



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Respuesta a las micorrizas arbusculares del virote
(*Caesalpinia mollis* (H.B.K) Spreng) árbol vulnerable de
un matorral xerófito en la península de Macanao, estado
Nueva Esparta**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la bachiller Karla C. Cáceres M.
como requisito parcial para optar al
título de Licenciada en Biología.

Tutora: Profa. Alicia Cáceres.

CARACAS, VENEZUELA
Septiembre, 2012

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por la paciencia y comprensión durante este largo camino, pero sobre todo, por ser mi mayor fuente de inspiración, mi modelo a seguir: “Cuando sea grande quiero ser como tú”. A mi hermana y mi cuñado, por compartir cada tropiezo con una palabra de aliento, y cada momento de satisfacción disfrutándolo tanto como yo. A mis abuelos, mis ángeles que están en el cielo que sé que nunca me desampararon, ni lo harán.

A la Profa. Alicia Cáceres, por ser más que una tutora, una amiga. Gracias por la enseñanza, la confianza, los buenos momentos y hasta por los no tan buenos que compartimos.

A mis jurados, Prof. Ismael Hernández y Profa. Pauline Arrindell por su valioso tiempo y por la asesoría.

A Inés Aguirre por la colaboración prestada, pero sobre todo por haber sido parte fundamental del camino y mi apoyo incondicional. A Eliana Navarro por transmitirme siempre su buena vibra y hacerme sonreír en todo momento.

A todo el equipo del Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas Superiores. A la Profa. Carolina Kalinhoff por el aporte de los inóculos y la información necesaria para complementar el presente trabajo, así como toda la colaboración prestada. A Yamilet Lira por la ayuda prestada, los consejos y las risas.

Al equipo de la arenera La Chica, Asnaldo Marín y Romer Marín, por toda la colaboración prestada, sin la cual el trabajo de campo no hubiese sido posible.

Al equipo del Laboratorio de Absorción Atómica del Instituto de Ciencias de la Tierra (ICT) por su excelente trato. Al Prof. Williams Meléndez, Lic. Franco Palmiotto y Lic. Angel Rivas por la excelente colaboración.

A Lorena Carrillo por enseñarme que tengo el pincel y los colores, y que puedo pintar un paraíso y entrar en él. Gracias totales.

A Kervy Escobar, Adriana Zamora, Markling Peraza, Adriana Salazar, Marcia Arteaga, César Arias e Ylhay González por el apoyo, la paciencia, las palabras de aliento, las oraciones y las porritas.

Y a todas las personas que formaron parte de este trayecto con su afecto, apoyo y compañía. ¡Eternamente agradecida!.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página.
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
ANTECEDENTES.....	17
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
ÁREA DE ESTUDIO.....	27
METODOLOGÍA.....	30
- Material vegetal.....	30
- Suelos e inóculos.....	31
- Fase de invernadero.....	32
- Fase de campo.....	34
- Determinaciones.....	36
- Análisis estadísticos.....	39
RESULTADOS.....	40
- Fase de invernadero.....	40
- Fase de campo.....	46
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXOS.....	107
- Anexo 1. Resultados del ANOVA de dos vías para los diferentes parámetros determinados en la fase de invernadero.....	108
- Anexo 2. Características de los suelos del matorral y parcela sucesional de 20 años (arbustal).....	109
- Anexo 3. Listado de morfotipos de Glomeromycorta presentes en los inóculos producidos con los suelos provenientes de matorral y de la parcela sucesional de 20 años.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Matorral xerófito y localidad sucesional de 20 años.....	29
Figura 2. Plántulas de <i>C. mollis</i> sembradas en tubetes, cultivadas bajo condiciones de invernadero.....	33
Figura 3. Plántulas de <i>C. mollis</i> sembradas en bolsas de 3Kg en un vivero ubicado en la arenera La Chica, en la península de Macanao.....	35
Figura 4. Aspecto de la siembra. Trasplante luego de 248 DDS en el vivero en campo.....	35
Figura 5. Altura de <i>C. mollis</i> a los 248 DDS bajo condiciones de invernadero.....	41
Figura 6. Biomasa (peso seco) de <i>C. mollis</i> a los 248 DDS bajo condiciones de invernadero.....	42
Figura 7. Relación vástago/raíz en plantas con 248 DDS bajo condiciones de invernadero.....	42
Figura 8. Plantas de <i>C. mollis</i> después de 248 DDS.....	43
Figura 9. Nitrógeno foliar en plantas de <i>C. mollis</i> con 248 DDS en condiciones de invernadero.....	44
Figura 10. Índice de dependencia micorrízica (IDM) en plantas de 248 DDS bajo condiciones de invernadero.....	45
Figura 11. Supervivencia en plantas de <i>C. mollis</i> después de 248 DDS bajo condiciones de invernadero.....	46
Figura 12. Biomasa (peso seco) en plantas de <i>C. mollis</i> . Primera cosecha después de 120 DDS. Segunda cosecha después de 248 DDS.....	49
Figura 13. Relación vástago/raíz en plantas de <i>C. mollis</i> cultivadas en el vivero en campo.....	50
Figura 14. Asignación de biomasa en plantas de <i>C. mollis</i> cultivadas en campo.....	50
Figura 15. Altura en plantas de <i>C. mollis</i> con 496 DDS en el campo.....	51
Figura 16. Plantas de <i>C. mollis</i> en la primera cosecha realizada después de 120 DDS en el campo.....	53
Figura 17. Plantas de <i>C. mollis</i> en la segunda cosecha realizada después de 248 DDS en el campo.....	53

Figura 18. Contenido de fósforo foliar en plantas de <i>C. mollis</i> con 248 DDS en el campo.....	54
Figura 19. Contenido de nitrógeno foliar en plantas de <i>C. mollis</i> con 248 DDS en el campo.....	55
Figura 20. Índice de respuesta micorrízica (IRM) en plantas de 248 DDS en el campo.....	56
Figura 21. Tasa de crecimiento relativo en plantas (TCR) de <i>C. mollis</i> en campo.....	56
Figura 22. Porcentaje de sobrevivencia en plantas de <i>C. mollis</i> con 496 DDS en el campo.....	57

RESUMEN

La extracción de arena representa una de las principales perturbaciones a la que se encuentra expuesta la península de Macanao, Isla de Margarita, lo cual origina la destrucción de la cobertura vegetal del bosque seco y sus matorrales asociados. Las leguminosas representan el grupo más numeroso en términos de especies (21) presentes en esta zona, dentro del cual se encuentra *Caesalpinia mollis*, una especie arbórea reportada como vulnerable, y que se localiza únicamente en ecosistemas maduros correspondientes a matorrales xerófitos y bosques secos de la península, mas no se encuentra en las localidades sucesionales originadas por la extracción de arena. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrízicos provenientes del matorral xerófito y de una localidad de 20 años de sucesión, sobre el crecimiento y respuesta micorrízica de plantas de *C. mollis* cultivadas en suelos provenientes de dichas zonas, bajo condiciones de invernadero, así como también su crecimiento y sobrevivencia en campo después de sembrarlas en un área recién perturbada. En el ensayo realizado bajo condiciones de invernadero, la inoculación favoreció el crecimiento de *C. mollis*, siendo la altura, biomasa y el contenido de nitrógeno significativamente mayores en plantas cultivadas en suelos provenientes del matorral, con respecto a las cultivadas en el suelo de la localidad sucesional de 20 años. En el ensayo en campo, la inoculación con HMA aumentó la sobrevivencia de *C. mollis*, y la inoculación con HMA provenientes del matorral favoreció su crecimiento, obteniéndose valores significativamente mayores para la mayoría de los parámetros evaluados, tales como biomasa,

contenido de nutrientes, TCR. Se concluye que el establecimiento de programas de restauración que incluyan la inoculación con HMA provenientes del matorral xerófito sin perturbar, utilizando como sustrato de siembra suelos provenientes de la misma localidad, constituye un estrategia favorable que podría representar un factor determinante en el establecimiento, crecimiento y sobrevivencia de las plántulas de *C. mollis* en las localidades perturbadas por la actividad minera.

INTRODUCCIÓN

Las regiones áridas y semiáridas, dentro de las zonas de vida de Venezuela, representan un alto porcentaje del territorio nacional (Castillo *et al.* 1992), con un total aproximado de 28.000 km² cubiertos por vegetación xerófila espinosa (Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables, 1980). Algunas de estas formaciones vegetales han sido intervenidas, degradadas, y en muchos casos, han desaparecido bajo la presión urbana, agrícola y ganadera (Ewel & Madriz, 1968).

Los bosques secundarios o intervenidos en los trópicos suelen ser definidos como vegetaciones leñosas sucesionales que se desarrollan sobre tierras cuya vegetación original ha sido destruida por actividades humanas (Santana *et al.* 2002). Entre los factores que afectan la riqueza de especies y la estructura de la vegetación, destacan las perturbaciones antrópicas, las cuales representan el factor de mayor impacto en las comunidades naturales. Una de las consecuencias de las perturbaciones es la división del ambiente natural de bosque en un mosaico de estados sucesionales de la vegetación, lo cual puede determinar la estructura en manchones en las comunidades y la consecuente especialización de las especies a hábitats particulares (López & Ramírez, 2004).

Venezuela contiene una fracción importante de ecosistemas más amenazados a nivel mundial y una extensa superficie de áreas naturales en condición prístina, la mayoría de los cuales corresponden a ecosistemas boscosos

considerados como las últimas fronteras forestales del mundo tropical (Bevilacqua & Ochoa, 2001).

En la península de Macanao, ubicada al oeste de la isla de Margarita, la explotación de minas de arena a cielo abierto, que se llevó a cabo desde 1976, ha alterado radicalmente la matriz suelo-vegetación, tanto en el sector norte como en el sector sur de la península. La extracción de los fondos arenosos de los márgenes de las quebradas intermitentes eliminó 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).

Los matorrales xerófitos representan la principal comunidad de plantas presente en la Isla de Margarita, ocupando el 56,70% de la vegetación con 5205,57 ha. (González, 2007). 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.

Los territorios de explotación minera a cielo abierto representan uno de los espacios de la superficie terrestre más profundamente modificados por el hombre ya que todos los aspectos del medio físico son alterados o destruidos: topografía, suelo, vegetación, hidrología, fauna, microclima. La explotación a cielo abierto comprende una excavación y un sistema de transporte que junto a los volúmenes

de materiales que se mueven, condicionan que las áreas perturbadas sean extensas (López, 1987).

La explotación minera es considerada una de las causas principales de deforestación (Pacheco *et al*, 2011). La deforestación produce un impacto negativo que conduce a la erosión del suelo, daños a los hábitats de vida silvestre, la degradación de las cuencas hidrográficas y el deterioro de la calidad de vida (UNCED, 1992). Esta deforestación y la conversión del hábitat son reconocidas como el mayor factor en la crisis de la diversidad biológica presente (May *et al.*, 1995). Los modelos de pérdida de hábitats sugieren que este proceso puede llevar a que grupos de especies se extingan, a menos que el hábitat sea reparado o restaurado (Tilman *et al.*, 1994).

La eliminación del agente causante de la degradación no es suficiente para que la recuperación de estas áreas sea alcanzada, ya que aspectos tales como la propagación vegetativa y el banco de semillas del suelo son severamente afectados, disminuyendo la capacidad del sistema para regenerarse de forma natural. En consecuencia, es probable que la intervención humana sea necesaria para acelerar los procesos de regeneración y reconstrucción de estas comunidades vegetales (Fajardo, 2005). El proceso de restauración es esencial para la recuperación del funcionamiento de este ecosistema y para la preservación de la biodiversidad, ya que debido a las actividades antrópicas muchas especies, tanto animales como vegetales, se encuentran en riesgo.

Hay muchas definiciones de restauración ecológica (Jackson *et al.* 1995), pero todos tienen dos puntos en común. El primero es que la restauración requiere de la manipulación humana de los ecosistemas perturbados y no se basan estrictamente en los procesos naturales de sucesión (Allen *et al.* 2003). El segundo punto es que la restauración tiene como objetivo crear un ecosistema similar al anterior, lo cual puede resultar muy difícil por la escasez de sistemas de referencias, que en muchos casos han desaparecido (Aronson *et al.*, 1993; Pickett & Parker, 1994; White & Walker, 1997; MacMahon, 1998).

La restauración de las áreas degradadas para la conservación ambiental, se basa en el establecimiento de especies nativas (Ramírez, 1997; Leopold *et al.*, 2001; Elliot *et al.*, 2002; Pakkad *et al.*, 2003). En general, podría decirse que en la ejecución de los programas de restauración las especies de plantas adecuadas son aquéllas que pueden tolerar y mejorar las condiciones adversas del sitio y además que actúen para acelerar los procesos de colonización atrayendo a los agentes que dispersan las semillas (Lamb *et al.*, 1997).

La estrategia restauradora debe basarse en la comprensión de los factores limitantes de la progresión de la sucesión secundaria, en el espacio y en el tiempo, y en el desarrollo de tratamientos que superen dichas limitaciones. El propósito concreto suele ser el de acelerar la sucesión. La técnica de restauración forestal consiste en introducir algún componente clave (generalmente una especie arbórea, en algunos casos con sus simbiontes) y dejar después que la naturaleza siga su curso (Vallejo *et al.* 2003). Las plantas consideradas en peligro de

extinción o gravemente amenazadas son especies a considerar cuando se establecen programas de restauración (Escudero & Iriondo, 2003).

La restauración de poblaciones vegetales se ha convertido en una herramienta importante para la conservación de especies en peligro de extinción o amenazadas (Maunder, 1992), debido a que los hábitats naturales están siendo destruidos por todo el mundo a un ritmo acelerado, el valor de esta alternativa de manejo va ganando peso, al tiempo que desaparecen los lugares a proteger (Falk *et al.* 1996).

Los procesos de deforestación de áreas boscosas afectan no sólo la biomasa aérea y subterránea sino también parte de los procesos biológicos que se encuentran relacionados con los mecanismos de recuperación de nutrientes, entre los cuales se encuentran los hongos formadores de micorrizas, que además de representar una de las simbiosis más extendidas e importantes sobre la tierra, poseen un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas en condiciones naturales (Brundett *et al.*, 1996).

El sistema de raíces de la mayoría de las plantas vasculares (95%) hospedan diferentes comunidades de hongos micorrízicos y se encuentran en una amplia gama de hábitats (Read, 1991; Smith & Read, 1997), donde los más comúnmente representados en las zonas tropicales son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Marschner, 1990).

