1.5). En la última cosecha se determinó además la relación vástago/raíz y la biomasa de nódulos (apartado 6.1.6), la altura y el diámetro basal del tallo (6.1.1) y el índice de respuesta micorrízica (IRM, apartado 6.3).

Los resultados fueron analizados a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías con el programa SPSS versión 10.0. Se utilizó el test de homogeneidad de varianzas de Barlett. En el caso de que las varianzas no fueran homogéneas se realizaron transformaciones logarítmicas y de arcoseno. Se aplicó la prueba a posteriori de comparación de medias de diferencias mínimas significativas (LSD) ( $\alpha= 0,05$ ).

### **7.3. Resultados**

#### **7.3.1. Análisis de suelos del mosaico sucesional**

El análisis químico y físico de los suelos del Matorral, parcela sucesional de veinte años y de la parcela sucesional de dos años se muestra en la Tabla 2. La concentración de fósforo total, fósforo disponible y los porcentajes de nitrógeno y materia orgánica fueron significativamente más altos en el matorral que en la parcela sucesional de veinte años y estas localidades a su vez presentaron valores significativamente mayores a los observados en la parcela sucesional de dos años (Tabla 2). El pH varió entre 6,64 y 7,51 en las tres localidades, con el mayor valor en la parcela de dos años y el porcentaje de limo disminuyó en un 13% en las parcelas sucesionales en comparación con el matorral (Tabla 2).

#### **7.3.2. Descripción de inóculos de HMA del mosaico sucesional**

El número de esporas y el número más probable de propágulos infectivos (NMP) de cada inóculo se muestran en la Tabla 3. El inóculo de la parcela sucesional de dos años exhibió los valores más altos de número de esporas y NMP, seguido en orden decreciente por los inóculos de parcela sucesional de 20 años y del matorral (Tabla 3). La riqueza de especies de HMA de cada inóculo se muestra en la Tabla 4. Se aislaron en total 23 morfotipos de HMA entre los tres inóculos producidos (Tabla 4). El mayor número de morfotipos fue observado en el inóculo proveniente del matorral (19 morfotipos) seguido por el inóculo de la localidad de veinte años con 9 morfotipos, y por el inóculo de la localidad de dos años con 6 morfotipos (Tabla 4).

**Tabla 2.** Características de los suelos del matorral, parcela sucesional de veinte años (arbustal) y de la parcela sucesional de dos años (pastizal). Fósforo (P), Nitrógeno (N), Materia orgánica (MO). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD.

	Matorral	Parcela veinte años	Parcela dos años
P Total (mg Kg <sup>-1</sup> )	446,7 ± 5,4 a	300,1 ± 20,3 b	169,9 ± 2,8 c
P disponible (mg Kg <sup>-1</sup> )	46,7 ± 7,2 a	27,8 ± 4,8 b	7,6 ± 1,4 c
N (%)	0,40 ± 0,04 a	0,16 ± 0,01 b	0,06 ± 0,00 c
pH (agua)	6,64 ± 0,51 b	6,93 ± 0,13 b	7,51 ± 0,04 a
MO (%)	1,58 ± 0,25 a	1,69 ± 0,07 b	1,06 ± 0,08 c
Arena/Limo/Arcilla (%)	60 / 31 / 9	77 / 18 / 5	78 / 18 / 4

**Tabla 3.** Densidad de esporas y número más probable de propágulos infectivos de los inóculos utilizados en los experimentos. Para el número de esporas se muestran los promedios  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD.

Inóculo	Nº de esporas 100 g <sup>-1</sup>	Propágulos infectivos 100 g <sup>-1</sup>
Matorral	961 $\pm$ 116 c	121.5 (57-259)*
Parcela de veinte años	1307.5 $\pm$ 110 b	506.3 (395-622)*
Parcela de dos años	1959.8 $\pm$ 363 a	673.7 (546-749)*

\*El límite de confianza para el NMP de propágulos infectivos es de 95%.

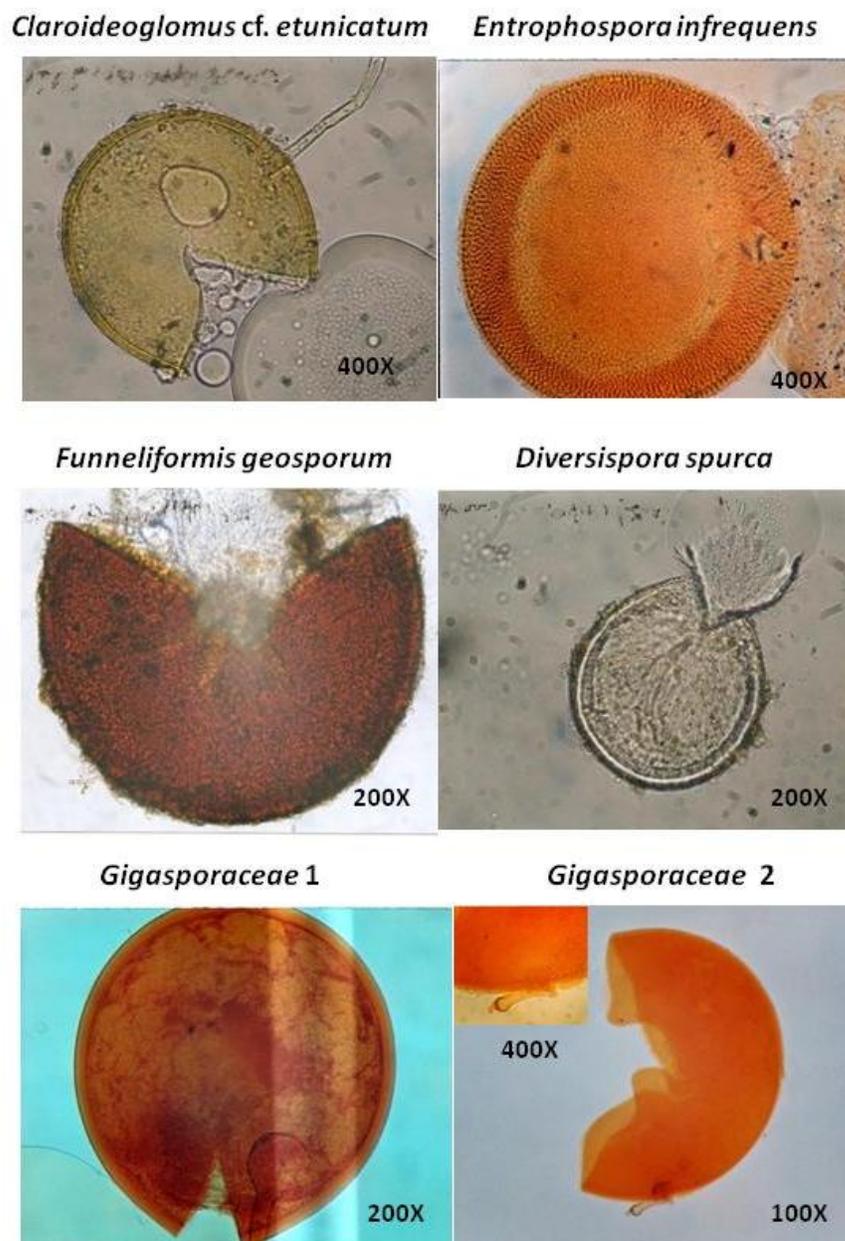
**Tabla 4.** Listado de morfotipos de Glomeromycota presentes en los inóculos producidos con los suelos provenientes de matorral, de la parcela sucesional de 20 años y de la parcela sucesional de dos años. La abundancia está referida al número total de esporas observados en tres aislados de 50 g<sup>-1</sup> de suelo: >50 (alta), 20-50 (media), 5-20 (baja), <5 (rara).

Familia		Matorral	Parcela 20 años	Parcela 2 años	
1	<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglo mus</i> cf. <i>etunicatum</i>	Media	<b>Alta</b>	<b>Alta</b>
2	<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora infrequens</i>	Baja	Media	<b>Alta</b>
3	<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformis geosporum</i>	Ausente	Media	Media
4	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora spurca</i>	Baja	Ausente	Rara
5	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i> cf. <i>leavis</i>	Ausente	Media	Ausente
6	<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>	Ausente	Baja	Ausente
7	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> cf. <i>tortuosum</i>	Baja	Media	Ausente
8	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus aggregatum</i>	Baja	Baja	Ausente
9	<i>Glomeraceae</i>	<i>Sclerocystis sinuosa</i>	Media	Ausente	Ausente
10	<i>Glomeraceae</i>	<i>Sclerocystis</i> sp. 1	Rara	Ausente	Ausente
11	<i>Glomeraceae</i>	<i>Sclerocystis</i> sp. 2	Baja	Ausente	Ausente
12		Amarilla pared delgada	Baja	Ausente	Baja
13		Amarilla pared gruesa	Ausente	Ausente	Rara
14		<i>Glomus</i> sp. 1	Baja	Media	Ausente
15		<i>Glomus</i> sp. 2	Baja	Baja	Ausente
16		<i>Glomus</i> sp. 3	Rara	Ausente	Ausente
17		<i>Glomus</i> sp. 4	Media	Ausente	Ausente
18		Manojito rojo mínimo	Rara	Ausente	Ausente
19		Manojito amarillo	Baja	Ausente	Ausente
20		Manojo espinoso	Rara	Ausente	Ausente
21		Amarilla múltiples paredes	Rara	Ausente	Ausente
22	<i>Gigasporaceae</i>	Amarilla con bulbo	<b>Alta</b>	Ausente	Ausente
23	<i>Gigasporaceae</i>	Amarilla-naranja con bulbo	Media	Ausente	Ausente
<b>Número de morfotipos</b>			<b>19</b>	<b>9</b>	<b>6</b>

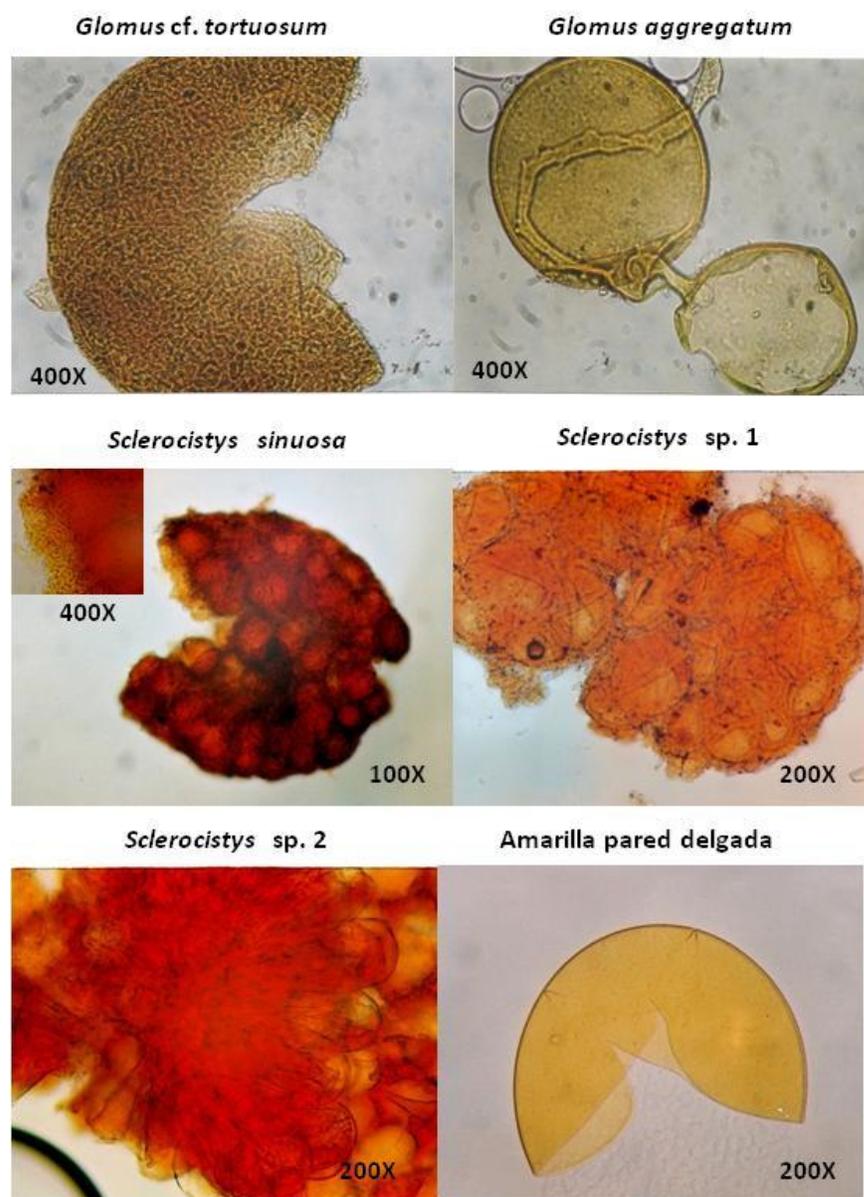
En las Figuras 2, 3 y 4 se observan las diferencias morfológicas entre los distintos tipos de esporas de HMA (morfotipos) señalados en la Tabla 4.

Los morfotipos *Claroideoglopus* cf. *etunicatum*, y *Entrophospora infrequens* fueron observados en los tres inóculos con distinta abundancia (Tabla 4, Figura 2). *Claroideoglopus* cf. *etunicatum* fue el más abundante en los inóculos provenientes de las localidades sucesionales de dos y de veinte años (>50 esporas 100 g<sup>-1</sup> suelo seco), mientras que *Entrophospora infrequens* (Entrophosporaceae) fue más abundante en el inóculo de la parcela de dos años (Tabla 4).

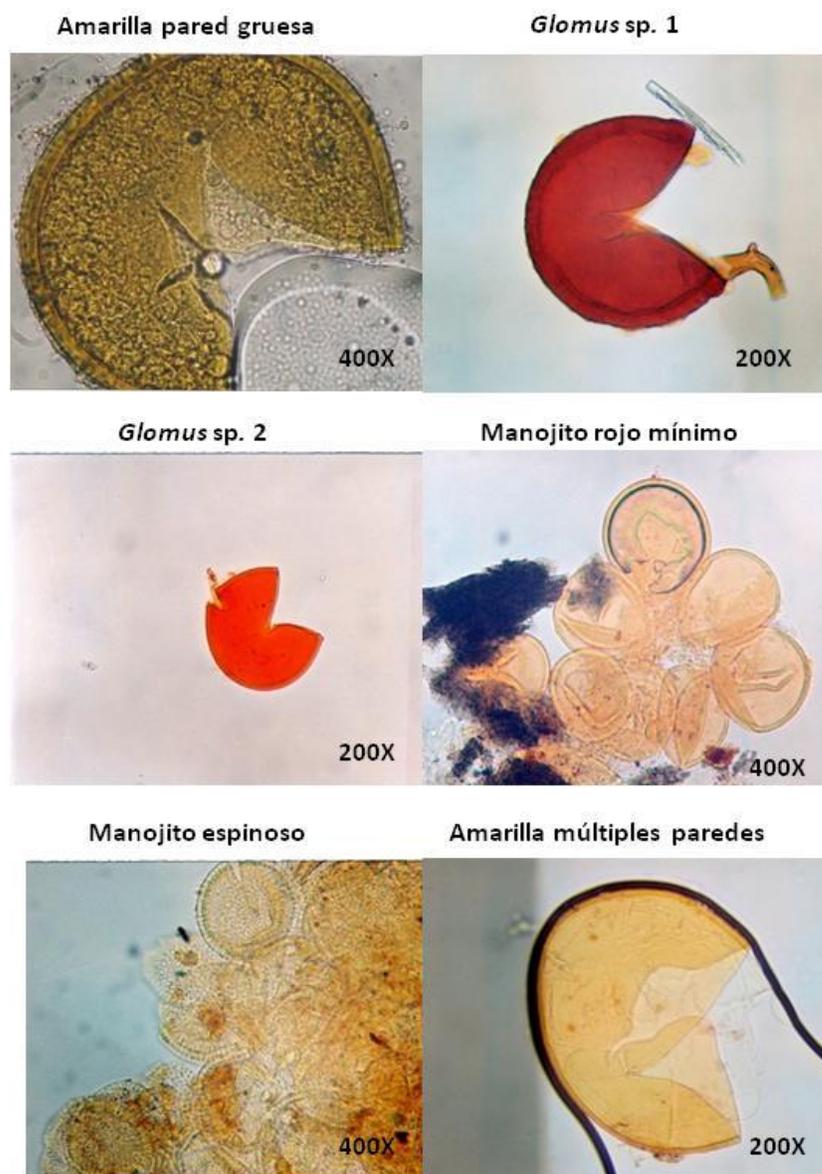
En el inóculo del matorral se observó una alta abundancia de un morfotipo de la familia *Gigasporaceae* (Amarilla con bulbo, Tabla 4, Figura 2), una abundancia media de *Claroideoglopus* cf. *etunicatum*, *Sclerocystis sinuosa*, *Glomus* sp. 4 y de otro morfotipo de *Gigasporaceae* (amarilla-naranja con bulbo, Tabla 4, Figura 2), además de un alto número de morfotipos de abundancia baja (<5 esporas 100 g<sup>-1</sup> suelo seco) o muy baja (5-20 esporas 100 g<sup>-1</sup> suelo seco), en comparación con los inóculos de las parcelas sucesionales de veinte años y de dos años (Tabla 4).



**Figura 2.** Algunos morfotipos de HMA presentes en los inóculos del mosaico sucesional de matorral xerófito no perturbado-localidad sucesional de veinte años-localidad sucesional de dos años. Para el morfotipo Gigasporaceae 2, se muestra un detalle del bulbo suspensor (400X).



**Figura 3.** Algunos morfotipos de HMA presentes en los inóculos del mosaico sucesional de matorral xerófito no perturbado-localidad sucesional de veinte años-localidad sucesional de dos años. Para *Sclerocistys sinuosa* se muestra un detalle del peridio compuesto por hifas de pared gruesa dispuestas en forma compacta cubriendo el esporocarpio (400X).



**Figura 4.** Algunos morfotipos de HMA presentes en los inóculos del mosaico sucesional de matorral xerófito no perturbado-localidad sucesional de veinte años-localidad sucesional de dos años.

### **7.3.3. Ensayo de crecimiento y dinámica de colonización micorrízica.**

#### **7.3.3.1. Crecimiento:**

Al finalizar el periodo de 112 días de crecimiento se observó un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la interacción entre los factores suelo x inóculo sobre los parámetros morfométricos de *P. carthagenensis*, excepto para el AFE (Tabla 5). Las plantas cultivadas en el suelo de la parcela sucesional de veinte años (Va), e inoculadas con los inóculos micorrízicos de las parcelas sucesionales de veinte y de dos años (tratamientos Va-V y Va-D respectivamente) mostraron los mayores valores de altura y área foliar, en comparación con los demás tratamientos.

La inoculación produjo incrementos significativos en el diámetro del tallo, respecto a los controles no inoculados (Tabla 5). Para las plantas cultivadas en los suelos de veinte años y dos años, los inóculos nativos (M, V y D) determinaron los mayores incrementos en el diámetro del tallo, no así para las plantas cultivadas en el suelo de matorral, donde el inóculo foráneo (L) produjo el mayor efecto (Tabla 5).

El área foliar específica (AFE) fue el único parámetro que no fue afectado significativamente por la inoculación micorrízica (ver  $p$ -valores de la Tabla 5), pero si se observó un efecto altamente significativo de los suelos de siembra sobre este parámetro. Las plantas cultivadas en el suelo de la parcela sucesional de veinte años exhibieron los mayores valores de área foliar específica, mientras que las cultivadas en el suelo de dos años presentaron los menores valores (Tabla 5).

**Tabla 5.** Parámetros morfométricos de *P. carthagenensis* a las 14 semanas de crecimiento en tres suelos: Matorral (Mat), parcela sucesional de 20 años (Va) y parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (control), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los 15 tratamientos ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD. Se muestran resultados del ANOVA

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	AFE (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
Mat-control	10.1 ± 0.5 c	4.3 ± 0.2 d	73 ± 04 b	208 ± 16 ab
Mat-M	9.7 ± 0.2 c	5.6 ± 0.2 c	99 ± 19 b	198 ± 18 abc
Mat-V	10.1 ± 0.4 bc	5.2 ± 0.2 c	89 ± 18 b	180 ± 12 c
Mat-D	9.8 ± 0.6 c	5.8 ± 0.4 b	97 ± 11 b	179 ± 04 c
Mat-L	9.5 ± 0.4 c	7.8 ± 0.4 a	73 ± 08 b	185 ± 12 c
Va-control	7.6 ± 0.3 d	2.8 ± 0.2 e	23 ± 02 c	224 ± 17 a
Va-M	10.6 ± 0.4 b	3.5 ± 0.2 d	72 ± 14 b	201 ± 1.4 b
Va-V	12.4 ± 0.4 a	3.9 ± 0.1 d	154 ± 03 a	219 ± 6.5 a
Va-D	13.0 ± 0.5 a	4.2 ± 0.3 d	152 ± 06 a	213 ± 11 ab
Va-L	11.33 ± 0.4 b	3.9 ± 0.2 d	163 ± 16 a	239 ± 22 a
Da-control	6.9 ± 0.3 d	4.1 ± 0.3 d	37 ± 09 c	147 ± 04 d
Da-M	9.5 ± 0.6 c	6.0 ± 0.4 b	114 ± 09 b	158 ± 05 d
Da-V	10 ± 0.4 c	6.5 ± 0.2 b	78 ± 17 b	153 ± 10 d
Da-D	10.9 ± 0.1 b	6.3 ± 0.5 b	120 ± 14 b	159 ± 08 d
Da-L	8.6 ± 0.2 d	5.3 ± 0.2 c	65 ± 14 bc	160 ± 04 d
ANOVA				
Suelo (S)	***	***	***	***
Inóculo (I)	***	***	***	NS
S x I	***	***	***	NS

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$   
con los  $p$ -valores.

El inóculo micorrízico foráneo *A. lacunosa* tuvo un efecto significativo sobre algunos de los parámetros morfométricos evaluados, pero su efecto en la mayoría de los casos fue inferior en comparación al producido por los inóculos micorrízicos nativos.

### **7.3.3.2. Biomasa y relación vástago-raíz:**

El suelo de siembra, las condiciones de inoculación micorrízica, y la interacción entre ambos factores tuvieron efectos altamente significativos sobre la biomasa total (Figura 5).

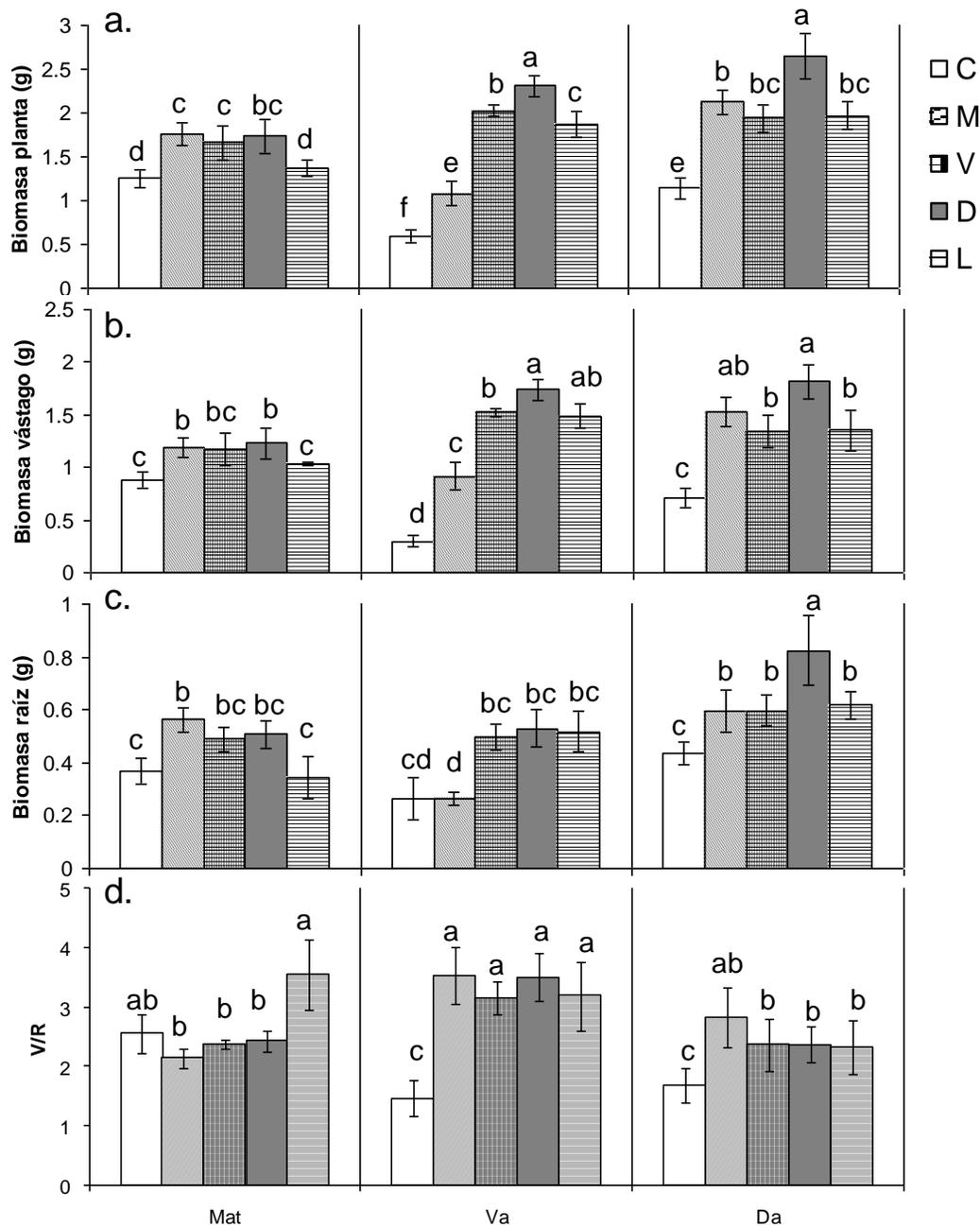
En la Figura 5-a se observa que en todos los suelos de siembra, la biomasa total de la planta fue significativamente mayor en las plantas inoculadas que en las plantas control, excepto en el caso de las plantas cultivadas con *A. lacunosa* en suelo del matorral (tratamiento Mat-L), cuya biomasa total fue similar al control. En las plantas cultivadas en el suelo del matorral, todos los inóculos nativos tuvieron un efecto similar sobre la biomasa total, mientras que en los suelos provenientes de las parcelas sucesionales, el inóculo de la parcela de dos años (inóculo D) tuvo un mayor efecto significativo (Figura 5-a).

Se observó una disminución de todos los parámetros de biomasa en el tratamiento Va-M, en comparación al resto de los tratamientos inoculados, mientras que en el suelo de dos años no se observaron estas diferencias (Figura 5). Las plantas no micorrizadas (control) sembradas en el suelo del matorral, presentaron valores de biomasa total más altos que las plantas control sembradas en los suelos de las parcelas sucesionales de veinte y de dos años (Figura 5-a).

En la Figura 5-b se observó una tendencia similar en cuanto a un mayor desarrollo de la biomasa del vástago en los tratamientos inoculados respecto a las plantas control, y de nuevo las plantas inoculadas con *D*, en los suelos de las parcelas sucesionales fueron los tratamientos más eficientes. El inóculo foráneo de *A. lacunosa* no tuvo un efecto significativo sobre la biomasa del vástago de las plantas cultivadas en el suelo de matorral, no así para las plantas cultivadas en los suelos de veinte y de dos años (Figura 5-b).

No se observaron diferencias significativas entre la biomasa de raíces de las plantas inoculadas y de las plantas control en los suelos Mat y Va, excepto en el tratamiento Mat-M donde se observó una biomasa significativamente mayor (Figura 5-C). Únicamente el suelo de dos años (Da) la biomasa de raíces de las plantas inoculadas fue significativamente mayor a la de las plantas control (Figura 5-C).

No se observaron diferencias significativas en la relación V/R de plantas inoculadas y plantas control cultivadas en suelo del matorral, pero si hubo un efecto significativo de la inoculación en las plantas cultivadas en los suelos sucesionales (Va y Da), observándose los mayores valores respecto al control en el suelo Va (Figura 5-d).



**Figura 5.** Biomasa (peso seco) de *P. carthagenensis* a las 14 semanas de crecimiento en los suelos del Matorral (Mat), parcela sucesional de 20 años (Va) y parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (control), y con inóculo del matorral (M), de la parcela de 20 años (V), de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los 15 tratamientos ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD.

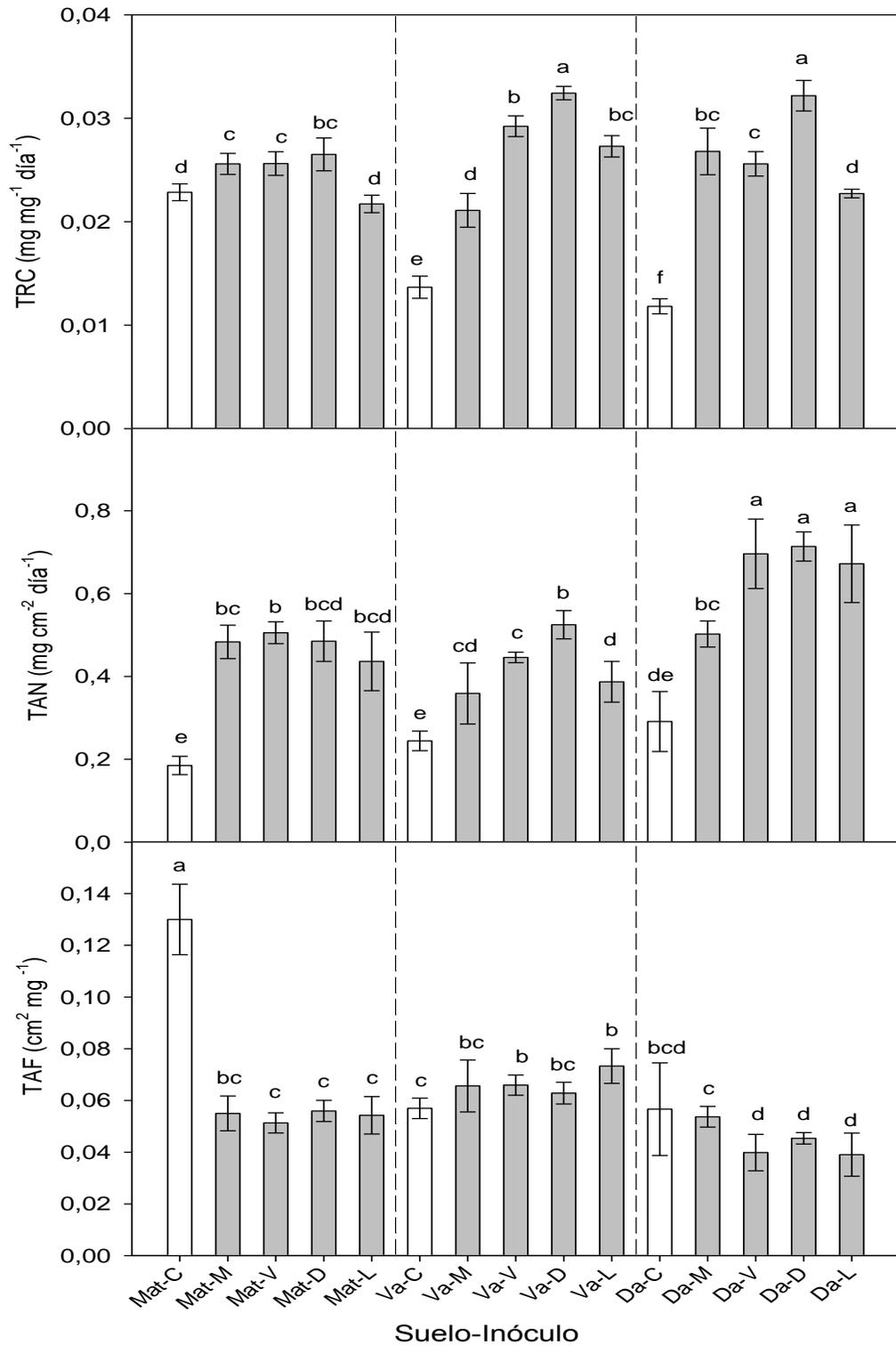
### **7.3.3.3. Tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN) y tasa de producción foliar (TAF):**

En los suelos sucesionales (Va y Da) la TRC de las plantas inoculadas fue significativamente mayor que la de las plantas control, mientras que en el suelo del matorral no se observó un efecto significativo de la inoculación sobre la TRC (Figura 6). En el suelo de dos años, las plantas cultivadas con los inóculos nativos (tratamientos Da-M, Da-V y Da-D) mostraron una TRC significativamente mayor que con el inóculo foráneo (Da-L, Figura 6). Las plantas inoculadas con el inóculo nativo de dos años (D) mostraron las mayores TRC en suelos sucesionales (Figura 6).