La formación de micorrizas conlleva amplios cambios fisiológicos en el hospedero que hacen que éste se desarrolle y responda al estrés ambiental de

manera diferente a las plantas no micorrizadas (Linderman, 1993). El incremento en la capacidad de incorporación de nutrientes en el suelo, tales como fósforo, nitrógeno, zinc y cobre, es el principal beneficio que obtienen las plantas hospedadas de HMA (Jakobsen *et al.*, 1992; Smith & Read, 1997; Govindarajulu *et al.*, 2005), mientras el hongo obtiene compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Brundrett, 1996).

Los HMA pertenecen al phylum Glomeromycota que forman la micorriza arbuscular (MA) con una gran gama de plantas vasculares y no vasculares. Los HMA tienen un micelio aseptado y delgado que al penetrar dentro de la raíz, se extiende entre y dentro de las células corticales de la planta, donde puede dar lugar a varias estructuras características solamente de estos hongos, como lo son los arbuscúlos y las vesículas (Álvarez & Peña, 2009). Los arbuscúlos son estructuras intrincadas y ramificadas que se forman a partir de ramificaciones dicotómicas de la hifa y funcionan como sitios de transferencia de carbono, agua y minerales entre el hongo y la planta hospedada (Harley & Smith, 1984; Johnson *et al.*, 1999). Las vesículas son estructuras intracelulares redondas, elípticas o irregulares, formadas por un hinchamiento de la hifa entre y dentro de las células corticales, que almacenan fosfolípidos y no se presentan en todos los géneros de HMA (Barker *et al.*, 1998; Johnson, 1999). Las delgadas hifas (de 2-5 μm de diámetro) que se extienden desde la raíz colonizada formando el micelio externo del hongo, pueden penetrar poros del suelo que son inaccesibles para los pelos radicales, los cuales poseen un diámetro mucho mayor (de 10 a 20 μm),

incorporando agua y nutrientes a partir de zonas del suelo no disponibles para las raíces (Ruiz- Lozano & Azcón, 1995). Además, las MA protegen a las plantas de patógenos radicales (Wehner, 2010), y aumentan su sobrevivencia bajo condiciones abióticas estresantes, como el déficit hídrico (Augé 2001; Caravaca *et al.*, 2003; Porcel & Ruiz-Lozano, 2004).

Muchas plantas son dependientes de los HMA, lo que indica que en suelo estéril el crecimiento de las plántulas es deficiente (Barrer, 2009). Hay especies de plantas que no son dependientes de los HMA en las primeras etapas de crecimiento debido a que tienen semillas con grandes reservas alimenticias, suficientes para las primeras fases de desarrollo, no obstante, en etapas posteriores, cuando las reservas se han acabado, ellas pueden convertirse en plantas micotróficas dependientes (Saggin- Júnior & Lovato, 1999).

La relación HMA-planta no es considerada específica. Un sistema radical puede ser colonizado simultáneamente por varias especies de hongos y alternativamente un hongo puede colonizar simultáneamente raíces de varias especies vegetales que crecen próximas, sin embargo, distintas especies muestran un grado diferente de susceptibilidad a la colonización con el hongo (Raju *et al.*, 1988). Las distintas especies de hongos pueden exhibir un potencial de colonización diferente en un mismo hospedador, lo cual se interpreta como diferencias en el grado de compatibilidad entre las plantas y los distintos hongos (Abbott & Robson, 1985; Sieverding, 1991).

La reducción de las actividades microbianas en el sistema del suelo es un acontecimiento fundamental en la alteración de los suelos y su reinstalación es un enfoque esencial de la restauración del hábitat (Quoreshi, 2008), en especial de los hongos formadores de micorrizas ya que dentro de sus ventajas está la prevención de la erosión del suelo, debido a que son un factor en la formación de agregados y la retención de materia orgánica, por lo que le dan estructura al suelo y reducen o evitan el efecto de la erosión tanto hídrica como eólica con su respectiva pérdida de nutrientes (Jasper, 1994; Haselwandter, 1997). Perturbaciones severas alteran la composición y actividad de los hongos micorrízicos, así como a las plantas hospedadoras (Allen *et al.*, 2005).

El rol de los hongos micorrízicos y de otros microorganismos en la restauración de suelos perturbados ha sido objeto de interés para los científicos durante décadas, y se ha determinado que el éxito del establecimiento de plantas de bosques en localidades perturbadas a menudo depende de las diferentes especies de HMA y de la capacidad de las plántulas para captar rápidamente los recursos durante el establecimiento de la plantación (Amaranthus & Perry, 1987; Perry *et al.*, 1987; Van den Driessche, 1991; Dunabeitia *et al.*, 2004).

La minería de arena en Macanao ha provocado la destrucción y remoción del banco de propágulos del suelo, y en combinación con el clima árido a semiárido de la península de Macanao, la recuperación de dichos ambientes se ha limitado considerablemente; es por esta razón que actualmente, después de 20 años, a pesar de que la extracción de arena se encuentra abandonada, el proceso

de recuperación es muy lento (González, 2007). Después de la extracción de arena la materia orgánica del suelo, los bancos de semillas y los nutrientes se diluyen o se ausentan, provocando lixiviación y pérdida de humedad (Prosser & Roseby, 1995; Fajardo *et al.*, 2011).

Caesalpinia mollis es una especie arbórea caducifolia que se localiza únicamente en ecosistemas maduros correspondientes a matorrales xerófitos y bosques secos de la península, mientras que en las localidades sucesionales originadas por la extracción de arena no se encuentran plantas ni semillas en el banco (Fajardo, 2007). En este contexto la producción y uso de inóculos nativos de HMA representa una estrategia favorable para la restauración asistida, ya que los árboles nativos presentan generalmente una mayor compatibilidad funcional con los mismos, aumentando su capacidad de sobrevivir y desarrollarse exitosamente bajo condiciones abióticas estresantes (Caravaca *et al.*, 2003).

Debido a que *Caesalpinia mollis* posee una baja capacidad de dispersión a largas distancias, que le impide recolonizar sitios alejados de su población de origen luego de perturbaciones naturales o antrópicas (Olivieri *et al.*, 2003), la inoculación con HMA nativos podría representar una estrategia que incremente su crecimiento y sobrevivencia en localidades severamente perturbadas. La información obtenida respecto a la respuesta micorrízica de esta especie vulnerable contribuirá al mejoramiento del manejo de los matorrales xerófitos. La explotación arenera en el área de manera persistente y continua, sin duda continuará generando un fuerte impacto sobre estos matorrales y bosques, por lo

que el desarrollo de tecnologías sustentables para la restauración ecológica resulta prioritario.

ANTECEDENTES

La persistente amenaza a la cual han sido sometidos los bosques secos y los matorrales en la región de la Península de Macanao ha generado la pérdida o vulnerabilidad de un gran número de especies vegetales, entre ellas *Caesalpinia mollis*, señalada en el Libro Rojo de la Flora como una especie vulnerable (Llamozas *et al.*, 2003). La principal amenaza que enfrenta la especie se relaciona con la destrucción del hábitat para el desarrollo de actividades agropecuarias y urbanas, y en menor grado, la explotación de su madera; mientras que en la península de Macanao la explotación de arena en las minas de cielo abierto ha ocasionado la desaparición de la misma en las localidades perturbadas. En este sentido, los estudios relacionados con la biología de la especie, específicamente la simbiosis con HMA, podría arrojar resultados importantes con fines de recuperación de áreas degradadas por la explotación de arena en Macanao.

González (2007) visitó cerca de 20 localidades de antiguas explotaciones de arena en la península de Macanao, actualmente abandonadas y con distintos años transcurridos, después de haber detenido los trabajos de explotación, con el objetivo de establecer si por fenómenos de sucesión secundaria, la tasa de restablecimiento de una nueva cobertura arbórea, era lo suficientemente rápida para no justificar alguna actividad no dirigida por el hombre que acelerara dicho proceso. Los resultados preliminares indicaron que, aún después de 20 años de

haberse abandonado la minería de arena, el proceso de recuperación es muy lento.

Después de una perturbación severa, la germinación y el subsecuente establecimiento de plántulas es la etapa más crítica en el ciclo de vida de una planta, por la vulnerabilidad ante diversos factores abióticos (altas temperaturas, irradiación) y bióticos (herbivoría, competencia, alelopatía) que afectan la supervivencia o establecimiento de las especies, especialmente en ambientes limitantes (Padilla, 2005; Fajardo *et al.*, 2011). En este sentido, todos los estudios conducentes a mejorar las condiciones edáficas o restablecer la microbiota del suelo, utilizando técnicas de inoculación de HMA, podrían resultar en zonas severamente perturbadas.

Existen dos alternativas básicas en la utilización de HMA. La primera está relacionada al uso de inóculos de HMA nativos, partiendo de la premisa que la gran mayoría de las especies arbóreas tropicales son dependientes de los HMA para su crecimiento, y cada especie de HMA puede generar diferentes respuestas, en términos de efectividad, por el ambiente y por la planta hospedera (Sierverding 1991).

La otra alternativa es la inoculación de las plantas con cepas de una sola especie de HMA seleccionada, de esta forma se puede aumentar y controlar artificialmente la presencia de los HMA en la rizósfera de la planta, con esta alternativa se puede cambiar localmente la composición de la población de HMA naturales. Sin embargo, la producción de inóculos con fines comerciales a gran

escala es todavía un punto de discusión debido principalmente a que estos hongos son biótrofos obligados y dependen para su desarrollo y reproducción de los productos derivados de la fotosíntesis (Sieverding, 1991).

Numerosos son los trabajos donde se utilizan técnicas de inoculación con HMA tanto introducidos como autóctonos los cuales están enfocados a dilucidar el posible papel de las MA en los mecanismos de evasión de la sequía dentro de los cuales se pueden señalar de manera sucinta la protección ante estrés oxidativo, regulación de la conductancia estomática, incremento en la conductancia hidráulica radical, mejoramiento de la eficiencia de uso de agua y un mayor ajuste osmótico (Wu & Xia, 2006; Augé *et al.*, 2007; Goicoechea *et al.* 2005, Kyllö *et al.*, 2003; Querejeta *et al.*, 2006; Kalinhoff, 2012). Este mecanismo podría resultar importante si tomamos en cuenta la preponderancia de la simbiosis en esta zona donde el déficit de nutrientes, especialmente de P, no es la limitante en el establecimiento de las especies vegetales (Kalinhoff, 2012).

Como resultado de diferentes ensayos, se ha comprobado que la inoculación HMA autóctonos beneficia el desarrollo de las plantas y produce una mejora en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, tales como el estado de agregación, contenido en nitrógeno y materia orgánica, número de propágulos micorrízicos, etc., indica una restauración integral, clave para la estabilidad y sostenibilidad de estos ecosistemas (Requena *et al.*, 2001; Barea *et al.*, 2005; Kalinhoff, 2012).

Indudablemente, en la restauración de los sitios perturbados se debe considerar a los HMA, debido a que juegan un importante papel en la nutrición mineral de las plantas (Smith & Read, 1997) y además tienen un papel crucial en la creación de la estructura del suelo (Miller & Jastrow, 2000). Diferentes especies de plantas exhiben habilidad variable para establecer asociaciones micorrízicas y para beneficiarse de ellas y se ha sugerido que la composición de una comunidad de plantas es influida por los hongos micorrízicos (Van der Heijden *et al.*, 1998).

Experimentos realizados en un ecosistema semiárido degradado con riesgo de desertificación, localizado en la Sierra de los Filabres (Almería) con *Anthyllis cytisoides*, una leguminosa arbórea, mostraron el beneficio de la inoculación con una mezcla de HMA (una mezcla de hongos nativos y un inóculo producido con un hongo alóctono). Los resultados indicaron una mayor supervivencia de las plantas micorrizadas (85%) en comparación con las no micorrizadas (65%), que posteriormente fueron colonizadas durante su desarrollo en campo. Los efectos evaluados, después de 5 años del trasplante al campo, indicaron que la micorrización benefició significativamente el desarrollo de las plantas. Igualmente, reportaron un mejoramiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, que implica una auténtica restauración de la calidad del suelo, tales como: el estado de agregación, contenido de N y materia orgánica. Además los resultados pusieron en manifiesto que a medida que transcurre el proceso de restauración el efecto de la mezcla de hongos nativos supera a la inoculación con HMA de colección (Requena *et al.*, 2001). Estas conclusiones demuestran la importancia de utilizar hongos propios del ecosistema para simular la diversidad

natural, lo que da lugar a un incremento en el tamaño de las poblaciones naturales existentes (Palenzuela & Barea, 2009).

También se han reportado estudios realizados en un matorral xerófito deteriorado de México, donde Monroy y colaboradores (2007) evaluaron la supervivencia de plantas de mezquite (*Prosopis laevigata*) y de huizache (*Acacia farnesiana*), previamente inoculadas con HMA en condiciones de campo durante un año. Las plantas fueron cultivadas durante 9 meses en invernadero y 2 meses en vivero antes de ser trasplantadas al matorral localizado en el Valle de Actopan, Hidalgo, México. Los resultados mostraron de plantas de mezquite y de huizache aumenta de manera significativa la supervivencia, incrementándose el porcentaje de 19 a 54% para *P. laevigata* y de 18 a 48% para *A. farnesiana*.

Además, estudios realizados por Kalinhoff (2012) en la península de Macanao, en la misma zona de estudio del presente trabajo (Arenera La Chica), demostraron que las plantas de *Piscidia carthagenensis* inoculadas con HMA nativos, mostraron una mayor sobrevivencia que las inoculadas con un inóculo foráneo y las no inoculadas, luego de 17 meses de crecimiento en el campo, después de una temporada de sequía natural, resaltando la importancia del uso de inóculos nativos para disminuir la mortalidad de las especies vegetales en suelos perturbados.