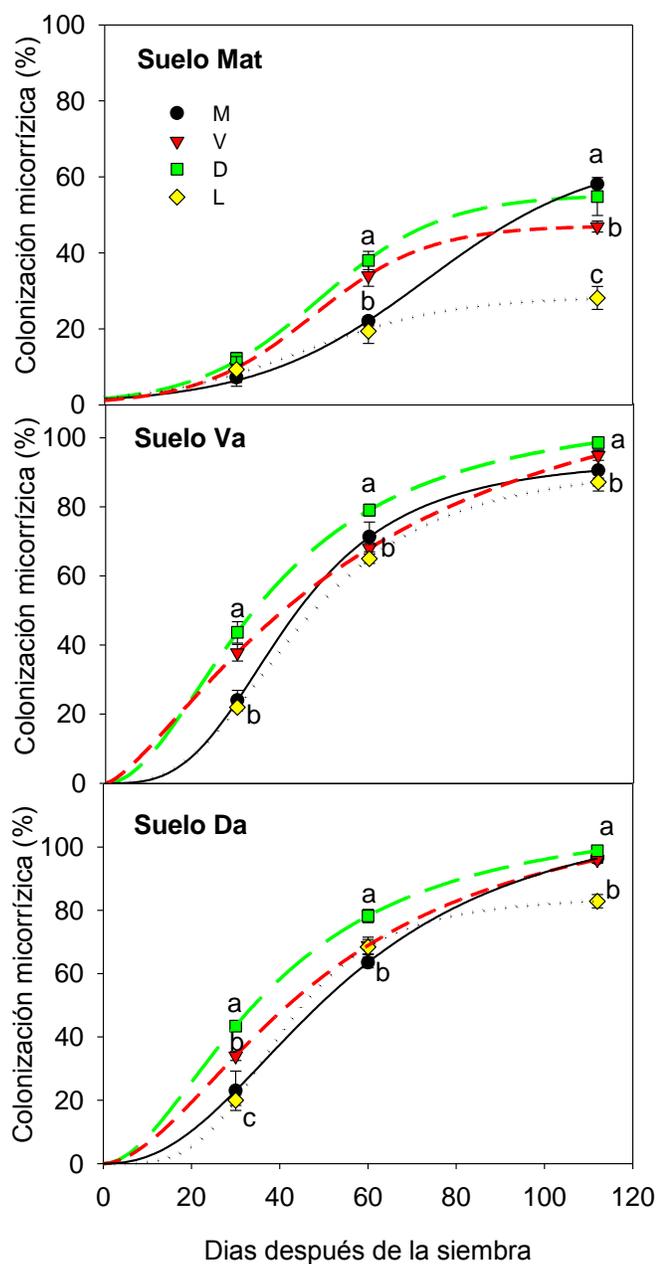
La TAN fue significativamente mayor en las plantas inoculadas que en las plantas control en todos los suelos de siembra, con los mayores valores en los tratamientos Da-V, Da-D y Da-L. Todas las plantas excepto las plantas del tratamiento Mat-C mostraron valores muy similares de TAF (entre 0,05 y 0,07  $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ , Figura 6).

### **7.3.3.4. Dinámica de colonización micorrízica:**

La dinámica de colonización micorrízica a los 30, 60 y 112 días después de la siembra se muestra en la Figura 7. Las curvas de colonización presentaron valores de  $r^2 > 0,92$  al realizar ajustes a curvas sigmoidales. Todas las plantas inoculadas presentaron colonización micorrízica a los 30 días de crecimiento en todos los suelos de siembra (Figura 7). Las plantas no inoculadas (controles en suelo estéril) no presentaron colonización micorrízica (datos no mostrados).



**Figura 6.** Tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN) y tasa de producción de área foliar (TAF) en los suelos del Matorral (Mat), parcela sucesional de 20 años (Va) y parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación.



**Figura 7.** Dinámica de colonización por micorrizas arbusculares a los 30, 60 y 112 días de siembra en los suelos provenientes del Matorral (Suelo Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Suelo Va) y de la parcela sucesional de dos años (Suelo Da). Condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (C), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de *A. lacunosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre inóculos en cada uno de los tres periodos evaluados ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD.

La colonización de las plantas cultivadas en el suelo del matorral alcanzó valores entre 7 y 12% a los 30 días de crecimiento y no se observaron diferencias significativas entre inóculos (Figura 7-a). A los 60 días de crecimiento, los porcentajes de colonización de los inóculos V y D fueron significativamente mayores (35 y 38% respectivamente), en comparación con los porcentajes de los inóculos M y L (Figura 7-a). A los 112 días de crecimiento los inóculos M y D produjeron porcentajes de colonización significativamente mayores (55-57%), seguidos por el inóculo V (45%) y por el inóculo L (26%) (Figura 7-a).

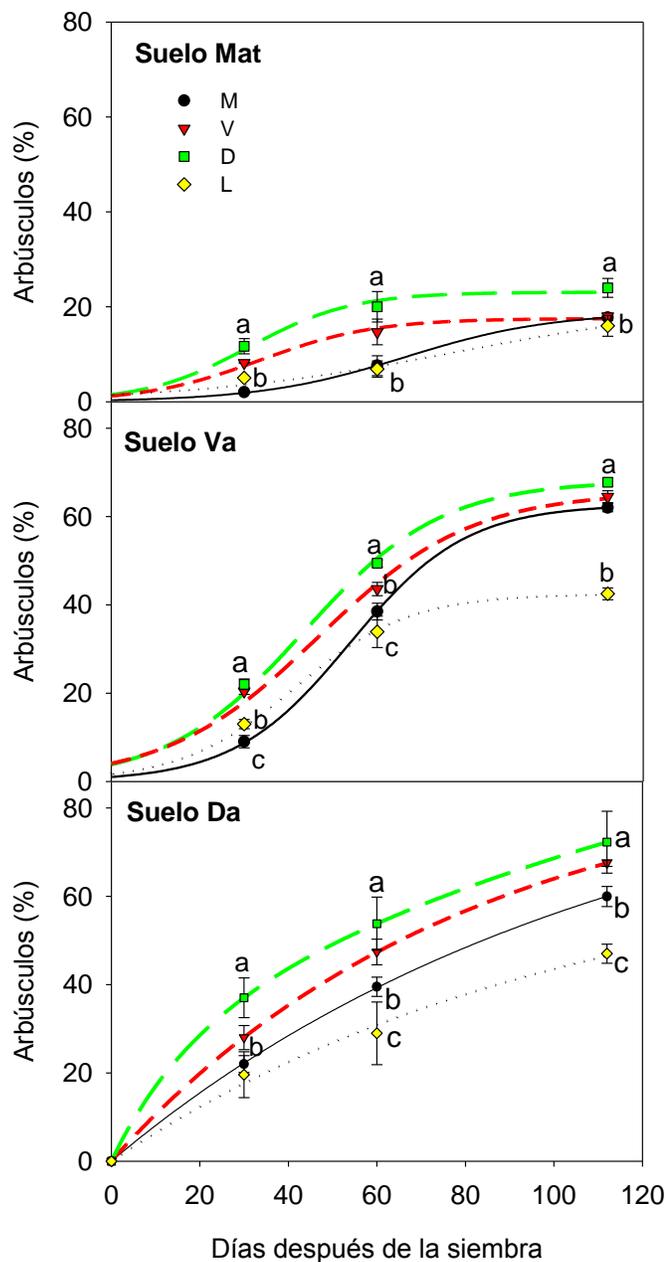
En las plantas cultivadas en el suelo Va, la colonización micorrízica a los 30 días fue significativamente más alta para los inóculos nativos de las localidades sucesionales, en comparación con el inóculo del matorral (Figura 7-b). A los 60 días de crecimiento se observaron porcentajes de colonización significativamente mayores con los inóculos nativos que con el inóculo L (Figura 7-b). A los 112 días se mantuvo la misma tendencia y la colonización aumentó hasta alcanzar valores entre 90.5 y 98.7% para los inóculos nativos y de 86% para el inóculo L (Figuras 7-b).

En las plantas cultivadas en el suelo Da se observó una tendencia similar a la observada en el suelo Va (Figura 7-C). Desde los 30 hasta los 60 días después de la siembra se observó un porcentaje de colonización mayor con los inóculos V y D que con los inóculos M y L (Figura 7-c). A los 112 días después de la siembra, el inóculo M alcanzó un valor similar al observado para los

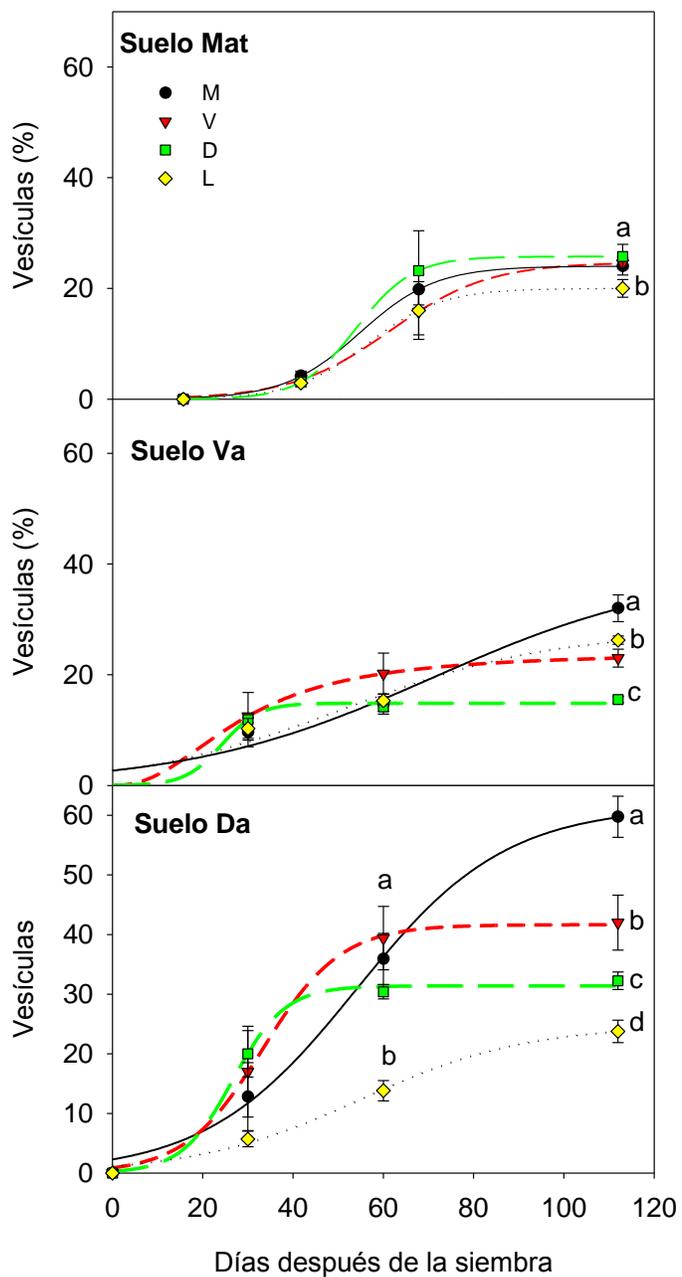
inóculos sucesionales, mientras que el inóculo L mantuvo un porcentaje de colonización significativamente más bajo que los demás inóculos (Figura 7-c).

La colonización por arbusculos se muestra en la Figura 8. Las plantas cultivadas en el suelo del matorral mostraron porcentajes de arbusculos menores (entre 0.9 y 22.3 %) que las plantas cultivadas en los suelos sucesionales (entre 40 y 70%). En estos últimos suelos se observaron incrementos graduales y significativos en el porcentaje de arbusculos, hasta alcanzar entre 61 y 72 % con los inóculos nativos, y entre 43 y 47% con el inóculo foráneo *A. lacunosa* (Figura 8). Se observaron porcentajes de arbusculos significativamente mayores en las plantas cultivadas con inóculos nativos (M, V y D), que en las cultivadas con el inóculo foráneo (L), a partir de los 60 días de crecimiento en los suelos sucesionales (Figura 8).

La curva de colonización por vesículas se muestra en la Figura 9. En las plantas cultivadas en el suelo del matorral no se observaron diferencias significativas entre inóculos a los 30 y 60 días, mientras que a los 112 días se observó una colonización por vesículas significativamente mayor en las plantas inoculadas con los inóculos nativos que con *A. lacunosa* (Figuras 9-a). En el suelo Va se observó una tendencia similar a la observada en el suelo Mat a los 30 y 60 días, pero con el inóculo M con un porcentaje de vesículas significativamente mayor al de los demás inóculos a los 112 días (Figura 9-b).



**Figura 8.** Dinámica de colonización por arbusculos a los 30, 60 y 112 días de siembra en los suelos provenientes del Matorral (Suelo Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Suelo Va) y de la parcela sucesional de dos años (Suelo Da). Condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (C), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de *A. lacunosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre inóculos en cada uno de los tres periodos evaluados ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD.



**Figura 9.** Dinámica de colonización por vesículas a los 30, 60 y 112 días de siembra en los suelos provenientes del Matorral (Suelo Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Suelo Va) y de la parcela sucesional de dos años (Suelo Da). Condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (C), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de *A. lacunosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre inóculos en cada uno de los tres periodos evaluados ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD.

En las plantas cultivadas en el suelo Da no se observaron diferencias significativas entre inóculos a los 30 días, mientras que a los 60 y a los 112 días la colonización por vesículas fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con los inóculos nativos que con *A. lacunosa* (Figura 9-c).

#### **7.3.3.5. Colonización micorrízico arbuscular (CMA):**

La CMA al finalizar el experimento (112 días) fue significativamente mayor en las plantas cultivadas en los suelos de veinte y de dos años, que en el suelo del matorral (Tabla 6). En todos los suelos los inóculos nativos exhibieron valores de CMA mayores que el inóculo foráneo (Tabla 6).

#### **7.3.3.6. Índice de respuesta micorrízica (IRM):**

El IRM fue mayor en plantas cultivadas en los suelos de dos y veinte años (39-69.5%), y menor en plantas cultivadas en el suelo del matorral (7-27%) (Tabla 6). Los tratamientos Va-V, Va-D y Va-L exhibieron valores de IRM significativamente más altos que el resto de los tratamientos. También se observó un efecto altamente significativo ( $p < 0.001$ ) del suelo de siembra sobre el IRM (Tabla 6).

#### **7.3.3.7. Biomasa de nódulos:**

El peso seco de nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico se muestra en la Tabla 6. La inoculación micorrízica tuvo un efecto altamente significativo sobre la biomasa de nódulos ( $p < 0.001$ ). Las plantas de los tratamientos Da-M, Da-V y Da-D, presentaron una biomasa de nódulos significativamente mayor respecto a los demás tratamientos

**Tabla 6.** Colonización por micorrizas arbusculares (CMA), índice de respuesta micorrízica (IRM) y peso seco de nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno (Nódulos), a las 14 semanas de crecimiento en tres suelos: Matorral (Mat), parcela sucesional de 20 años (Va) y parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no micorrizadas en suelo estéril (control), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) o con el inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los 15 tratamientos ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD. Se muestran resultados del ANOVA de dos vías con los  $p$ -valores.

Tratamiento	CMA (%)	IRM (%)	Nódulos (mg)
Mat-control	0	—	2 ± 0.4 e
Mat-M	48 ± 3 c	26.9 ± 5.3 d	77 ± 7 b
Mat-V	40 ± 7 c	21 ± 7.5 d	63 ± 9 bc
Mat-D	49 ± 5 c	23 ± 9.8 d	45 ± 8 c
Mat-L	20 ± 8 d	7.1 ± 6 e	41 ± 6 c
Va-control	0	—	4 ± 1.5 e
Va-M	97 ± 2 a	39.8 ± 7 cd	29 ± 9 d
Va-V	100 ± 3 a	66.4 ± 1.1 a	51 ± 11 c
Va-D	100 ± 1 a	69.5 ± 2.7 a	53 ± 12 c
Va-L	86 ± 4 b	66.3 ± 1.1 a	51 ± 6 c
Da-control	0	—	1 ± 0.1 e
Da-M	100 ± 2 a	45.5 ± 3.4 c	80 ± 17 a
Da-V	98 ± 3 a	39.6 ± 5.2 c	94 ± 17 a
Da-D	98 ± 2 a	60.2 ± 4.3 b	81 ± 10 a
Da-L	93 ± 2 b	40.7 ± 4.3 c	31 ± 3 d
ANOVA			
Suelo (S)	***	***	*
Inóculo (I)	**	**	***
S x I	**	*	NS

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

## **7.4. Discusión**

### **7.4.1. Análisis de Suelos del mosaico sucesional**

De acuerdo a los límites establecidos por el Soil Survey Staff (2003), el contenido de nitrógeno total en el suelo del matorral corresponde a un suelo extremadamente rico, mientras que el observado en las parcelas de veinte y dos años corresponden a suelos ricos y pobres respectivamente.

Todos los suelos presentan una concentración de fósforo disponible de moderada a alta, y un pH que varía de neutro (Matorral y localidad de veinte años) a medianamente alcalino (localidad de dos años). El porcentaje de materia orgánica (MO) en el matorral corresponde a un contenido medio, y disminuye aproximadamente en un 50% con la conversión a pastizal (sucesión de dos años) hasta un valor bajo de MO considerado como bajo (Soil Survey Staff, 2003). La textura del suelo de las tres localidades es franco-arenosa, según el triángulo textural del sistema de clasificación de la USDA.

### **7.4.2. Descripción de Inóculos de HMA del mosaico sucesional**

La presencia de esporas de HMA en el inóculo proveniente de la parcela sucesional de dos años a pesar de que la extracción de arena elimina el suelo del matorral original, podría deberse a la permanencia de algunos propágulos viables de HMA que colonizaron las plantas que se establecieron en las localidades recién perturbadas, como *Rhynchelytrum repens*, *Cenchrus ciliaris* y *Canavalia brasiliensis*. Estas plantas de rápido crecimiento presentaron porcentajes de colonización micorrízica superiores al 25% (datos no mostrados),

y las dos primeras han sido señaladas en la literatura como especies micotróficas; *Rhynchelytrum repens* ha sido reportada en zonas costeras de Singapur con un alto porcentaje de colonización por hifas y esporas de *Glomus macrocarpum* (Louis, 1990) y *Cenchrus ciliaris* mostró un mayor crecimiento y acumulación de biomasa ante la inoculación con *Gigaspora rosea*, *Rhizophagus intraradices* y *Claroideoglomus etunicatum* respecto a plantas no inoculadas en suelo estéril (Khan *et al.* 2007).

La eliminación de la cobertura vegetal para la extracción de arena, así como los cambios producidos en las condiciones químicas y físicas de los suelos que sustentaban los bosques y matorrales intervenidos para tal fin, pueden alterar significativamente la dinámica de las comunidades de HMA a través de cambios en las poblaciones de HMA. En este sentido, el bajo número de morfotipos observado en los inóculos producidos a partir de suelos provenientes de las localidades sucesionales de veinte y de dos años (nueve y seis morfotipos respectivamente), respecto al observado en el inóculo del matorral no perturbado (19 morfotipos), reflejan la disminución de la riqueza de HMA producida posiblemente por el impacto de la actividad minera, sin embargo la prevalencia de algunos morfotipos sugiere que esas especies nativas de HMA son posiblemente más tolerantes a las nuevas condiciones edáficas y se ven favorecidas por la presencia de las nuevas plantas hospederas como se señaló anteriormente.

El alto número de esporas de los inóculos provenientes de las localidades perturbadas en contraste con una menor esporulación en el ecosistema de

referencia (matorral) se ha observado tanto en potes trampa como en suelos provenientes directamente del campo, y es atribuida a las diferentes estrategias de vida de los HMA (Lopes-Leal *et al.* 2009). La estrategia *r* de algunas especies que asignan más carbono a la esporulación, en contraste con las estrategias *k* que producen pocas esporas y asignan más recursos al crecimiento vegetativo (Picone, 2000; Zangaro *et al.* 2000; Lopes-Leal *et al.* 2009). En este sentido se ha señalado que los HMA pueden ser catalogados como “colonizadores” o “persistentes” dependiendo de su historia de vida. Los HMA colonizadores producen numerosas esporas de rápida germinación que producen muchos puntos de infección en la raíz hospedera, y en consecuencia altos porcentajes de colonización, mientras que los HMA persistentes producen menos esporas, son tolerantes a una baja disponibilidad de recursos, y son resistentes a colonizar determinados hospederos (Hart *et al.* 2001).

Así, el alto valor observado tanto en el número de esporas como en el número más probable de propágulos infectivos de los inóculos provenientes de las localidades sucesionales en comparación con el inóculo del matorral sin perturbar, podría deberse a que los morfotipos que predominan en dichos inóculos como *Claroideoglossum* cf. *etunicatum*, poseen una estrategia de colonización rápida tanto a través de sus hifas como de sus esporas, incluyéndolas en el grupo de los HMA “colonizadores”, en comparación con el inóculo de matorral dominado por HMA del grupo de las *Gigaspora* los cuales presentan una estrategia lenta de colonización debido a que sólo germinan a partir de sus esporas (las hifas de este grupo no tienen capacidad infectiva), lo

cual los incluye en el grupo de los HMA “persistentes”(Klironomos & Hart, 2002; Hart *et al.* 2001).

Es probable que los 23 morfotipos reportados en este estudio no representen la riqueza total de especies presentes en las localidades sucesionales y en el matorral xerófito, debido a que los pots trampa pueden actuar como un filtro que favorece la esporulación de especies de HMA capaces de colonizar y producir esporas en periodos cortos de tiempo con plantas hospederas de rápido crecimiento bajo las condiciones óptimas de un invernadero (Mathimaran *et al.* 2005; Lopes-Leal *et al.* 2009), sin embargo en el presente estudio no se encontraron nuevos morfotipos en los aislados de esporas realizados a partir de muestras de suelo provenientes directamente del campo (datos no mostrados), por lo que es posible que este listado sea una buena aproximación a la riqueza de HMA de estas localidades durante la temporada de sequía. En este sentido, un muestreo durante la temporada de lluvia sería necesario para complementar esta información.

#### **7.4.3. Ensayo de crecimiento y dinámica de colonización micorrízica**

Los inóculos de HMA nativos provenientes de las localidades sucesionales y el inóculo foráneo *Acaulospora lacunosa*, estimularon de forma diferencial el crecimiento de *Piscidia carthagenensis* bajo condiciones de vivero, dependiendo del suelo de siembra utilizado. Los inóculos micorrízicos nativos provenientes de las localidades de dos y veinte años de sucesión, produjeron los mayores efectos positivos en la altura, diámetro del tallo y biomasa, únicamente cuando las plantas fueron cultivadas en los suelos sucesionales.

Este efecto dependiente del suelo de siembra, podría estar relacionado con la menor concentración de nutrientes respecto al suelo del ecosistema de referencia (Matorral), y a la alta respuesta de las leguminosas arbóreas a la inoculación micorrízica, especialmente bajo condiciones estresantes (Herrera *et al.* 1993).

El efecto positivo de la inoculación se reflejó también en las mayores tasas relativas de crecimiento (TRC) observadas en plantas micorrizadas en comparación con las plantas control en todos los suelos evaluados, indicando que la colonización micorrízica podría minimizar el tiempo en el que la planta permanece en un tamaño vulnerable, aumentando así su probabilidad de sobrevivir al siguiente periodo de sequía (Rincón *et al.* 2000). El mantenimiento de una alta TRC en un ambiente determinado, permite a la planta colonizar más rápidamente un área, asimilar más recursos y reducir el tiempo entre el crecimiento vegetativo y la reproducción, representando una ventaja selectiva (Chapin, 1987; Poorter, 1989).

El análisis de los dos componentes de la tasa relativa de crecimiento (TRC), la tasa de asimilación neta (TAN) y la tasa de producción de área foliar (TAF), mostró que la TAN fue el componente que más contribuyó al incremento de la TRC en plantas inoculadas, indicando que la asociación micorrízica influencia la tasa crecimiento de la planta a través de una mayor ganancia de biomasa por unidad de área foliar, lo cual podría estar asociado a una mayor eficiencia fotosintética (Hunt *et al.* 1993). Además los mayores valores de área foliar total en plantas inoculadas sugiere que la simbiosis micorrízica contribuye

significativamente tanto al incremento del área foliar como a su eficiencia funcional.

Uno de los principales mecanismos mediante los cuales las plantas se ajustan a la disponibilidad de recursos es asignando biomasa hacia el órgano más eficiente en incorporar el recurso limitante, así cuando la planta se encuentra limitada por carbono debido a los altos requerimientos de la simbiosis micorrízica, y además tiene un excedente de nitrógeno proporcionado en este caso por la fijación biológica, la planta compensa el requerimiento de carbono produciendo más vástago y menos biomasa radical, favoreciendo un mejor balance de nutrientes y carbono para el crecimiento (Chapin, 1987). Así el incremento en el área foliar observado en las plantas inoculadas cultivadas en los suelos sucesionales, podría contribuir a incrementar la ganancia de carbono de la plantas compensando el alto costo de la simbiosis micorrízica (Smith & Read, 2008). El incremento en la relación vástago/raíz por la inoculación micorrízica ha sido reportado en numerosas plantas del grupo de las leguminosas y se atribuye a su capacidad de formar simbiosis con HMA y bacterias fijadoras de nitrógeno (Puppi *et al.* 1994).

Características de crecimiento similares a las de *P. carthagenensis* fueron reportadas en tres especies de *Caesalpinia* (Leguminosae) de la selva caducifolia de Chamela, Jalisco, México, en las cuales se observó una contribución más importante del área foliar y la TAN a la TRC, que aquellas relacionadas con la morfología foliar (Rincón *et al.* 2000).

Por otro lado, la mayor TAF en el tratamiento Mat-C, podría indicar que la TRC de las plantas sin micorrizas cultivadas bajo las condiciones nutricionales óptimas de su hábitat natural es influenciada principalmente por una mayor producción de área foliar por unidad de biomasa total de la planta, y no por una mayor eficiencia fotosintética. La mayor AFE observada en este tratamiento indica a su vez que el incremento en la TAF es debido principalmente a la producción de hojas más delgadas.

Al utilizar el suelo del matorral como sustrato de siembra las plantas inoculadas con los inóculos nativos produjeron valores similares y de pequeña magnitud en la biomasa total de las plantas, los cuales no representaron un beneficio significativo en términos de crecimiento para *P. carthagenesis*. Dado que la magnitud del incremento en el crecimiento producido por las MA está relacionada con el fósforo disponible en el suelo (Schroeder & Janos, 2004; Schweiger *et al.* 2007), posiblemente la alta concentración de fósforo disponible en el suelo del matorral ( $46,7 \text{ mg K}^{-1}$ ) afectó negativamente la eficiencia simbiótica de las MA.

La dinámica de colonización micorrízica observada en los suelos sucesionales presentó una tendencia de crecimiento logístico con una fase de infección rápida en los primeros 30 días de crecimiento, seguida por una fase de infección más lenta hasta alcanzar valores cercanos al 100% a los 112 días. Esta tendencia es característica en el curso de la infección micorrízica (Mosse *et al.* 1981; Mc.Gonigle, 2001). En el suelo del matorral el porcentaje inicial de infección fue mucho más bajo que en los suelos sucesionales (10-20% menor),

y aunque aumentó significativamente en las siguientes fases, las curvas de los inóculos nativos sólo alcanzaron valores máximos de colonización de 45 a 57%, a diferencia de los valores alcanzados por estos inóculos en los suelos sucesionales. Esta tendencia podría atribuirse a una regulación negativa de la colonización micorrízica por la planta hospedera, debido posiblemente a una alta concentración de fósforo en sus tejidos (Koide & Schreiner, 1992).

Se ha reportado que la colonización micorrízica se inhibe al añadir fosfato foliar, sugiriendo que es el fósforo de la planta el que inhibe la colonización, y no el fósforo en el suelo (Sanders, 1975). El mecanismo responsable de esta inhibición es la reducción de la asignación de carbono al hongo (Olsson *et al.* 2002). Aunque esta tendencia ha sido también observada en cultivos *in vitro* de MA sometidos a altas concentraciones de fósforo por periodos de tiempo prolongado (>100 días Olsson *et al.* 1997), se ha observado que en las primeras etapas de colonización (25-50 días) hay un flujo positivo de carbono desde las raíces al hongo micorrízico, comprobando que el hongo se puede beneficiar inicialmente de su hospedero en medios enriquecidos con fósforo (Olsson *et al.* 2006), lo cual podría ser una explicación de la presencia de plateau o valor máximo de colonización por arbusculos a los 60 días, a partir del cual no incrementó más dicho porcentaje en los inóculos V y D en el suelo del matorral, a diferencia de lo observado en los suelos sucesionales.

Por otro lado, tanto el inóculo del matorral (M) como el inóculo foráneo (L), no alcanzaron un plateau de colonización por arbusculos a los 112 días en el suelo del matorral, y además en el caso particular del inóculo M no se observó

un valor máximo de colonización micorrízica a los 112 días como se observó con los demás inóculos, sino una tendencia a seguir aumentando. Esto podría indicar que al menos una de las especies de HMA presentes en este inóculo, involucrada en el proceso de colonización sea más lenta en su colonización y más tolerante a mayores concentraciones de fósforo en la planta hospedera (Sanders, 1975; Mengue *et al.* 1978). La mayor riqueza de especies pertenecientes al género de las *Gigaspora* presente en el inóculo del matorral, señalada en la sección 7.4.2 del presente capítulo, apoya esta tendencia, ya que en este grupo de HMA la colonización depende exclusivamente de las esporas y las hifas no parecen tener capacidad infectiva (Klironomos & Hart, 2002). Además se ha reportado una estrategia de crecimiento lenta en cultivos *in vitro*, de este género de micorrizas, con una mayor producción de biomasa fúngica y de esporas después de que la raíz ha cesado su crecimiento, a diferencia de los HMA del género *Glomus* cuyo crecimiento vegetativo y reproductivo coincide con el crecimiento radical (de Souza, 2005).

El menor porcentaje de arbuscúlos observado para todos los inóculos en el suelo del matorral (de 7 a 22%), en comparación con el observado en los suelos sucesionales (de 43 a 72%), coincide con el bajo incremento en biomasa y con la ausencia de diferencias en altura y área foliar de las plantas inoculadas respecto a las plantas control observada en este suelo, lo cual podría indicar que a pesar de que los hongos colonizadores se beneficiaron de su hospedero, no hubo un beneficio significativo para la planta en términos de crecimiento durante el periodo de tiempo evaluado. Aún así, es posible que la inoculación

micorrízica en este suelo sea eficiente en mejorar otros atributos de la planta que no fueron evaluados en este capítulo, como por ejemplo la conductancia estomática, la conductancia hidráulica radical, la eficiencia de uso de agua u otros atributos fisiológicos, que pueden mejorar con la inoculación independientemente de los cambios en biomasa (Augé, 2001).

Otra posible explicación de la disminución de la colonización micorrízica en el suelo del matorral podría ser la disminución en la germinación de algunas cepas de presentes en los inóculos estudiados, como es el caso de una de las especies de HMA de mayor abundancia en los inóculos sucesionales *Claroideoglossum etunicatum*, para la cual se observó que la germinación de esporas disminuye a medida que incrementa la concentración de fósforo en el suelo (52 % de germinación a  $0 \mu\text{g}^{-1}$  de fósforo en el suelo, 46% a  $25 \mu\text{g}^{-1}$  y 21% a  $259 \mu\text{g}^{-1}$ ) en un periodo de siete días (Miranda & Harris, 1994). Este ejemplo confirma la sensibilidad de algunas cepas fúngicas ante concentraciones altas de fósforo en estados pre-simbióticos. Así, posiblemente en el suelo del matorral por ser más enriquecido en fósforo, algunos de los morfotipos de HMA presentes en los inóculos sean más sensibles al fósforo, y en consecuencia menos capaces de colonizar las raíces.

El efecto negativo del fósforo fue reportado en cinco especies endémicas de *Mimosa* L. del valle semiárido de Tehuacán, México, cultivadas en suelo nativo y fertilizadas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Camargo-Ricalde *et al.* 2010). Estos resultados fueron atribuidos al efecto negativo del incremento en la

concentración de fósforo en el suelo sobre la germinación de las esporas y sobre el crecimiento de las hifas de HMA (Jansa *et al.* 2005).

El inóculo nativos más eficientes en aumentar el crecimiento de *P. carthagenensis* respecto a las plantas control en suelos sucesionales, fue el inóculo de dos años, el cuales presentó altos porcentajes de colonización total y de colonización por arbusculos. Esta tendencia posiblemente esté relacionada con las especies de HMA predominantes en este inóculo, *Glomus cf. etunicatum* y *Entrophospora infrequens* cuya historia de vida sea posiblemente del tipo “colonizadores”, productores de un gran número de esporas de rápida germinación y de grandes unidades de infección micorrízica en la raíz (Hart *et al.* 2001),

Aunque el inóculo foráneo *A. lacunosa* tuvo efectos positivos sobre los parámetros de crecimiento y de biomasa de *P. carthagenensis*, estos efectos fueron en general inferiores a los obtenidos con los inóculos nativos. Estos resultados coinciden con lo reportado para otros ensayos de inoculación de árboles y arbustos nativos realizados en regiones áridas, orientados a la rehabilitación de áreas degradadas (Caravaca *et al.* 2003b; Labidi *et al.* 2006; Ouahmane *et al.* 2007). Dichos estudios indican que el uso de una mezcla de HMA nativos puede incrementar la oportunidad de incluir un aislado fúngico altamente efectivo que garantice el establecimiento exitoso de árboles y arbustos nativos en suelos degradados, además de crear un ambiente más favorable para el desarrollo de los procesos de la microflora del suelo (Caravaca *et al.* 2003b; Ouahmane *et al.* 2007). De manera similar, existen modelos

ampliamente aceptados que apoyan la hipótesis de que una comunidad de HMA posee el potencial para ejercer múltiples funciones (Fitter, 2005; van der Heijden *et al.* 1998) y posiblemente la coexistencia de más de un aislado fúngico en las raíces de las plantas cultivadas con los inóculos mixtos sea más beneficiosa bajo condiciones abióticas estresantes.

El alto IRM observado en las plantas cultivadas con inóculos sucesionales en los suelos sucesionales, podría ser el resultado de una mayor compatibilidad funcional de esta planta con las especies de HMA más abundantes en dichos inóculos. Estudios recientes han demostrado que existe una alta diversidad funcional en la simbiosis micorrízica, ya que diferentes combinaciones de plantas hospederas y HMA, tienen impactos diferentes sobre la morfología, eficiencia y patrones de expresión genética de la simbiosis (Feddermann *et al.* 2010). Por otro lado, el menor IRM observado en las plantas cultivadas con el inóculo del matorral en los suelos sucesionales, podría deberse a una estrategia más lenta de colonización de los HMA provenientes de dicha localidad, tal como se señaló anteriormente.

Así, aunque se esperaba que el inóculo del matorral produjera el mayor IRM debido a una mayor riqueza de especies de HMA, es posible que sea necesario un periodo de crecimiento mayor para observar este efecto, o que éste sea más significativo en una etapa posterior del ciclo de vida de la planta. En este sentido Allen *et al.* (2005) observaron una diferenciación temporal en la respuesta a la inoculación dependiendo del origen de los HMA nativos utilizados, donde un inóculo de localidad perturbada tuvo un efecto positivo

durante en el crecimiento de árboles nativos en campo durante el primer año, mientras que un inóculo más diverso proveniente del bosque seco no perturbado produjo un efecto significativo sólo a partir del segundo año de crecimiento.

El bajo peso seco de nódulos en las plantas control podría indicar que el filtrado de suelo nativo agregado a este tratamiento no fue una fuente efectiva de bacterias fijadoras de nitrógeno, o que la ausencia de HMA afectó negativamente la formación de nódulos, la cual requiere tres veces más fósforo y energía que la requerida para el crecimiento del tejido radical, produciendo una mayor dependencia de la asociación micorrízica en la simbiosis tripartita (Almeida *et al.* 2000, Olivera *et al.* 2004; Varennes & Goss, 2007).

La mayor biomasa de nódulos observada en las plantas micorrizadas en todos los suelos evaluados, especialmente en las cultivadas con los inóculos nativos en el suelo de la localidad de dos años, podría indicar que el menor contenido de nitrógeno y fósforo de este suelo estimuló el efecto sinérgico de la simbiosis tripartita. El efecto beneficioso de las MA sobre la incorporación de fósforo en las plantas incrementa en condiciones de baja fertilidad, aumentando la actividad de la enzima nitrogenasa del simbionte rizobial lográndose una mayor fijación de nitrógeno, un mayor crecimiento radical y un mayor desarrollo micorrízico (Johansson *et al.* 2004).

Los bajos valores de biomasa total observados en los tratamientos Va-C y Da-C respecto al tratamiento Mat-C, indican que los cambios en las condiciones fisicoquímicas del suelo producidos por la perturbación afectan negativamente el crecimiento de la planta, pero el incremento en la mayoría de los parámetros

morfométricos en las plantas cultivadas en los suelos sucesionales en presencia de HMA, indica que este efecto negativo se ve contrarrestado por la inoculación micorrízica, y que la presencia de esta simbiosis podría ser un factor determinante en el establecimiento y crecimiento de las plántulas de *P. carthagenensis* en localidades perturbadas por la actividad minera.

La inoculación de plántulas de *P. carthagenensis* con HMA provenientes de las comunidades vegetales sucesionales, utilizando como sustrato de siembra suelos provenientes de las mismas localidades constituye una estrategia favorable para incrementar el vigor de *P. carthagenensis* bajo condiciones de vivero y posiblemente su posterior sobrevivencia en áreas profundamente alteradas por la minería en la Península de Macanao.

Este efecto positivo suelo sucesional-inóculo, podría deberse al bajo contenido de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) de los suelos sucesionales, a un mayor potencial infectivo de los inóculos de estas localidades, a las estrategias de colonización e historias de vida de los HMA presentes en los inóculos, y a una mayor expresión de las bacterias fijadoras de nitrógeno bajo estas condiciones. El efecto de estos inóculos en etapas posteriores de siembra en campo, así como las interacciones que se produzcan con los HMA presentes en las localidades perturbadas, son respuestas que determinarán cuales combinaciones suelo-inóculo son realmente las más apropiadas para mejorar la sobrevivencia y crecimiento de *P. carthagenensis* a largo plazo.

### 7.5. Conclusiones

- Los inóculos micorrízicos nativos provenientes de las localidades sucesionales, produjeron los mayores efectos positivos en la altura, diámetro y biomasa cuando las plantas fueron cultivadas en los suelos de las mismas localidades (suelos perturbados), lo cual podría deberse a la baja concentración de nutrientes de estos suelos y al alto número de propágulos infectivos observado en dichos inóculos.
- El alto índice de respuesta micorrízica observado en las plantas cultivadas con inóculos sucesionales en los suelos sucesionales, podría ser el resultado de una mayor compatibilidad funcional de esta planta con las especies de HMA más abundantes en dichos inóculos (*Glomus* cf. *etunicatum* y *Entrophospora infrequens*).
- Los inóculos nativos en el suelo del matorral alcanzaron valores de colonización menores a los alcanzados en los suelos sucesionales. Esta tendencia podría atribuirse a una regulación negativa de la colonización micorrízica debido posiblemente a una alta concentración de fósforo en los tejidos de la planta hospedera.
- Aunque el inóculo M en su suelo de origen (matorral), presentó una velocidad de colonización más lenta que los inóculos sucesionales, posiblemente las especies de HMA involucradas en el proceso de colonización sean más tolerantes a altas concentraciones de P en la planta hospedera. En este sentido, se esperaría que debido a una estrategia de crecimiento más lenta de los HMA presentes en este

inóculo, los efectos sobre el crecimiento de la planta sean también más lentos y solo evidentes en un periodo de tiempo mayor.

- El menor IRM observado en las plantas cultivadas con el inóculo del matorral en los suelos sucesionales, podría deberse a una estrategia más lenta de colonización de los HMA de la familia *Gigasporaceae*, que fueron los más abundantes en este inóculo. Así, es posible que sea necesario un periodo de crecimiento mayor para observar el efecto de este inóculo, o que éste sea más significativo en una etapa posterior del ciclo de vida de la planta.
- Aunque el inóculo foráneo *A. lacunosa* tuvo efectos positivos sobre los parámetros de crecimiento y de biomasa de *P. carthagenensis*, estos efectos fueron en general inferiores a los obtenidos con los inóculos nativos.
- La mayor biomasa de nódulos de rizobios observada en las plantas micorrizadas en todos los suelos evaluados, especialmente en las cultivadas con los inóculos nativos en el suelo de la localidad de dos años, podría indicar que el menor contenido de nitrógeno y fósforo de este suelo estimuló el efecto sinérgico de la simbiosis tripartita.
- El incremento en la mayoría de los parámetros morfométricos en las plantas cultivadas en los suelos sucesionales en presencia de HMA, indica que el efecto negativo de los cambios en las condiciones fisicoquímicas del suelo producidos por la perturbación se ve contrarrestado por la inoculación micorrízica, y que la presencia de esta

simbiosis podría ser un factor determinante en el establecimiento y crecimiento de las plántulas de *P. carthagenensis* en localidades perturbadas por la actividad minera.

- La inoculación de plántulas de *P. carthagenensis* con HMA provenientes de las comunidades vegetales sucesionales, utilizando como sustrato de siembra suelos provenientes de las mismas localidades constituye una estrategia favorable para incrementar el vigor de *P. carthagenensis* bajo condiciones de vivero.

## **8. CAPÍTULO II**

**Influencia de las micorrizas arbusculares nativas de un mosaico sucesional de matorral xerófito sobre el crecimiento, estatus hídrico e intercambio gaseoso de *Piscidia carthagenensis* Jacq. bajo condiciones de sequía.**

### **8.1. Introducción**

El status hídrico de una planta es cuantificado por mediciones del potencial hídrico ( $\Psi$ ) o de sus componentes; el potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) y el potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ), o a través del contenido relativo de agua (CRA). Bajo condiciones de óptima irrigación el  $\Psi$  foliar generalmente no es afectado por la simbiosis con MA (Goicoechea *et al.* 1997), pero al someter las plantas a déficit hídrico (DH) el  $\Psi$  foliar de plantas M suele ser mayor. En plantas NM del arbusto *Rosmarinus officinalis* sometidas a DH, el  $\Psi$  foliar fue 0,7 MPa menor que el de plantas M, y el contenido relativo de agua (CRA) en las plantas M permaneció alrededor de 70% (tan sólo 10% menos que las plantas sin DH) mientras que en plantas NM disminuyó hasta 50% (Sánchez-Blanco *et al.* 2004). De manera similar se ha observado en algunos estudios un retraso en la disminución del  $\Psi$  foliar, incluso cuando la humedad del suelo es menor en plantas M; así como también el retorno del  $\Psi$  foliar a valores control más rápidamente (El Tohamy *et al.* 1999; Augé *et al.* 1987<sup>a</sup>; Subramanian *et al.* 1997).

Las MA incrementan la conductancia estomática ( $g_s$ ) de las plantas hospederas, en un amplia gama de condiciones de humedad y con plantas M y NM de tamaño similar (Augé, 2001). Se ha observado que el aumento en  $g_s$  sucede en una proporción de 3:1 en plantas M respecto a plantas NM (Allen & Boosalis, 1983). En plantas de sorgo inoculadas con *Glomus intraradices* y *Gigaspora margarita*, las plantas M mostraron valores de conductancia tres veces mayores que en plantas NM, además de presentar mayores tasas de

transpiración (Augé *et al.* 2004). En concordancia con los efectos sobre  $g_s$ , las plantas micorrizadas sometidas a DH frecuentemente muestran mayores tasas fotosintéticas que sus contrapartes no inoculadas (Sánchez-Blanco *et al.* 2004). Otros parámetros como la eficiencia de uso de fósforo (EUP) han mostrado una gran variabilidad (aumento o disminución) en un mismo hospedero dependiendo de la especie de HMA que la colonice, como se observó en plantas de *Lactuca sativa* inoculadas con siete especies de *Glomus* spp., el mayor valor de EUP fue reportado para *G. occultum* y *G. caledonium* (Ruiz-Lozano & Azcón, 1995).

Los efectos de la simbiosis MA sobre las relaciones hídricas e intercambio gaseoso de las plantas hospederas bajo DH, pueden ser interpretados en muchos casos como incrementos en la resistencia a la sequía. Los mecanismos que permiten la sobrevivencia y productividad de las plantas en condiciones de sequía se dividen en dos grupos, evasión y tolerancia. Las plantas evasoras pueden presentar a su vez tres estrategias; el escape a la sequía (latencia, ciclos de vida cortos durante cortos periodos humedad), la conservación del agua (plantas con hojas pequeñas, alta resistencia cuticular, absorción limitada de la radiación y baja conductancia estomática) y/o incorporación efectiva de agua (a través de sistemas radicales profundos y/o densos). Las plantas tolerantes mantienen la turgencia de los tejidos mediante el incremento en la concentración de solutos y cambios en el módulo de elasticidad de las paredes celulares, y/o producen solutos y enzimas que protegen las membranas y el citoplasma durante la desecación. El uso eficiente

del agua disponible también se considera como un mecanismo que favorece la sobrevivencia de las plantas durante la sequía (Jones, 1983).

Las MA producen generalmente un incremento en el ajuste osmótico (AO) en plantas sometidas a DH. En plántulas de *Citrus tangerine* inoculadas con *Glomus versiforme* sometidas a sequía durante 80 días, se observó una mayor concentración de azúcares y almidones solubles en hojas que plantas NM; un aumento de 29% en la  $g_s$  y de 21% en el  $\Psi$  foliar. La concentración  $K^+$  y  $Ca_2^+$  en hojas fue también significativamente mayor (Qiangsheng *et al.* 2007). De igual forma, un arbusto decíduo (*Anthyllis cytisoides*) inoculado con HMA presentó AO inducido por la conversión de almidones a azúcares solubles, cuando se sometió a DH (Goicochea *et al.* 2004). En plantas de soya inoculadas con *Glomus intraradices* se observó un incremento de 14% en la concentración de prolina en raíces, respecto a plantas no inoculadas (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004).

Además de formar simbiosis con MA, la mayoría de las leguminosas se asocian con bacterias del suelo de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Photorhizobium* formando órganos especializados (nódulos) en las raíces y excepcionalmente en los tallos, en los que se produce la reducción de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio (Gordon *et al.* 2001). La formación de esta interacción simbiótica denominada genéricamente como rizobios, es de gran interés tanto en agrosistemas sustentables como en restauración de zonas áridas degradadas (Caravaca *et al.* 2003<sup>a</sup>). Las leguminosas establecen un feedback con los

nódulos para regular la fijación de  $N_2$  de acuerdo a la disponibilidad de  $NO_3^-$  en el suelo; Cuando la concentración de nitrógeno en la planta es alta, se requiere una gran cantidad de carbono para la síntesis de proteínas y aminoácidos y en consecuencia la planta invierte menos carbono en los nódulos (Pacovsky, 1989). Las MA puede alterar este feedback a través del incremento de la demanda de carbono por la raíz, al mismo tiempo que incrementa la concentración nitrógeno en la planta (Pacovsky, 1989).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del déficit hídrico sobre las relaciones hídricas y el intercambio gaseoso de plantas de *P. carthagenensis* inoculadas con inóculos micorrízicos nativos provenientes de un mosaico sucesional de matorral xerófito y con el inóculo foráneo *Acaulospora lacunosa*, en un suelo perturbado, bajo condiciones de invernadero.

## 8.2. **Materiales y Métodos**

El experimento se llevó a cabo en un vivero ubicado en el Instituto de Biología Experimental de la UCV, ubicado en Colinas de Bello Monte, Caracas. Los valores promedio de las variables microclimáticas en el vivero durante el experimento fueron las siguientes: Temperatura del aire:  $25,5 \pm 0,5$  C°, humedad relativa  $54,3 \pm 0,8$  % y radiación máxima:  $1450 \pm 0,6$   $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ .

El diseño experimental consistió en una combinación de dos condiciones de humedad del suelo (riego y sequía) y de seis condiciones de inoculación: Control estéril sin micorrizas (CE), plantas en suelo no estéril con las poblaciones nativas de HMA (SNE), plantas cultivadas con los inóculos de hongos micorrízicos arbusculares provenientes del Matorral Xerófito (M), de la localidad sucesional de 20 años (V) y de la localidad sucesional de dos años (D), y plantas inoculadas con el inóculo micorrízico foráneo *Acalulospora lacunosa* (L) (Tabla 7). Fueron incluidas cinco réplicas por cada combinación humedad-inóculo para un total de 60 plantas. Se establecieron cinco plantas adicionales por tratamiento (30 plantas), que luego de ser sometidas a sequía fueron re-irrigadas.

Las plántulas fueron sembradas en bolsas de polietileno de tres Kg de capacidad con suelo proveniente de una localidad recién perturbada por la explotación arenosa. Las plantas del tratamiento SNE no fueron cultivadas con inóculos concentrados de HMA, pero el suelo contenía las poblaciones naturales de hongos micorrízicos arbusculares. Las plantas del resto de los tratamientos

fueron cultivadas en suelo estéril con 50 g del inóculo respectivo, salvo el tratamiento CE.

**Tabla 7.** Tratamientos derivados del diseño experimental completamente aleatorizado, formado por una combinación factorial de dos condiciones de humedad y seis condiciones de inoculación. El primer factor tiene dos niveles (riego y sequía) y el segundo factor tiene 6 niveles (condiciones de inoculación con hongos micorrízicos arbusculares).

Factor Inóculo	Factor humedad del suelo	
	Riego	Sequía
<b>Control, estéril sin micorrizas (CE)</b>	R-CE	S-CE
<b>Control en suelo no estéril (SNE)</b>	R-SNE	S-SNE
<b>Matorral (M)</b>	R-M	S-M
<b>Parcela 20 años (V)</b>	R-V	S-V
<b>Parcela 2 años (D)</b>	R-D	S-D
<b><i>Acaulospora lacunosa</i> (L)</b>	R-L	S-L

Con el fin de garantizar la disponibilidad del inóculo natural de bacterias fijadoras de nitrógeno en todos los tratamientos, se agregó a todas las plantas 20 ml de una solución de nódulos provenientes de raíces de *P. carthagenensis* previamente cultivadas en suelo no estéril de la localidad sucesional de dos años. La solución se obtuvo macerando 40 g de nódulos frescos y diluyendo el macerado en 2000 ml de agua destilada.

Las plantas fueron cultivadas durante cuatro meses y veinte días (140 días) para garantizar el establecimiento de la colonización micorrízica, de acuerdo a los resultados obtenidos en la dinámica de colonización micorrízica con las distintas combinaciones suelo-inóculo (Figura 7). Durante su crecimiento fueron regadas con agua corriente cada dos días.

La sequía se estableció por suspensión del riego y todas las mediciones fueron realizadas al momento de observarse síntomas de marchites foliar. El contenido de agua en el suelo (CAS) se determinó por diferencia de peso de las macetas, tomando como referencia el peso de agua necesario para mantener el suelo de cada maceta al 100% de la capacidad de campo. Se observaron signos de marchites foliar en todos los tratamientos al alcanzar entre 0,035 y 0,080 g de agua  $\text{g}^{-1}$  de suelo seco, entre los doce y veinticinco días de suspensión del riego.

En las plantas re-irrigadas se determinaron únicamente parámetros de intercambio gaseoso 48 horas después de re-irrigar (apartado 6.5). Tanto en las plantas en riego como en las plantas en sequía se realizaron determinaciones de altura, diámetro (apartado 6.1.1) y área foliar total (apartado 6.1.2), de biomasa (tallo, hojas, raíz pivotante, raíces finas, relación vástago/raíz, y nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno, apartado 6.1.6), cuantificación de la colonización (apartado 6.2) y del índice de respuesta micorrízica (apartado 6.3), de relaciones hídricas (apartado 6.4) potencial hídrico ( $\Psi$ , apartado 6.4.2), potencial osmótico y potencial de turgencia ( $\Psi_s$ ,  $\Psi_t$ , apartado 6.4.3), potencial osmótico a máxima turgencia ( $\Psi_s^{100}$  apartado 6.4.5), ajuste osmótico ( $\Delta\Psi_s^{100}$  apartado 6.4.6), contenido relativo de agua (CRA, apartado 6.4.4) y conductancia hidráulica radical ( $K_r$ , apartado 6.4.7), mediciones de intercambio gaseoso ( $A$ ,  $E$ ,  $g_s$ ,  $C_i$ , EUA, apartado 6.5), y determinaciones de clorofilas y proteínas totales (apartados 6.6.1 y 6.6.2 respectivamente).

Se realizó una descripción cualitativa de la anatomía foliar de *P. carthagenensis* con hojas adultas de 5 plantas del tratamiento control estéril (CE) y del tratamiento M, únicamente bajo la condición de riego. Para ello se realizaron cortes a mano alzada de la sección media de la lámina foliar de muestras preservadas en alcohol. Se realizaron montajes en glicerina y una tinción con azul de toluidina acuosa. Las descripciones se realizaron con un microscopio óptico de luz y con un microscopio óptico de luz polarizada.

#### *Análisis Estadístico*

Los resultados fueron analizados a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías, con el programa SPSS versión 10.0. Se utilizó el test de Barlett como criterio para comprobar la homogeneidad de las varianzas. En los casos en que las varianzas no fueron homogéneas se realizaron transformaciones logarítmicas y de arcoseno. Se aplicó la prueba a posteriori de comparación de medias de diferencias mínimas significativas LSD ( $\alpha= 0,05$ ).

### **8.3. Resultados**

#### **8.3.1. Crecimiento:**

La inoculación micorrízica en plantas de *P. carthagenensis* produjo un incremento significativo en la altura y en el diámetro del tallo respecto a las plantas cultivadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), bajo la condición de riego (Tabla 8). Las plantas cultivadas con los inóculos nativos del matorral xerófito y de las localidades sucesionales de veinte y de dos años (inóculos M, V y D), mostraron diámetros de tallo significativamente mayores que las cultivadas con el inóculo foráneo *A. lacunosa* (Tabla 8).

Bajo la condición de sequía la altura de todas las plantas fue significativamente menor, con excepción de los tratamientos M y V, para los cuales no se observaron cambios significativos respecto a los valores en riego (Tabla 8). El diámetro del tallo disminuyó en una mayor magnitud en los tratamientos CE y SNE (29% y 34% respectivamente) respecto a sus valores en riego, y en menor magnitud en el tratamiento M (16,4%, Tabla 8). No se observaron cambios en el diámetro del tallo de los tratamientos V, D y L por efecto de la sequía (Tabla 8).

Al igual que la altura y el diámetro, el área foliar total fue significativamente mayor en las plantas cultivadas con los inóculos nativos (M, V y D) que en los demás tratamientos bajo la condición de riego (Tabla 8).

Bajo la condición de sequía, el área foliar total disminuyó significativamente en todos los tratamientos micorrizados, que incluyen tanto los tratamientos cultivados con los inóculos concentrados (M, V, D y L) como el

tratamiento cultivado en suelo no estéril (SNE); mientras que en el tratamiento cultivado en suelo estéril (CE) el área foliar total no cambió con la sequía (Tabla 8).

**Tabla 8.** Altura, diámetro, área foliar (AF) y área foliar específica (AFE) de plantas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de riego y sequía. Plantas no inoculadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), e inoculadas con los inóculos del matorral (M), de las parcelas de 20 años (V) y de dos años (D) y con *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

Humedad	Inoculación	Altura (cm)	Diámetro (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	AFE (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
Riego	CE	10 d	3,8 c	61,3 e	304,1 bc
	SNE	11 d	4,4 bc	136,4 c	341,5 b
	M	14,4 b	5,45 a	251,7 a	236,1 d
	V	16,5 a	5,8 a	416,3 a	222,8 d
	D	13,7 b	5,4 a	238,5 a	220,4 d
	L	13,6 b	4,9 b	188,7 b	272,2 c
Sequía	CE	7,5 e	2,7 d	50,7 e	259,4 c
	SNE	9,2 e	2,9 b	107,1 d	394,9 a
	M	13,5 b	4,6 b	170,5 bcd	302,9 c
	V	17,8 a	4,8 ab	141,3 c	321,5 b
	D	12,1 c	5,1 a	159,6 c	280,9 c
	L	11,8 c	4,3 b	140,8 cd	331,3 b
ANOVA					
Humedad (H)		*	*	***	***
Inoculación (I)		***	***	***	*
H x I		*	NS	**	NS

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

En plantas regadas, el área foliar específica (AFE) fue significativamente menor en las plantas cultivadas con los inóculos nativos M, V y D respecto a las plantas cultivadas con los inóculos CE, SNE y L (Tabla 8). Bajo la condición de sequía el AFE las plantas micorrizadas fue significativamente mayor respecto a sus valores en riego, mientras que en el tratamiento CE se mantiene igual en ambas condiciones de humedad del suelo (Tabla 8).

La biomasa total y la biomasa de los compartimientos tallo, hojas y raíz pivotante de las plantas bajo la condición de riego, fueron significativamente mayores en los tratamientos inoculados (M, V, D y L) respecto a los tratamientos no inoculados (Tabla 9). Los inóculos nativos (M, V y D) mostraron valores significativamente más altos de estos parámetros que el inóculo foráneo L (Tabla 9).

En las plantas inoculadas bajo la condición de sequía todos los parámetros de biomasa fueron significativamente menores respecto a los observados bajo la condición de riego, no así para las plantas del tratamiento CE, cuyos parámetros de biomasa no variaron con la sequía (Tabla 9). En las plantas del tratamiento SNE únicamente la biomasa total y la biomasa foliar disminuyeron significativamente respecto a las condiciones de riego (Tabla 9).

Durante todo el periodo de sequía se observó que la pérdida de hojas sucedió primero en las plantas de los tratamientos inoculados (M, V, D y L), seguidas por el tratamiento SNE. En las plantas cultivadas en suelo estéril (CE) la pérdida de hojas no fue significativa (Tabla 9).

**Tabla 9.** Biomasa de plantas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de riego y sequía. Plantas no inoculadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), e inoculadas con los inóculos del matorral (M), de las parcelas de 20 años (V) y de dos años (D) y con *A. lacunosa* (L).. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

Humedad	Inoculación	Biomasa total (g)	Biomasa tallo (g)	Biomasa hojas (g)	Biomasa raíz pivotante (g)	Biomasa raíces finas (g)	V/R
Riego	CE	2,16 e	0,81 e	0,61 e	0,36 cd	0,39 d	2,4 d
	SNE	1,94 e	0,61 e	0,96 d	0,24 de	0,12 e	5,06 a
	M	5,51 b	1,97 b	2,23 b	0,75 b	0,55 c	3,28 b
	V	7,59 a	2,51 a	2,85 a	1,35 a	0,88 ab	2,49 c
	D	6,07 b	1,84 b	2,23 b	1,1 a	0,9 b	2,04 d
	L	3,72 c	1,29 c	1,50 c	0,46 c	0,47 c	3,04 b
Sequía	CE	1,55 ef	0,64 e	0,45 e	0,24 d	0,21 de	2,42 d
	SNE	1,16 f	0,47 e	0,43 f	0,13 e	0,13 e	2,01 bc
	M	3,18 d	1,15 d	1,05 d	0,56 c	0,42 c	2,30 bc
	V	3,78 c	1,39 c	1,12 c	0,58 c	0,69 bc	2,00 bc
	D	4,62 bc	1,31 c	1,30 cd	0,63 c	1,38 a	1,57 d
	L	3,22 d	1,12 cd	1,11 d	0,47 c	0,52 c	2,25 c
ANOVA							
	Humedad (H)	***	*	***	**	*	*
	Inoculación (I)	***	***	***	**	**	*
	H x I	**	*	*	NS	*	NS

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

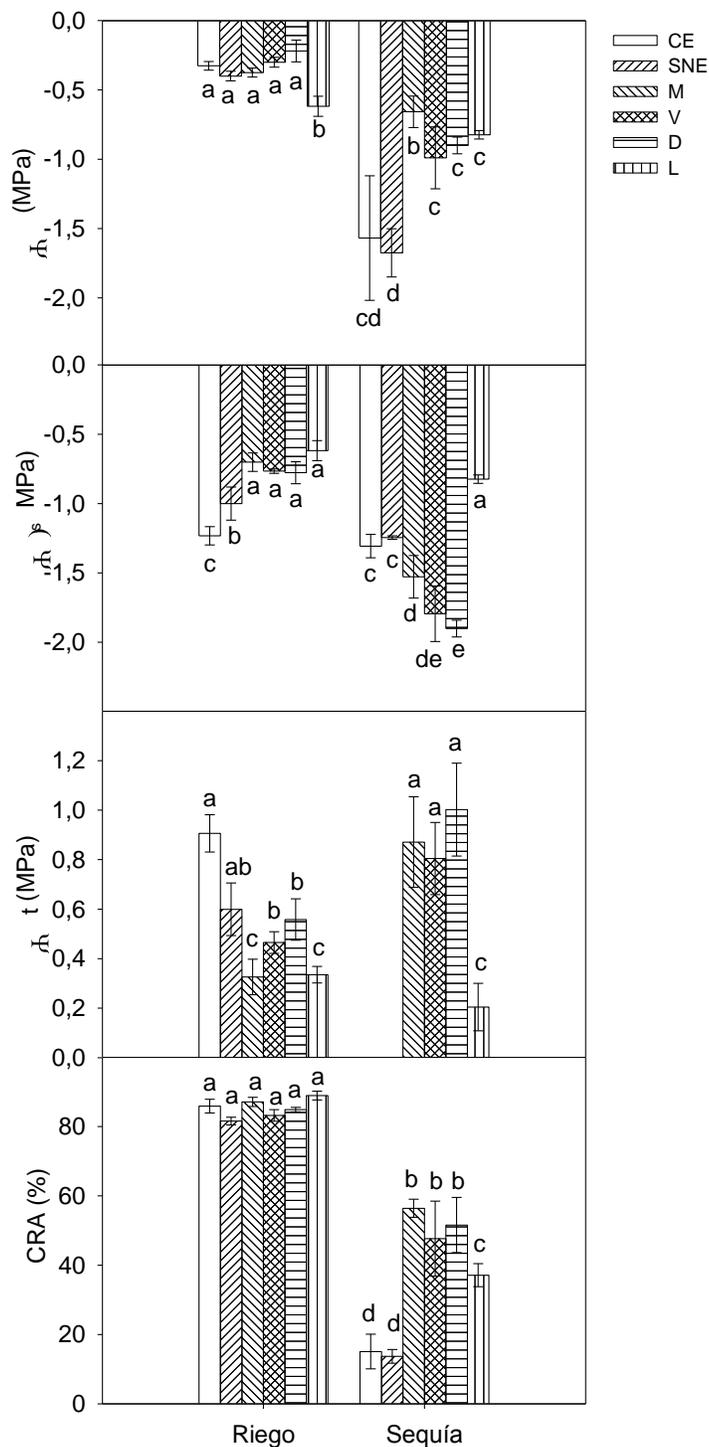
La biomasa de raíces finas bajo la condición de riego fue significativamente mayor en las plantas cultivadas con los inóculos M, V, D y L, que en el tratamiento CE (Tabla 9). Al comparar entre la condición de riego y la de sequía, se observó un incremento significativo en la biomasa de raíces finas en las plantas del tratamiento D, y el mantenimiento de este parámetro en los demás tratamientos (Tabla 9).

La relación vástago raíz (V/R) en plantas irrigadas fue significativamente mayor en los tratamientos M y L respecto a los tratamientos V y D (Tabla 9). Bajo la condición de sequía la relación V/R disminuyó significativamente respecto a la condición de riego únicamente en los tratamientos SNE y L, mientras que en el resto de los tratamientos se mantuvo igual en ambas condiciones de humedad del suelo (Tabla 9).

### **8.3.2. Relaciones hídricas:**

El contenido de agua en el tallo de las plantas irrigadas fue significativamente mayor en los tratamientos M, V y D (66,1- 70,7%) seguidos por el tratamiento L con un valor intermedio (64,2%), y por los tratamientos CE y SNE con los valores más bajos (62,9%).

En las plantas bajo la condición de riego no se observaron diferencias significativas en el  $\Psi$  de los distintos tratamientos, únicamente el tratamiento L mostró un valor significativamente bajo (Figura 10).



**Figura 10.** Potencia hídrico ( $\Psi$ ), potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) y contenido relativo de agua (CRA) en plantas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de riego y sequía. Plantas no inoculadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), e inoculadas con los inóculos del matorral (M), de las parcelas de 20 años (V) y de dos años (D) y con *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

Bajo la condición de sequía el  $\Psi$  disminuyó significativamente en todos los tratamientos respecto a sus valores en riego, sin embargo dicha disminución fue de mayor magnitud en los tratamientos no inoculados (alrededor de 1.3 MPa), respecto a la observada en los tratamientos inoculados (entre -0.55 y -0.70 MPa, Figura 10).