Una forma de reintroducir HMA en sitios severamente perturbados es a través de inoculación artificial en plántulas cultivadas en viveros antes de ser trasplantadas al campo; sin embargo, esta práctica tiene sus limitaciones y se

aplica efectivamente a pequeña escala (Allen, 1999). En algunos casos, implica la selección de inóculos mixtos de diferentes situaciones sucesionales y en diferentes grupos funcionales de plantas, obteniéndose una gran variedad de respuesta asociada a la diversidad del inóculo y de la compatibilidad funcional de la mezcla hongo-planta. Por ejemplo, Allen *et al.* (2003) observaron que las especies *Ceiba pentandra*, *Guazuma ulmifolia*, *Havardia albicans*, *Brosimum alicastrum* y *Acacia pennatula* inoculadas con HMA de suelos provenientes de la sucesión temprana mostraron una mayor respuesta de crecimiento, que cuando fueron inoculadas en suelos de la sucesión tardía; respuesta que además se encontró asociada a la mayor abundancia y rápida colonización del género *Glomus*, que las del género *Gigasporaceae*, las cuales fueron más abundantes en los suelos provenientes de sucesión tardía. Igualmente, las diferentes respuestas a la colonización por MA que presentan los diferentes grupos funcionales a través de la sucesión ha sido muy bien estudiado por Siqueira *et al.* (1998), los cuales reportaron que de 28 de especies arbóreas de diferentes estadios serales e inoculados con dos especies de HMA *Glomus etunicatum* y *Gigaspora margarita* mostraron que a medida que se avanza en los estados sucesionales la dependencia micorrízica disminuye, convirtiéndose las especies pioneras en las más dependientes de los HMA. Similarmente, Zangaro *et al.* (2000) señalan que las especies propias del bosque maduro son menos dependientes de los HMA, debido a que presentan tasas lentas de crecimiento y bajos requerimientos nutricionales, en comparación con las especies de sucesión secundaria. Otros estudios indican que las especies no micotróficas se encuentran más bien

restringidas a zonas ricas en nutrientes, mientras que en suelos oligotróficos predominan las especies micotróficas a lo largo del proceso sucesional (Allen *et al.*, 1999). De una u otra forma, la presencia de HMA en una amplia variedad de plantas en bosques tropicales, resalta la importancia de estos hongos en la estructura y funcionamiento de estos ecosistemas.

En ecosistemas áridos, se ha sugerido que el matorral inicialmente se establece en manchones y son las denominadas “islas de fertilidad”. Estas islas son también sitios con las mayores actividades de HMA. De esta forma Allen (1999) propone plantar matorrales en patrones y densidades diseñados para optimizar los procesos naturales. Al plantar inicialmente el matorral en manchones, los propágulos viables de HMA se retienen en las capas superficiales del suelo y se obtienen niveles bajos de infección durante el primer año. La técnica de plantación “por parches”, acompañada de la manipulación de plantas invasoras, puede mejorar el restablecimiento natural de la micorriza. Estas unidades de matorral pueden servir como islas para reinocular un área dada. Como lo menciona Allen (1999) obviamente la mejor alternativa es el manejo cuidadoso de un sitio, previniendo la pérdida de HMA y cubierta vegetal.

Pocos trabajos reportan el efecto de la inoculación sobre especies de *Caesalpinia*, sin embargo, Huante *et al.* (1993) estudiaron la influencia de HMA en el crecimiento de plántulas de *Caesalpinia eriostachys* bajo condiciones de invernadero en la Estación Biológica de Chamela en la costa del Pacífico de México. La producción de biomasa seca, la tasa de crecimiento relativo y la

dependencia micorrízica fueron cuantificadas por 75 días. La infección con micorrizas provocó un incremento significativo en la producción de biomasa, tasa relativa de crecimiento y en el área foliar. Además, *C. eriostachys* presentó una alta dependencia micorrízica.

Partiendo de la importancia que puede tener la selección de HMA nativos en los procesos de inoculación de especies promisorias para recuperar zonas perturbadas, bien sea seleccionadas a partir de sus características de crecimiento o por ser especies consideradas vulnerables según el Libro Rojo de la Flora (Llamozas *et al.*, 2003) nos planteamos entonces dilucidar algunas características biológicas de la especie que comprenda la evaluación del crecimiento en términos de biomasa inoculadas con HMA nativos de una localidad sucesional de 20 años y del matorral xerófito en condiciones de invernadero con el fin de seleccionar la combinación inóculo-suelo más eficiente para establecer los ensayos de campo que correspondería a una segunda fase de este estudio.

HIPÓTESIS

C.mollis, según datos reportados por Fajardo (2007), predomina en las zonas de matorral; por lo tanto los HMA nativos provenientes de zonas donde esta especie habita tendrán una mayor compatibilidad funcional desde el punto de vista de crecimiento y sobrevivencia que el inóculo proveniente de la localidad sucesional de 20 años, esperamos entonces que:

- a) El crecimiento de *C. mollis* varíe de acuerdo al sustrato de siembra utilizado, debido a cambios en las características del suelo generados por la perturbación.
- b) El crecimiento de *C. mollis* varíe de acuerdo al inóculo utilizado, debido a factores relacionados con la compatibilidad funcional de la simbiosis.
- c) El inóculo de matorral producirá una mayor respuesta en las plantas de *C. mollis* en términos de crecimiento, establecimiento y sobrevivencia en campo, debido a la mayor adaptación de los HMA nativos a las condiciones prevalecientes en la zona.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar el crecimiento, respuesta a las micorrizas arbusculares, establecimiento y sobrevivencia de *C. mollis* con inóculos nativos de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de un matorral xerófito y de una localidad de 20 años de sucesión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

FASE 1:

- Evaluar los cambios en la producción de biomasa de vástago y raíz, de las plantas de *C. mollis* cultivadas bajo condiciones de invernadero a los ocho meses de crecimiento, para seleccionar el inóculo más efectivo a ser utilizado posteriormente en la fase de campo.
- Evaluar la sobrevivencia de plantas cultivadas bajo condiciones de invernadero.
- Determinar el efecto de la fuente de inóculos sobre el status nutricional de hojas de plantas cultivadas en invernadero.
- Determinar de dependencia micorrízica bajo condiciones de invernadero.

FASE 2:

- Evaluar los cambios en la producción de biomasa de vástago y raíz a los cuatro y ocho meses de crecimiento en la fase 2 de invernadero en campo.
- Determinar el efecto de la fuente de inóculos sobre el status nutricional de hojas de plantas cultivadas en invernadero en campo.
- Determinar la respuesta micorrízica en condiciones de campo.
- Evaluar la sobrevivencia de plantas en el campo.
- Cuantificar la colonización micorrízica a los ocho meses de crecimiento.

ÁREA DE ESTUDIO

La península de Macanao, ubicada en el estado Nueva Esparta, es un núcleo montañoso que se corresponde con la parte occidental de la isla de Margarita, su altura máxima está en el cerro Macanao (742 metros). La península de Macanao se une a la parte oriental del estado por medio e istmo donde se localiza el Parque Nacional de la laguna La Restinga (Figuroa, 1995).

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, 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. 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 comprende localidades entre ≤ 1 y ≥ 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 (Fajardo, 2007).

El **matorral xerófito** (Figura 1- Arriba) de la península de Macanao corresponde al ecosistema de referencia de este trabajo, y se caracteriza por ser una comunidad vegetal madura donde dominan las especies *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae), *Lonchocarpus punctatus*, *Lonchocarpus* sp. (Fabaceae), *Beureria cumanensis* (Boraginaceae), *Subpilocereus repandus*, *Acanthocereus tetragonus*, *Stenocereus griceus* (Cactaceae) y *Bromelia humilis* (Bromeliaceae). La **localidad sucesional de 20 años** (Figura 1- Abajo) contiene una fisionomía arbustal dominada por las especies *Melochia tomentosa* (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).



Figura 1. Arriba: matorral xerófito. Abajo: Localidad sucesional de 20 años.

METODOLOGÍA

El proyecto se dividió en dos fases: la fase de invernadero que se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas Silvestres ubicado en el Instituto de Biología Experimental (IBE); y la fase de campo que se llevó a cabo en la península de Macanao, Arenera la Chica.

Material vegetal:

Caesalpinia mollis (H.B.K.) Spreng es una leguminosa perteneciente a la familia Caesalpiaceae que se distribuye al norte de Colombia y Venezuela (Schnee, 1960). En Venezuela es reportada para los estados Anzoátegui, Aragua, Carabobo, Distrito Federal, Falcón, Guárico, Lara, Miranda, Nueva Esparta, Sucre y Zulia. Crece en bosques xerófilos, cardonales, espinares, bosques secos, matorrales y bosques deciduos, entre 0 y 300 m snm. (Llamozas *et al.*, 2003).

Actualmente, *C. mollis* se encuentra vulnerable, es un árbol muypreciado y su área de distribución ha sido considerablemente reducida, pues todas las localidades naturales referidas se encuentran fuera de parques nacionales, y no existe ninguna medida en particular para la protección de la especie (Llamozas *et al.*, 2003).

Es un árbol de 2 a 8 metros de altura. Hojas compuestas, bipinnadas, alternas, estípulas presente. Hojas casi opuestas ovaladas, de 3 a 5 cm de largo y 1,5 a 2,5cm de ancho. Inflorescencias laterales con racimos simples de 6 a 10 cm de largo. Flores amarillas. Frutos oblongos de 7 a 15 cm de largo y de 2 a 4 cm de

ancho. Se propaga por semillas y soporta fuerte irradiación solar, sequía y suelos pobres (Schnee, 1960; Hoyos, 1985).

Las leguminosas forman el grupo más numeroso en términos de especies (21) presentes en la zona de estudio (Fajardo, 2007). Esto coincide con numerosos trabajos realizados en estos ecosistemas que reportan a las leguminosas como el grupo más importante en la composición florística (Aristeguieta, 1968; Gentry, 1995; Gillespie *et al.*, 2000). Además, Gentry (1995) señala que las leguminosas tienen un papel especialmente sobresaliente en los bosques secos no porque sea una familia muy diversa, sino debido a que muchas otras familias están ausentes o pobremente representadas.

Suelos e inóculos:

Los suelos e inóculos que se utilizaron provienen de un matorral xerófilo poco perturbado que corresponde al ecosistema presente antes de la extracción de arena, y de una localidad sucesional formada después de 20 años de dicha perturbación.

Los inóculos utilizados fueron preparados utilizando potes trampas, los cuales consisten en preparar un sustrato adecuado a las condiciones ecológicas del hongo, así como la utilización de especies altamente micotróficas para lograr la rápida infección y esporulación del hongo con el fin de producir propágulos infectivos en ese suelo (Sieverding, 1991).

Se cultivaron plantas de *Vigna luteola*, leguminosa herbácea altamente micotrófica (Hernández *et al.* 2000) en macetas con suelo fresco de cada localidad, para obtener cultivos mixtos de HMA (Bever, 1994). Luego de 8 meses de cultivo se eliminó la parte aérea de las plantas y se conservaron las raíces como parte del inóculo. La mezcla del suelo, raíces infectadas y esporas de HMA que se obtuvieron en cada tipo de suelo se utilizó como inóculo de HMA en los experimentos.

Fase de invernadero:

Este ensayo fue llevado a cabo bajo condiciones de invernadero en el IBE, el cual se encuentra ubicado en Caracas a 1200 m, con una temperatura promedio de 26 °C y una humedad relativa promedio de 65%.

Esta fase se realizó con el objetivo de seleccionar en condiciones de invernadero la combinación inóculo de HMA-suelo más eficiente en el crecimiento de *C. mollis*, el cual fue utilizado posteriormente en el ensayo en campo.

Se realizaron seis tratamientos con diez réplicas cada uno:

1. Suelo de matorral con inóculo de HMA de matorral (MM).
2. Suelo de matorral con inóculo de HMA de la localidad sucesional después de 20 años de perturbación (MV).
3. Control estéril con suelo de matorral (MC).

4. Suelo de la localidad sucesional después de 20 años de perturbación con inóculo de HMA de matorral (VM).
5. Suelo de la localidad sucesional después de 20 años de perturbación con inóculo de HMA de esta misma localidad (VV).
6. Control estéril con suelo de 20 años (VC).



Figura 2. Plántulas de *C. mollis* sembradas en tubetes, cultivadas bajo condiciones de invernadero.

Las plántulas (previamente germinadas) fueron sembradas en tubetes con suelo estéril correspondiente a cada localidad a los cuales se les añadieron 50 gr. del inóculo de micorrizas correspondiente a cada tratamiento (Figura 2).

Se realizó la cosecha de todas las réplicas luego de 248 días después de la siembra (DDS) (8 meses de crecimiento) y se determinaron parámetros como altura, sobrevivencia, biomasa total y biomasa de hojas, tallo y raíz, relación

vástago/raíz, índice de respuesta micorrízica micorrízica (IRM) y contenido de N foliar.

Fase de campo:

Las actividades se realizaron en cuatro salidas de campo:

➤ 1º salida: las plantas pregerminadas fueron sembradas en bolsas de tres kilos en un vivero ubicado en la zona (Figura 3), con tres condiciones de inoculación:

1. Suelo de matorral nativo sin esterilizar con inóculo de HMA de matorral (MM)
2. Suelo de matorral nativo sin esterilizar con inóculo de HMA de una localidad sucesional de 20 años (MV).
3. Control (no estéril) con suelo de matorral (MC).

➤ 2º salida: luego de 120 DDS (4 meses de crecimiento) en vivero, se cosecharon 10 réplicas por tratamiento, para las cuales, posteriormente en laboratorio, fue determinada la biomasa total y la biomasa de hojas, tallo y raíz.

➤ 3º salida: luego de 248 DDS (8 meses de crecimiento), se cosecharon 10 réplicas por tratamiento; posteriormente en laboratorio, fue determinada la biomasa total y la biomasa de hojas, tallo y raíz, porcentaje de asignación al vástago y raíz, relación vástago/raíz, contenido foliar de P y N, colonización micorrízica y el índice de respuesta micorrízica. Se llevó a cabo el trasplante de las plantas restantes al campo.

- 4º salida: luego de 496 DDS (16 meses de crecimiento), se evaluó la altura y el porcentaje de sobrevivencia en campo (Figura 4).



Figura 3. Plántulas de *C. mollis* sembradas en bolsas de 3Kg en un vivero ubicado en la arenera La Chica, en la península de Macanao.



Figura 4. Aspecto de la siembra. Trasplante luego de 248 DDS en el vivero en campo.

Determinaciones:

Altura: se utilizó una cinta métrica tanto en plantas de invernadero como en campo.

Biomasa: Se determinó la biomasa seca de las plantas separándolas en tallos, hojas y raíces. Estas fracciones se colocaron en la estufa a 60 °C.

Tasa relativa de crecimiento (TRC): la tasa de producción de materia seca por unidad de peso seco inicial de la planta se estimó para el intervalo de tiempo transcurrido entre las dos cosechas sucesivas a través de la expresión matemática de Hunt (1982):

$$TRC = [PS_2 - PS_1] / T$$

PS₁ = Peso seco en la primera cosecha.

PS₂ = Peso seco en la segunda cosecha.

T = Tiempo transcurrido entre las dos cosechas, en días.

Índice de dependencia micorrízica (IDM): 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 determinó según (Plenchette *et al.* 1983):

$$IDM = [PS (M) - PS (C) / PS (M)] \times 100$$

PS (M) = peso seco de la planta micorrizada.

PS (C) = peso seco de la planta control o no micorrizada.

Evaluación de la colonización micorrízica arbuscular (CMA):

Con la finalidad de determinar la ocurrencia y el porcentaje de colonización micorrízica según el método de McGonigle *et al.* (1990), las raíces fueron teñidas a través del método de Phillips & Hayman (1970). Se colocaron en H₂O₂ durante 30 minutos para el aclarado de las raíces (debido al grosor de las raíces), se lavaron y colocaron en KOH al 10 % y se calentó en baño de María durante 1 hora. Se lavó el KOH con agua corriente y se adicificaron con HCl al 10% por 15 minutos, se escurrió el ácido (sin lavar), se adicionó azul de tripán al 0,05 % en lactoglicerina y se calentó baño de María durante 10 minutos. Se decantó el colorante y las raíces se conservaron en lactoglicerina.

El método de cuantificación de McGonigle *et al.* (1990) permitió evaluar la presencia o ausencia de estructuras fúngicas (arbúsculos, vesículas, enrollados e hifas solas) independientemente de su abundancia. Una vez clarificadas y teñidas las raíces, se seleccionaron segmentos y se alinearon en un portaobjeto, se observaron 100 campos por muestra utilizando para ello el objetivo de 20X del microscopio. Para calcular el porcentaje de colonización micorrízica (%MA) se utilizó la siguiente expresión:

$$\% MA = \frac{\text{N}^\circ \text{ de campos observados} - \text{NI}}{\text{N}^\circ \text{ de campos observados}} \times 100$$

Nº de campos observados

NI = Total campos no infectados por HMA.

Análisis de nutrientes:

- Determinación de nitrógeno:

Se utilizó el método de Kjeldahl modificado por Jackson (1976) para la cuantificación de nitrógeno total en muestras de hojas secas provenientes de plantas de cada tratamiento. Este método consiste en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado, con el fin de transformar todo el nitrógeno a especies amonio, el amonio es transformado en amoniaco, el cual es recogido en una solución con exceso de ácido bórico y finalmente es titulado usando ácido clorhídrico y el indicador mixto rojo de metilo-verde de bromocresol. Para esto se procedió de la siguiente forma:

Digestión: se pesaron aproximadamente 0,2 g de muestra y se agregaron en los tubos Kjeldahl, se agregaron 3 mL de ácido sulfúrico concentrado y dos perlas de ebullición. Se realizó el calentamiento en un bloque digestor con la siguiente rampa de calentamiento: Paso 1 - 90 °C – 30 min; Paso 2 – 180 °C – 30 min; Paso 3 – 270 °C – 30 min; Paso 4 – 360 °C – 90 min. Al terminar la digestión se dejó enfriar y se enrasó a 50 mL con agua destilada.

Destilación: se utilizó un equipo Kjeltex system 1002 distilling unit-TECATOR. Se agregaron aproximadamente 15 mL de NaOH al 40 % p/v a cada solución para liberar el amoniaco, el mismo fue recolectado en una fiola con 10 mL de ácido bórico para formar el borato diácido por cada mol de amoniaco. A la solución se le agregó el indicador mixto, se procedió a la destilación y se tituló por retroceso con una solución de HCl 0,01 M.

La concentración de nitrógeno se determinó con la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{(\text{VHCL muestra} - \text{VHCL blanco}) \times 100 \times \text{CHCL} \times 14}{\text{Peso muestra (mg)}}$$

- Determinación de fósforo:

Para la determinación de P foliar las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Ecología del Paisaje y Agroecología, ubicado en el IZET de la Facultad de Ciencias, UCV. Las muestras fueron pulverizadas y fueron digeridas a 360 °C por 2 horas en una mezcla binaria de H₂SO₂ / H₂O₂. Posteriormente el extracto se diluyó con agua destilada hasta 50 mL. Se tomó una alícuota de 3 mL para la determinación de P de acuerdo al método de Murphy y Riley (1962).

Análisis estadísticos:

Los resultados fueron analizados a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías para la fase de invernadero y de una sola vía en el caso de la fase de invernadero, para lo cual se utilizó con el programa STATISTICA. Se aplicó la prueba a posteriori de comparación de medias LSD ($\alpha = 0,5$).

RESULTADOS

Fase de invernadero:

Parámetros de crecimiento:

Luego de un periodo de 248 DDS se observó un efecto altamente significativo ($p < 0.05$) de la interacción inóculo- suelo sobre los parámetros de crecimiento de *C. mollis*. Las plantas cultivadas en el suelo del matorral xerófito sin perturbar e inoculadas con los inóculos micorrízicos del matorral y de la parcela sucesional de 20 años (MM, MV, MC), mostraron los mayores valores de altura en comparación con los demás tratamientos realizados en suelo de parcelas sucesional de 20 años (Figura 5). Es de notar que las plantas cultivadas en suelo estéril (C) no mostraron diferencias significativas en la altura con los tratamientos inoculados en suelos de matorral (M) y parcela sucesional 20 años (V). 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 sucesional de 20 años (Figura 6-A).

En la Figura 6-B se observó un mayor desarrollo de la biomasa de hojas en los tratamientos inoculados respecto a las plantas control en el suelo M, sin embargo en el suelo V la inoculación no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo foliar, además los tratamientos inoculados en este suelo no presentaron diferencias significativas con el control de matorral (MC). La inoculación micorrízica incrementó la biomasa de tallo y raíces en los tratamientos en suelo M

(Figura 6-C,D), mientras que los tratamientos en suelo V no mostraron diferencias significativas con el control.

La interacción inóculo- suelo no mostró mayores diferencias significativas en cuanto a la relación vástago/raíz (Figura 7). Los valores obtenidos en cuanto a la relación vástago/raíz indican que en todos los tratamientos las plantas presentaron una mayor asignación de biomasa hacia la parte aérea.

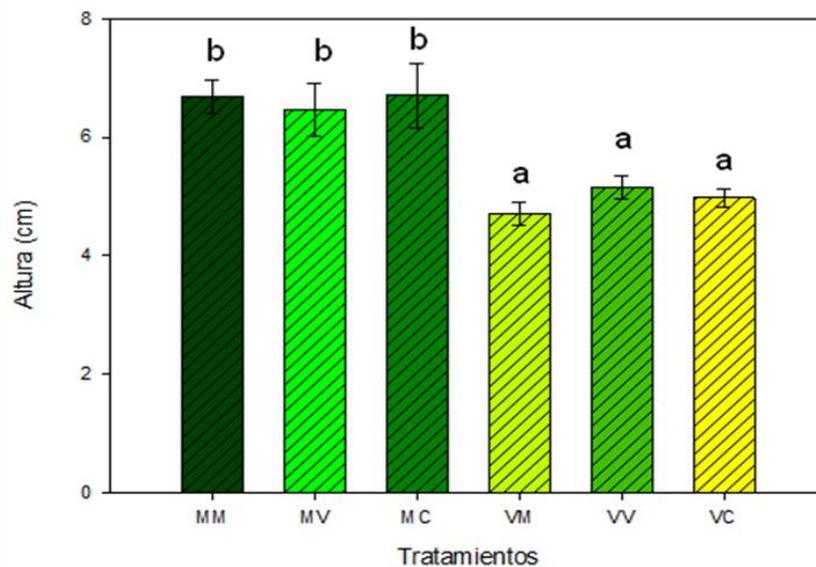


Figura 5. Altura de *C. mollis* a los 248 DDS bajo condiciones de invernadero. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo; VM: suelo de 20 años con inóculo de matorral; VV: suelo de 20 años con inóculo de 20 años; VC: suelo de 20 años sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

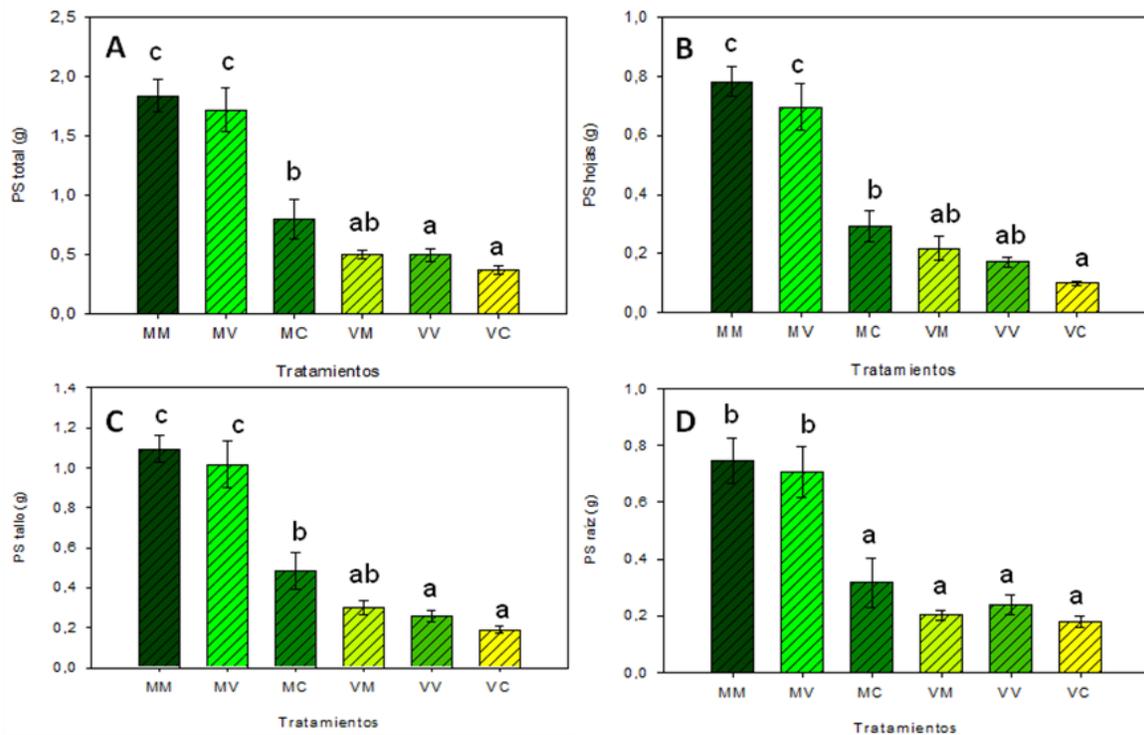


Figura 6. Biomasa (peso seco) de *C. mollis* a los 248 DDS bajo condiciones de invernadero. (A) peso seco total, (B) peso seco de hojas, (C) peso seco del tallo, (D) peso seco de la raíz. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo; VM: suelo de 20 años con inóculo de matorral; VV: suelo de 20 años con inóculo de 20 años; VC: suelo de 20 años sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

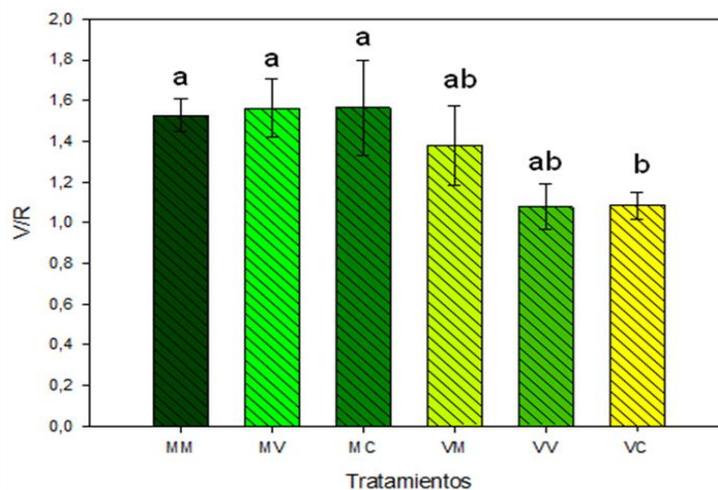


Figura 7. Relación vástago/raíz en plantas con 248 DDS bajo condiciones de invernadero. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo; VM: suelo de 20 años con inóculo de matorral; VV: suelo de 20 años con inóculo de 20 años; VC: suelo de 20 años sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.



MC

VC

VM

VV

MM

MV



MM

MV

VM

VV

Figura 8. Plantas de *C. mollis* después de 248 DDS. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo; VM: suelo de 20 años con inóculo de matorral; VV: suelo de 20 años con inóculo de 20 años; VC: suelo de 20 años sin inóculo.

Determinación de nutrientes:

El suelo de siembra tuvo un efecto significativo sobre el contenido de N foliar, observándose un incremento en las plantas cultivadas en suelo de matorral, con respecto a aquellas cultivadas en suelo de 20 años (Figura 9).

Para los tratamientos en suelo de matorral la inoculación con HMA tuvo efectos significativos en cuanto al contenido de N, obteniéndose un aumento de aproximadamente un 70% con respecto al tratamiento control (Figura 9).

La determinación del contenido de P foliar no se pudo llevar a cabo en esta primera fase por falta de material vegetal, debido a que la producción de biomasa de hojas fue baja.

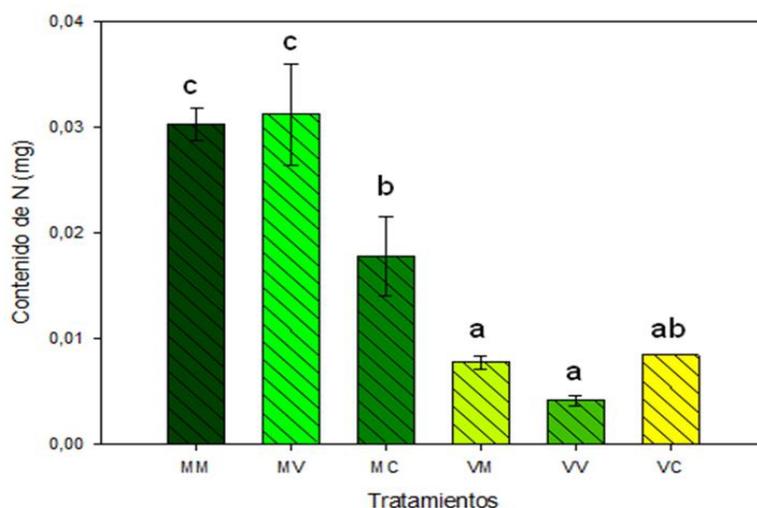


Figura 9. Nitrógeno foliar en plantas de *C. mollis* con 248 DDS en condiciones de invernadero. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo; VM: suelo de 20 años con inóculo de matorral; VV: suelo de 20 años con inóculo de 20 años; VC: suelo de 20 años sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Índice de dependencia micorrízica (IDM):

Se observó que la perturbación debido a la extracción de arena afecta la dependencia de la planta, ya que el IDM fue mayor en plantas cultivadas en los suelos del matorral xerófito, obteniéndose un incremento de aproximadamente el doble con respecto a los tratamientos en suelos de la localidad sucesional de 20 años (Figura 10).