El  $\Psi_s$  fue significativamente más alto en los tratamientos inoculados en comparación con los no inoculados, mientras que el  $\Psi_t$  exhibió una tendencia opuesta (Tabla 2). El CRA permaneció constante (alrededor de 90%) en plantas irrigadas inoculadas y no inoculadas, (Figura 10).

Bajo condiciones de sequía el  $\Psi_s$  de las plantas cultivadas con los inóculos nativos M, V y D fue significativamente más bajo que en todos los demás tratamientos. El  $\Psi_t$  de los tratamientos M, V y D aumentó significativamente respecto a los valores observados en riego, y el CRA fue más alto en las plantas cultivadas con los inóculos nativos que en las cultivadas con el inóculo foráneo (Figura 10). Los tratamientos CE y SNE bajo condiciones de sequía mostraron valores de CRA menores a 15% (Figura 10).

El potencial osmótico a máxima turgencia ( $\Psi_s^{100}$ ) en plantas regadas fue significativamente mayor en los tratamientos inoculados respecto a los no inoculados (Tabla 10). Bajo la condición de sequía, sólo aquellas plantas cultivadas con los inóculos nativos (M, V y D) disminuyeron significativamente su  $\Psi_s^{100}$  y mostraron valores positivos de  $\Delta\Psi_s^{100}$ , indicando que hubo ajuste osmótico (Tabla 10). Las plantas de los tratamientos CE, SNE y L no mostraron ajuste osmótico bajo la condición de sequía (Tabla 10).

Los valores de conductancia hidráulica radical expresada por unidad de peso seco de raíces finas ( $K_{rRF}$ ) y por unidad de área foliar ( $K_{rAF}$ ) fueron significativamente mayores en los tratamientos inoculados que en los tratamientos CE y SNE bajo la condición de riego. Bajo la condición de sequía la  $K_{rRF}$  disminuyó significativamente en todos los tratamientos respecto a sus valores en riego, excepto en las plantas del tratamiento CE (Tabla 10). Las  $K_{rAF}$  de los tratamientos con inóculos nativos disminuyeron con la sequía, pero siempre fueron mayores que las de los tratamientos CE y SNE, en contraste la  $K_{rAF}$  de L no cambió con la sequía (Tabla 10).

### **8.3.3. Intercambio Gaseoso:**

La inoculación micorrízica y la condición de humedad del suelo tuvieron un efecto significativo sobre el intercambio gaseoso de *P. carthagenensis* (Figura 11). Bajo la condición de riego las plantas inoculadas mostraron valores significativamente mayores de A, E,  $g_s$  y EUA, respecto a las plantas no inoculadas (Figura 11). Los valores más altos de A se observaron en los tratamientos M y D, seguidos en orden decreciente por los tratamientos L, V, SNE y finalmente CE con el menor valor (Figura 11). Las variaciones observadas en la A bajo la condición de riego, estuvieron acompañadas con variaciones similares en la E y  $g_s$ , (Figura 11). La  $C_i$ , no varió significativamente entre tratamientos en plantas irrigadas (Figura 11).

Bajo la condición de sequía los valores de A, E y  $g_s$  de todos los tratamientos disminuyeron significativamente respecto a los valores observados en plantas irrigadas, y únicamente el tratamiento M mostró un valor de A

significativamente más alto respecto a los demás tratamientos (Figura 11). La  $C_i$  fue similar en todos los tratamientos tanto en riego como en sequía (Figura 11). Bajo la condición de reirrigación se produjo la recuperación de la A respecto a los valores en sequía, y los tratamientos inoculados mostraron valores más altos que los no inoculados, pero la capacidad fotosintética fue inferior a la observada bajo la condición de riego, con excepción de los tratamientos V y L (Figura 11). Los tratamientos CE y SNE no mostraron una recuperación de la tasa fotosintética con la reirrigación (Figura 11).

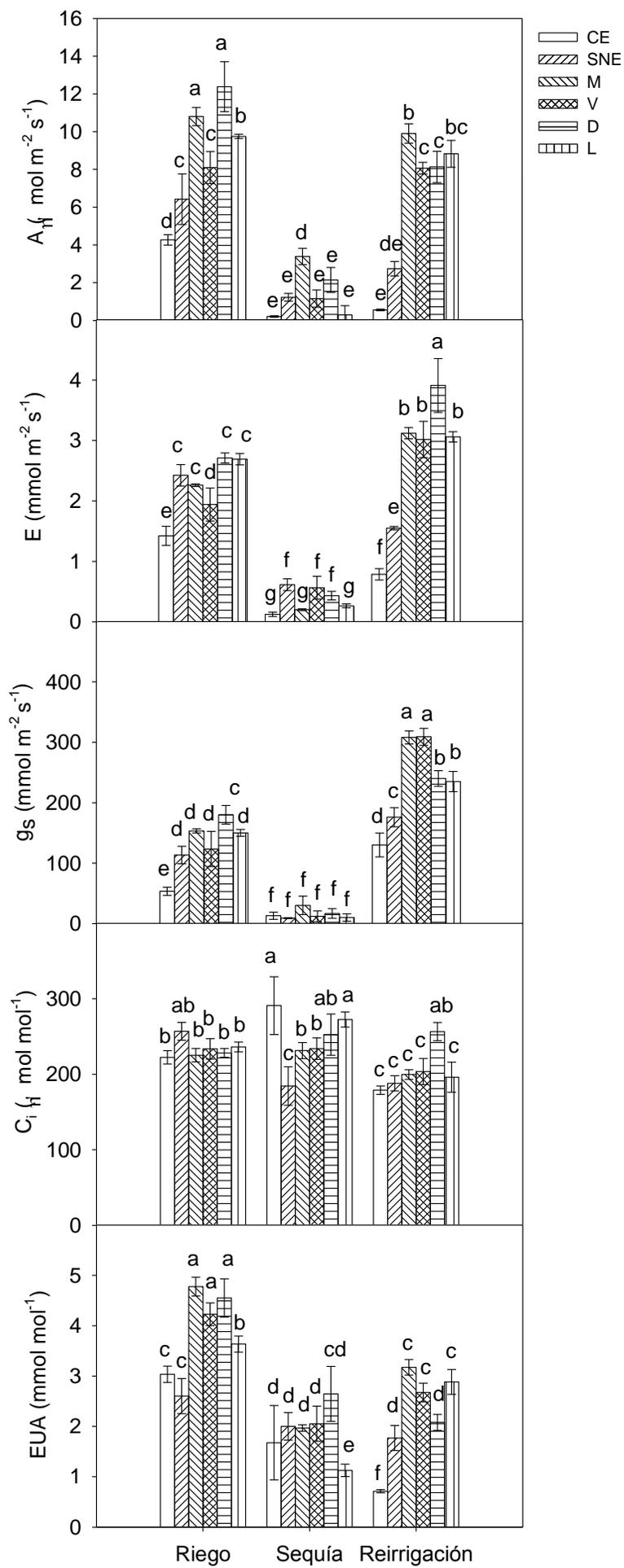
La E y la  $g_s$  de las plantas inoculadas bajo la condición de reirrigación fueron significativamente mayores que la de plantas no inoculadas, y la  $g_s$  aumentó significativamente con la reirrigación en todos los tratamientos respecto a la condición de riego (Figura 11). La  $C_i$  mostró una disminución de pequeña magnitud en todos los tratamientos re-irrigados respecto a los valores en riego y sequía (Figura 11).

La EUA de las plantas inoculadas bajo la condición de riego fue significativamente más alta respecto a las plantas no inoculadas, y los tratamientos M, V y D exhibieron los mayores valores, en comparación con el tratamiento L (Figura 11). Bajo la condición de sequía la EUA fue significativamente menor que en riego, y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, excepto para L que mostró el menor valor (Figura 11).

**Tabla 10.** Potencial osmótico a máxima turgencia ( $\Psi_s^{100}$ ), ajuste osmótico ( $\Delta\Psi_s^{100}$ ), y conductancia hidráulica radical expresada por unidad de peso seco de raíces finas ( $K_{r,RF}$ ) y por unidad de área foliar ( $K_{r,AF}$ ) en plantas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de riego y sequía. Plantas no inoculadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), e inoculadas con los inóculos del matorral (M), de las parcelas de 20 años (V) y de dos años (D) y con *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

Humedad	Inoculación	$\Psi_s^{100}$	$\Delta\Psi_s^{100}$	$K_{r,RF}$	$K_{r,AF}$
Riego	CE	-1,06 d	—	0,36 c	1,16 c
	SNE	-0,82 c	—	0,63 b	0,45 d
	M	-0,61b	—	1,00 a	2,11 b
	V	-0,64 b	—	0,90 a	0,37 d
	D	-0,66 bc	—	1,13 a	4,47 a
	L	-0,55 b	—	1,03 a	2,47 b
	Sequía	CE	-0,73 bc	-0,33	0,24 cd
SNE		-0,29 a	-0,53	0,15 d	0,33 d
M		-0,85 c	0,24	0,46 bc	1,51 bc
V		-0,92 cd	0,28	0,47 bc	1,57 bc
D		-0,99 cd	0,33	0,21 d	1,20 c
L		-0,31 a	-0,24	0,31 cd	1,75 bc
ANOVA					
	Humedad (H)	***	—	***	**
	Inoculación (I)	**	—	***	**
	H x I	**	—	NS	*

**Figura 11.** Intercambio gaseoso de plantas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de riego, sequía y reirrigación en vivero. Plantas no inoculadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), e inoculadas con los inóculos del matorral (M), de las parcelas de 20 años (V) y de dos años (D) y con *A. lacunosa* (L). Fotosíntesis instantánea (A), transpiración (E), conductancia estomática ( $g_s$ ), concentración intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) y eficiencia de uso de agua (EUA). RFA=  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

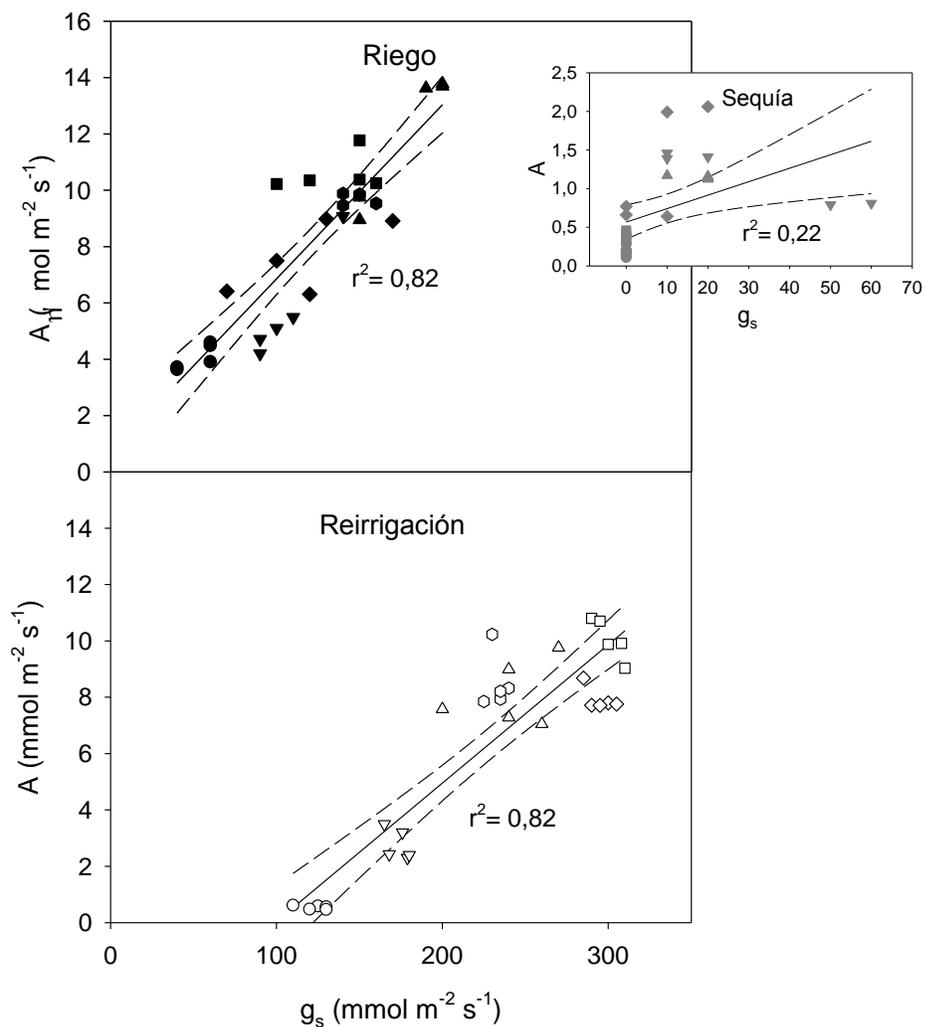


Con la reirrigación, la EUA aumentó en los tratamientos M, V y L y disminuyó significativamente en el tratamiento CE, respecto a los valores observados en sequía, sin alcanzar los valores observados en los tratamientos regados (Figura 11).

Se observó una relación lineal significativa entre  $A$  y  $g_s$  bajo condiciones de riego y reirrigación (Figura 12). Bajo la condición de sequía la relación lineal no fue significativa (Figura 12).

#### **8.3.4. Proteínas solubles y clorofilas totales:**

Las proteínas solubles totales (PST) y las clorofilas totales se muestran en la Tabla 11. Bajo la condición de riego las plantas cultivadas con los inóculos nativos (M, V y D) presentaron una concentración de PST significativamente más alta que la observada en los tratamientos CE, SNE y L (Tabla 11). Bajo la condición de sequía disminuyeron en los tratamientos CE, M y V, y no variaron en SNE, D y L respecto a sus valores en riego (Tabla 11).



**Figura 12.** Relación entre tasa de fotosíntesis instantánea ( $A$ ) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) de plantas de *P. carthagenensis* sujetas a riego (símbolos negros), sequía (símbolos grises) y re-irrigación (símbolos blancos). Plantas no inoculadas en suelo estéril (círculos) y en suelo no estéril (triángulo invertido), e inoculadas con los inóculos del matorral (cuadrado), de las parcelas de 20 años (rombo) y de dos años (triángulo) y con *A. lacunosa* (hexágono). Se incluyen las líneas de regresión (continuas), los intervalos de confianza (líneas punteadas,  $p < 0,05$ ) y los valores del coeficiente de determinación para cada condición.

La concentración de clorofilas totales fue significativamente mayor en los tratamientos V y D, respecto a los tratamientos M y L, y estos valores fueron a su vez más altos que en SNE y CE (Tabla 11). Bajo la condición de sequía las clorofilas totales disminuyeron en todos los tratamientos, y las plantas cultivadas con los inóculos nativos mostraron los mayores valores, seguidos del inóculo L, SNE y CE (Tabla 11).

### **8.3.5. Colonización micorrízica y biomasa de nódulos:**

El porcentaje de colonización por micorrizas arbusculares en todos los tratamientos inoculados y en el tratamiento SNE fue superior al 77% y no hubo un efecto significativo de la sequía sobre este parámetro (Tabla 12). Las plantas del tratamiento CE no presentaron colonización micorrízica (Tabla 12). En ambas condiciones de humedad del suelo el tratamiento L mostró porcentajes de colonización significativamente más altos respecto a los demás tratamientos (95-96%), seguido por los tratamientos M y V con valores intermedios (85-90%), y por los tratamientos SNE y D con los menores valores (77-82%) (Tabla 12).

**Tabla 11.** Proteínas solubles totales (PST) y clorofilas totales de plantas de *P. carthagenensis* bajo condiciones de riego y sequía. Plantas no inoculadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), e inoculadas con los inóculos del matorral (M), de las parcelas de 20 años (V) y de dos años (D) y con *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

Humedad	Inoculación	PST (g m <sup>-2</sup> )	Clorofilas totales (µg cm <sup>-2</sup> )
Riego	CE	1,01 ± 0,08 bc	17,7 ± 0,3 h
	SNE	1,02 ± 0,09 bc	26,4 ± 0,7 g
	M	1,49 ± 0,20 a	48,1 ± 1,8 d
	V	1,41 ± 0,12 a	60,4 ± 1,5 b
	D	1,36 ± 0,10 a	67,8 ± 1,3 a
	L	1,09 ± 0,08 bc	54,1 ± 1,1 c
Sequía	CE	0,61 ± 0,07 d	12,1 ± 0,4 j
	SNE	1,13 ± 0,06 b	17,3 ± 0,5 i
	M	1,03 ± 0,04 c	39,9 ± 1,1 e
	V	0,97 ± 0,06 c	40,2 ± 1,5 e
	D	1,24 ± 0,11 ab	56,3 ± 1,3 c
	L	0,94 ± 0,03 c	35,6 ± 0,9 f
ANOVA			
	Humedad (H)	**	***
	Inoculación (I)	***	***
	H x I	**	**

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

**Tabla 12.** Colonización por micorrizas arbusculares (MA), índice de respuesta micorrizica (IRM), biomasa de nódulos y relación entre el peso seco de nódulos y el peso seco de las plantas, bajo condiciones de riego y sequía. Plantas no inoculadas en suelo estéril (CE) y en suelo no estéril (SNE), e inoculadas con los inóculos del matorral (M), de las parcelas de 20 años (V) y de dos años (D) y con *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

Humedad	Inoculación	Colonización MA (%)	Arbúsculos (%)	Vesículas (%)	IRM	Nódulos (mg)	Nódulo/planta
Riego	CE	0	0	0	—	65,0 e	0,042 ab
	SNE	79,3 c	30,6 d	39,9 d	-10,9 e	78,3 d	0,045 ab
	M	87,7 b	67,3 a	56,6 c	64,1 b	154,8 ab	0,027 bc
	V	89,7 b	52,6 b	31,7 e	73,1 a	185,0 a	0,024 cd
	D	80,1 c	46,9 b	26,1 ef	66,5 b	121,5 b	0,020 d
	L	96,0 a	67,4 a	67,5 b	45,8 d	148,0 ab	0,041 ab
Sequía	CE	0	0	0	—	35,3 f	0,021 c
	SNE	81,6 bc	54,4 b	46,1 d	-30,0 f	62,0 e	0,053 a
	M	84,8 b	58,0 b	50,8 d	51,3 c	92,25 c	0,029 c
	V	87,0 b	58,1 b	33,2 e	55,8 c	148,75 ab	0,042 b
	D	77,1 c	40,6 c	21,5 f	62,3 bc	125,0 ab	0,031 bc
	L	94,6 a	29,4 d	73,2 a	53,7 c	94,5 c	0,026 c
ANOVA							
Humedad (H)		NS	**	*	*	***	*
Inoculación (I)		**	**	***	**	**	NS
H x I		NS	NS	*	NS	*	NS

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

El porcentaje de colonización por arbuscúlos en las plantas bajo la condición de riego varió significativamente entre los distintos tratamientos, con valores altos en M (67,3%) y L (67,4%), valores intermedios en V (52,6%) y D (46,9%) y el menor valor en el tratamiento SNE (30,6%). La condición de sequía aumentó significativamente el porcentaje de arbuscúlos en el tratamiento SNE, produjo una disminución de pequeña magnitud en los tratamientos M y D (6-9%) y una disminución de mayor magnitud en el tratamiento L (38%) respecto a sus valores en riego, mientras que para el tratamiento V dicho porcentaje no varió con la sequía (Tabla 12).

La colonización por vesículas mostró una tendencia similar a la colonización por arbuscúlos en plantas bajo la condición de riego, con valores significativamente altos para los tratamientos M y L respecto a los tratamientos V, D y SNE (Tabla 12). La sequía disminuyó significativamente la colonización por vesículas en el tratamiento M y no produjo ningún efecto en los tratamientos SNE, V y D respecto a sus valores en riego, mientras que el tratamiento L mostró un aumento significativo en el porcentaje de vesículas por efecto de la sequía (Tabla 12).

El índice de respuesta micorrízica (IRM) bajo la condición de riego fue significativamente mayor en las plantas cultivadas con los inóculos nativos, en comparación con el IRM del inóculo foráneo L (Tabla 12). Bajo la condición de sequía el IRM disminuyó significativamente respecto a los valores en riego de cada tratamiento, con la excepción del tratamiento D que presentó valores

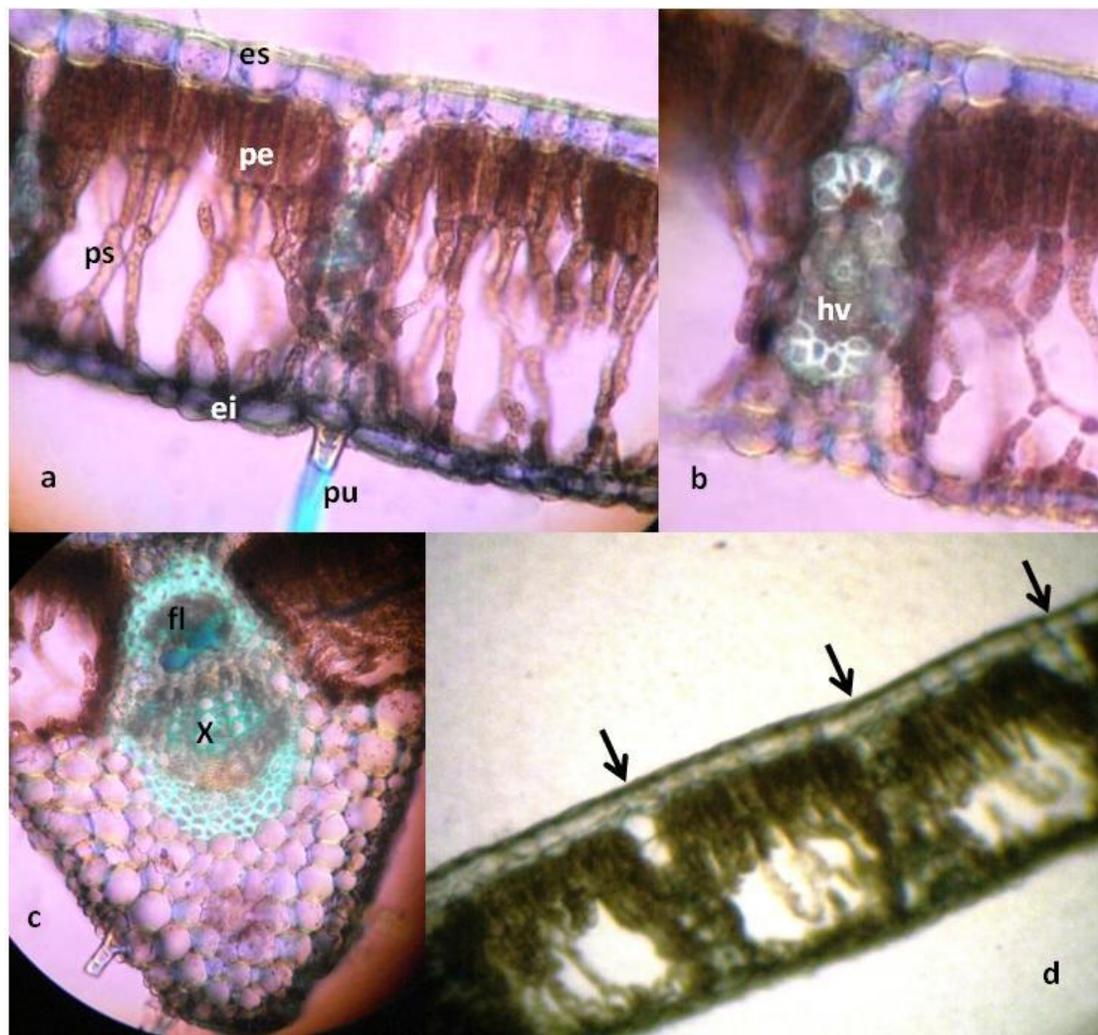
similares en ambas condiciones de humedad (Tabla 12). El IRM del tratamiento SNE fue negativo en ambas condiciones de humedad del suelo (Tabla 12).

En todos los tratamientos de este experimento se formaron nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno, incluyendo el tratamiento CE (Tabla 12). Las plantas cultivadas con los distintos inóculos de HMA bajo la condición de riego, exhibieron los mayores valores de peso seco de nódulos, mientras que las plantas de los tratamientos SNE y CE mostraron los más bajos (Tabla 12). En la condición de sequía el peso seco de nódulos de los tratamientos V y D no varió significativamente respecto a sus valores en riego, mientras que en los demás tratamientos la biomasa de nódulos disminuyó con la sequía (Tabla 12).

La relación biomasa de nódulos/ biomasa total en plantas regadas fue significativamente menor en los tratamientos M, V y D respecto a los tratamientos CE y SNE (Tabla 12), mientras que bajo la condición de sequía los tratamientos SNE y V mostraron mayores valores que los tratamientos CE, M, D y L (Tabla 12).

#### **8.3.6. Anatomía foliar de *P. carthagenensis*:**

El corte transversal de la hoja mostró una hoja bifacial con epidermis uniestratificada en ambas superficies, constituida por células poligonales de paredes redondeadas y presencia de cutícula. La epidermis adaxial es más gruesa que la epidermis abaxial. La hoja es hipoestomática (los estomas sólo están presentes en la cara abaxial de la hoja), con estomas de 2 ó 3 células anexas o acompañantes, en el mismo plano del resto de las células de la epidermis inferior (Figura 13).



**Figura 13.** Descripción anatómica foliar de *P. carthagenensis*. a) Se observa la epidermis superior más gruesa (es) en comparación con la epidermis inferior (ei), el parénquima en empalizada compacto de una sola capa (pe), el parénquima esponjoso con espacios intercelulares (ps) y un pelo uniseriado (pu). b) Detalle de haz vascular de nervadura secundaria (hv). c) Nervadura central de la hoja con floema (fl), xilema (x) y casquetes de esclerénquima (células de paredes engrosadas en color azul claro). d) Disposición regular de los haces vasculares tipo columnar en el mesófilo formando “cámaras”.

El mesófilo está constituido por un parénquima en empalizada uniestratificado con células alargadas y dispuestas compactamente en la cara adaxial y un parénquima esponjoso de 2 a 3 estratos de células dispuestos de tal manera que forma grandes espacios intercelulares (Figura 13).

Las células de parénquima esponjoso asociadas al parénquima en empalizada presentan forma de embudo. Ambos tejidos contienen muchos cloroplastos. La nervadura central está representada por un haz vascular colateral abierto rodeado de casquetes de fibras (figura 13).

Se observaron haces vasculares secundarios tipo columnar, dispuestos regularmente formando “cámaras” en el mesófilo (Figura 13). La epidermis abaxial presenta pelos largos uniseriados, cada uno con células basales cortas (de 1 a 5 células), acompañadas de una célula terminal alargada (Figura 13).

No se encontraron diferencias anatómicas foliares cualitativas que coincidieran con las diferencias en el área foliar específica observadas entre plantas inoculadas y no inoculadas.

#### 8.4. Discusión

El incremento en la altura, el diámetro del tallo, el área foliar y la biomasa de las plantas inoculadas de *P. carthagenensis* con respecto a las no inoculadas, y la mayor eficiencia de los inóculos nativos respecto al inóculo foráneo bajo condiciones de riego, coincide con lo reportado en el Capítulo I, donde las plantas cultivadas en suelo estéril de dos años con el inóculo de *A. lacunosa* mostraron un menor desarrollo que las cultivadas con los inóculos nativos. A diferencia de las tendencias observadas en el Capítulo I el efecto del inóculo del matorral sobre la mayoría de los parámetros morfométricos de *P. carthagenensis* fue similar al observado con el inóculo de dos años.

Bajo la condición de sequía se observó una menor biomasa total de las plantas inoculadas respecto a las plantas en riego, la cual se debió principalmente a la abscisión foliar, en contraste con la menor pérdida de hojas o ausencia de abscisión en los tratamientos no inoculados. Estos resultados coinciden con lo observado en especies leñosas como *Rosa hybrida* y *Anthyllis cytisoides*, (Davies *et al.* 1996; Goicoechea *et al.* 2004), y son considerados como una ventaja de la inoculación micorrízica, ya que la disminución de la biomasa aérea a través de la abscisión foliar es una estrategia característica de plantas evasoras de la sequía, que permite la reducción de la pérdida de agua, favorece la redistribución de recursos y aumenta la tasa de sobrevivencia de la planta (Munné-Bosch & Alegre 2004).

La disminución de la biomasa total de las plantas cultivadas con los inóculos nativos observada con la sequía, se produjo por la pérdida de hojas, por la disminución de la biomasa del tallo y de la raíz pivotante. Este resultado

coincidió con el mantenimiento de valores similares de biomasa de raíces finas en ambas condiciones de humedad, y con el aumento de la biomasa de raíces finas en el tratamiento D. Esta tendencia podría indicar el retraslado de biomasa desde el tallo y desde la raíz pivotante hacia la sustitución de las raíces finas afectadas por la sequía o hacia la producción de más raíces finas, favorecido posiblemente por la presencia de la simbiosis micorrízica. En este sentido se ha reportado que los hongos micorrízicos arbusculares pueden alterar la arquitectura del sistema radical de sus plantas hospederas (Auge, 2004).

Aunque en el presente estudio no se realizaron determinaciones cuantitativas de diámetro y longitud radical, se observó que las plantas inoculadas presentaron una mayor proporción de raíces de pequeño diámetro en comparación con las no inoculadas, y este efecto fue más evidente en el tratamiento D. Se han reportado incrementos en la intensidad de las ramificaciones de las raíces laterales de primer orden (Azcón-Aguilar *et al.* 1996), y en el número y longitud de raíces de *Annona cherimola* (Padilla & Encina 2005), así como también inducciones simultáneas en la producción de raíces finas (<0,4 mm de diámetro) y en la reducción de raíces gruesas (0,6-1,2 mm de diámetro) en *Poncirus trifoliata* como respuesta a la inoculación con HMA (Yao *et al.* 2009).

Los valores de área foliar específica (AFE) observados en *P. carthagenensis* son considerados valores altos, característicos de hojas con una alta productividad, vida corta, adaptadas a ambientes con alta disponibilidad de nutrientes y vulnerable a los herbívoros, en contraste con hojas de bajo AFE, que funcionan mejor en suelos pobres, donde la retención y captura de recursos

es la mayor prioridad (Wilson *et al.* 1999). El menor AFE observado en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas del presente estudio tanto en riego como en sequía, indica que se produjo un aumento en el grosor de la hoja como respuesta a la inoculación con HMA (especialmente con los HMA nativos). Este resultado coincide con el aumento del peso foliar específico en plantas inoculadas de *A. cytisoides* y *Erythrina variegata* respecto a plantas no inoculadas, el cual es interpretado como un aumento de la adaptación a ambientes xéricos producido por la simbiosis micorrízica (Busquest *et al.* 2010; Manoharan *et al.* 2010).

Los altos valores de diámetro, biomasa y contenido de agua en el tallo de las plantas cultivadas con los inóculos nativos, podrían deberse a una mayor proporción de tejido almacenador de agua en el tallo, lo cual implicaría una mayor reserva hídrica durante el periodo de sequía. La disminución del diámetro del tallo en el tratamiento M bajo la condición de sequía respecto a su valor en riego podría indicar traslado de agua hacia las hojas contribuyendo al mantenimiento de potenciales hídricos más altos durante la sequía en este tratamiento.

La descripción anatómica de la hoja de *P.carthagenensis* indica que esta no presenta caracteres xeromorfos foliares típicos, por lo que podría considerarse fundamentalmente mesomorfa. Por otro lado, la presencia de paquetes de extensiones de la vaina del haz que se proyectan como costillas en ambas superficies de la lámina foliar formando compartimientos, son caracteres típicos de hojas heterobáricas (Wylie, 1951; Terashima, 1992). Este tipo de hojas difiere no solo en sus características estructurales respecto a las hojas

que poseen un mesófilo relativamente homogéneo (hojas homobáricas), sino también difieren en sus características funcionales y mecánicas, ya que estas extensiones permiten un mayor soporte a la lámina foliar protegiéndola de la deshidratación, actúan como conductos de agua (Terashima, 1992; Roth-Nebelsick et al. 2001).

El alto contenido de agua del tallo (63-71% del peso fresco del tallo) y la abscisión foliar como respuesta a la sequía, permiten clasificar a *P. carthagenensis* entre los grupos funcionales de Borchert, como un árbol de madera ligera con alto contenido de agua en el tallo (Borchert, 1994). Estos árboles son en su mayoría pioneros, con altos requerimientos de luz, ocupan localidades rocosas abiertas muy secas, presentan una baja densidad de madera ( $<0,5 \text{ g cm}^{-3}$ ), un contenido de agua del tallo excepcionalmente alto (52-69% del peso fresco del tallo) y un extensivo tejido parenquimático no lignificado en sus tallos (Borchert, 1994, Lima & Rodal, 2010).

La inoculación con hongos micorrízicos nativos tuvo una importante influencia en las relaciones hídricas de *P. carthagenensis* bajo la condición de sequía ya que se observó ajuste osmótico y un aumento en el  $\Psi_t$  foliar respecto a la condición de riego, únicamente en las plantas cultivadas con los inóculos provenientes del mosaico sucesional (tratamientos M, V y D). Muchas de las respuestas de las plantas a la sequía, se producen por cambios en la fitohormona ácido abscísico (ABA), cuyo efecto protector promueve primeramente el cierre estomático para evitar la pérdida de agua por transpiración, además de promover la activación de genes estrés-inducibles que

colectivamente incrementan la tolerancia a la sequía (Bray 2002, Zhang *et al.* 2006).

Dado que la conductancia estomática ( $g_s$ ) disminuyó significativamente en todos los tratamientos bajo la condición de sequía, posiblemente los estomas de *P. carthagenensis* presenten una alta sensibilidad al estrés hídrico independientemente de la presencia de la simbiosis. Es posible que en los tratamientos M, V y D se produjera una amplificación de la señal de estrés a través de la producción de mayores cantidades de ABA en respuesta a la desecación del suelo, favoreciendo además el ajuste osmótico (Duan *et al.* 1996). Un mayor transporte de ABA de raíces a vástagos explicaría también la mayor incidencia de abscisión foliar en plantas inoculadas en respuesta a la sequía.

El contenido de agua del suelo proveniente de la localidad sucesional de dos años utilizado en este experimento, varió entre 0,035 y 0,080 g de agua  $g^{-1}$  de suelo seco, los cuales equivalen probablemente a  $\Psi$  menores a -1,5 MPa, tomando en cuenta su textura areno-francosa (terraGIS, 2011). Bajo estas condiciones, los valores de  $\Psi$  foliar observados en los tratamientos M, V y D (entre -0,5 y -1,0 MPa), no favorecen un flujo positivo de agua desde el suelo seco a la planta, por lo que es posible que el ajuste osmótico observado en estos tratamientos durante la sequía favorezca la incorporación de agua a la hoja desde los tejidos almacenadores presentes en el tallo, en lugar de favorecer la incorporación del agua desde el suelo.

El aumento en el  $\Psi_t$  conjuntamente con la disminución del CRA observado en plantas cultivadas con los inóculos nativos bajo la condición de sequía, podría indicar que hubo una reducción de la elasticidad de la pared celular en dichos tratamientos (aumento en el módulo de elasticidad). El aumento en la rigidez de las paredes celulares en especies que presentan ajuste osmótico, puede ser necesaria para mantener la integridad del tejido en periodos de rehidratación posteriores al estrés hídrico (Clifford *et al.* 1998). El mantenimiento de la integridad estructural y bioquímica del tejido foliar bajo condiciones de sequía es favorable en ecosistemas secos, aún si es mantenida por unos pocos días más de lo que normalmente es esperado, ya que provee a la planta de una mayor ventaja competitiva ante precipitaciones impredecibles (Clifford *et al.* 1998). La aclimatación al déficit hídrico por sequía, producido por la simbiosis micorrízica a través del incremento en la rigidez de las paredes celulares, ha sido reportada en el arbusto *R. hybrida* inoculada con *Glomus intrarádices* y *Glomus desertícola* (Augé *et al.* 1987<sup>b</sup>).

Los mayores valores de conductancia hidráulica expresada por unidad de biomasa de raíces finas ( $K_{rRF}$ ) y por unidad de área foliar ( $K_{rAF}$ ) observados en plantas inoculadas bajo la condición de riego, podrían interpretarse como una mayor eficiencia en la incorporación de agua producida por la simbiosis MA, para el mantenimiento de un balance hídrico adecuado en plantas de mayor tamaño, ya que el  $\Psi$  y el CRA fue similar en todos los tratamientos independientemente de la condición de inoculación. La  $K_{rAF}$  es una medida de la suficiencia de incorporación de agua para la transpiración y la fotosíntesis, y el

aumento observado en este parámetro en plantas inoculadas indica que la conductancia hidráulica radical se ajustó a los cambios en el área foliar producidos por la inoculación, para soportar una mayor tasa de transpiración (Kyllo *et al.* 2003).

Bajo la condición de sequía los valores de  $K_{rRF}$  y  $K_{rAF}$  disminuyeron en todos los tratamientos donde hubo micorrizas, tanto en las plantas cultivadas en suelo no estéril (SNE) como en las plantas inoculadas (M, V, D y L), lo cual podría estar relacionado con el efecto de la simbiosis micorrízica sobre la regulación de algunos de los genes que codifican para la expresión de canales proteicos intrínsecos de la membrana plasmática que aumentan la permeabilidad al agua, denominados aquaporinas (Ruiz-Lozano *et al.* 2006). Las aquaporinas tienen un papel importante en el control del transporte de agua de célula a célula y se ha observado que la presencia de MA disminuye la expresión de los genes que codifican para su producción en las raíces durante la sequía (regulación negativa), lo cual es considerado como un mecanismo que limita la pérdida de agua de las células durante el estrés hídrico (Smart *et al.* 2001; Ruiz-Lozano *et al.* 2006). A pesar de la reducción de la conductancia hidráulica radical con la sequía, se observó una mayor  $K_{rAF}$  en plantas inoculadas, lo cual posiblemente incremento los valores de  $\Psi$  y CRA observados en estas plantas.

Otro factor que posiblemente influyó en la disminución de la  $K_{rRF}$  y  $K_{rAF}$  con la sequía, pudo ser la disminución la capacidad de agregación del suelo por parte de las hifas del micelio externo de MA (Fitter, 1985; Gonzalez-Dugo,

2009). La capacidad de agregación del micelio externo, previene la pérdida de conductancia hidráulica suelo-raíz en suelos secos, y puede verse afectada negativamente en suelos con alto contenido de arena (Gonzalez-Dugo, 2009), como el que fue utilizado en el presente estudio. Así, el rápido descenso del contenido de agua producido por la sequía aunado al aumento de la compactación posiblemente dañó la integridad del micelio disminuyendo su efecto sobre la conductancia hidráulica radical (Goicoechea *et al.* 2004).

Algunos de los resultados discutidos hasta ahora, señalan que *P. carthagenensis* presenta mecanismos de resistencia a la sequía similares a los encontrados en algunas especies adaptadas a ecosistemas semiáridos, como *A. cytisoides* y *Rosmarinus officinalis* (Goicoechea *et al.* 2004, Sanchez-Blanco *et al.* 2004). *A. cytisoides* disminuye su crecimiento, mantiene valores de CRA > 50%, aumenta la senescencia foliar y realiza ajuste osmótico únicamente en plantas inoculadas bajo condiciones de sequía (Goicoechea *et al.* 2004), exhibiendo un doble mecanismo de resistencia que le permite evadir la sequía a través de la defoliación, al mismo tiempo que tolera la sequía mediante el ajuste osmótico. De manera similar el arbusto *Rosmarinus officinalis*, disminuye significativamente sus valores de  $\Psi$ , CRA y  $K_{RF}$  por efecto de la sequía, pero esta disminución es de menor magnitud en plantas inoculadas con HMA, respecto a plantas no inoculadas, resaltando que el efecto de la simbiosis micorrízica se produce fundamentalmente como un aumento en la capacidad de sus hospederos para evadir la sequía (Sánchez-Blanco *et al.* 2004).

La alta colonización micorrízica observada en todos los tratamientos inoculados del presente estudio posiblemente produjo un aumento del sumidero del compartimiento radical, incrementando su demanda de carbono y con ello la producción de biomasa de los órganos fotosintéticamente activos de la planta (Jacobsen & Rosendahl, 1990; Wright *et al.* 1998; Augé, 2001). Esta alta colonización coincidió además con mayores tasas de  $A$  y  $g_s$  que en plantas no micorrizadas, indicando que la colonización micorrízica puede mejorar la capacidad de intercambio gaseoso a través del mantenimiento de la apertura estomática por cambios en la fitohormona ABA (Bray, 2002). Además de estos efectos, el incremento en la  $A$  producido por las MA podría deberse al incremento en la incorporación de nutrientes tales como P (Black *et al.* 2000).

*P. carthagenensis* disminuyó significativamente los valores de  $g_s$  en todos los tratamientos bajo la condición de sequía, independientemente de las diferencias en biomasa producidas por la inoculación micorrízica, contrario a lo observado en otros estudios donde la simbiosis MA mantiene valores de  $g_s$  más altos que sus contrapartes no inoculadas durante el estrés hídrico (Augé, 2001). Esta tendencia indica que el cierre estomático constituye un mecanismo importante de regulación de la respuesta fotosintética durante el déficit hídrico en *P. carthagenensis*.

Aunque la relación entre  $A$  y  $g_s$  de las plantas reirrigadas señala que el 82% de los cambios en la tasa fotosintética son explicados por los cambios en la  $g_s$ , la  $g_s$  alcanzó valores mayores a los de riego sin que la  $A$  lograra recuperarse, indicando que los factores no estomáticos de la fotosíntesis podrían tener más peso sobre la respuesta fotosintética de la planta.

Por otro lado, la ausencia de recuperación de la A en los tratamientos no inoculados (CE y SNE) a pesar del incremento en la  $g_s$  en estos tratamientos, indican que la inoculación con inóculos concentrados de HMA favorece el mantenimiento de la integridad del aparato bioquímico. La presencia de una mayor concentración de clorofilas totales en los tratamientos inoculados bajo condiciones de sequía posiblemente influyó la capacidad de recuperación de estas plantas en el periodo de reirrigación.

Con relación a la eficiencia de cada inóculo, el mayor valor de A y EUA observado en plantas inoculadas con los inóculos nativos M y D bajo la condición de riego, podría deberse a una mayor eficiencia simbiótica de los HMA presentes en dichos inóculos. Únicamente las plantas del tratamiento M mostraron una mayor tasa de fotosíntesis bajo la condición de sequía, lo que podría representar una ventaja en una planta caducifolia como *P. carthagenensis*, ya que el mantenimiento de una tasa fotosintética baja en numerosas hojas próximas a senescer podría ser significativa para la productividad en términos globales.

La alta colonización MA observada en todas las plantas micorrizadas indican un alto potencial infectivo de las micorrizas presentes tanto en el suelo recién perturbado (SNE) como en los inóculos producidos en el laboratorio. El comportamiento del tratamiento SNE fue similar al observado en el control estéril en la mayoría de los parámetros de crecimiento evaluados, a pesar de presentar un alto porcentaje de colonización micorrízica. Este comportamiento se reflejó también en las relaciones hídricas y en el intercambio gaseoso de este tratamiento, indicando que posiblemente las poblaciones de HMA presentes en

el suelo perturbado poseen una eficiencia simbiótica baja para *P. carthagenensis*, en comparación con los HMA presentes en los inóculos producidos en el laboratorio. La presencia de un porcentaje de arbusculos menor en SNE respecto al reportado en los tratamientos M, V, D y L bajo la condición de riego, podría apoyar la hipótesis de una menor eficiencia simbiótica de los HMA presentes en el suelo recién perturbado.

La presencia de nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno en el tratamiento CE indica que la solución de nódulos frescos fue efectiva como inoculante, y que la formación de nódulos es un proceso que se desarrolla independientemente de la presencia de micorrizas arbusculares, pero la nodulación en ausencia de micorrización no produce un efecto positivo en el crecimiento y en la respuesta fisiológica de *P. carthagenensis*. En este caso podría haber un alto costo de mantenimiento de la simbiosis con *Rhizobium* que es compensado por la simbiosis micorrízica. La simbiosis MA favorece la formación de nódulos de *Rhizobium*, ya que este proceso demanda tres veces más fósforo y energía que el crecimiento del tejido radical, produciendo una mayor dependencia de la asociación micorrízica (Olivera *et al.* 2004). Estos resultados coinciden con los reportados en un meta-análisis de la respuesta de 12 leguminosas a la inoculación con *Rhizobium* y MA, el cual indicó que la inoculación con combinaciones adecuadas de ambos simbioses produce la estimulación de la fotosíntesis por incremento en el sumidero de carbono, lo cual aumenta la productividad de las leguminosas (Kaschuk *et al.* 2010).

Aunque en la práctica no es posible separar cuantitativamente el efecto de las MA del efecto de los nódulos de rizobios sobre la respuesta de la planta,

no se observaron diferencias significativas en la relación nódulos/biomasa total entre las plantas control (sin micorrizas, con rizobios) y las inoculadas (con micorrizas y rizobios), por lo que se podría suponer que se mantuvo la proporcionalidad del efecto de la simbiosis con rizobios en todos los tratamientos.

El inóculo del matorral xerófito (tratamiento M), reunió algunos atributos que podrían significar una mayor compatibilidad funcional de este inóculo con *P. carthagenensis*, como un mayor porcentaje de arbusculos, mayor relación vástago/raíz en ambas condiciones de humedad del suelo, y mayores valores de potencial hídrico y de fotosíntesis bajo condiciones de sequía. Por otro lado, la inoculación con el hongo foráneo *A. lacunosa* no resultó tan ventajosa para la planta como el uso de inóculos nativos, ya que a pesar de producir efectos positivos en algunos parámetros de crecimiento e intercambio gaseoso, este tratamiento mostró el potencial hídrico más bajo en plantas regadas, no exhibió ajuste osmótico bajo condiciones de sequía (por lo que el potencial de turgencia fue bajo) y presentó menos clorofilas totales que los tratamientos nativos en ambas condiciones de humedad.

Los resultados presentados hasta ahora, indican que aún cuando *P. carthagenensis* presenta una serie de mecanismos intrínsecos que le permiten evadir la sequía (cierre estomático, presencia de un tallo acumulador de agua y abscisión foliar), la disminución del estrés nutricional mediante la inoculación con HMA nativos fue favorable para aumentar la capacidad evasora a través un mayor crecimiento antes de la sequía y de la capacidad de realizar ajuste osmótico durante la sequía. Así la asociación con hongos micorrízicos nativos o

autóctonos posiblemente mejor adaptados a la sequía, ha demostrado ser la estrategia más favorable para mejorar la resistencia a la sequía de *P. carthagenensis* bajo condiciones de invernadero.

### 8.5. Conclusiones:

- La mayor abscisión foliar observada en las plantas inoculadas durante la sequía (abscisión foliar) es una estrategia característica de plantas evasoras de la sequía que permite la reducción de la pérdida de agua, favorece la redistribución de recursos y aumenta la tasa de sobrevivencia de la planta.
- Los altos valores de diámetro, biomasa y contenido de agua en el tallo de las plantas cultivadas con los inóculos nativos, podrían deberse a una mayor proporción de tejido almacenador de agua en el tallo, lo cual implicaría una mayor reserva hídrica durante el periodo de sequía.
- La inoculación con hongos micorrízicos nativos tuvo una importante influencia en las relaciones hídricas de *P. carthagenensis* bajo la condición de sequía ya que se observó ajuste osmótico y un aumento en el  $\Psi_t$  foliar respecto a la condición de riego.
- El aumento en el  $\Psi_t$  conjuntamente con la disminución del CRA observado en plantas cultivadas con los inóculos nativos durante la sequía, podría indicar que hubo una reducción de la elasticidad de la pared celular en dichos tratamientos que posiblemente mantiene la integridad del tejido en periodos de rehidratación posteriores al estrés hídrico, lo cual es favorable en ecosistemas secos, aún si es mantenida por unos pocos días más de lo que normalmente es esperado, ya que provee a la planta de una mayor ventaja competitiva ante precipitaciones impredecibles.

- Los mayores valores de conductancia hidráulica expresada por unidad de biomasa de raíces finas ( $K_{rRF}$ ) y por unidad de área foliar ( $K_{rAF}$ ) observados en plantas inoculadas bajo la condición de riego, podrían interpretarse como una mayor eficiencia en la incorporación de agua producida por la simbiosis MA, para el mantenimiento de un balance hídrico adecuado en plantas de mayor tamaño.
- Bajo la condición de sequía los valores de  $K_{rRF}$  y  $K_{rAF}$  disminuyeron en todos los tratamientos donde hubo micorrizas, lo cual podría estar relacionado con el efecto de la simbiosis sobre la regulación de algunos de los genes que codifican para la expresión de canales proteicos intrínsecos de la membrana plasmática que aumentan la permeabilidad al agua (aquaporinas).
- Únicamente las plantas de *P. carthagenensis* inoculadas presentaron mecanismos de resistencia a la sequía similares a los encontrados en algunas especies adaptadas a ecosistemas semiáridos, como la disminución del crecimiento, el mantenimiento de valores de  $CRA > 50\%$ , el aumento de la senescencia foliar y el ajuste osmótico, exhibiendo un doble mecanismo de resistencia que le permite evadir la sequía a través de la defoliación, al mismo tiempo que tolera la sequía mediante el ajuste osmótico.
- *P. carthagenensis* disminuyó significativamente los valores de  $g_s$  en todos los tratamientos bajo la condición de sequía, independientemente de las diferencias en biomasa producidas por la inoculación micorrízica, lo cual

posiblemente indica que el cierre estomático constituye un mecanismo importante de regulación de la respuesta fotosintética durante el déficit hídrico en *P. carthagenensis*.

- La mayor tasa de fotosíntesis del tratamiento M bajo la condición de sequía podría representar una ventaja en una planta caducifolia como *P. carthagenensis*, ya que el mantenimiento de una tasa fotosintética baja en numerosas hojas próximas a senescer podría ser significativa para la productividad en términos globales.
- La presencia de nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno en el tratamiento CE indica que la solución de nódulos frescos fue efectiva como inoculante, pero la nodulación en ausencia de micorrización no produce un efecto positivo en el crecimiento y en la respuesta fisiológica de *P. carthagenensis*.
- Aunque *P. carthagenensis* presenta una serie de mecanismos intrínsecos que le permiten evadir la sequía (cierre estomático, presencia de un tallo acumulador de agua y abscisión foliar), la disminución del estrés nutricional mediante la inoculación con HMA nativos fue favorable para aumentar la capacidad evasora a través un mayor crecimiento y de la capacidad de realizar ajuste osmótico durante la sequía.

### **9. CAPÍTULO III**

**Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares sobre el crecimiento, sobrevivencia, fotosíntesis y relaciones hídricas de *Piscidia carthagenensis* Jacq. en una localidad de bosque seco perturbado por la minería.**

### **9.1. Introducción**

El clima árido con un prolongado periodo de sequía, aunado a las condiciones adversas de las localidades perturbadas por la minería en la Península de Macanao (alto porcentaje de fragmentos de roca, condiciones físicas y químicas pobres, baja disponibilidad de fósforo y nitrógeno, bajo contenido de materia orgánica, altos valores de pH y altas temperaturas superficiales), representan un reto para el establecimiento de plantaciones de árboles con fines de restauración. La eliminación de propágulos de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) es frecuentemente un factor limitante en el proceso de regeneración natural de la vegetación después de una perturbación de mediano y gran impacto (Cuenca *et al.* 1998; Allen *et al.* 2005), sin embargo, estos pueden ser incorporados o inoculados exitosamente a la rizósfera de plantas que tengan una etapa de vivero antes de ser transplantadas al campo (Cuenca *et al.* 2003).

Bajo condiciones adversas similares en otras regiones áridas y semiáridas del mundo se ha observado que la inoculación con HMA es un pre-requisito para garantizar el crecimiento, la resistencia a la sequía y la sobrevivencia de leguminosas nativas en áreas degradadas (Herrera *et al.* 1993; Palenzuela *et al.* 2002; Allen *et al.* 2005). En un ensayo realizado con leguminosas exóticas y nativas en un área degradada del Mediterráneo, se encontró que solamente las especies nativas sobrevivieron a las condiciones ambientales locales y respondieron positivamente a la colonización con HMA

(Herrera *et al.* 1993). De manera similar la inoculación de arbustos nativos de la misma región con el hongo micorrízico *Glomus intraradices* indujo un mayor desarrollo del micelio externo y un incremento del contenido de nutrientes en los tejidos vegetales después de ocho meses de crecimiento en suelos perturbados (Palenzuela *et al.* 2002).

En proyectos de restauración ecológica con fines de conservación, se han reintroducido inóculos nativos de HMA provenientes de diferentes etapas sucesionales para facilitar la recuperación de bosques deciduos y aumentar su resiliencia (Allen *et al.* 2003), poniendo de manifiesto la importancia de la fuente del inóculo en la respuesta de crecimiento de árboles nativos. Se han señalado efectos que varían en el tiempo, como el de un inóculo sucesional temprano dominado por especies del género *Glomus*, que produjo un mayor crecimiento durante el primer año, y que posteriormente fue superado por un inóculo del bosque maduro de mayor diversidad, en el segundo año de crecimiento en campo (Allen *et al.* 2005). Se ha reportado que el uso de inóculos nativos colectados localmente son igual o más efectivos en incrementar el crecimiento y productividad de las plantas que los inóculos foráneos conformados por una sola especie de HMA (Requena *et al.* 2001; Caravaca *et al.* 2005), y por ello el uso de inóculos producidos en el ámbito local podría representar una alternativa económica y ecológicamente más adecuada que el uso de inoculantes comerciales foráneos de HMA (Pellegrino *et al.* 2011).

Entre las principales limitaciones del uso de especies nativas para la reforestación de zonas áridas y semiáridas del mundo, se encuentra el lento

crecimiento que reportan estas especies en comparación con árboles exóticos seleccionados y el desconocimiento sobre los métodos de establecimiento más adecuados para las distintas condiciones ecológicas y sobre la fisiología de las especies nativas, fundamentalmente en lo que se refiere a la resistencia al estrés hídrico (Cony, 1995).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto a largo plazo de diferentes combinaciones suelo-inóculo provenientes del mosaico sucesional de matorral xerófito y del inóculo foráneo *A. lacunosa* sobre el crecimiento, sobrevivencia, relaciones hídricas e intercambio gaseoso de plantas de *P. carthagenensis* sembradas en una localidad recién perturbada por la minería, incluyendo tres periodos consecutivos de lluvia, sequía y recuperación de la sequía (segundo periodo de lluvias).

## 9.2. Materiales y Métodos

Este experimento estuvo conformado por 15 tratamientos establecidos por una combinación de tres tipos de suelos (factor suelo) y de cinco condiciones de inoculación (factor inóculo). Los suelos utilizados, provenientes del matorral (Mat), de las parcelas sucesionales de veinte años (Va) y de dos años (Da), no fueron esterilizados, por lo que presentaban poblaciones naturales de microorganismos. Las condiciones de inoculación fueron: Plantas no inoculadas (NI), inoculadas con HMA nativos provenientes del matorral (M), de las localidades sucesionales de 20 años (V) y dos años (D), e inoculadas con el HMA foráneo *A. lacunosa* (L). En la Tabla 13 se observan los tratamientos derivados del diseño experimental de campo.

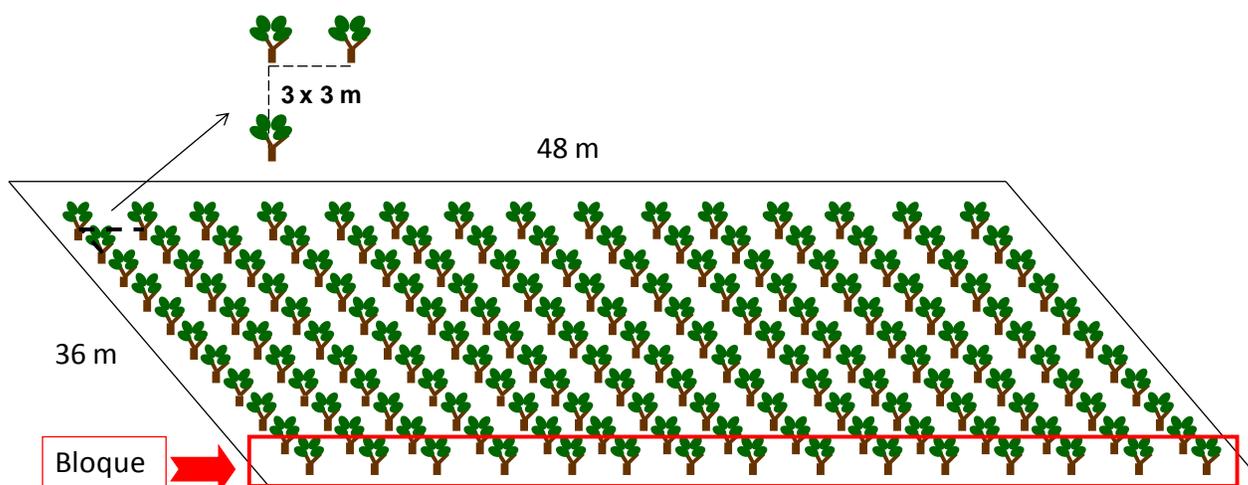
**Tabla 13.** Tratamientos derivados de la combinación de tres tipos de suelo no estériles y cinco condiciones de inoculación del experimento de campo. El primer factor tiene tres niveles (suelos de tres etapas sucesionales contrastantes) y el segundo factor tiene 5 niveles (condiciones de inoculación con hongos micorrízicos arbusculares).

Factor Inóculo	Factor Suelo (no estéril)		
	Matorral (Mat)	Parcela sucesional 20 años (Va)	Parcela sucesional 2 años (Da)
<b>Control no inoculado (NI)</b>	Mat-NI	Va-NI	Da-NI
<b>Matorral (M)</b>	Mat-M	Va-M	Da-M
<b>Parcela 20 años (V)</b>	Mat-V	Va-V	Da-V
<b>Parcela 2 años (D)</b>	Mat-D	Va-D	Da-D
<b><i>Acaulospora lacunosa</i> (L)</b>	Mat-L	Va-L	Da-L

Para evaluar el efecto de las 15 combinaciones suelo-inóculo sobre el crecimiento, la sobrevivencia y la respuesta a la sequía de *P. carthagenensis* en campo, se estableció una parcela de 1728 m<sup>2</sup> con 165 plantas (11 réplicas por tratamiento) en una localidad degradada por la minería en la Península de Macanao,

Las plantas fueron previamente cultivadas desde la etapa de plántula en bolsas de polietileno de tres kilos bajo los diferentes tratamientos, en un vivero establecido en la arenera La Chica. Luego de cinco meses de crecimiento en el vivero las 165 plantas fueron sembradas en la localidad degradada, utilizando un diseño de bloques al azar. Se incorporó aleatoriamente una réplica de cada uno de los 15 tratamientos en cada bloque con una distancia entre plantas de 3 x 3 m (Figura 14).

**Figura 14.** Diseño de siembra en campo mostrando la orientación de los bloques lineales. El área de la parcela experimental fue de 1728 m<sup>2</sup> con 165 plantas.



En la Figura 15 se muestra el aspecto general de la parcela seleccionada antes de la siembra y de las plantas distribuidas en bloques lineales listas para sembrar. Al momento de la siembra se conservó el suelo en el cual se cultivo cada planta, es decir, no se realizó la siembra de las plantas a raíz desnuda (Figura 15).

El momento de siembra en campo es considerado como  $t=0$  (Tabla 14). Las plantas fueron regadas dos veces por semana durante los tres primeros meses hasta el inicio del primer periodo de lluvias. A los 4 meses se realizó la primera medición después de la siembra. A los 9, 11 y 17 meses de crecimiento en campo se realizaron las mediciones correspondientes a los periodos consecutivos de lluvia, sequía y recuperación de la sequía (la recuperación corresponde al segundo periodo de lluvias).

La sequía tuvo una duración de cuatro meses consecutivos (meses 11, 12, 13 y 14 de siembra en campo) y las mediciones se realizaron al inicio del periodo de sequía, específicamente a los 17 días de haber finalizado las lluvias (Tabla 14). En la Figura 15 se muestra el aspecto general de la parcela y de las plantas a los 9, 11 y 17 meses de crecimiento en campo.

En el transcurso del periodo de sequía se produjo la pérdida total de las hojas de todos los árboles del experimento. La producción y expansión completa de nuevas hojas tardó dos meses y medio aproximadamente desde el inicio del segundo periodo de lluvias (Tabla 14).



**Figura 15.** Aspectos generales del proceso de siembra. a) Localidad perturbada seleccionada para el establecimiento de la parcela experimental. b) Ubicación de las plantas en un diseño de bloques al azar justo antes de la siembra. c) siembra de una planta conservando el suelo en el cual se cultivó la planta en el vivero. c) Planta a los cuatro meses de crecimiento en campo. d) Mediciones a los cuatro meses de crecimiento.



### *Mediciones al momento de la siembra*

Al momento de la siembra se evaluó el porcentaje de colonización micorrízica en raíces finas de cinco réplicas por tratamiento (apartado 6.2), y se realizaron mediciones de altura, diámetro basal del tallo (apartado 6.1.1) y medidas intercambio gaseoso entre las 9:00 y 11:00 am (apartado 6.5) en 7 réplicas por tratamiento.

### *Mediciones después de la siembra*

A los 4, 9, 11 y 17 meses después de la siembra, se realizaron mediciones de altura y diámetro en 7-9 réplicas por tratamiento (apartado 6.1.1). A los 9, 11 y 17 meses se midieron parámetros de relaciones hídricas e intercambio gaseoso en 4 réplicas por tratamiento. El potencial hídrico ( $\Psi$ ) se midió entre las 6:00 y las 8:00 am (apartado IV.4.2), se congelaron los folíolos medidos para determinar el potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) y el potencial de turgencia ( $\Psi_t$  apartado 6.4.3). El contenido de agua foliar (CAF) se determinó en otro folíolo de la misma hoja compuesta (apartado 6.4.4).

La fotosíntesis instantánea (A), La transpiración (E), la conductancia estomática ( $g_s$ ), la concentración intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), y la eficiencia de uso de agua (EUA), se midieron entre las 9:00 y las 11:00 am (apartado 6.5). La radiación fotosintéticamente activa (RFA) no varió significativamente entre las temporadas de lluvia y sequía y fue de  $1456,4 \pm 42,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\pm\text{ES}$ ).

La tasa de sobrevivencia se determinó mediante la relación entre el número de individuos vivos al final de cada censo y la cantidad de plantas

sembradas inicialmente para cada tratamiento (Krebs, 1999). Se realizaron censos a los 4, 9 y 17 meses después de la siembra.

#### *Análisis Estadístico*

La colonización micorrízica, el intercambio gaseoso y las relaciones hídricas al momento de la siembra se analizaron con un ANOVA multivariado (MANOVA) de dos vías. Se aplicó la prueba a posteriori de comparación de medias de LSD ( $\alpha=0,05$ ).

La altura y el diámetro de las plantas al momento de la siembra ( $t=0$ ) y a los 4, 9, 11 y 17 meses de crecimiento en campo, se analizaron por separado para cada uno de los periodos con un ANOVA de dos vías. Se aplicó la prueba a posteriori de comparación de medias de LSD ( $\alpha=0,05$ ).

Los datos de intercambio gaseoso y relaciones hídricas en lluvia (9 meses) y sequía (11 meses) se analizaron conjuntamente a través de un MANOVA de tres vías. Este análisis incluyó 9 variables dependientes ( $\Psi$ ,  $\Psi_s$ ,  $\Psi_t$ , CAF, A, E,  $g_s$ ,  $C_i$  y EUA) y la interacción de las tres fuentes de variación: temporada (lluvia y sequía), suelo de siembra (Mat, Va y Da) y condición de inoculación: NI, M, V, D y L. Para evaluar las medidas multivariadas de asociación, se utilizó el estadístico Lambda de Wilks ( $\lambda$ ). Todas las variables presentaron homogeneidad de varianzas con la prueba de Cochran (Anexo I), excepto el potencial osmótico, el cual no se incluyó en el análisis. Se aplicó la prueba a posteriori de comparación de medias de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). Los datos de intercambio gaseoso y relaciones hídricas a los 17 meses

(recuperación de la sequía), se analizaron con un MANOVA de dos vías. Se aplicó la prueba a posteriori de comparación de medias de LSD ( $\alpha = 0,05$ ).

### **9.3. Resultados**

#### **9.3.1. Colonización micorrízica al momento de la siembra**

En el ANOVA de dos vías que se realizó para comprobar el efecto de los factores suelo e inóculo sobre la colonización micorrízica (CMA), únicamente se observó un efecto significativo del factor inóculo sobre este parámetro ( $p < 0,05$ , Tabla 15).