La procedencia del inóculo no tuvo efectos significativos en cuanto al IDM, observándose una dependencia de 54 % y 56 % para los tratamientos MM y MV, respectivamente, y un 24 % y 28 % para los tratamientos VM y VV (Figura 10).

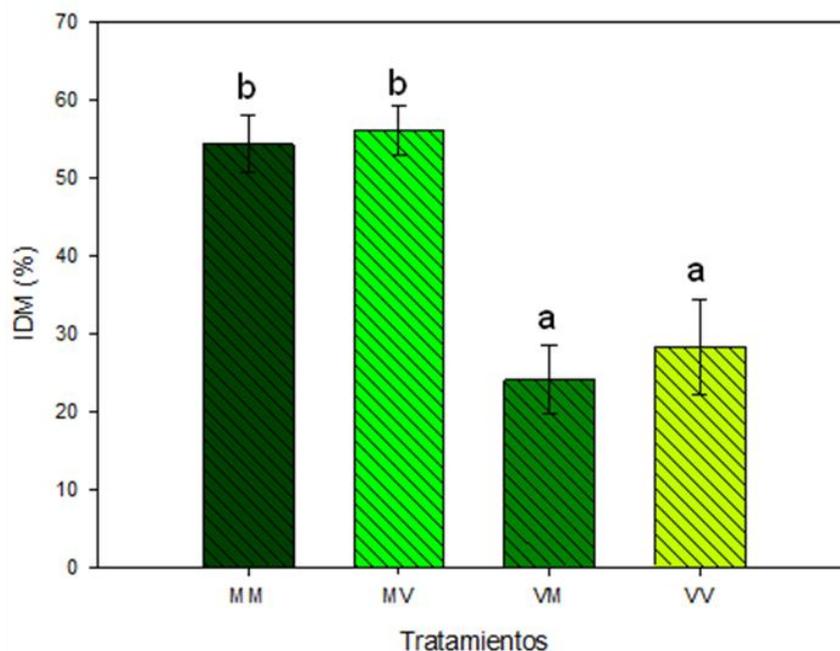


Figura 10. Índice de dependencia micorrízica (IDM) en plantas de 248 DDS bajo condiciones de invernadero. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; VM: suelo de 20 años con inóculo de matorral; VV: suelo de 20 años con inóculo de 20 años. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Sobrevivencia:

Los resultados del porcentaje de sobrevivencia de *C.mollis* no presentaron diferencias significativas entre sí, y no hubo interacción entre los factores suelo x inóculo, ya que para todos los tratamientos se encontraron altos porcentajes de sobrevivencia (Figura 11).

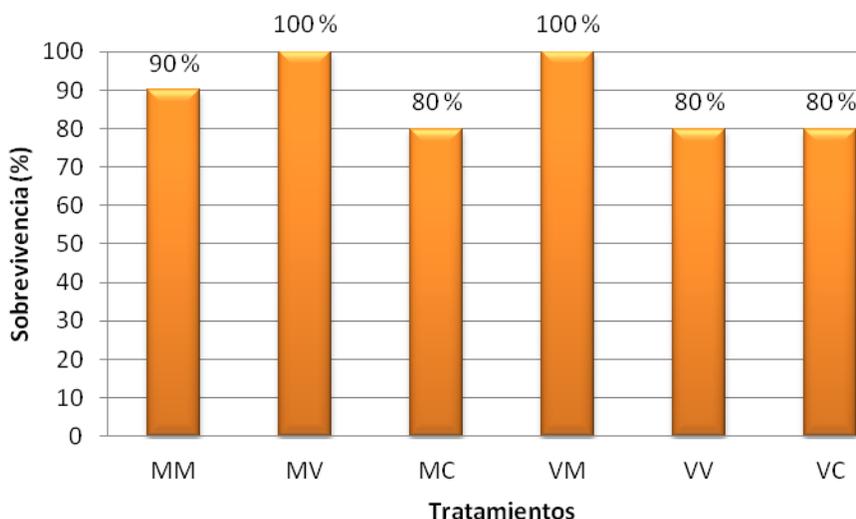


Figura 11. Sobrevivencia en plantas de *C. mollis* después de 248 DDS bajo condiciones de invernadero. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo; VM: suelo de 20 años con inóculo de matorral; VV: suelo de 20 años con inóculo de 20 años; VC: suelo de 20 años sin inóculo.

Fase de campo:

Parámetros de crecimiento:

Posterior a los ensayos de invernadero donde se evaluó la combinación suelo- inóculo más eficiente en términos de crecimiento de la especie, en campo se seleccionó el suelo de matorral no estéril y se utilizaron los inóculos M y V. Es

importante señalar que el uso de suelo no estéril, permite evaluar la respuesta que tiene la especie a la inoculación (IRM) y permite establecer protocolos de ensayos viables en condiciones de campo.

En la primera cosecha realizada a los 120 DDS, la inoculación con HMA no arrojó diferencias significativas en el peso seco de las hojas, mientras que a los 248 DDS las plantas de los tratamientos inoculados, MM y MV, incrementaron significativamente el peso seco de las hojas, en comparación a las plantas MC (control –no estéril) (Figura 12).

Los resultados obtenidos en el peso seco del tallo y peso seco de la raíz no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en la primera cosecha realizada, mientras que en la segunda cosecha el tratamiento MM presentó incrementos significativos en ambos parámetros en relación con los tratamientos MV y MC (Figura 12).

Los valores de biomasa total mostraron que a los 120 DDS las plantas del tratamiento MV presentaron valores de biomasa total significativamente mayor en comparación con los tratamientos MM y MC. En la segunda cosecha a los 248 DDS, los resultados mostraron que las plantas del tratamiento MM incrementaron significativamente todos los valores de biomasa en comparación con los otros tratamientos, mientras que los tratamientos MV y MC no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 12).

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en la relación vástago/raíz. La asignación de biomasa a los diferentes

compartimientos muestra que todos los tratamientos presentaron una mayor producción de biomasa en el vástago, obteniéndose un 64,62 % para MM, 76,46 % para MV y 77,52% para MC de asignación de biomasa a la parte aérea de la planta (Figura 14). La inoculación con HMA provenientes del matorral (MM) produjo un incremento de la biomasa total en un 68% con respecto a MV, y un 89% con respecto a MC. Aún cuando no se encontraron diferencias significativas en la relación vástago/raíz entre los diferentes tratamientos, se observó que la asignación del tallo fue mayor en MC (35%) que en el resto de los tratamientos (Figura. 14).

Luego de 248 DDS las plantas fueron trasplantadas al campo (Figura 4). Las medidas de altura de estas plantas mostraron que las provenientes de los tratamientos MM y MC no presentaron diferencias significativas entre sí, mientras que las plantas en los tratamientos MV presentaron las menores alturas (Figura 15).

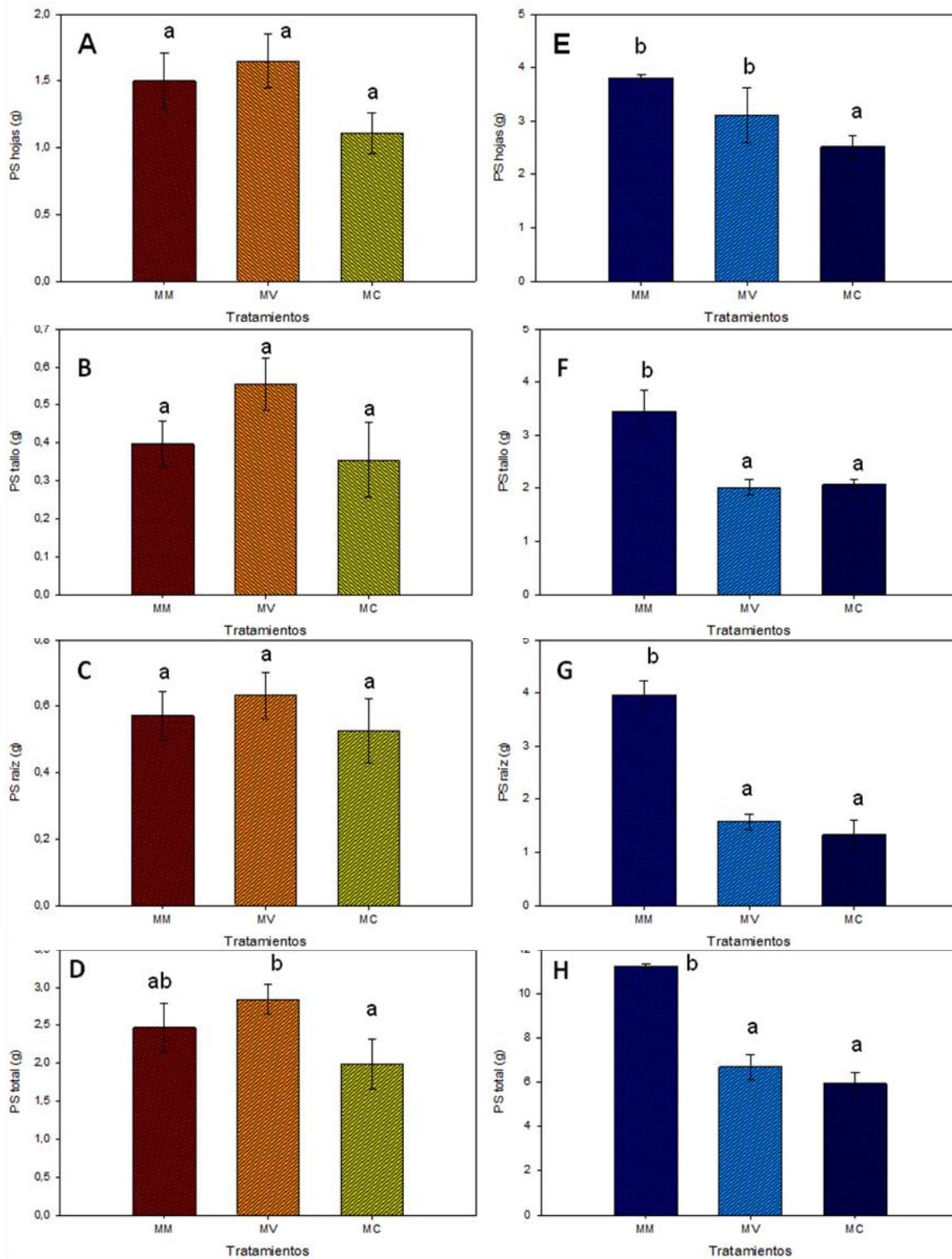


Figura 12. Biomasa (peso seco) en plantas de *C. mollis*. Primera cosecha después de 120 DDS: (A) peso seco de hojas; (B) peso seco del tallo; (C) peso seco de la raíz; (D) peso seco total. Segunda cosecha después de 248 DDS: (E) peso seco de hojas; (F) peso seco del tallo; (G) peso seco de la raíz; (H) peso seco total. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

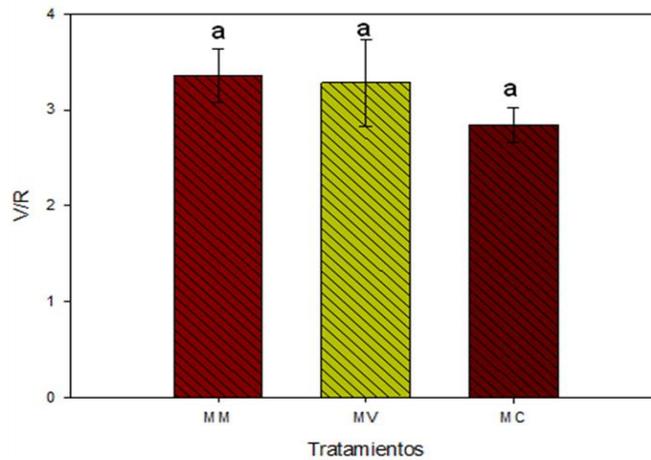


Figura 13. Relación vástago/raíz en plantas de *C. mollis* cultivadas en un vivero en campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

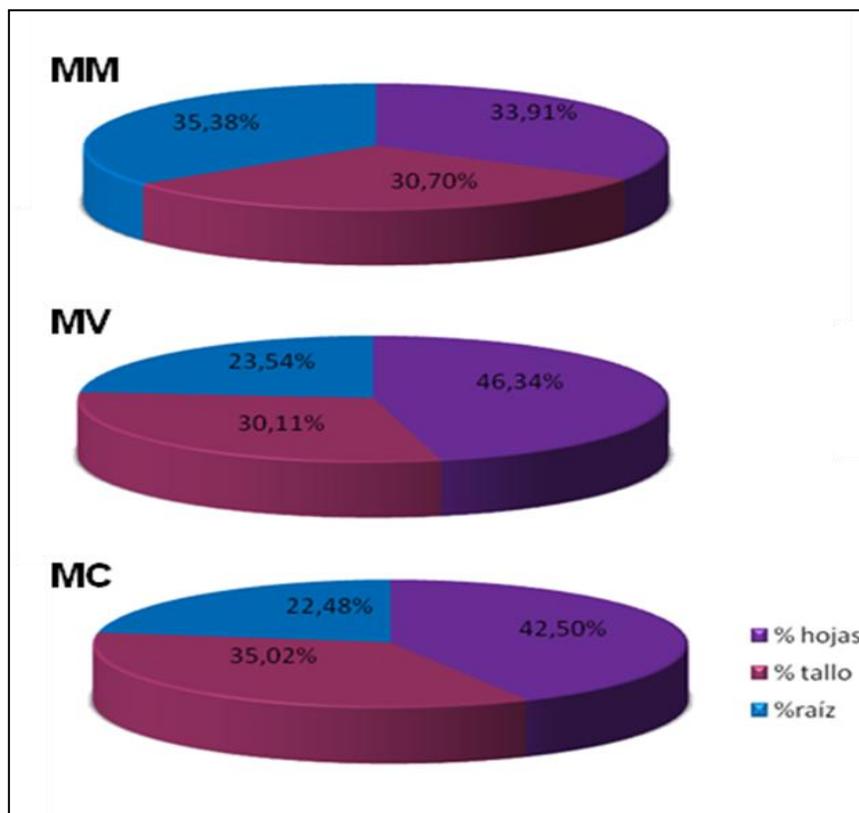


Figura 14. Asignación de biomasa en plantas de *C. mollis* cultivadas en campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo.