Tanto las plantas inoculadas como las no inoculadas presentaron colonización micorrízica, pero los valores de colonización de los tratamientos M, D y L fueron significativamente mayores que en el tratamiento NI (Tabla 15). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de arbusculos e hifas entre tratamientos, pero la colonización por vesículas fue significativamente mayor en plantas inoculadas que en las no inoculadas (Tabla 15). Las plantas de los tratamientos D y L mostraron el mayor valor de colonización por vesículas, seguidas por los tratamientos M y V (Tabla 15).

#### **9.3.2. Intercambio gaseoso al momento de la siembra**

El intercambio gaseoso al momento de la siembra en campo (cinco meses de cultivo en el vivero de la arenera La Chica), se muestra en la Tabla 16. El suelo de siembra, las condiciones de inoculación y la interacción suelo x inóculo tuvieron un efecto significativo sobre algunos parámetros de intercambio gaseoso (Tabla 16).

**Tabla 15.** Colonización por micorrizas arbusculares (CMA), arbusculos, vesículas e hifas, al momento de la siembra en campo ( $t=0$ ). Bajo cinco condiciones de inoculación: Plantas no inoculadas (NI), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) y con inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los 15 tratamientos ( $p<0.05$ ) utilizando el test de LSD.

Inoculación	CMA (%)	Arbusculos (%)	Vesículas (%)	Hifas (%)
NI	65,7 ± 5,1 b	20,1 ± 1,1 a	15,1 ± 2,5 c	30,4 ± 2,9 a
M	89,6 ± 3,3 a	24,6 ± 1,7 a	33,7 ± 2,3 b	31,3 ± 1,4 a
V	79,7 ± 11,6 ab	24,3 ± 3,7 a	28,7 ± 2,7 b	26,7 ± 2,5 a
D	94,2 ± 9,8 a	22,1 ± 3,3 a	46,9 ± 11,8 a	25,1 ± 10,1 a
L	91,5 ± 11,9 a	26,2 ± 5,3 a	37,7 ± 10,2 ab	27,9 ± 9,5 a

**Tabla 16.** Intercambio gaseoso al momento de la siembra ( $t=0$ ). Fotosíntesis instantánea (A), transpiración (E), conductancia estomática ( $g_s$ ) y eficiencia de uso de agua (EUA), a una RFA natural promedio de  $1750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las plantas fueron previamente cultivadas en suelos no estériles del Matorral (Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Va) y de la parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no inoculadas (NI), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) y con inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los 15 tratamientos ( $p<0.05$ ) utilizando el test de LSD. Se muestran resultados del ANOVA de dos vías con los p-valores.

Suelo	Inóculo	A ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	E ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	EUA ( $\text{mmol mol}^{-1}$ )
Mat	NI-control	3,35 b	2,21 bc	35,71 b	151,01 b	2,23 a
	M	5,76 a	3,49 ab	67,14 ab	174,39 ab	2,25 ab
	V	5,48 ab	3,28 b	62,86 ab	195,04 a	1,93 ab
	D	5,98 a	4,52 a	95,71 a	179,53 ab	2,01 ab
	L	2,36 bc	2,03 bc	34,29 bc	202,51 a	1,77 bc
Va	NI-control	1,85 c	1,09 cd	15,71 c	176,27 ab	1,59 bc
	M	3,74 b	1,93 c	32,86 b	142,11 b	1,88 b
	V	4,16 ab	2,68 bc	47,14 b	151 b	1,57 c
	D	4,07 ab	2,88 bc	55,71 b	169,23 b	1,35 d
	L	4,5 ab	3,08 b	65,71 ab	202,76 a	1,33 cde
Da	NI-control	1,61 c	1,61 c	17,14 c	174,04 b	1,41 cde
	M	3,66 b	0,79 d	32,86 b	147,84 b	1,83 bc
	V	3,21 b	1,87 c	45,71 b	147,29 b	1,71 bc
	D	3,76 b	1,67 c	34,29 b	178,79 ab	1,32 de
	L	2,8 bc	1,43 c	35,71 b	204,99 a	0,99 e
ANOVA						
	Suelo (S)	*	***	*	NS	***
	Inóculo (I)	*	**	*	*	**
	S x I	*	*	NS	NS	NS

Todas las plantas inoculadas cultivadas en los suelos Va y Da, mostraron valores de  $A$  y  $g_s$  significativamente mayores que las plantas no inoculadas, mientras que en el suelo Mat únicamente los tratamientos Mat-M y Mat-D mostraron tasas de  $A$  significativamente mayores que el tratamiento Mat-NI (Tabla 16).

La  $E$  fue significativamente menor en las plantas cultivadas en el suelo Da que en los demás suelos, mientras que los tratamientos Mat-D y Mat-M mostraron los mayores valores de  $E$  (Tabla 16).

El suelo de siembra no tuvo un efecto significativo sobre la  $C_i$ , y únicamente los tratamientos inoculados Mat-V y Mat-L y Da-L mostraron valores de  $C_i$  significativamente más altos que los tratamientos no inoculados Mat-NI y Da-NI (Tabla 16).

Tanto el suelo de siembra como las condiciones de inoculación tuvieron un efecto significativo sobre la EUA (Tabla 16). Las plantas cultivadas en el suelo Mat mostraron los valores más altos de EUA que las cultivadas en los suelos Va y Da, excepto para el tratamiento Mat-L (Tabla 16). En los suelos Va y Da no se observaron diferencias significativas en la EUA de plantas inoculadas y no inoculadas (Tabla 16).

### ***9.3.3. Altura y diámetro de las plantas desde el momento de la siembra hasta los 17 meses de crecimiento.***

La inoculación micorrízica no tuvo un efecto significativo sobre la altura de las plantas al momento de la siembra en campo ( $t=0$ ), únicamente se observó un efecto del suelo de siembra (Tabla 17).

**Tabla 17.** Altura de las plantas (cm) desde el momento de la siembra ( $t=0$ ) y a los 4, 9, 11 y 17 meses de crecimiento en campo. Las plantas fueron previamente cultivadas en suelos no estériles del Matorral (Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Va) y de la parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no inoculadas (NI), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) y con inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los 15 tratamientos ( $p<0.05$ ) utilizando el test de LSD. Se muestran resultados del ANOVA de dos vías con los p-valores.

Suelo	Inóculo	Meses después de la siembra				
		0	4	9	11	17
Mat	NI-control	18,1 b	92,5 b	179,7 ab	180,3 ab	190,0 c
	M	21,3 a	66,8 c	148,8 bc	152,2 bc	183,9 c
	V	16,3 bc	92,1 bc	162,6 b	169,1 ab	168,6 cd
	D	17,2 b	72,8 c	134,6 c	137,9 c	182,2 c
	L	17,6 bc	85,9 bc	156 b	159,7 b	212,4 c
Va	NI-control	14,7 bc	42,5 d	162,7 b	165,2 b	179,4 c
	M	15,8 bc	65,9 bc	175,3 a	180,4 a	201,1 bc
	V	14,8 c	117,6 ab	151,4 b	159,9 b	164,3 d
	D	14,9 c	77,1 bc	194,8 a	196,2 a	235,9 b
	L	11,4 d	86,1 bc	136,7 c	139,3 c	161,3 c
Da	NI-control	15,4 bc	48,7 d	155 b	157,9 b	173,0 cd
	M	14,9 bc	69,1 bc	181,8 a	189,4 a	301,2 a
	V	15,7 bc	126,8 a	187,1 a	185,7 a	239,5 b
	D	14,9 bc	79,4 b	172,9 a	186,4 a	227,0 b
	L	14,6 c	94,7 b	199 a	200,1 a	223,9 b
ANOVA						
Suelo (S)		*	*	*	*	*
Inóculo (I)		NS	*	**	***	**
S x I		NS	NS	*	*	*

\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$

Las plantas de los tratamientos Mat-NI, Mat-M y Mat-D mostraron valores mayores de altura que todos los demás tratamientos al momento de la siembra (Tabla 17).

A los 4, 9 y 11 meses de siembra, se observó una mayor altura en las plantas inoculadas que en las NI, únicamente en las plantas previamente cultivadas en los suelos sucesionales, mientras que en el suelo Mat las plantas inoculadas con M, V y D mostraron valores de altura iguales o significativamente menores al observado en las plantas NI (Tabla 17). En el suelo Va, las plantas inoculadas con los inóculos nativos mostraron valores de altura significativamente mayores que las inoculadas con el inóculo foráneo L, a los 9 y 11 meses de crecimiento (Tabla 17).

A los 17 meses de crecimiento se observaron valores de altura significativamente mayores en las plantas inoculadas en el suelo Da, con el mayor valor en el tratamiento Da-M (Tabla 17). En las plantas previamente cultivadas en el suelo Va el tratamiento Va-D mostró una altura significativamente mayor que en el tratamiento Va-NI, mientras que en el suelo Mat no se observaron diferencias significativas entre plantas inoculadas y NI (Tabla 17).

El diámetro basal del tallo desde el momento de la siembra hasta los 17 meses de crecimiento se muestra en la Tabla 18. Se observó un efecto significativo del factor suelo al momento de la siembra y a los cuatro meses de crecimiento en campo, pero a partir de los nueve meses de crecimiento no se observó un efecto significativo de este factor (Tabla 18).

**Tabla 18.** Diámetro basal del tallo (mm) desde el momento de la siembra (t=0) y a los 4, 9, 11 y 17 meses de crecimiento en campo. Las plantas fueron previamente cultivadas en suelos no estériles del Matorral (Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Va) y de la parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no inoculadas (NI), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) y con inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los 15 tratamientos ( $p < 0.05$ ) utilizando el test de LSD. Se muestran resultados del ANOVA de dos vías con los p-valores.

		Meses después de la siembra				
Suelo	Inóculo	0	4	9	11	17
Mat	NI-control	7,9 bc	19 b	39,2 ab	38 a	54,4 b
	M	9,1 a	19,7 b	39 ab	39,3 a	50,6 bc
	V	7,6 bc	19,8 b	38,5 ab	39 a	51,4 bc
	D	7,7 b	16,2 c	35,4 bc	41,3 a	54,4 b
	L	7,2 bc	18,8 bc	35,4 bc	36,5 a	52,6 b
Va	NI-control	7,5 bc	16,3 c	37,2 b	24,8 b	63 ab
	M	8,2 bc	18,8 b	40 ab	40,3 a	54,4 b
	V	7,0 c	23,0 a	32,2 c	36,7 a	42,8 c
	D	7,9 b	16,9 bc	39,1 b	36,3 a	47,9 bc
	L	7,6 bc	18,1 bc	38,2 ab	38,9 a	64,7 ab
Da	NI-control	6,0 d	15,2 c	36,0 b	30,6 b	58,6 b
	M	6,1 d	20,7 ab	39,3 a	39,1 a	51,2 b
	V	7,2 bc	22,9 a	41,4 a	39,4 a	65,9 a
	D	7,5 bc	17,2 bc	34,8 bc	38,2 a	57,5 ab
	L	6,7 c	18,3 bc	41,7 a	39,7 a	63,2 a
ANOVA						
Suelo (S)		*	*	NS	NS	NS
Inóculo (I)		*	*	*	*	*
S x I		NS	NS	NS	NS	NS

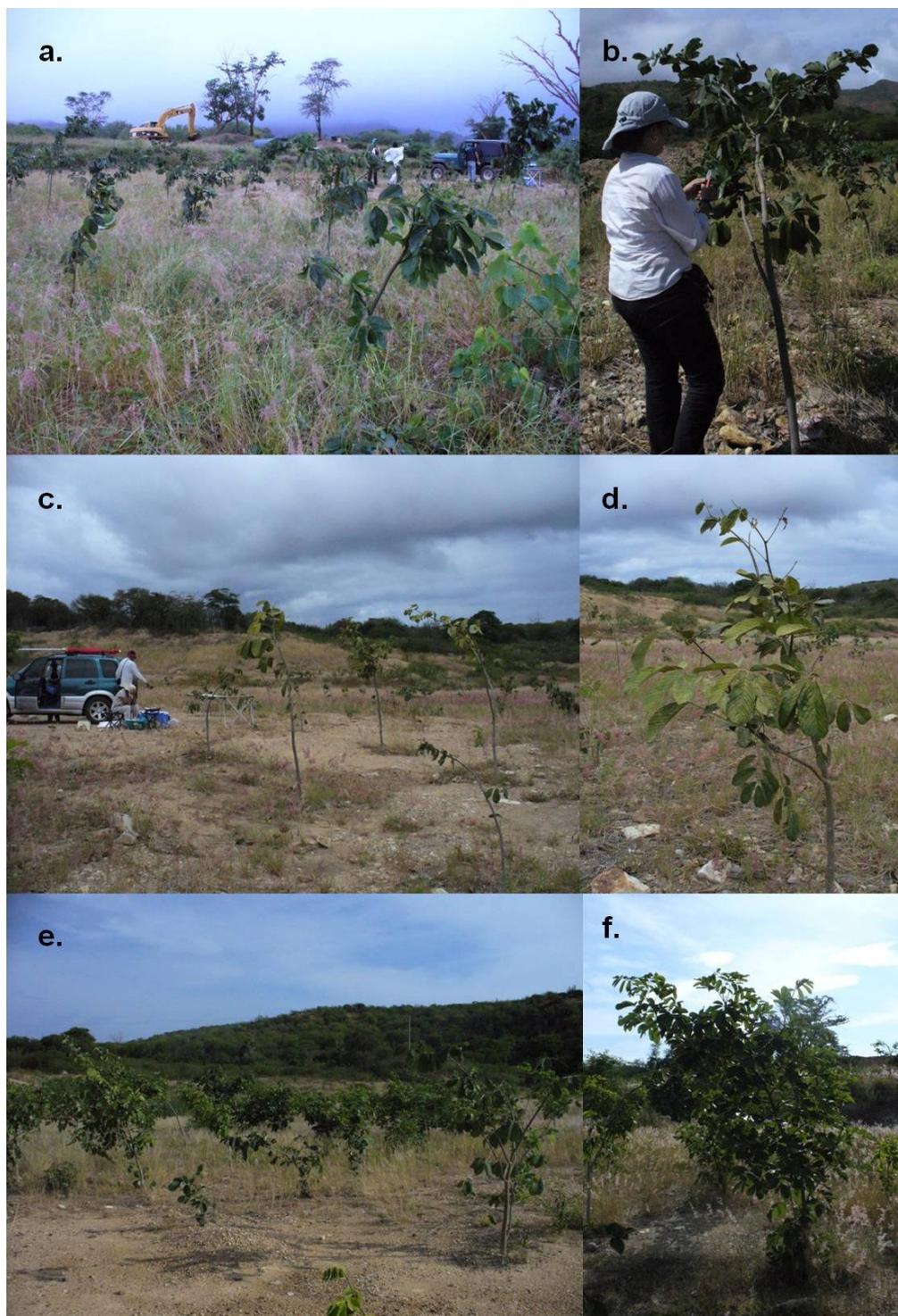
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

El diámetro de Mat-M al momento de la siembra fue significativamente mayor que el de todos los demás tratamientos, los cuales mostraron diámetros significativamente menores o iguales a las plantas NI (Tabla 18). A los 4 y 9 meses de crecimiento únicamente en las plantas previamente cultivadas en los suelos sucesionales, se observaron diámetros del tallo significativamente mayores en algunos tratamientos inoculados que en plantas NI (Tabla 18). A los 11 meses todas las plantas inoculadas mostraron diámetros significativamente mayores que las NI, pero a los 17 meses este efecto positivo de la inoculación se mantuvo únicamente en los tratamientos Da-V y Da-L (Tabla 18).

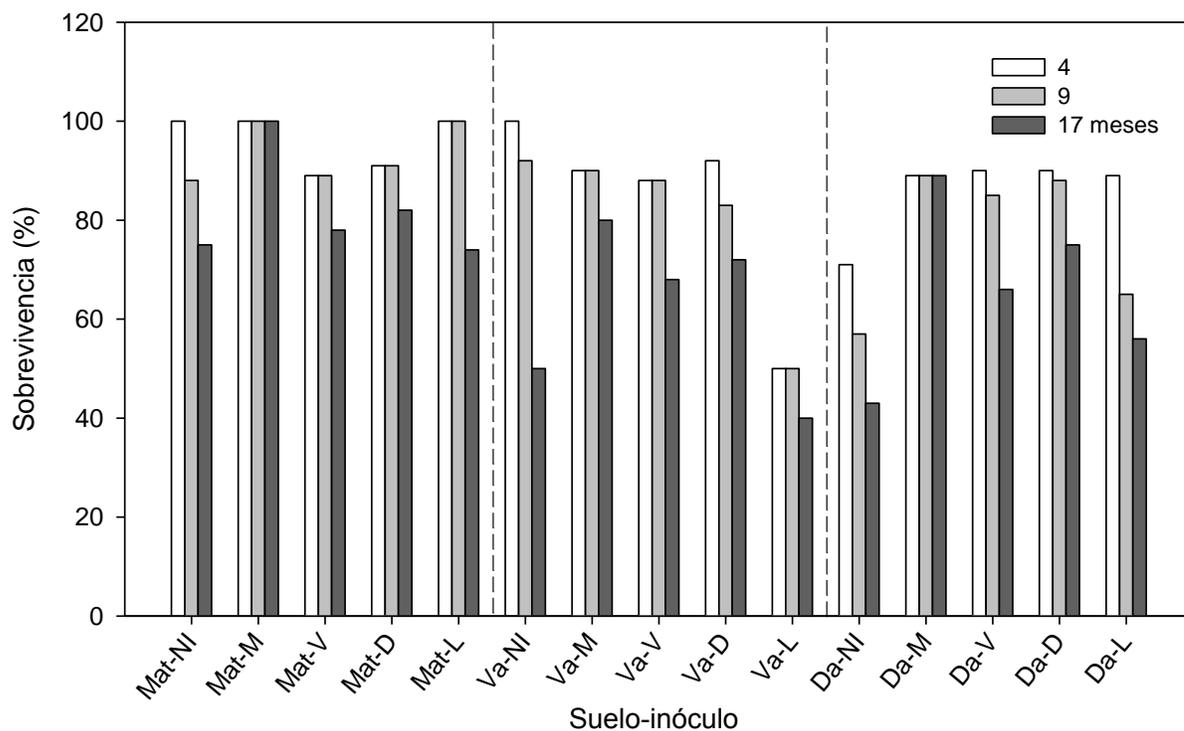
En la figura 16 se muestra el aspecto general de las plantas a los 9, 11 y 17 meses de crecimiento.

#### **9.3.4. Supervivencia a los 4, 9 y 17 meses de crecimiento**

El porcentaje de supervivencia a los 4, 9 y 17 meses de establecimiento en campo se muestra en la Figura 17. Entre los 4 y 9 meses de crecimiento la mayoría de los tratamientos mostró porcentajes de supervivencia superiores al 80%, excepto para los tratamientos Da-NI, Va-L y Da-L cuyo porcentaje de supervivencia fue menor (50-60%). La supervivencia durante el segundo periodo de lluvias (17 meses de crecimiento) fue más alta en las plantas cultivadas en el suelo Mat que en las plantas cultivadas en los suelos sucesionales (Figura 17). Las plantas del tratamiento Mat-M mostraron un 100% de supervivencia a diferencia de los demás tratamientos en los cuales se observó un porcentaje de supervivencia que varió entre 74 y 82% (Figura 17).



**Figura 16.** Aspecto de las plantas en el período de lluvia (a-b), sequía (c-d) y recuperación de la sequía (e-f).



**Figura 17.** Sobrevivencia de las plantas a los 4, 9 y 17 meses de crecimiento en una localidad perturbada. Las plantas fueron previamente cultivadas en suelos no estériles del Matorral (Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Va) y de la parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no inoculadas (NI), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) y con inóculo de *A. lacunosa* (L).

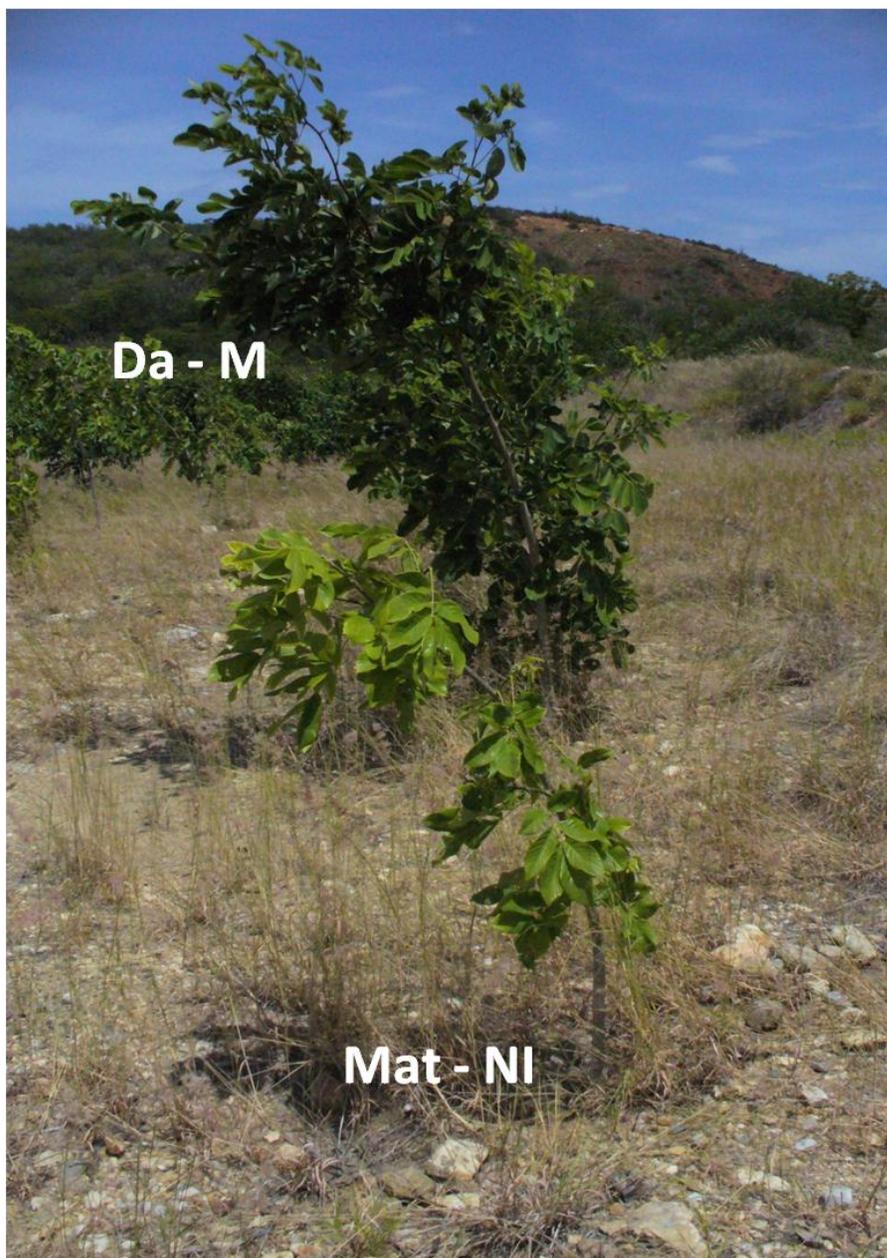
La sobrevivencia de las plantas previamente cultivadas en suelos sucesionales (Va y Da) fue mayor en los tratamientos inoculados con M, V y D (65-90%), que en las plantas no inoculadas y en las inoculadas con L (40-57%, Figura 17).

La mayoría de las plantas no inoculadas que sobrevivieron fueron notablemente más pequeñas y con menos ramificaciones que las plantas inoculadas (Figura 18).

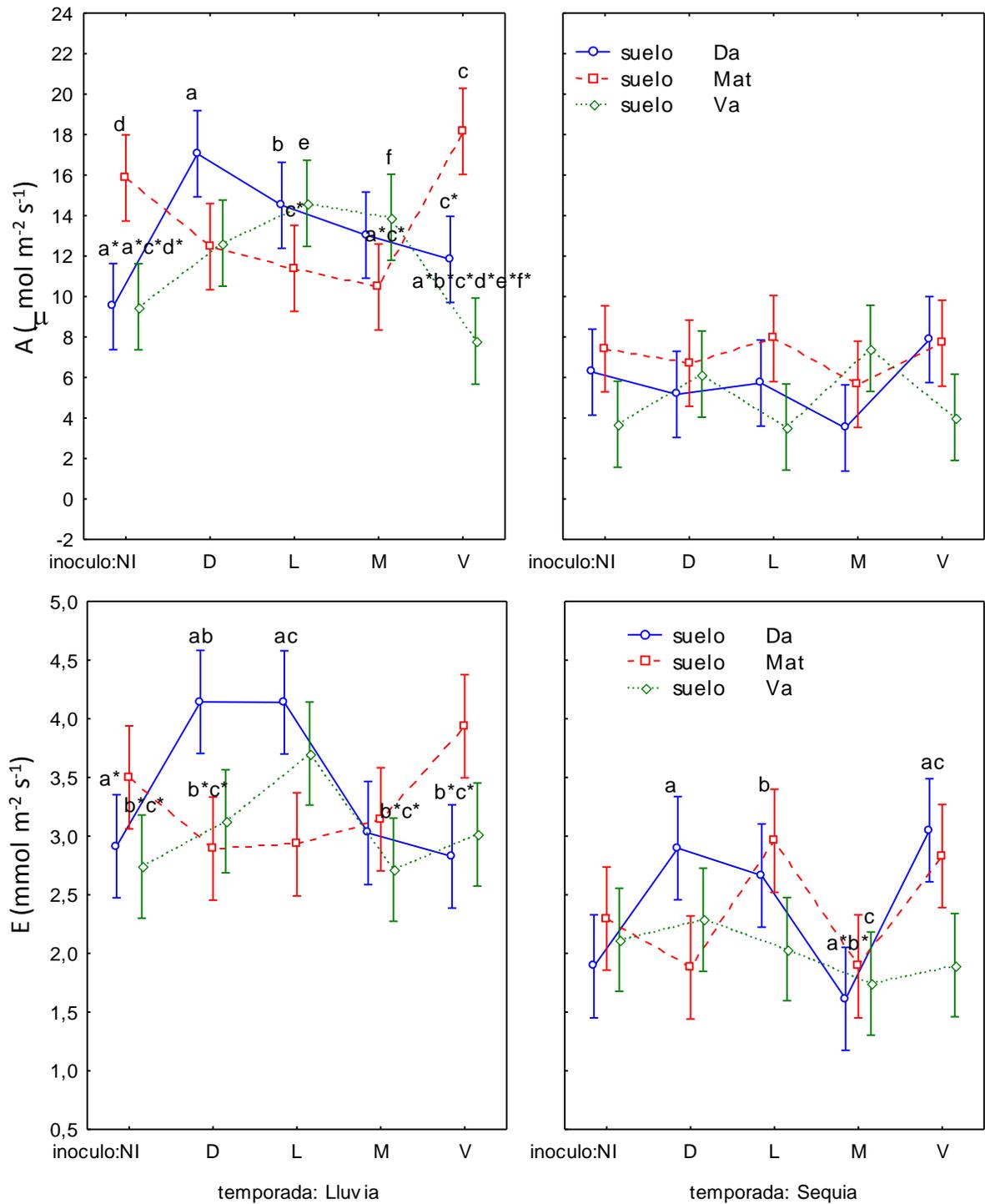
### ***9.3.5. Intercambio gaseoso en las temporadas de lluvia y sequía (9 y 11 meses de crecimiento)***

Los valores de medias para la tasa de fotosíntesis instantánea (A) y la tasa de transpiración (E) fueron significativamente más altos en la temporada de lluvia que en la temporada de sequía (Figura 19). Se observó un efecto significativo de la interacción entre la condición de inoculación y el suelo de siembra inicial (Anexo II).

En el periodo de lluvia, en las plantas previamente cultivadas en los suelos Mat y Va no se observaron diferencias significativas en A y E entre plantas inoculadas y no inoculadas, mientras que en las cultivadas en el suelo Da se observaron valores de A y E significativamente mayores en las plantas inoculadas con D, que en las plantas no inoculadas (Figura 19).



**Figura 18.** Diferencias en tamaño de una planta no inoculada previamente cultivada en suelo no estéril del matorral (Mat-NI), y otra previamente cultivada en suelo no estéril de la parcela sucesional de dos años inoculada con inóculo del matorral (Da-M).

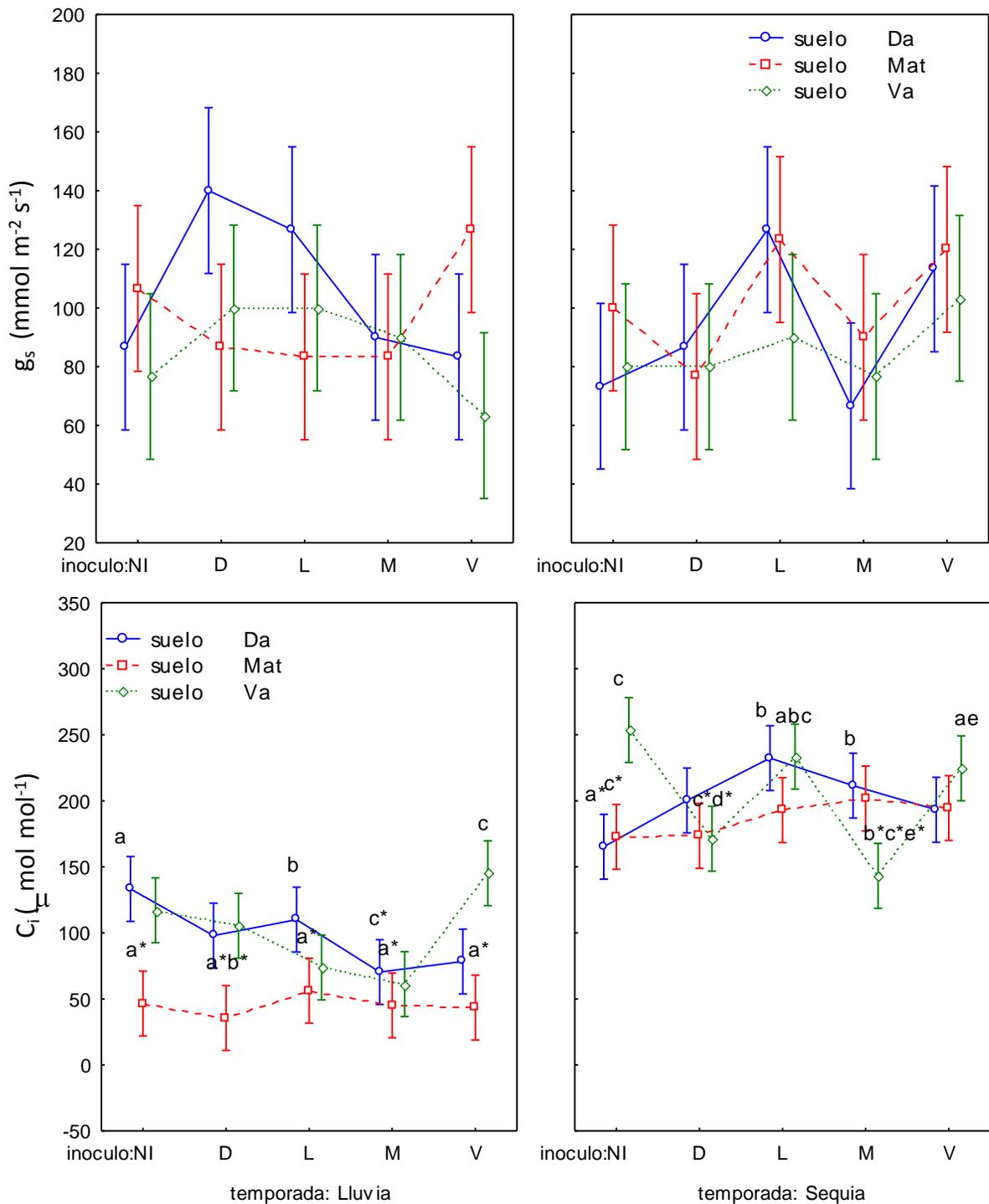


**Figura 19.** MANOVA de tres vías, resultado para la tasa de fotosíntesis instantánea ( $A$ ) y la tasa de transpiración ( $E$ ). Wilks lambda=0,007,  $F(104, 341, 52) = 3,4$ ,  $p < 0,0001$ . Barras verticales indican intervalos al 95% de confianza. Letras iguales con asterisco indican diferencias significativas de medias de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). RFA promedio entre temporadas ( $\pm$  error estándar) =  $1456,4 \pm 42,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

En el periodo de sequía la A fue significativamente menor en todos los tratamientos respecto a los valores observados en lluvia, y no hubo diferencias significativas entre las distintas condiciones de inoculación, ni entre suelos (Figura 19). La E en plantas cultivadas en los suelos Mat y Va no mostró diferencias debidas a la inoculación, mientras que en plantas cultivadas previamente en el suelo Da, la E fue significativamente mayor en las inoculadas con D, V y L que en las inoculadas con M y las no inoculadas (Figura 19).

La conductancia estomática ( $g_s$ ) y la concentración intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ), en las temporadas de lluvia y sequía se muestran en la Figura 20. No se observó un efecto significativo de la temporada, del suelo de siembra inicial, ni de la condición de inoculación sobre la  $g_s$  (Anexo II), pero la  $C_i$  fue significativamente más alta en la temporada de sequía que en la temporada de lluvia (Figura 20), y se observó un efecto significativo de la interacción entre la condición de inoculación y el suelo de siembra inicial (Anexo II).

En la temporada de lluvia se observaron valores significativamente más bajos de  $C_i$  en las plantas inoculadas con M y V que en plantas NI, únicamente en las plantas cultivadas previamente en el suelo Da, mientras que en los suelos Mat y Va no se observó un efecto de la inoculación sobre este parámetro (Figura 20). En la temporada de sequía únicamente los tratamientos Va-M y Va-D mostraron valores de  $C_i$  significativamente menores a las plantas no inoculadas (Va-NI), mientras que en las plantas previamente cultivadas en los suelos Mat y Da no se observó un efecto significativo de la inoculación sobre la  $C_i$  (Figura 20).



**Figura 20.** MANOVA de tres vías, resultado para la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la concentración intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ). Wilks lambda=0,007,  $F(104, 341, 52) = 3,4$ ,  $p < 0,0001$ . Barras verticales indican intervalos al 95% de confianza. Letras iguales con asterisco indican diferencias significativas de medias de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). RFA promedio entre temporadas ( $\pm$  error estándar) =  $1456,4 \pm 42,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

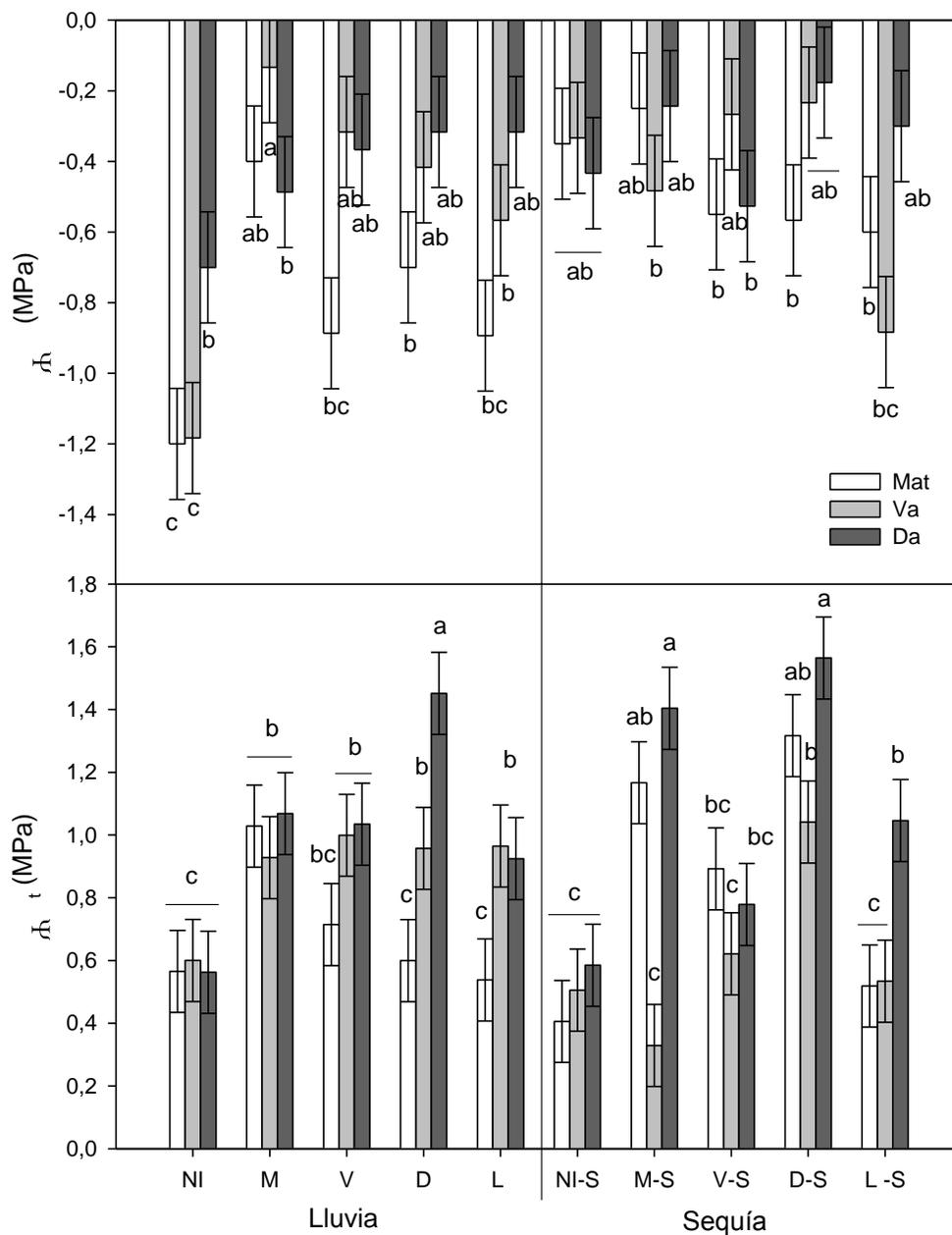
### **9.3.6. Relaciones hídricas en las temporadas de lluvia y sequía (9 y 11 meses de crecimiento)**

Los valores de potencial hídrico ( $\Psi$ ) y potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) en las temporadas de lluvia y sequía se muestran en la Figura 21. Se observó un efecto significativo de la interacción entre los factores temporada, condición de inoculación y suelo de siembra para ambos parámetros (Anexo II).

En la temporada de lluvia los  $\Psi$  de los tratamientos Mat-M, Mat-V, Mat-D, Va-L y Va-D fueron significativamente mayores que los de sus contrapartes no inoculadas (Mat-NI y Va-NI, Figura 21). El  $\Psi_t$  de las plantas inoculadas con M fue significativamente mayor que el de las plantas no inoculadas en todos los suelos de siembra inicial, mientras que las plantas previamente cultivadas en los suelos sucesionales e inoculadas con V, D y L mostraron un  $\Psi_t$  significativamente mayor que las NI (Figura 21).

En la temporada de sequía no se observaron diferencias significativas en el  $\Psi$  de plantas inoculadas con los inóculos nativos y plantas NI, en ninguno de los suelos evaluados, no así para el  $\Psi_t$  que fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con M y D (cultivadas previamente en los suelos Mat y Da), que en plantas no inoculadas (Figura 21).

El  $\Psi$  de las plantas inoculadas en sequía no varió significativamente respecto al de sus contrapartes en lluvia, a diferencia del  $\Psi_t$ , para el cual se observaron valores significativamente más altos en los tratamientos Mat-D y Da-M en sequía que en lluvia (Figura 21).



**Figura 21.** MANOVA de tres vías, resultado para el potencial hídrico ( $\Psi$ ) y potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ). Wilks lambda=0,007, F (104, 341, 52)= 3,4,  $p < 0,0001$ . Barras verticales indican intervalos al 95% de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas de medias de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

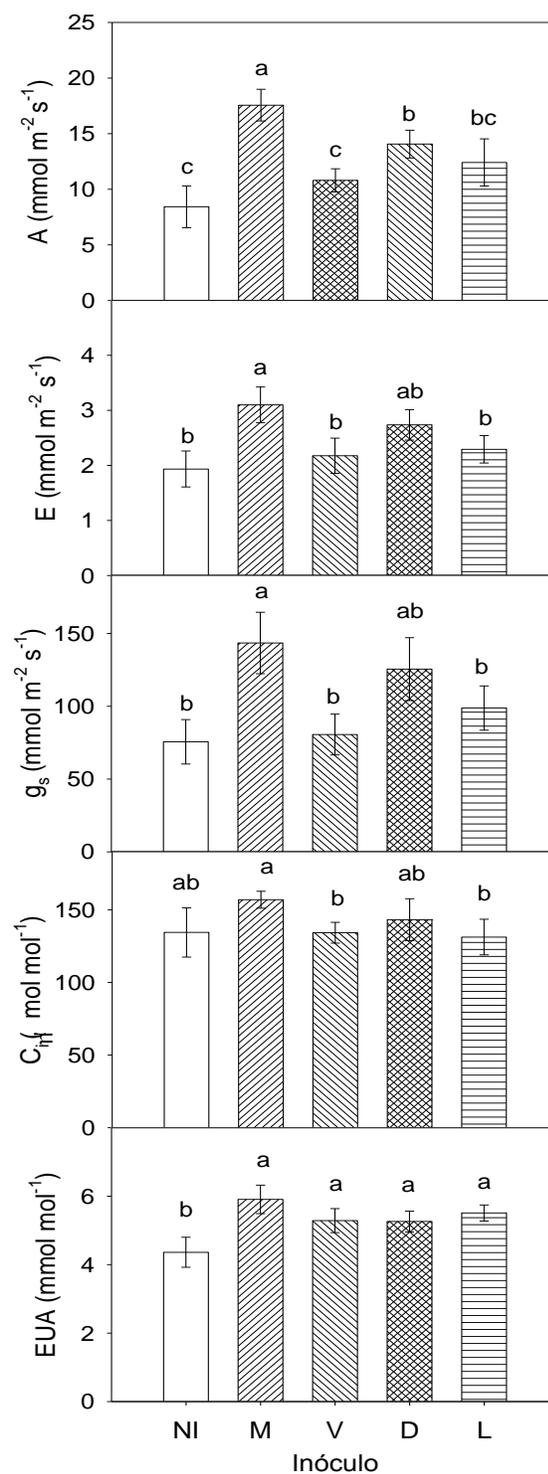
### **9.3.7. Intercambio gaseoso en el segundo periodo de lluvias (recuperación de la sequía 17 meses de crecimiento).**

El intercambio gaseoso durante el segundo periodo de lluvias (después de la formación de nuevas hojas) se muestra en la Figura 22. Durante este periodo no se observó un efecto significativo del suelo de siembra inicial sobre el intercambio gaseoso, pero si hubo un efecto significativo de las condiciones de inoculación (Anexo III). Los valores promedio mostrados corresponden a un  $n=12$ .

La tasa de fotosíntesis (A) fue significativamente mayor en el tratamiento M seguido de los tratamientos D y L con un valor intermedio y los tratamientos NI y V con los valores más bajos (Figura 22). La tasa de transpiración (E) y la conductancia estomática ( $g_s$ ) mostraron un comportamiento similar al observado en A, pero únicamente el tratamiento M mostró valores significativamente mayores en comparación con los demás tratamientos (Figura 22).

No se observaron diferencias significativas en la concentración intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) entre plantas inoculadas y no inoculadas, mientras que al comparar entre plantas inoculadas se observó una mayor  $C_i$  en M que en V y L (Figura 22).

La eficiencia de uso de agua instantánea (EUA) fue significativamente mayor en las plantas inoculadas que en plantas no inoculadas y no se observaron diferencias significativas entre inóculos (Figura 22).



**Figura 22.** Intercambio gaseoso en el segundo periodo de lluvias. Fotosíntesis instantánea (A), transpiración (E), conductancia estomática ( $g_s$ ), concentración intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) y eficiencia de uso de agua (EUA), a una RFA promedio ( $\pm$  error estándar) =  $1500,9 \pm 0,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Plantas no inoculadas (NI), con inóculo del

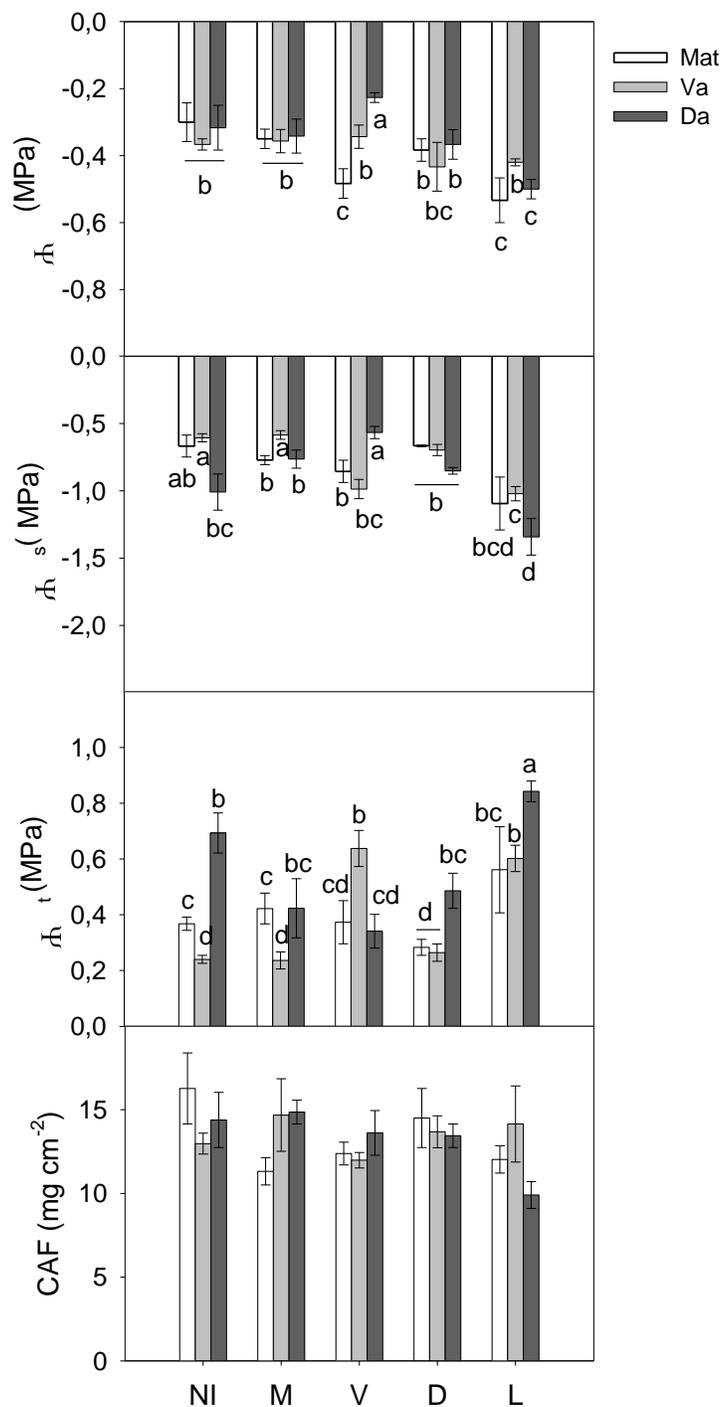
matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) y con inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

### **9.3.8. Relaciones hídricas en el segundo periodo de lluvias (recuperación de la sequía 17 meses de crecimiento).**

Las relaciones hídricas durante el segundo periodo de lluvias se muestran en la Figura 23. Se observó un efecto significativo de la interacción de los factores suelo x inóculo únicamente para los potenciales hídrico, osmótico y de turgencia ( $\Psi$ ,  $\Psi_s$  y  $\Psi_t$ ), mientras que para el contenido de agua foliar (CAF) no se observaron efectos significativos de estos factores (Anexo III).

Las plantas cultivadas con el inóculo M no mostraron diferencias significativas en sus valores de  $\Psi$ ,  $\Psi_s$  y  $\Psi_t$  respecto a las plantas no inoculadas, independientemente del suelo de siembra utilizado, mientras que para los demás tratamientos de inoculación la respuesta hídrica de la planta varió dependiendo del suelo de siembra (Figura 23). El  $\Psi$  de los tratamientos Mat-V, Mat-L y Da-L fue significativamente menor que el de sus contrapartes no inoculadas (Figura 23).

El  $\Psi_s$  fue significativamente menor en los tratamientos Va-V, Va-D, Va-L y Da-L, lo cual coincidió con un incremento en el  $\Psi_t$  en dichos tratamientos respecto a sus contrapartes no inoculadas, mientras que en los demás tratamientos inoculados se observaron valores de  $\Psi_t$  similares o inferiores a los observados en sus contrapartes no inoculadas (Figura 23).



**Figura 23.** Relaciones hídricas en el segundo periodo de lluvias. Potencial hídrico ( $\Psi$ ), potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) y contenido de agua foliar (CAF). Las plantas fueron previamente cultivadas en suelos no estériles del Matorral (Mat), de la parcela sucesional de 20 años (Va) y de la parcela sucesional de dos años (Da), combinados con cinco condiciones de inoculación: Plantas no inoculadas (NI), con inóculo del matorral (M), con inóculo de la parcela de 20 años (V), con inóculo de la parcela de dos años (D) y con inóculo de *A. lacunosa* (L). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ( $p < 0,05$ ) utilizando el test de LSD.

#### **9.4. Discusión**

Los resultados mostrados previamente confirman lo observado en los Capítulos I y II sobre el efecto positivo de la inoculación con HMA nativos sobre el crecimiento de *P. carthagenensis* en suelos perturbados, destacando en este caso el mantenimiento a largo plazo de dicho efecto. La inoculación asistida durante la etapa de vivero en combinación con el uso de suelos sucesionales como sustrato de siembra, tuvieron un efecto significativo durante un periodo de crecimiento en campo de nueve meses bajo condiciones edafoclimáticas estresantes, como una alta radiación incidente, baja disponibilidad de fósforo y nitrógeno, bajo contenido de materia orgánica, baja capacidad de retención de agua y alta pedregosidad en la localidad de siembra. Además el efecto positivo de la inoculación se mantuvo luego de un periodo de cuatro meses de sequía.

La presencia de colonización micorrízica en las plantas no inoculadas (NI), indica que los suelos nativos (no estériles) utilizados como sustrato de siembra contienen esporangios residuales de HMA con una capacidad infectiva no despreciable. Aún así, la presencia de un porcentaje de colonización micorrízica mayor en las plantas inoculadas que en las no inoculadas al momento de la siembra, indica que la inoculación favoreció un mayor desarrollo de la colonización, reflejando un mayor poder infectivo de los inóculos elaborados a partir de los distintos suelos nativos. Frecuentemente la respuesta positiva de las plantas a la inoculación micorrízica ha sido reportada utilizando suelo estéril (Alexander *et al.* 1992), sin embargo la esterilización de suelos no

es común en la mayoría de los viveros lo cual representa una limitación para la verdadera aplicabilidad de los resultados obtenidos.

La ausencia de un efecto significativo de la inoculación micorrízica sobre el crecimiento en altura al momento de la siembra podría deberse a la presencia de colonización micorrízica en las plantas no inoculadas, como se mencionó anteriormente. Aún así, la mayor  $A$  y  $g_s$  observada en las plantas inoculadas parece indicar que la inoculación micorrízica favoreció una mejor condición fisiológica en estos tratamientos. Se ha reportado que los efectos positivos de las MA pueden ser independientes de un incremento en el crecimiento de las plantas (Augé, 2001). El incremento en la incorporación de fósforo por una simbiosis MA más eficiente, puede aumentar la concentración de fósforo foliar afectando la sensibilidad de los estomas al ABA (Mansfield *et al.* 1990), además puede incrementar la apertura estomática y la transpiración a través del incremento en el sumidero de carbono de la raíz por la presencia de la simbiosis (Kaschuk *et al.* 2009). Por otro lado los cambios en  $A$  vienen dados también por factores bioquímicos (tales como la cantidad y actividad de la enzima Rubisco) que puede ser modulada por una mayor disponibilidad de nutrientes producida por las MA (Querejeta *et al.* 2003).

A partir de los 4 meses de crecimiento en campo se observó un incremento en la altura de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas, únicamente en las plantas previamente cultivadas en los suelos sucesionales (suelo de la localidad sucesional de veinte años y dos años), con los mayores incrementos en altura observados en el suelo de dos años, que corresponde al

sustrato más degradado. Este efecto positivo se mantuvo en los meses posteriores de crecimiento. Este resultado es particularmente importante ya que una estrategia común en el establecimiento de plantaciones para la restauración es la aplicación de mezclas de fertilizantes solubles de liberación lenta para promover el crecimiento de los árboles durante largos periodos de tiempo (Huat *et al.* 2002), y en este sentido la inoculación con HMA nativos podría considerarse como una alternativa sustentable al uso de fertilizantes en el ámbito de la restauración, reduciendo sustancialmente su uso y disminuyendo los daños ambientales.

Los suelos de siembra tuvieron un efecto significativo durante los primeros 11 meses de crecimiento y se observó una pérdida parcial de su efecto en el periodo de recuperación. La inoculación fue más importante cuando se combinó con los suelos perturbados, correspondientes a sustratos con una baja disponibilidad de nutrientes y materia orgánica. Estos resultados coinciden con lo observado en el capítulo VIII del presente estudio, confirmando que el efecto positivo de los MA sobre el crecimiento de las plantas es de mayor magnitud a bajas concentraciones de nutrientes del suelo.

Aunque la menor respuesta del inóculo foráneo respecto a los nativos no fue consistente para todos los parámetros ni para todos los periodos de crecimiento evaluados, la sobrevivencia con el inóculo foráneo fue similar a la observada en las plantas no inoculadas cultivadas en suelos sucesionales, lo cual representa una desventaja del uso de este inóculo en suelos perturbados. Las plantas previamente cultivadas en suelos sucesionales e inoculadas con

HMA nativos, mostraron una mayor sobrevivencia que las inoculadas con el inóculo foráneo y las no inoculadas a los 17 meses de crecimiento en campo, después de una temporada de sequía natural, resaltando la importancia del uso de inóculos nativos para disminuir la mortalidad de esta planta en suelos perturbados y comprobando por un lado que la inoculación micorrízica tiene un alto potencial para facilitar el establecimiento de plántulas en suelos perturbados (Onguene & Kuyper, 2005), y por otro lado que los HMA nativos representan una fuente preferencial de inóculo para estos fines.

Resultados similares sobre una mayor eficiencia a largo plazo de inóculos nativos de HMA fueron obtenidos por Requena *et al.* (2001), quienes reportaron que el uso de una mezcla de HMA nativos fue menos eficiente que el inóculo foráneo *Glomus intraradices* en promover el crecimiento del arbusto *Anthyllis cytisoides* durante el primer año de crecimiento después del trasplante a un área semiárida degradada, sin embargo cuatro años después de la siembra, el crecimiento de las plantas inoculadas con la mezcla de HMA nativos fue significativamente mayor que el de las inoculadas con el HMA foráneo, demostrando que las respuestas iniciales de crecimiento no necesariamente son un indicador confiable de un buen desempeño a largo plazo de la inoculación. De manera similar Caravaca *et al.* (2003)b obtuvieron un peso seco del vástago 172% mayor del arbusto *Rhammus lycioides* inoculado con una mezcla de ocho especies de *Glomus* sp. (aislados de un área semiárida donde la especie crece naturalmente), que con el HMA foráneo *Glomus claroideum* después de un año de establecimiento en un suelo degradado.

Los altos porcentajes de sobrevivencia observados en plantas inoculadas con los inóculos M y L (100% de sobrevivencia), cuando se utilizó como sustrato de siembra inicial el suelo del matorral sin perturbar, podría relacionarse con un efecto sinérgico de estos inóculos con las poblaciones nativas de HMA presentes en este suelo. Posiblemente las mejores condiciones nutricionales de este suelo aunado a una mayor riqueza microorganismos (entre ellos los HMA propios del matorral que se encontraban posiblemente en el suelo no estéril), influyeran en esta respuesta. Aún así, este resultado no coincidió con altas respuestas de crecimiento para estos tratamientos, indicando una alta sobrevivencia de plantas menos vigorosas en comparación con las cultivadas en suelos sucesionales.

Los resultados de intercambio gaseoso obtenidos durante los periodos de lluvia y sequía, indican una fuerte reducción de la A, la ausencia de cambios detectables en  $g_s$  y un aumento significativo en la  $C_i$  con la sequía en todos los tratamientos, incluyendo el control no inoculado. En el Capítulo II del presente estudio se observó que bajo condiciones de vivero el cierre estomático ejerció un fuerte control sobre la fotosíntesis y que además era posible que hubiese limitaciones no estomáticas de A durante la sequía. Bajo condiciones de campo no se observó un cambio de los valores de  $g_s$  con la sequía lo que sugiere que la reducción de A no fue debida al cierre estomático, y el incremento en la  $C_i$  podría indicar que las limitaciones no estomáticas juegan un papel importante en la disminución de A.

Durante estos dos periodos (lluvia y sequía) no se observó un efecto consistente de la inoculación con micorrizas en el intercambio gaseoso de *P. carthagenensis*, con excepción de una mayor A y E en el tratamiento Da-D respecto al tratamiento Da-NI durante la temporada de lluvia. Con relación a los resultados de relaciones hídricas, El  $\Psi$  no varió entre temporadas (lluvia y sequía) ni entre inóculos a diferencia del  $\Psi_t$ , el cual mostró un incremento significativo en la mayoría de los tratamientos inoculados respecto a los NI durante el periodo de lluvia, además de un aumento significativo en las plantas inoculadas con M y D durante la temporada de sequía. Un mejor estatus hídrico de estos tratamientos durante la sequía podría relacionarse con un mayor crecimiento radical en profundidad, que les permitiera a estas plantas una mayor cercanía al nivel freático. Por otro lado, la falta de consistencia en el efecto de la inoculación sobre el intercambio gaseoso y las relaciones hídricas durante la sequía podría deberse a la inminente abscisión foliar, dada la estrategia fundamentalmente evasora de la sequía de esta especie (Capítulo II).

Aunque durante la sequía no se observaron efectos contundentes de la inoculación sobre el intercambio gaseoso y las relaciones hídricas de *P. carthagenensis*, si se observó sin embargo un efecto de la inoculación sobre el intercambio gaseoso en la recuperación de la sequía con el nuevo período de lluvias: La A,  $g_s$  y la EUA fueron mayores en los tratamientos inoculados al compararlos con el control no inoculado, y las plantas del tratamiento M mostraron una mayor tasa de fotosíntesis instantánea que con los demás inóculos. Estas tendencias indican que el efecto positivo de la inoculación sobre

los parámetros fisiológicos se mantiene en el tiempo, y apoyan los resultados obtenidos por Querejeta *et al.* (2006) los cuales sugieren que el incremento en el intercambio gaseoso producido por inóculos nativos mixtos de MA es crítico para el desempeño de las plantas hospederas a largo plazo en ambientes semiáridos.

Así, el uso de un inóculo proveniente del matorral sin perturbar (ecosistema de referencia) puede ser eficiente a largo plazo, aunque su efecto no necesariamente se refleje en los primeros estadios de desarrollo de la planta como se observó en el Capítulo I. Por otro lado, la mayor eficiencia de los inóculos nativos cuando se establece la simbiosis en suelos provenientes de las localidades perturbadas (suelos sucesionales) como sustrato de siembra en vivero, indica que no es necesario el uso de sustratos orgánicos para mejorar el crecimiento de *P. carthagenensis* y que además es mucho mayor la respuesta de crecimiento al utilizar HMA nativos en suelos degradados.

El mayor éxito del inóculo de HMA del ecosistema de referencia (matorral), en comparación con los inóculos sucesionales coincide con lo reportado por Allen *et al.* (2005) en Quintana Roo, México, donde comprobaron que los HMA de un bosque maduro eran más eficientes que los HMA de una localidad sucesional temprana, en incrementar la sobrevivencia y productividad de árboles nativos en una localidad perturbada, debido a la mayor riqueza de especies de HMA del bosque. Plantas de *Cochlospermum vitifolium*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia* y *Piscidia piscipula*, cultivadas en suelo proveniente de

bosque maduro y luego transplantadas a zonas perturbadas, mostraron los mayores valores de altura en el segundo año de crecimiento (Allen *et al.* 2005).

Contario a lo observado en el presente trabajo, se ha reportado la ausencia de efectos debidos al origen del inóculo nativo de HMA, como lo indica una estudio realizado en un mosaico sucesional de bosque seco en Chamela, México, en el cual se inocularon 11 especies de plantas con HMA provenientes de estados sucesionales contrastantes y se produjo una alta respuesta de crecimiento de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas, pero no se encontraron diferencias significativas entre inóculos, sugiriendo que los cambios en la diversidad, cantidad o calidad de los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares presentes en las diferentes etapas sucesionales no afectan de manera diferencial el crecimiento de estas plantas en sus primeros cuatro meses de desarrollo (Gavito *et al.* 2008). Los resultados obtenidos en el estudio de Gavito *et al.* (2008) corresponden a plantas cultivadas en vivero durante un periodo corto de crecimiento, por lo que no se podría descartar que estos inóculos se diferencien en su respuesta en una etapa posterior de crecimiento, después de establecerse en campo.

Se concluye que el uso de combinaciones adecuadas de suelos perturbados e inóculos de HMA nativos durante la etapa de vivero es promisorio y recomendado para mejorar los atributos morfológicos, fisiológicos y la sobrevivencia de *P. carthagenensis* no sólo en los primeros meses de crecimiento, sino también en etapas posteriores del desarrollo de la planta, después de la siembra en suelos degradados, bajo condiciones edafoclimáticas

estresantes y en etapas posteriores a la sequía, después de un periodo de pérdida y recuperación de hojas.

### 9.5. Conclusiones

- La presencia de un porcentaje de colonización micorrízica mayor en las plantas inoculadas que en las no inoculadas al momento de la siembra, indica que la inoculación favoreció un mayor desarrollo de la colonización, reflejando un mayor poder infectivo de los inóculos elaborados a partir de los distintos suelos nativos en comparación con el poder infectivo de los suelos no estériles utilizados como sustrato de siembra.
- El mantenimiento en el tiempo de los incrementos en altura de las plantas inoculadas observados en el suelo de dos años, podría considerarse como una alternativa sustentable en el ámbito de la restauración, ya que es común el uso de fertilizantes para sostener el crecimiento de árboles durante largos periodos de tiempo.
- Las plantas previamente cultivadas en suelos sucesionales e inoculadas con HMA nativos, mostraron una mayor sobrevivencia que las inoculadas con el inóculo foráneo y las no inoculadas a los 17 meses de crecimiento en campo, después de una temporada de sequía natural resaltando la importancia del uso de inóculos nativos para disminuir la mortalidad de esta planta en suelos perturbados.

- Bajo condiciones de campo no se observó un cambio de los valores de  $g_s$  con la sequía lo que sugiere que la reducción de  $A$  no fue debida al cierre estomático, y el incremento en la  $C_i$  podría indicar que las limitaciones no estomáticas juegan un papel importante en la disminución de  $A$ .
- La falta de consistencia en el efecto de la inoculación sobre el intercambio gaseoso y las relaciones hídricas durante la sequía podría deberse a la inminente abscisión foliar, dada la estrategia fundamentalmente evasora de la sequía de esta especie.
- La inoculación micorrízica tuvo un efecto significativo sobre el intercambio gaseoso en la recuperación de la sequía observándose una mayor  $A$ ,  $g_s$  y  $EUA$  en los tratamientos inoculados y una mayor tasa de fotosíntesis instantánea en el tratamiento M, indicando que el efecto positivo de la inoculación sobre los parámetros fisiológicos se mantiene en el tiempo.
- El uso de un inóculo proveniente del matorral sin perturbar (ecosistema de referencia) puede ser eficiente a largo plazo, aunque su efecto no necesariamente se refleje en los primeros estadios de desarrollo de la planta.
- La mayor eficiencia de los inóculos nativos cuando se utilizan suelos sucesionales como sustrato de siembra en vivero, indica que no es necesario el uso de sustratos orgánicos para mejorar el crecimiento de *P. carthagenensis* y que además es mucho mayor la respuesta de crecimiento al utilizar HMA nativos en suelos degradados.

- El uso de combinaciones adecuadas de suelos e inóculos de HMA nativos durante la etapa de vivero es promisorio para mejorar los atributos morfológicos, fisiológicos y la sobrevivencia de *P. carthagenensis* no sólo en los primeros meses de crecimiento, sino también en etapas posteriores del desarrollo de la planta, después de la siembra en suelos degradados, bajo condiciones edafoclimáticas estresantes y en etapas posteriores a la sequía.

## **10. ANEXOS**

**ANEXO I:** Resultados de las pruebas de homogeneidad de varianzas para el intercambio gaseoso y las relaciones hídricas de *P. carthagenensis* en las temporadas de lluvia y sequía en campo. La hipótesis nula plantea que las varianzas son iguales a través de todas las condiciones. Se observa que ningún valor fue significativo ( $p > 0,05$ ), lo que indica que las varianzas son iguales.