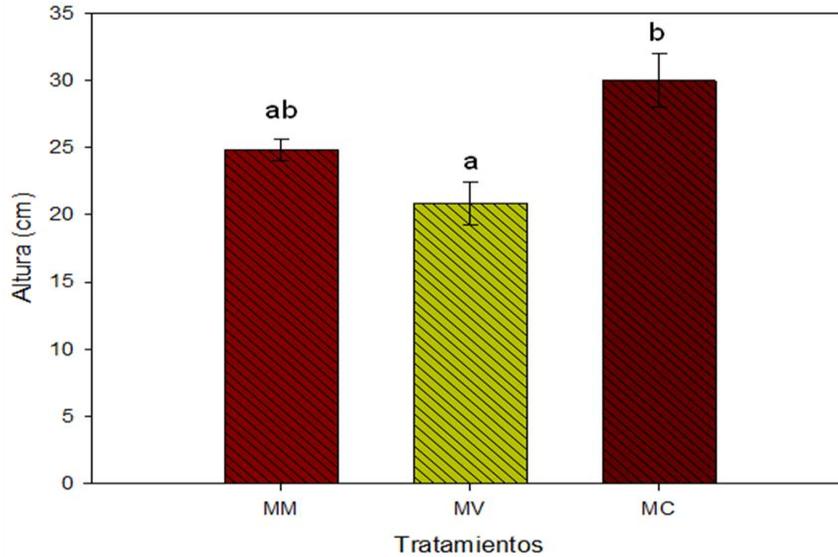


Figura 15. Altura en plantas de *C. mollis* con 496 DDS en el campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Colonización micorrízica arbuscular (CMA):

La CMA determinada luego 248 DDS de iniciado el experimento, fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con HMA provenientes tanto del matorral como de la localidad de 20 años, en comparación con las plantas no inoculadas. (Tabla 1). Las estructuras micorrízicas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos MM, MV y MC a excepción del % de arbuscúlos y enrollados hifales en las plantas MC.

Tabla 1. Porcentaje de colonización micorrízica determinado después de 248 DDS. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Tratamientos	% arbusculos	% vesículas	% hifas	% enrollados	% colonización
MM	8,1 \pm 1,2 a	14,4 \pm 3,1 a	11 \pm 1,6 a	13 \pm 1,5 a	46,5 \pm 5,2 a
MV	9,5 \pm 0,8 a	11 \pm 1,9 a	8,5 \pm 1,2 a	11,5 \pm 0,9 a	40,5 \pm 1,8 a
MC	3 \pm 1,0 b	14 \pm 3,5 a	6,5 \pm 2,0 a	5,7 \pm 0,02 b	29,2 \pm 0,8 b



MC

MM

MV

Figura 16. Plantas de *C. mollis* en la primera cosecha realizada después de 120 DDS en el campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo.



MM

MV

MC

Figura 17. Plantas de *C. mollis* en la segunda cosecha realizada después de 248 DDS en el campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo.

Determinación de nutrientes:

En la figura 18 se observa el contenido de P foliar en los diferentes tratamientos. Los valores muestran que las plantas en los tratamientos MM presentaron los mayores valores de contenido de P en comparación a las plantas en los tratamientos MV y MC los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí. Por otro lado, el contenido de N foliar no mostró variaciones significativas por efecto de la inoculación, ni por la procedencia de los inóculos (Figura 19).

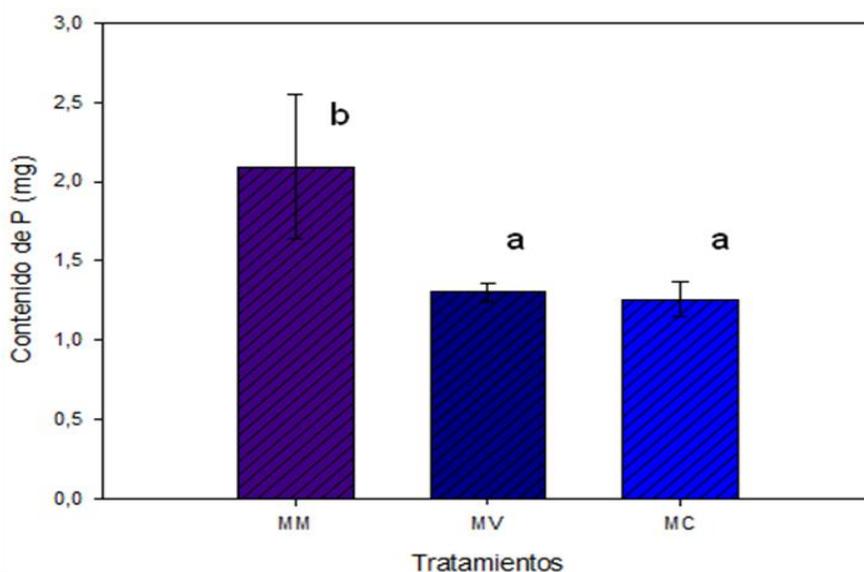


Figura 18. Contenido de fósforo foliar en plantas de *C. mollis* con 248 DDS en el campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

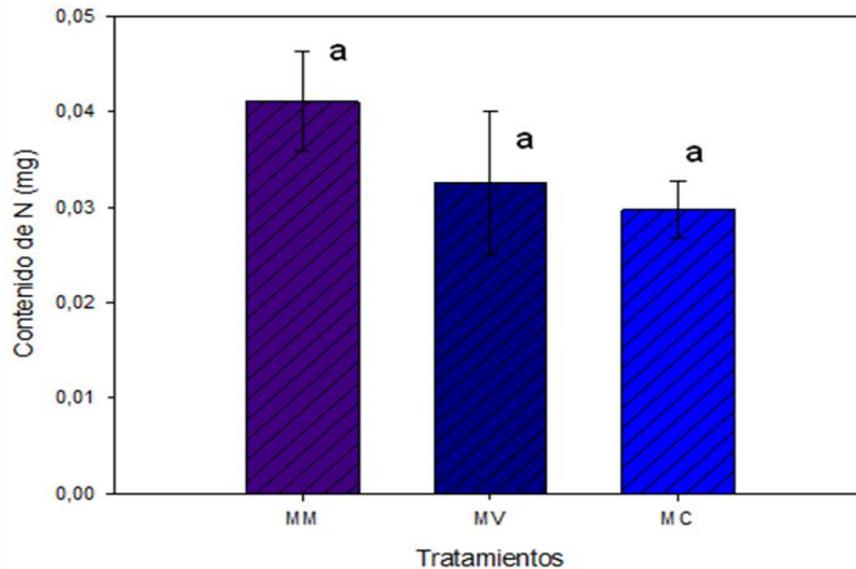


Figura 19. Contenido de nitrógeno foliar en plantas de *C. mollis* con 248 DDS en el campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Índice de respuesta micorrízica (IRM):

En la figura 20 se puede observar que las plantas de *C. mollis* presentaron una respuesta diferencial dependiendo de la procedencia del inóculo. El IRM fue mayor en plantas inoculadas con HMA provenientes del matorral xerófito (47 %), con respecto a plantas inoculadas con HMA provenientes de la localidad sucesional de 20 años (11 %).

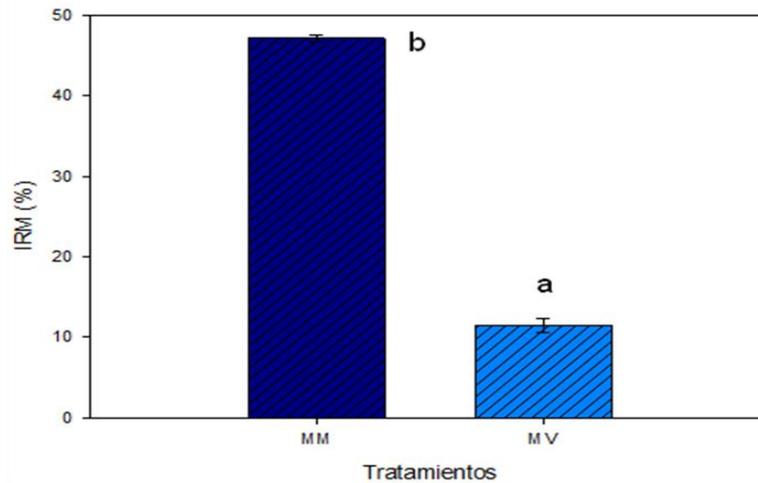


Figura 20. Índice de respuesta micorrízica (IRM) en plantas de 248 DDS en el campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Tasa de crecimiento relativo (TCR):

El tratamiento inoculado con HMA del matorral, que alcanzó una alta biomasa seca al finalizar el experimento, mostró una TCR significativamente más alta con respecto a los otros tratamientos. Se observa que la TCR del tratamiento MM fue aproximadamente tres veces mayor que la de los tratamientos MV y MC (Figura 21).

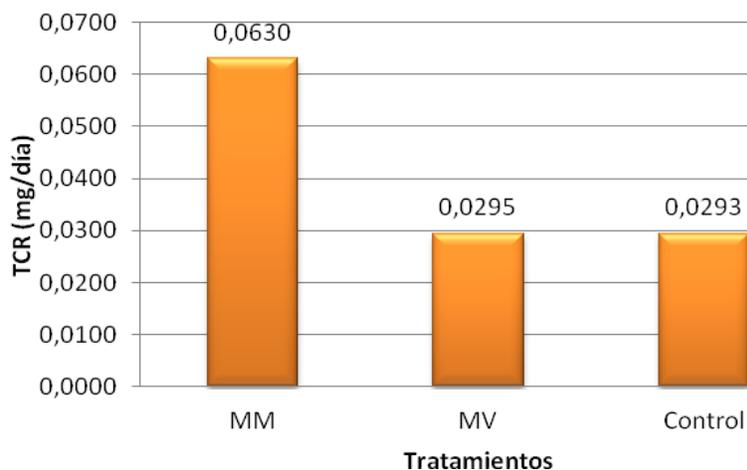


Figura 21. Tasa de crecimiento relativo en plantas de *C. mollis*. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años.

Sobrevivencia:

El efecto y la importancia de la inoculación con HMA se observó claramente en el parámetro de sobrevivencia, ya que a los 496 DDS en la zona seleccionada, las plantas inoculadas presentaron un alto porcentaje de sobrevivencia, que además duplica el de las plantas no inoculadas. Los tratamientos MM y MV presentaron un 88 y 100 % de sobrevivencia, respectivamente, mientras que el control presentó sólo un 53 % (Figura 22).

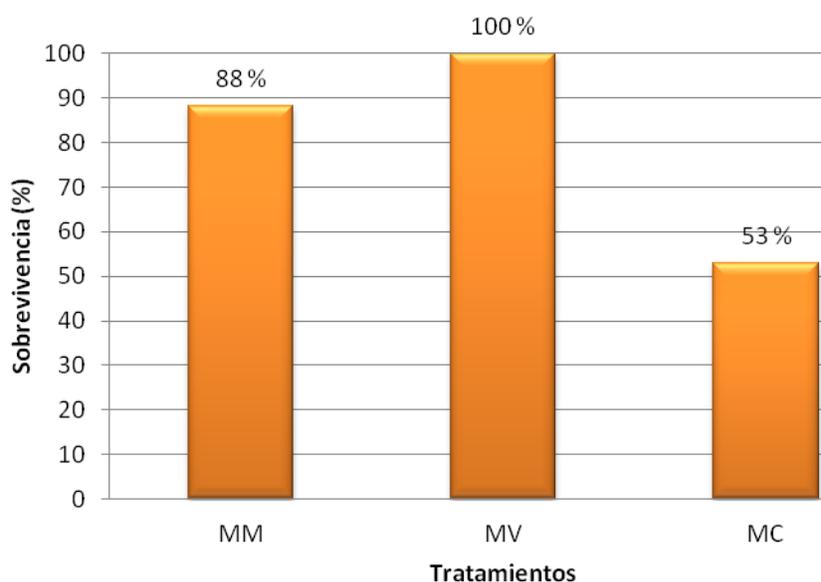


Figura 22. Porcentaje de sobrevivencia en plantas de *C. mollis* con 496 DDS en el campo. MM: suelo de matorral con inóculo de matorral; MV: suelo de matorral con inóculo de 20 años; MC: suelo de matorral sin inóculo.

DISCUSIÓN

Actualmente las zonas tropicales están expuestas a altas tasas de deforestación por diferentes motivos, por lo que se hace urgente el desarrollo de proyectos de restauración que estén acordes con las necesidades de cada área perturbada. En Venezuela, los bosques secos y sus matorrales asociados se ubican principalmente al norte del país ocupando el 3,2 % de su superficie, y gran parte de su extensión ha sido transformada por diferentes actividades antrópicas (González, 2007; Fajardo *et al.* 2005), por lo que actualmente se encuentran dentro de la categoría de riesgo más alta (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). A esto se le suma la cantidad de especies tanto animales como vegetales que se encuentran en riesgo de desaparecer junto a estos ecosistemas, como es el caso de *C. mollis*, que actualmente está considerada en el Libro Rojo de la Flora como una especie vulnerable (Llamozas *et al.*, 2003). Es por esta razón que la aplicación de HMA es propuesta como una herramienta biológica para asegurar el establecimiento y crecimiento de *C. mollis*, que se traduce en la obtención de plantones más vigorosos desde el punto de vista del incremento en las tasas de crecimiento, producción de biomasa y sobrevivencia

Las leguminosas son componentes importantes de la vegetación leñosa de ecosistemas áridos y semiáridos, con una versatilidad en la formación de simbiosis (Sprent & James, 2007), y con una alta dependencia micorrízica que les permiten

progresar bajo condiciones ambientales estresantes (Herrera *et al.*, 1993). Debido a que las perturbaciones generalmente afectan la presencia de los propágulos de HMA en el suelo, la inoculación de plántulas de leguminosas nativas con HMA antes de su establecimiento en áreas degradadas mejoran significativamente el crecimiento de la planta y la calidad del suelo, en cuanto a mejoras en la estructura debido a la presencia de la proteína glomalina que tiene un efecto cementante entre las partículas (Rilling & Mummey, 2006).

Los estudios sobre la simbiosis micorrízica que se han realizado en diferentes especies vegetales, han permitido establecer que los cambios morfológicos y fisiológicos generados por el micobionte en el hospedero estimulan el crecimiento y una respuesta exitosa ante las presiones ambientales (Al-Karabi, 1998; Davies *et al.*, 1996; Klironomos & Hart, 2002, Cáceres & Cuenca, 2006).

El éxito de la inoculación con HMA, además de depender del tipo de inóculo y su afinidad con la planta, depende de las condiciones ambientales, donde la composición y estructura del suelo juegan un papel muy importante, por lo que es necesario hacer una previa evaluación de la efectividad de la inoculación en los sustratos en los que se sembrará la planta inoculada (Herrera-Peraza *et al.* 2010).

Los resultados del presente trabajo indican que el crecimiento de *C. mollis* presenta una respuesta diferencial que depende de la procedencia del inóculo de HMA y del suelo utilizado como sustrato.

El efecto de las perturbaciones puede drásticamente reducir la sobrevivencia, implantación y crecimiento de las especies vegetales, debido a los

cambios que se generan en el suelo. En el presente trabajo la disminución en el peso seco en las plántulas de *C. mollis* cultivadas en invernadero se encontró relacionada con el uso de suelos pertenecientes a la localidad perturbada, lo que podría estar asociado a cambios tanto bióticos como abióticos. En efecto, los cambios en las propiedades químicas de los suelos sucesionales de 20 años y el matorral han mostrado que de acuerdo a los límites establecidos por el Soil Survey Staff (2003), el contenido de nitrógeno total disponible en el suelo del matorral corresponde a un suelo extremadamente rico, mientras que el observado en las parcelas de 20 años corresponden a suelos ricos (Kalinhoff, 2012); igualmente, las concentraciones de P disponible son significativamente diferentes (446 ppm vs 336 ppm) en el matorral y en la parcela sucesional respectivamente (Anexo 2). Estas diferencias de los nutrientes esenciales y el efecto de la perturbación, pueden generar cambios en la viabilidad de los diferentes propágulos y con ello cambios en la respuesta de las plántulas de *C.mollis*.

La efectividad y funcionamiento de los inóculos utilizados puede estar condicionada por una serie de factores edáficos que de una u otra forma influyen en el efecto que las micorrizas pueden ejercer sobre una especie en particular. Algunos de estos factores que influyen en la respuesta micorrízica pueden ser el pH del suelo, nivel de nutrientes disponibles, humedad, temperatura; todos, aunque de una manera distinta, afectan la formación y la actividad fisiológica de las micorrizas (Brundrett, 1991).

Otro parámetro que se debe considerar en este trabajo durante el ensayo de invernadero es el tamaño del tubete, el cual podría haber limitado el crecimiento de *C. mollis*. Aún cuando su desarrollo fue lento, se considera que pudo haber una limitación bastante importante, sobre todo cuando se compara con el ensayo de campo en bolsas de 3 Kg, donde el desarrollo de las plantas podría ser considerado mejor. Sin embargo, la respuesta de las plantas en los suelos M y la inoculación con hongos del matorral resultó ser similar en ambas fase (invernadero y campo).

Existen trabajos que plantean que el efecto de las micorrizas es mayor en suelos más pobres; sin embargo, en este trabajo se obtuvo una respuesta significativa a la inoculación y aún cuando los valores de dependencia obtenidos no son comparables con otras especies creciendo en suelos pobres, su efecto sobre el crecimiento es relevante (Cáceres & Cuenca, 2006; Mora, 2010).

En los tratamientos donde el sustrato corresponde al suelo de matorral, la respuesta de crecimiento en las plantas inoculadas demuestra una vez más el beneficio que los HMA confieren a la planta independientemente del inóculo utilizado. La determinación del peso seco producido por las plantas hospederas es considerado un criterio útil para predecir el potencial micorrízico de un determinado inóculo, siendo un parámetro mucho más confiable que el número de esporas o el porcentaje de colonización (Cuenca *et al.*, 2003). En este sentido, es importante destacar que la caracterización de los inóculos utilizados en este trabajo presentaron diferencias significativas entre el número de esporas y el

potencial infectivo, siendo el de matorral el inóculo que poseía el menor número de esporas en comparación con el inóculo de 20 años (961 esporas 100 g^{-1} suelo seco vs 1307,5 esporas 100 g^{-1} suelo seco, respectivamente) y el menor potencial infectivo (121,5 propágulos 100 g^{-1} suelo seco vs 506,3 propágulos 100 g^{-1} suelo seco, respectivamente) (Kalinhoff, 2012). El mayor número de esporas en suelos que han sido perturbados en contraste con una menor esporulación en suelos de ecosistemas prístinos se ha observado tanto en potes trampa como en suelos provenientes directamente del campo (Picone, 2000; Zangaro *et al.* 2000; Lopes-Leal *et al.* 2009), y es atribuida a las diferentes estrategias de vida de los HMA.

En proyectos con fines de restauración los experimentos en campo son de gran importancia ya que permiten validar los resultados obtenidos en invernadero, exponiendo las plantas a su ambiente natural. *C. mollis* mostró tener diferencias de compatibilidad con los inóculos utilizados. Esta compatibilidad inóculo – planta se pudo observar en los ensayos realizados en campo, donde los datos de biomasa total fueron significativamente mayores sólo para el inóculo de matorral, lo que indica que las plantas responden diferencialmente no sólo a la presencia del inóculo, sino también al tipo de inóculo de HMA. Estos resultados confirman que cada especie de HMA puede generar diferentes respuestas en términos de efectividad e infectividad, en la planta hospedera (Sieverding, 1991, Cáceres & Cuenca, 2006; Cáceres *et al.*, 2008; Mora, 2010, Kalinhoff, 2012).

La compatibilidad funcional se puede evaluar a través del aumento de la biomasa y mejor nutrición de la planta, donde la planta hospedera se puede

complementar con muchas o pocas especies de HMA (Ravnskov & Jakobsen, 1995).

Muchos trabajos muestran que diferentes especies vegetales responden diferencialmente a inóculos que provienen de localidades distintas. Por ejemplo, García (2011), evaluó el efecto de inóculos de HMA procedentes de tres zonas distintas de un matorral del Valle de Mezquital, Hidalgo, México, sobre las variables de crecimiento en dos especies de leguminosas (*Prosopis laevigata* y *Mimosa biuncifera*) en condiciones de invernadero. Después de 105 días se observó en las dos especies vegetales y para todas las variables de crecimiento un incremento debido a la micorrización, y a pesar de que los resultados no permitieron sugerir patrones de compatibilidad funcional entre las procedencias de los HMA y ambas leguminosas, se obtuvo que el efecto de la procedencia de los HMA fue diferente para cada una.

Por su parte, Cáceres *et al.* (2008) señalan la alta compatibilidad funcional de la especie arbórea *Pachira quinata* al ser inoculada con inóculos nativos y foráneos, observando una respuesta diferencial en cuanto a crecimiento y sobrevivencia cuando eran trasplantadas al campo.

En el presente trabajo, la disminución de compatibilidad con el inóculo proveniente de la localidad sucesional de 20 años podría deberse a un cambio en la composición de HMA en la misma, ocasionado por la perturbación proveniente de la extracción de arena, lo que fue confirmado en estudios realizados anteriormente en la zona por Kalinhoff (2012) que evaluó la riqueza de especies

de HMA en cada inóculo, los cuales fueron los mismos utilizados en este trabajo, reportando que efectivamente la composición de HMA era contrastante entre el matorral xerófito y la localidad sometida a la perturbación. El mayor número de morfotipos fue observado en el inóculo proveniente del matorral con 19 morfotipos diferentes, mientras que en la localidad sucesional de 20 años se observaron sólo 9 morfotipos (Anexo 3). En el inóculo del matorral se observó una alta abundancia de un morfotipo de la familia Gigasporaceae mientras que un morfotipo perteneciente a la familia Claroideoglomeraceae, fue el más abundante en el inóculo proveniente de la localidad de 20 años.

A pesar que la densidad de esporas fue menor en el inóculo de matorral (Kalinhoff, 2012), y que el morfotipo más abundante en él, pertenece a la familia Gigasporaceae, la cual se caracteriza por contactar a las raíces más lentamente con respecto a otras familias de HMA (Klironomos & Hart, 2002), este parece estar presentando una mayor compatibilidad funcional con la planta reflejado en un mayor beneficio en la mayoría de los parámetros evaluados en el presente trabajo. Esto también podría deberse a que las esporas de HMA no representan la principal fuente de inóculo de MA para este caso, como lo sugiere McGee (1989), para un sitio semiárido de Australia, sino que otros propágulos de HMA, como las raíces micorrizadas o fragmentos de ellas y la red del micelio del HMA, podrían estar contribuyendo en la infección (Requena, *et al.*, 1996).

Al igual que lo reportado por Kalinhoff (2012) en cuanto a la desaparición de la familia Gigasporaceae en ambientes perturbados otros trabajos han reportado

resultados similares. En distintos estudios realizados en ambientes pobres en nutrientes como los de La Gran Sabana, Venezuela, los géneros *Glomus* y *Entrophospora* fueron dominantes en situaciones de perturbación y posterior resiembra, mientras que los representantes de la familia Gigasporaceae desaparecieron, los cuales son parte importante de la comunidad de HMA presente en condiciones naturales (Cuenca & Lovera, 1992; Cuenca *et al.*, 1998). Sin embargo, es importante señalar que las especies de la familia Gigasporaceae pueden también ser comunes en ambientes intervenidos, por lo que se debe ser cuidadoso al hacer generalizaciones al respecto (Klironomos & Hart, 2002).

La utilización de inóculos mixtos en este estudio está justificada en el hecho de que en condiciones naturales las plantas están expuestas a una mezcla de especies de HMA (Van der Heijden *et al.*, 1998). Además, al utilizar inóculos mixtos se aumentan las posibilidades de que los hongos más apropiados se hagan dominantes en la eventualidad de que las condiciones del suelo cambien debido a la perturbación y en las etapas sucesionales (Abbott & Gazey, 1994). Las evidencias señalan que no todos los HMA son igualmente efectivos con las distintas especies de plantas (Klironomos & Hart, 2002).

La riqueza de los HMA está asociada a una elevada diversidad funcional, lo que se ve reflejado en el crecimiento y desarrollo de las plantas (García, 2011). Hay estudios que demuestran que la micorrización, la captación de nutrientes y la biomasa en la planta varían en función de los hongos con quien forma la simbiosis (Helgason *et al.*, 2002). Van der Heijden & Horton (2009) observaron que tanto la

producción de biomasa como el contenido de nitrógeno y fósforo en plantas están determinadas por los HMA con los que se complementan, además que el nivel de micorrización, la captación de nutrientes y la productividad de la planta varían en función de la procedencia de los HMA (Cruz *et al.*, 2004; Moora *et al.*, 2004). Además, Maherali & Klironomos (2007) sugieren que las familias de HMA han evolucionado de tal manera que sus funciones son complementarias entre sí, por lo que se puede suponer que si la comunidad vegetal interacciona simultáneamente con HMA de diferentes familias la productividad vegetal será mayor, en comparación con la interacción con HMA de una sola familia.

Las plantas presentan diferentes estrategias en cuanto a la asignación de biomasa dependiendo del ambiente en el que se desarrollen. Por ejemplo, las plantas que se desarrollan en suelos pobres suelen asignar mayor biomasa a las raíces (Chapin 1980, 1988; Grime, 1979), y por otro lado, la asignación de biomasa en plantas que crecen en suelos ricos en nutrientes suele ser mayor en el vástago que en la raíz (Huante *et al.*, 1993). Bajo este supuesto, *C. mollis* parece estar adaptada a un ambiente donde los nutrientes no son limitantes ya que la relación vástago/raíz mostró una mayor asignación de peso seco a la parte aérea de la planta tanto en el ensayo de invernadero como en el de campo. El estudio realizado anteriormente en la península de Macanao por Kalinhoff (2012) determinó que efectivamente los suelos de esta zona son ricos en nutrientes (N y P). Los resultados obtenidos en campo concuerdan con el estudio realizado por Huante *et al.* (1993) en un bosque tropical de México, cuya investigación se basó en determinar el efecto de los HMA sobre el crecimiento de cuatro especies de

árboles que coexisten en dicho bosque, dentro de las cuales se encuentran dos leguminosas (*Caesalpinia eriostachys* Benth y *Pithecellobium mangense* (Jacq.) MacBride). Este bosque se caracteriza por su clima altamente estacional y la alta diversidad de plantas (Lott, 1985), cuyos suelos poseen altas concentraciones de N y P, donde igualmente se encontró bajo estas condiciones, que para las cuatro especies vegetales, la asignación de biomasa fue mayor a la parte aérea de la planta.

El efecto de las micorrizas en ambientes donde no se presenten deficiencias nutricionales podría ser a través de las mejoras en algunos de los parámetros hídricos, que aún cuando no fue el objetivo de este trabajo es importante tener en cuenta todos estos beneficios que la simbiosis micorrízica le confiere a la planta bajo estrés hídrico.

Aunque los HMA se ven afectados por las perturbaciones ambientales, tienen la capacidad de mediar en las respuestas de las plantas a diferentes tipos de estrés ambiental (Finlay, 2004). Por ejemplo, aumentan la resistencia de la planta al estrés hídrico, que es una de las principales funciones en zonas áridas (Augé, 2001) y semiáridas, como lo es el matorral xerófito de la península de Macanao. Kalinhoff (2012) en su estudio en la Península de Macanao encontró que la inoculación con HMA nativos tuvo una importante influencia en las estado hídrico de *Piscidia carthagenensis* bajo la condición de sequía, ya que se observó un ajuste osmótico y aumento en el potencial de turgencia (Ψ_t) foliar respecto a la

condición de riego, además de presentar altos valores de conductancia hidráulica radical.