	<b>Hartley</b>	<b>Cochran</b>	<b>Bartlett</b>	<b>df</b>	<b>p</b>
<b>A (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>	2908,088	0,183757	40,19436	29	0,080809
<b>E (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>	231,384	0,129608	29,40212	29	0,444276
<b>gs (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>	172	0,319703	33,0528	29	0,275614
<b>Ci (mmol mol<sup>-1</sup>)</b>	185,434	0,179496	25,01898	29	0,677262
<b>EUA (mmol mol<sup>-1</sup>)</b>	805,184	0,113781	27,58899	29	0,53996
<b>Ψ (Mpa)</b>	79	0,118448	19,61475	29	0,904498
<b>Ψ<sub>t</sub> (Mpa)</b>	191,7	0,121513	34,37257	29	0,225883

**ANEXO II:** Resultados del MANOVA de tres vías de los efectos de los factores temporada, suelo de siembra inicial e inóculo de HMA sobre el intercambio gaseoso y las relaciones hídricas de *P. carthagenensis* en las temporadas de lluvia y sequía en campo. Se muestran los p-valores.

	A	E	$g_s$	$C_i$	EUA	$\Psi$	$\Psi_t$
temporada	0,000	0,000	0,637	0,000	0,000	0,000	0,047
suelo	0,000	0,001	0,055	0,000	0,141	0,000	0,000
inoculo	0,221	0,000	0,018	0,000	0,219	0,000	0,000
temporada*suelo	0,600	0,793	0,401	0,001	0,876	0,000	0,000
temporada*inoculo	0,284	0,303	0,041	0,028	0,826	0,004	0,000
suelo*inoculo	0,000	0,000	0,045	0,000	0,002	0,000	0,000
temporada*suelo*inoculo	0,000	0,001	0,376	0,000	0,180	0,000	0,000

**ANEXO III:** Resultados del MANOVA de dos vías de los efectos de los factores suelo de siembra inicial e inóculo de HMA sobre el intercambio gaseoso y las relaciones hídricas de *P. carthagenensis* en el periodo de recuperación de la sequía en campo (17 meses). Se muestran los p-valores.

	A	E	$g_s$	$C_i$	EUA	$\Psi$	$\Psi_s$	$\Psi_t$	CAF
suelo	0,590	0,302	0,346	0,348	0,432	<0,001	0,184	0,004	0,540
inoculo	0,032	0,082	0,179	0,651	0,852	<0,001	<0,001	<0,001	0,416
suelo*inoculo	0,066	0,105	0,157	0,272	0,960	<0,001	0,012	<0,001	0,690

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre Z, Lars P (2005) Floristic composition and conservation status of the dry forests in Ecuador. *Lyonia. A Journal of Ecology and Application* 8: 41-67.
- Alexander I, Norani A, Lee Su S (1992) The role of mycorrhizas in the regeneration of some Malaysian forest trees. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 335: 379-388.
- Al-Karaki G, McMichael B, Zak J (2004) Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14:263-269.
- Allen E, Allen M, Egerton-Warburton L, Cordiki L, Gomez-Pompa A (2003) Impacts of early and late seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest, Mexico *Ecological Applications* 13:1701-1717.
- Allen M, Allen E, Gómez-Pompa A (2005) Effects of mycorrhizae and nontarget organisms on restoration of a seasonal tropical forest in Quintana Roo, Mexico: Factors limiting tree establishment. *Restoration Ecology* 13:325-333.
- Allen M, Boosalis M (1983) Effects of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerant of winter wheat. *New Phytologist* 93: 67-76.
- Allsopp N, Stock D (1994) VA mycorrhizal infection in relation to edaphic characteristics and disturbance regime in three lowland plant communities in the south-western Cape, South Africa. *Journal of Ecology* 82: 271-279.
- Almeida J, Hartwig U, Frehner M, Nosberger J, Luscher A (2000) Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* 51: 1289-1297.

- Augé R (2001) Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42.
- Augé R, Moore J (2005) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant drought resistance Pp. 136-162. En: V Mehrotra (Ed.). *Mycorrhiza: Role and implications*. Allied Publishers Limited, New Dehli.
- Augé R, Moore J, Sylvia D, Cho K (2004) Mycorrhizal promotion of host stomatal conductance in relation to irradiance and temperature. *Mycorrhiza* 14: 85-92.
- Augé R, Schekel K, Wample R (1987)<sup>a</sup> Leaf water and carbohydrate status of VA mycorrhizal rose exposed to drought stress. *Plant and Soil* 99: 291-302.
- Augé R, Toler H, Moore J, Cho K, Saxton A (2007) Comparing contributions of soils versus root colonization to variations in stomatal behavior and soil drying in mycorrhizal *Sorghum bicolor* and *Cucurbita pepo*. *Journal of Plant Physiology* 164: 1289-1299.
- Augé R, Schekel K, Wample R (1987)<sup>b</sup> Rose leaf elasticity changes in response to mycorrhizal colonization and drought acclimation. *Physiologia Plantarum* 70: 175-182.
- Avio L, Pellegrino E, Bonari E, Giovannetti M (2006) Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytologist* 172: 347-357.
- Ayala-Sánchez A, Krishnamurthy L, Basulto L, Leos-Rodríguez J (2007) Native Tree Legumes for Improvement of Slash-and-Burn Maize System in Yucatan, Mexico. *Terra Latinoamericana* 25: 195-202.

- Azcon-Aguilar C, Padilla L, Encina C, Azcón R, Barea J (1996) Arbuscular mycorrhizal inoculation enhanced plant growth and changes root system morphology in micropropagated *Annona cherimolla* Mill. *Agronomie* 16: 647-652.
- Barea J, Palenzuela J, Cornejo P, Sánchez-Castro I, Navarro-Fernández C, López-García A, Estrada B, Azcón R, Ferrol N, Azcón-Aguilar C (2011) Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Deserts of the World Part IV: Iberian Southeast. Journal of Arid Environments* 75: 1292-1301.
- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Becard G, Sejalón-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4: e226.
- Bethlenfalvay G, Brown M, Ames R, Thomas R (1988) Effects of drought on host and endophyte development in mycorrhizal soybeans in relation to water use and phosphate uptake. *Physiologia Plantarum* 77: 565-571.
- Bever J (1994) Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology* 75: 1965-1977.
- Bever J (2003) Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist* 157: 465-473.
- Biermann B, Linderman R (1983) Use of arbuscular-mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculums. *The New Phytologist* 95: 97-105.
- Black K, Mitchell D, Osborne D (2000) Effect of mycorrhizal enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell & Environment* 23:797-809.

- Borchert R (1994) Soil and stem water storage determine phenology and distribution of tropical dry forest trees. *Ecology* 75:1437-1449.
- Bouyoucos G (1936) Directions for making mechanical analysis of soils by the hydrometer method. *Soil Sci.* 42: 225-228.
- Bradshaw A (1987) The reclamation of derelict land and the ecology of ecosystems. Pp. 53-74. En: W III, Gilpin M & J Aber (eds.). *Restoration ecology: A synthetic approach to ecological research*. Jordan Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Bray E (2002) Abscisic acid regulation of gene expression during water deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell and Environment* 25: 153-161.
- Bray R, Kurtz L (1945) Determination of total, organic and available forms of phosphate in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Brundrett M (1996) *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. 374p.
- Brundrett M (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275 -304.
- Brundrett M, Abott L (1995) Mycorrhizal fungus propágulos in the jarrah forest. II. Spatial variability in inoculum levels. *New Phytologist* 131: 461-469.
- Busquets M, Calvet C, Camprubí A (2010) Differential effects of two species of arbuscular mycorrhiza on the growth and water relations of *Spartium junceum* and *Anthyllis cytisoides*. *Symbiosis* DOI 10.1007/s13199-010-0097-8.
- Camargo- Ricalde S, Montaña N, Reyes-Jaramillo I, Jimenez-Gonzales C, Dhillion S (2010) Effect of mycorrhizae on seedlings of six endemic *Mimosa* L. species

(Leguminosae- Mimosoideae) from the semi-arid Tehuacán-Cuicatlán Valley. Mexico. *Trees* 24:67-78.

Caravaca F, Alguacil M, Barea J y Roldán A (2005) Survival of inocula and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 37:227-238.

Caravaca F, Alguacil M, Díaz G, Roldán A (2003)<sup>a</sup> Use of nitrate reductase activity for assessing effectiveness of mycorrhizal symbiosis in *Dorycnium pentaphyllum* under induced water deficit. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34:2291-2302.

Caravaca F, Barea J, Palenzuela J, Figueroa D, Alguacil M, Roldan A (2003)<sup>b</sup> Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 22: 103-111.

Ceccon E, Huante P, Rincon E (2006) Abiotic factors influencing tropical dry forest regeneration. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 305-312.

Chapin F III, Bloom A, Field C, Waring R (1987) Plant responses to multiple environmental factors. *Bio Science* 37: 49-57.

Clifford S, Arndt S, Corlett J, Joshi S, Sankhla N, Popp M, Jones H (1998) The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *Journal of Experimental Botany* 49: 967-977.

Cony M (1995) Reforestación racional de zonas áridas y semiáridas con árboles de múltiples propósitos. *Interciencia* 20: 249-253.

- Cuenca G, De Andrade Z, Escalante G (1998) Arbuscular mycorrhizae in the rehabilitation of fragile degraded tropical lands. *Biology and Fertility of Soils* 26: 107-111.
- Cuenca G, De Andrade Z, Lovera M, Fajardo L, Meneses E, Márquez M, Machuca R (2003) Pre-selección de plantas nativas y selección de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de La Gran Sabana, Edo. Bolívar, Venezuela. *Ecotrópicos* 16:27-40.
- Cummings J, Reid N, Davies I, Grants C (2005) Adaptive restoration of sand-mined areas for biological conservation. *Journal of Applied Ecology* 42: 160-170.
- Davies F Jr, Svenson S, Cole J, Phavaphutanon L, Duray S, Olalde-Portugal V, Meier C, Bo S (1996) Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology* 16: 985-993.
- De Souza F (2005) Biology, ecology and evolution of the family *Gigasporaceae*, arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Leiden University, The Netherlands. 157 p.
- Dodd J, Boddington C, Rodriguez A, Gonzalez-Chavez C, Mansur I (2000) Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant Soil* 226:131-151.
- Dodd J, Thomson B (1994) The screening and selection of inoculants arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 159: 149-158.
- Drüge U, Schönbeck F (1992) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *Journal of Plant Physiology* 141: 40-48.

- Duan X, Neuman D, Reiber J, Green C, Saxton A, Augé R (1996) Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors involved in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* 47: 1541-1550.
- Ebel R, Stodola A, Duan X, Augé R (1994) Nonhydraulic root-shoot signaling in mycorrhizal and non-mycorrhizal sorghum exposed to partial soil drying or severing. *New Phytologist* 127: 495-506.
- El-Tohamy W, Schnitzler W, El-Behairy U, El-Betagy M (1999) Effect of VA mycorrhiza on improving drought and chilling tolerance of bean plants. *Journal of Applied Botany* 73: 178-183.
- Evans G (1972) *The quantitative analysis of plant growth*. University of California Press, Berkeley. 761 p.
- Fajardo L (2007) *Bases ecológicas para la restauración de bosques secos tropicales de la Península de Macanao. Isla de Margarita. Tesis Doctoral*. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC. 183 p.
- Fajardo L, Gonzalez V, Nassar J, Lacabana P, Portillo C, Carrasquel F, Rodriguez J (2005) Tropical dry forest of Venezuela: Characterization and current conservation status. *Biotrópica* 37: 531-546.
- Feddermann N, Finlay R, Boller T, Elfstrand M (2010) Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology* 3: 1-8.
- Fitter A (2005) Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93:231-243.

- Flora representativa de Yucatán (2007) Gobierno del estado de Yucatán. Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente. D.R. Gobierno del Estado de Yucatán 2007 - 2012, México. <http://www.yucatan.gob.mx/estado/flora/jabin/>
- Gavito M, Perez-Catillo D, Gonzalez-Monterrubio C, Vieyra-Hernández T, Martinez-Trujillo M (2008) High compatibility between arbuscular mycorrhizal fungal communities and seedlings of different land use types in a tropical dry ecosystem. *Mycorrhiza* 19: 47-60.
- Gebrekirostos A, Teketay D, Fetene M, Mitlöhner R (2006) Adaptation of five co-occurring tree and shrub species to water stress and its implication in restoration of degraded lands. *Forest Ecology and Management* 229: 259-267.
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C (2010) Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth-Physiological and Genetics Aspects Pp.3-32. En: Koltai H & Y Kapulnik (eds.). *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and function*. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York.
- Goicoechea N, Antolin M, Sanchez-Díaz M (1997) Gas Exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. *Physiologia Plantarum* 100: 989-977.
- Goicoechea N, Merino S, Sanchez-Díaz M (2004) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to the adaptations exhibited by the deciduous shrub *Anthyllis cytisoides* under water deficit. *Physiologia Plantarum* 122: 453-464.
- Goicoechea N, Merino S, Sanchez-Díaz M (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi can contribute to maintain antioxidant and carbon metabolism in nodules of *Anthyllis cytisoides* L. subjected to drought. *Journal of Plant Physiology* 162: 27-35.

- González V (2003) Delta del Orinoco. Pp. 900-917. En Aguilera M, Azocar A & E González (eds.). Biodiversidad de Venezuela Tomo II., Fundación Polar, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Fondo Nacional para la Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT). Editorial ExLibris, Caracas, Venezuela.
- González V (2007) La vegetación de la Isla de Margarita y sus interrelaciones con el ambiente físico. Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales 167: 131-161.
- Gordon A, Lea P, Rosenberg C, Trinchant J (2001) Nodule formation and function. Pp.101-146 En: Lea P & M Gaudry (eds.) Plant Nitrogen. Springer-Verlag editions. Berlin, Heidelberg, New York.
- Govindarajulu M, Pfeffer P, Jin H, Abubaker J, Douds D, Allen J, Bücking H, Lammers P, Hill S (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature doi: 10.1038/nature03610
- Graham J, Abbott L (2000) Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 220: 207-218.
- Harrison M (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual Review of Microbiology 59:19-42.
- Hart M, Reader R, Klironomos J (2001) Life-History Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Relation to Their Successional Dynamics. Mycologia 93: 1186-1194.
- Helgason T, Fitter A (2009) Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). Journal of Experimental Botany. 60: 2465-2480.

- Helgason T, Merryweather J, Denison J, Wilson P, Young J, Fitter A (2002) Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371-384.
- Hernandez G, Cuenca G, Garcia A (2000) Behaviour of arbuscular-mycorrhizal fungi in *Vigna luteola* growth and its effect on the exchangeable ( $^{32}\text{P}$ ) phosphorus of soil. *Biology and Fertility of Soils* 31: 232-236.
- Herrera H, Salamanca C, Barea J (1993) Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover decertified Mediterranean ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 59:129-133.
- Herrera-Peraza R, Hamel C, Fernández F, Ferrer R, Furrázola E (2010) Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza* DOI 10.1007/s00572-0100322-6.
- Hokche O, Berry P, Huber O (eds.) (2008) Nuevo Catálogo de la flora vascular de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas. 859 p.
- Honrubia M (2009) Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66: 133-144.
- Hoyos J (1985) Flora de la Isla de Margarita. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle, Caracas, Venezuela. 277 p.
- Huante P, Rincon E, Chapin III F (1995) Responses to phosphorous of contrasting successional tree seedling species from the tropical deciduous forest of Mexico. *Functional Ecology* 9:760-766.
- Huat O, Awang K, Hashim A, Majid N (2002) Effects of fertilizers and vesicular-arbuscular mycorrhizas on the growth and photosynthesis of *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs seedlings. *Forest Ecology and Management* 158: 51-58.

- Huber O, Alarcón C (1988) Mapa de Vegetación de Venezuela 1:2.000.000. The Nature Conservancy, MARNR. Oscar Todtmann Editores. Caracas, Venezuela.
- Hunt R, Neal A, Laffarga J, Montserrat-Marti G, Stockey A, Whitehouse J (1993) Mean relative growth rate. Pp. 98-102. En: Hendry E & J Grime (eds.). Methods in comparative plant ecology. Chapman & Hall, London.
- Jackson M (1976) Análisis Químico del Suelo. 3a ed. Omega. Barcelona, España. 662 p.
- Jakobsen I, Abbott L, Robson A (1992) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. I. Spread of hyphae. New Phytologist 120: 371-380.
- Janos D (1980) Mycorrhizae Influence Tropical Succesion. Biotropica: 56-64.
- Janos D (2007) Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. Mycorrhiza 17: 75-91.
- Jansa J, Mozafar A, Frossard E (2005) Phosphorous acquisition strategies within arbuscular mycorrhizal fungal community of a single field site. Plant Soil 276: 163-176.
- Johanson J, Paul L, Finlay R (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbiology Ecology 48: 1-13.
- Johnson N, Graham J, Smith F (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. New Phytologist 135: 575-586.
- Jones H (1983) Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology. pp. 323.

- Kaschuk G, Kuyper T, Leffelaar P, Hungria M, Giller K (2009) Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1233-1244.
- Kenrick P, Crane P (1997) The origin and early evolution of plant on land. *Nature* 389: 33-39.
- Khan I, Ahmad S, Mirza S, Nizami M, Athar M, Shabbir S (2007) Growth Response of Buff el Grass (*Cenchrus ciliaris*) to Phosphorus and Mycorrhizal Inoculation. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 72: 129-132.
- Klironomos J (2003) Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292-2301.
- Klironomos J, Hart M (2002) Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12: 181-184.
- Koide R, Schreiner R (1992) Regulation of the vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 557-581.
- Krebs C (1999) *Ecological Methodology*, 2<sup>nd</sup> edition. Addison Wesley Longman Inc. Educational Publishers, Menlo Park. California, USA.
- Kyllo DA Velez V, Tyree M (2003) Combined effects of arbuscular mycorrhizas and Light on water uptake of the neotropical understory shrubs, Piper y Psychotria. *New Phytologist* 160: 443-454.
- Labidi S, Zouaghi M, Wallander H (2006) Effects of compost addition on extra-radical growth of arbuscular mycorrhizal fungi in *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* savanna in a pre-Saharan area. *Applied Soil Ecology* 969: 1-9.

- Levy Y, Krikum J (1980) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations. *New Phytologist* 85: 25-31.
- Lima A, Rodal M (2010) Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Arid Environments* 74: 1363-1373.
- Lopes-Leal P, Stürmer S, Siqueira J (2009) Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:111-121.
- Louis I (1990) A Mycorrhizal Survey of Plant Species Colonizing Coastal Reclaimed Land in Singapore. *Mycologia* 82: 772-778.
- Maass J (1995) Conversion of tropical dry forest to pasture and agriculture. Pp. 399-422. En: Bullock S, Mooney H & E Medina (Eds.). *Seasonally Dry Tropical Forest*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mansfield T, Hetherington A, Atkinson C (1990) Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review in Plant Physiology* 41:55-75.
- Manoharan P, Shanmugaiyan V, Balasubramanian N, Gomathinayagam S, Sharma M, Muthuchelian K (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.
- Marulanda A, Azcón R, Ruiz-Lozano J (2003) Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119: 526-522.
- Mathimaran N, Ruh R, Vullioud P, Frossard E, Jansa J (2005) *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavily textured agricultural soil. *Mycorrhiza* 16: 61-66.

- Mc. Gonigle T (2001) On the use of non linear regression with the logistic equation for changes with time of percentage root length colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 10: 249-254.
- Mc. Gonigle T, Miller M, Evans D, Fairchild G, Swan J (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular -arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 115: 495-501.
- Meli, P (2003) Restauración ecológica de bosques tropicales. Veinte años de investigación académica. *INCI* 10: 581-589.
- Mengue J, Sterile D, Bagyaraj D, Johnson E, Leonard R (1978) Phosphorous concentration in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist* 80: 575-578.
- Miranda J, Harris P (1994) Effects of soil P on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 128: 103-108.
- Morton J (1986) Three New Species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from High Aluminum, Low pH Soils in West Virginia. *Mycologia* 78: 641-648.
- Mosse B, Stribley D, LeTacon F (1981) Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Advanced in microbiological ecology* 5: 137-210.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31: 203-216.
- Murphy J, Riley J (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- Murphy P, Lugo A (1986) Ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic Annual Review*. *Ecology Systematic* 17: 67-88.

- Muthukumar T, Udayan K (2000) Arbuscular mycorrhizas of plant growing in the western ghats region Southern India. *Mycorrhiza* 9: 297- 313.
- Oliveira-Miranda M (2010) Riesgo de eliminación de los ecosistemas terrestres de Venezuela. Pp. 109-231 En: Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela. Rodriguez J, Rojas-Suarez F & D Giraldo-Hernández (eds.). Provita, Shell Venezuela, Lenovo (Venezuela). Caracas, Venezuela.
- Olivera M, Tejera N, Iribarne C, Ocana A, Lluch C (2004) Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Effect of phosphorous. *Physiologia Plantarum* 121: 498-505.
- Olsen R, Cole V, Watanabe F, Dean L (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA. Washington, D.C. Circular 939.
- Olsson P, Bååth E, Jakobsen I (1997) Phosphorus effects on the mycelium and storage structures of an arbuscular mycorrhizal fungus as studied in the soil and roots by analysis of fatty acid signatures. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3531-3538.
- Olsson P, Hammer E, Pallon J, Van Aarle I, Wallander H (2011) Elemental composition in vesicles of an arbuscular mycorrhizal fungus, as revealed by PIXE analysis. *Fungal Biology* 115: 643-648.
- Olsson P, Hansson M, Burleigh S (2006) Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and *Glomus intraradices* high-affinity P transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4115-4120.
- Olsson P, Jakobsen I, Wallander H (2002) Foraging and resource allocation strategies of mycorrhizal fungi in a patchy environment. *Mycorrhizal Ecology* 157: 93-115.

- Onguene N, Kuyper T (2005) Growth response of three native timber species to soils with different arbuscular mycorrhizal inoculum potentials in South Cameroon: Indigenous inoculum and effect of addition of grass inoculum. *Forest Ecology and Management* 210: 283-290.
- Osonubi O, Bakare O, Mulongoy K (1992) Interactions between drought stress and vesicular-arbuscular mycorrhiza on the growth of *Faidherbia albida* (Syn. *Acacia albida*) and *Acacia nilotica* in sterile and non-sterile soils. *Biology and Fertility of Soils* 14: 159-165.
- Ouahmane L, Thioulouse J, Hafidi M, Prin Y, Ducouso M, Galiana A, Plenchette C, Kisa M, Duponnois R (2007) Soil functional diversity and P solubilization from rock phosphate after inoculation with native and allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and Management* 241: 200-208.
- Padilla L, Encina C (2005) Changes in root morphology accompanying mycorrhizal alleviation of phosphorus deficiency in micropropagated *Annona cherimolla* Mill. plants. *Scientia Horticulturae* 106: 360-369.
- Pacovsky R (1989) Carbohydrate protein and amino acid status of Glycine-Glomus-Bradyrhizobium symbioses. *Physiologia Plantarum* 75: 346-354.
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Figueroa D, Caravaca F, Roldán A, Barea J (2002) Effects of mycorrhizal inoculation of shrubs from Mediterranean ecosystems and composted residue application on transplant performance and mycorrhizal developments in a desertified soil. *Biology and Fertility of Soils* 36: 170-175.
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Focus on Symbiosis - Nature Reviews* 6: 763-775.

- Pellegrino E, Bedini S, Avio L, Bonari E, Giovannetti M (2011) Field inoculation effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean agricultural soil. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 367-376.
- Phillips J, Hayman D (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158 -161.
- Picone C (2000) Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture. *Biotropica* 32: 734-750.
- Pirozynski K (1981) Interactions between fungi and plants through the ages. *Canadian Journal of Botany* 59: 1824-1827.
- Plenchette C, Fortin J y Furlan V (1983) Growth response of several plant species to mycorrhiza in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 70: 191-209.
- Poorter H (1989) Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. Pp. 45-68. En: Lambers H (ed.). *Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants*. SPB Academic Publishing. The Hague, Nedtherlads.
- Porcel R, Aroca R, Azcon R, Ruiz-Lozano J (2006) PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology* 60: 389-404.
- Porcel R, Ruiz-Lozano J (2004) Arbuscular mycorrhizal influence of leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 403: 1743-1750.

- Porter W (1979) The "Most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscula mycorrhizal fungi in soil. *Australian Journal of Soil Research* 17: 515-519.
- Puppi G, Azcón R, Höflich G (1994) Management of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. Pp. 201-215. En: Gianinazzi S, Schüepp H (Eds.). *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser, Basel.
- Querejeta J, Barea J, Allen M, Caravaca F, Roldán A (2003) Differential response of  $\delta^{13}\text{C}$  and water use efficiency to arbuscular mycorrhizal infection in two aridland woody plant species. *Oecologia* 135: 510-515.
- Querejeta J, Allen M, Caravaca F, Roldán A (2006) Differential modulation of host plant  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  by native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid environment. *New Phytologist* 169: 379-387.
- Qiang-Sheng W, X Ren-Xue, Z Ying-Ning, W Gui-Yang (2007) Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings to drought stress. *Acta Physiol Plant.* 29:543-549.
- Rao A, Tak R (2002) Growth of different tree species and their nutrient uptake in limestone mine spoil as influenced by arbuscular mycorrhizal (AM)-fungi in Indiana arid zone. *Journal of Arid Environment* 51: 113-119.
- Remy W, Thomas T, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 11841-11843.

- Requena N, Pérez-Solís E, Azcón-Aguilar C, Jeffries P, Barea J (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied Environmental Microbiology* 67: 495-498.
- Reynolds H, Packer A, Bever J, Clay K (2003) Grassroots ecology: plant-microbe-soil interactions as drivers of plant community structure and dynamics. *Ecology* 84: 2281-2291.
- Rillig M, Mummey D (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171:41-53.
- Rincon E, Huante P, Alvarez-Añorve M (2000) Análisis de crecimiento de tres especies de *Caesalpinia* (Leguminosae) de la selva caducifolia de Chamela, Mexico. *Boletín de la Sociedad Botánica de Mexico* 66: 5-13.
- Robinson-Boyer L, Grzyb I, Jeffries P (2009) Shifting the balance from qualitative to quantitative analysis of arbuscular mycorrhizal communities in field soils. *Fungal Ecology* 2: 1-9.
- Rodriguez J, Rojas-Suárez F (eds.) (2008) Libro Rojo de la Fauna Venezolana. Tercera Edición. Provita y Shell Venezuela, S.A., Caracas, Venezuela. 364 pp.
- Roth-Nebelsick A, Uhl D, Mosbrugger V, Kerp H (2001) Evolution and function of leaf venation architecture: a review. *Annals of Botany* 87:553-566.
- Rudd V (1969) A synopsis of the genus *Piscidia* (Leguminosae). *Phytologia* 18: 473-499.
- Ruiz-Lozano J, Azcón R (1995) Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by fungal species and water status. *Physiologia Plantarum* 95: 472-478.

- Ruiz-Lozano J, Azcón R (2000) Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. From saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10: 137-143.
- Ruiz-Lozano J, Porcel R, Aroca R (2006) Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytologist* 171: 693-698.
- Safir G, Boyer J, Gerdemann J (1972) Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Plant Physiology* 49: 700-703.
- Sanchez-Azofeifa G, Kalacska M, Quesada M, Calvo-Alvarado J, Nassar J, Rodriguez J, (2005) Need for integrated research for a sustainable future in tropical dry forests. *Conservation Biology* 19: 1-2.
- Sánchez-Blanco M, Fernández T, Morles M, Morte A, Alarcón J (2004) Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *Journal of Plant Physiology* 161:675-682.
- Sanders F (1975) The effect of foliar-applied phosphate of the mycorrhiza infections of onion roots. Pp. 261-276 En: Sanders F, Mosse B, P Tinker (Eds.). *Endomycorrhizas*. Academic Press, New York.
- Sanz V (2001) "Ecología de *Amazona barbadensis* (Aves: Psittacidae) en la Península de Macanao (Isla de Margarita). Un estudio de las características del hábitat, dinámica de uso y selección". Seminario de Avance de la Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- Sanz V (2004) Ecología de *Amazona barbadensis* (Aves: Psittacidae): caracterización y uso del hábitat en la Península de Macanao (Isla de Margarita) a diferentes escalas

espaciales y temporales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Schenck N, Pérez Y (1990) Manual for the identification of mycorrhizal fungi. 3<sup>a</sup> ed. Synergistic Publications. University of Florida, USA. 241 p.

Schroeder M, Janos D (2004) Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 264: 335-348.

Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.

Sieverding E (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. In Technical Cooperation Federal Republic of Germany. 371 p.

Simon L, Bousquet J, Levesque R, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.

Smart L, Moskal W, Cameron K, Bennett A (2001) Mip genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant and Cell Physiology* 42: 686-693.

Smith S, Facelli E, Pope S, Smith F (2010) Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 326: 3-20.

Smith S, Read D (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Cambridge, UK. 605 p.

Smith S, Read D (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Third Edition. Academic Press, Boston. 800 p.

Smith S, Smith F, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated

with mycorrhizal responses in growth and total P uptake. *New Phytologist* 162: 511–524.

Soil Survey Staff (2003) *Keys to Soil Taxonomy*. 9<sup>a</sup> ed. Natural Resources Conservation Service. USDA. Washington, DC, EEUU. 332 pp.

Sprent J, James E (2007) Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144: 575-581.

Subramanian K, Charest C, Dwyer L, Hamilton R (1997) Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential, sugar content, and P content during drought and recovery of maize. *Canadian Journal of Botany* 75: 1582-1591.

Subramanian K, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P (2006) Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* 107:245-253.

Terashima I (1992) Anatomy of non-uniform leaf photosynthesis. *Photosynthesis Research* 31:195-212.

Terra GIS (2011). *Soil Moisture Classification*. Web-based Geographic information System (GIS) of New South Wales University. © Copyright UNSW 2007.  
[http://www.terragis.bees.unsw.edu.au/terraGIS\\_soil/sp\\_water-soil\\_moisture\\_classification.html](http://www.terragis.bees.unsw.edu.au/terraGIS_soil/sp_water-soil_moisture_classification.html)

Tinker P, Durall D, Jones M (1994) Carbon use efficiency in mycorrhizas: theory and sample calculations. *New Phytologist* 128: 115-122.

Tommerup I (1992) Methods for the study of the population biology of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Pp. 23-51. En: Norris J, Read D y A Varma (eds.) *Methods in microbiology* vol. 24. Academic Press, London. United Kingdom.

- Van Aarle I, Cavagnaro T, Smith S, Smith F, Dickson S (2005) Metabolic activity of *Glomus intraradices* in Arum- and Paris- type arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytologist* 166: 611-618.
- van der Heijden M (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grasslands. *Ecology Letters* 7: 293-303.
- van der Heijden M, Klironomos J, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders I (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 72-75.
- Varenes A, Goss M (2007) The tripartite symbiosis between legumes, rhizobia and indigenous mycorrhizal fungi is more efficient in undisturbed soil. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2603-2607.
- Wang G, Coleman D, Freckman D, Dyer M, McNaughton S, Acra M, Goeschl J (1989) Carbon partitioning patterns of mycorrhizal versus non-mycorrhizal plants: real time dynamic measurements using  $^{14}\text{C}$ . *New Phytologist* 112:489-493.
- Wehner J, Antunes P, Powell J, Mazukatow J, Rillig M (2010) Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity. *Pedobiologia* 53: 197-201.
- Willard H, Merrit L, Dean J (1974) *Instrumental methods of analysis*. 5<sup>th</sup> edition Van Nostrand.
- Wilson P, Thompson K, Hodgson J (1999) Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist* 143: 155-162.
- Wu Q, Xia R (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.

- Wylie R (1951) Principles of foliar organization shown by sun–shade leaves from ten species of deciduous dicotyledonous trees. *American Journal of Botany* 38:355-361.
- Yao Q, Wang L, Zhu H, Chen J (2009) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on root system architecture of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. *Scientia Horticulturae* 121: 458-461.
- Zangaro W, Nishidate F, Vandresen J, Andrade G, Nogueira M (2007) Root mycorrhizal colonization and plant responsiveness are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 23: 53-62.
- Zangaro W, Nisizaky S, Domingos J, Nakano E (2002) Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 19: 315-324.
- Zangaro, W, Bononi V, Trufem, S (2000) Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 16: 603-621.
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail A (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* 97: 111-119.
- Zhang Y, Wang P, Yang Y, Bi Q, Tian S, Shi X (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi improve reestablishment of *Leymus chinensis* in bare saline-alkaline soil: Implication on vegetation restoration of extremely degraded land. *Journal of Arid Environments* 75: 773-778.