Se ha observado que las plantas colonizadas suelen resistir mejor la sequía que las plantas no colonizadas (Augé & Moore, 2005), y que este efecto muchas veces depende de las diferentes combinaciones planta – hongo (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 (Ruíz-Lozano & Azcón, 1995; Marulanda *et al.*, 2003; Porcel & Ruíz –Lozano, 2004). En este trabajo los resultados obtenidos en condiciones de campo mostraron una mayor sobrevivencia de las plantas inoculadas en comparación a las no inoculadas. Es importante destacar que en este trabajo, aún cuando las plántulas de *C. mollis* no fueron inoculadas, las mismas presentaron colonización micorrízica ya que fueron cultivadas en suelos no estériles. Estos suelos por lo general no presentan el mismo número de propágulos infectivos (datos no mostrados), que se pueden encontrar en inóculos preparados, pero sí poseen la misma capacidad de colonizar las raíces de las plantas en su ambiente natural. Éste factor refleja cómo la inoculación no sólo podría afectar la sobrevivencia de las plantas en condiciones naturales, sino podría también estar afectando los parámetros hídricos. Igualmente, en este trabajo los resultados mostraron que no existe una relación entre el crecimiento y la colonización de *C. mollis*, ya que ambos inóculos en la fase de campo mostraron efectos diferenciales en el crecimiento más no en la colonización micorrízica. En este sentido, aún cuando

no existe especificidad en esta simbiosis, las diferentes especies de HMA difieren en su grado de efectividad e infectividad, las distintas especies, e incluso cultivares de la misma especie, muestran un grado diferente de susceptibilidad a la colonización con el hongo (Raju *et al.*, 1988). Aunque el genotipo del hospedero es crítico para definir el nivel máximo de colonización con MA, las distintas especies de hongos pueden exhibir un potencial de colonización diferente en un mismo hospedador, lo cual se interpreta como diferencias en el grado de compatibilidad entre las plantas y los distintos hongos (Sieverding, 1991).

Estos resultados no son consistentes con lo encontrado por Moyersoén *et al.* (1998), Siquiera *et al.*, (1998) y Cáceres & Cuenca (1996), los cuales trabajando con especies arbóreas encontraron relaciones positivas entre el porcentaje de colonización y el crecimiento de las especies estudiadas, y a su vez, encontraron una relación positiva entre el porcentaje de colonización y la incorporación de P a las plantas.

Es de notar también que la evaluación de la colonización en la fase de campo se realizó a los 248 DDS ya que en la primera cosecha a los 120 DDS no se observó colonización. Este resultado podría indicar que existe un retardo en el establecimiento de la colonización en esta especie que podría estar asociado a una baja tasa de crecimiento o a la permanencia de los cotiledones (Allsopp & Stock 1993,1995; Siqueira *et al.*, 1998). En este sentido, se podría señalar que el establecimiento de la colonización temprana representa un beneficio para las plántulas, ya que su establecimiento y desarrollo, representan una etapa donde la alta demanda de nutrientes supera el suministro, lo que podría producir un déficit

nutricional; por ello, el rápido establecimiento de la colonización representaría una alternativa en la incorporación de nutrientes en ambientes pobres (Koide 1991). Este no es el caso en ambientes con mayor disponibilidad de nutrientes, pero si bien no es el déficit nutricional el que podría estar afectando la colonización temprana, existen factores como el déficit hídrico que podrían producir efectos sobre el establecimiento de las plántulas. Para esclarecer esta pregunta que surge de este trabajo sugerimos hacer ensayos que evalúen la dinámica de colonización en periodos de tiempo más largos y evaluar la relación entre la colonización y el estado hídrico de las plántulas en campo.

Todas estas ventajas fisiológicas conferidas a la planta por la presencia de las MA representan una gran importancia para el establecimiento y sobrevivencia de las mismas, ya que en época de sequía, donde el agua pasa a ser el recurso limitativo más importante, la captura de nutrientes está limitada debido a que éstos son absorbidos por las células a partir de la solución del suelo. Es por esta razón que la contribución de los HMA en cuanto a la absorción de nutrientes se vuelve más importante en suelos secos (Finlay, 2004).

El incremento en la eficiencia de la absorción de nutrientes, especialmente de P, es considerado uno de los principales beneficios de la asociación planta-micorriza debido a que mejora el estado nutricional de las plantas (Treseder & Allen, 2002; Smith & Read, 2008). Este beneficio se pudo observar en el ensayo de campo, donde el contenido de P en las plantas con inóculo proveniente del matorral xerófito fue significativamente mayor, lo que puede ser atribuible a la alta

abundancia de un morfotipo de la familia Gigasporaceae presente en el inóculo de matorral (Kalinhoff, 2012), cuya familia se destaca por aumentar la absorción de P por parte de la planta (García, 2011). Dado que el micelio extra-radical cumple funciones de absorción, se ha propuesto que las especies de Gigasporaceae, al tener un micelio extra-radical más extenso, podrían estar proporcionando mayores beneficios nutritivos a la planta huésped (Hart & Reader, 2002).

Un mayor contenido de P foliar, como efecto de la inoculación, concuerda con lo expuesto por Green *et al.* (1998), quienes indican que este efecto es una respuesta importante producida por los micosimbiontes a nivel foliar en las plantas, ya que favorecen la fotosíntesis y actúa en el metabolismo de las plantas en forma de ATP. Otros autores trabajando con especies arbóreas en zonas tropicales han demostrado la mayor incorporación de P y N foliar al ser inoculadas con HMA (Kalinhoff, 2012; Cáceres & Cuenca, 2006; Cáceres *et al.*, 2008; Mora, 2010; Huante *et al.*, 1995).

Puesto que los HMA están implicados tanto en la captación de agua del suelo como de fosfato (Safir & Nelsen, 1981), su capacidad para mantener una nutrición adecuada de P en las plantas en condiciones de sequía, es un factor importante para mejorar la tolerancia al estrés hídrico (Graham & Sylvertsen, 1984; Nelsen & Safir 1982; Sieverding 1986).

Otro nutriente importante para el desarrollo de la planta es el N y a pesar de que aún existen muchos aspectos que aclarar en cuanto a su absorción por medio de HMA, es indudable la capacidad de sus hifas de absorber tanto amonio como

nitrate (Cuenca, no publicado). Numerous studies have demonstrated that the presence of MA makes a considerable contribution to the absorption of N by the plant from the soil, having been reported cases in which up to 42% of the total N absorbed by the plant is provided through the hyphae (Smith & Read, 2008).

In this work the content of N in *C. mollis*, in the pot experiment, is affected by the soil type more than by the types of inoculants used. Plants grown in 20-year soils showed less incorporation of N compared to those grown in scrubland soil, evidencing a greater soil-inoculant compatibility generated by the alteration of the soil in the disturbed locality, explained previously. However, it was observed that in plants grown in scrubland soil the N content was higher in the mycorrhizal treatments, although no significant effect was observed due to the origin of the HMA demonstrating, once again, that the HMA are involved in the absorption and transfer of N to the plants.

In the soils of the successional locality a high pedregosity was observed, which could be affecting water retention and therefore the mobility of the different forms of N available to the plant, since these are capable of absorbing both nitrate (mobile form) and ammonium (less mobile form), but the mobility of these forms is restricted in dry soils (Cuenca, no publicado).

On the other hand, in the field experiment no differences were observed in the response to mycorrhization in terms of N absorption, so

que pudo deberse a que el suelo del matorral esta caracterizado como extremadamente rico en N (Kalinhoff, 2012), por lo que su absorción no se ve limitada. Además, es importante tener en cuenta que el suelo utilizado para el tratamiento control no fue esterilizado, por lo que de forma natural contaba igualmente con la presencia de microorganismos del suelo y de HMA que favorecen la incorporación de nutrientes.

El hecho de que el contenido de N no se haya visto afectado por las diferencias en cuanto a la composición de HMA de cada inóculo, también puede deberse a que la adquisición de este nutriente puede estar siendo beneficiada por alguna familia de HMA presente en ambos inóculos.

Es importante considerar que las MA no solamente poseen la capacidad de incorporar NH_4^+ (baja movilidad), sino que también se ha encontrado que el NO_3^- (alta movilidad) puede ser utilizado eficientemente por las plantas micorrizadas como fuente de N. Cuenca & Azcón (1994) encontraron que en *Erythrina poeppigiana* la inoculación con HMA incrementaba la incorporación de N en plantas fertilizadas con NO_3^- . También se han reportado incrementos en la actividad de las enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno como producto de la micorrización. En el caso de que la fuente de N sea NO_3^- , se han encontrado incrementos en la actividad de la nitrato reductasa en plantas micorrizadas, lo que sugiere que el efecto de las micorrizas se relaciona con el mejoramiento en la nutrición fosforada de la planta, que influye sobre los altos requerimientos de fósforo de la enzima (Azcón *et al.*, 1992).

Como se ha mencionado anteriormente, las leguminosas son elementos muy importantes dentro de los ecosistemas semiáridos, ya que se caracterizan por ser altamente micótrofas y además, forman una importante simbiosis con los rizobios, los cuales constituyen una fuente de entrada de N en el ecosistema (Barea *et al.*, 1992), por lo tanto, su restablecimiento en los matorrales es un paso clave para la revegetación (Requena *et al.*, 2001).

Un trabajo realizado por Requena *et al.* (2001) en un área de un ecosistema semiárido de la Sierra de los Filambres, Almería, España, donde la vegetación natural era un matorral degradado, demostró el importante papel de las leguminosas arbustivas como fuente de inóculo de HMA para el área circundante y en la mejora de la nutrición de N a largo plazo. El ensayo consistió en la inoculación de una leguminosa (*Anthyllis cytisoides*) con una mezcla HMA nativos, además de bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios). Después de 5 años, se observó una mejora en las propiedades físico-químicas del suelo, incluyendo el aumento del contenido de N, lo que se le atribuyó a una mejor nodulación y capacidad de fijación de N resultante de la inoculación. Además, también se observó una mejora en el estado nutricional (principalmente de N) en las plantas no leguminosas cultivadas en asociación a esta leguminosa.

Otros factores distintos a los nutrientes disponibles para las plantas en el suelo podrían estar teniendo un mayor peso o contribución a las lentas tasas de recuperación del bosque en las áreas intervenidas (Holl, 1999). En este sentido, es importante señalar que el análisis de las diferentes especies que conforman

una cronosecuencia de 2 a 20 años en la Península de Macanao, después de la extracción de arena, mostraron porcentajes de colonización micorrízica mayores de 25%. En parcelas 2 años de abandonadas se reporta la preponderancia de *Canavalia brasiliensis*, leguminosa pionera que ofrece no sólo protección al suelo por ser una forma de vida rastrera, sino que también se encuentra colonizada por micorrizas, al igual que plantas de rápido crecimiento que se establecen en estas localidades recién perturbadas como *Rhynchelytrum repens* y *Cenchrus ciliaris*, (Cáceres *et al.* 2009, datos no publicados). Estos resultados en la cronosecuencia en la Península de Macanao, sugieren que no es la pérdida del inóculo de micorrizas el que podría estar afectando la recuperación de estas parcelas, sino la eficiencia e infectividad de los inóculos de HMA, sumado a otros factores como la disponibilidad de semillas y cambios en las propiedades físicas y químicas de los suelos (Fajardo, 2007).

Debido a que las especies de plantas muestran diferencias en el grado de dependencia de las micorrizas, las estrategias de restauración también deben tomar en cuenta el nivel de dependencia de las plantas involucradas (Requena *et al.*, 1996). Gerdeman (1975) definió la dependencia micorrízica (DM) como el grado en el que la planta depende de la condición micorrizada para producir su máximo crecimiento o rendimiento, a un nivel dado de la fertilidad del suelo. Para efectos prácticos, el índice de dependencia micorrízica (IDM) se determina mediante el grado en el que la planta se beneficia de la presencia de MA comparado a cuando esta asociación está ausente, y puede ser utilizado para comparar la eficiencia simbiótica de distintos inóculos (Plenchette *et al.*, 1983). En

el presente trabajo el IDM fue determinado bajo condiciones de invernadero, donde se observó que los cambios en el suelo generados por la perturbación también afectan la DM, obteniéndose que en los suelos provenientes de la localidad sucesional de 20 años el IDM disminuyó en aproximadamente un 50%. Este resultado es contrario a lo esperado, ya que leguminosas leñosas se han reportado como altamente dependientes a las micorrizas, especialmente en ecosistemas estresados (Herrera *et al.*, 1993), y por ejemplo, trabajos como el de Requena *et al.* (1996), encontraron que la mayoría de las plantas en su estudio en la Sierra de Filabres, Almería, estaban fuertemente micorrizadas, indicando un alto nivel de micotrofia de la vegetación dentro del ecosistema degradado, donde la falta de niveles de nutrientes y la escases de agua dificultan la sobrevivencia de las plantas. Además, contrario a lo que esperaban, encontraron una alta dependencia en una planta con sistema de raíces graminoide (*Stipa tenacissima*), lo que lo atribuyen a que podría haber crecido en una capa del suelo delgada y más rocosa, donde los niveles de nutrientes son extremadamente bajos. La dependencia micorrízica puede ser alterada por muchas variables tales como el tipo de suelo, contenido de P en el suelo, especies micorrízicas presentes, etc. (Menge *et al.*, 1978).

En este trabajo las plantas cultivadas en suelo de 20 años, no mostraron diferencias significativas entre sí en cuanto a los valores de biomasa se refiere, independiente del inóculo utilizado. En este sentido, cuando se analizan los valores de IDM partiendo de una relación entre los pesos secos de plantas inoculadas y no inoculadas, por lo general la interpretación que se da es que hay

poca dependencia a los HMA .Sin embargo, dado que la respuesta de la planta de crecimiento en este suelo no fue significativa, se sugiere que más que interpretarlo como una baja dependencia debería esto indicar un efecto muy marcado del suelo de la parcela sucesional de 20 años y que deben existir otros factores tanto bióticos como abióticos que podrían estar afectando el incipiente crecimiento de la especie en este suelo que no sería atribuible a la compatibilidad con los HMA .

El IDM para *C. mollis* cuando fue cultivada en el suelo proveniente del matorral xerófito fue en promedio de 55%, lo que se compara con una revisión realizada por Tawaraya (2003) de diferentes trabajos, donde discuten la DM de diferentes grupos de especies vegetales, y donde obtiene que el valor medio de DM para todas las plantas tomadas en cuenta para dicha revisión, fue de un 56%. En el mismo trabajo de estudiaron varias especies de cultivos de forrajes procedentes de zonas tropicales y subtropicales, los cuales presentaron en promedio un 56% de DM. Cuando se comparó el valor de DM entre leguminosas, la DM fue mayor en especies tropicales que en especies de zonas templadas (Crush, 1974).

Se ha reportado que para leguminosas, y para otras especies vegetales, el valor de DM se redujo con el aumento en el nivel de P en el suelo (Habte & Musoko, 1994). Las plantas pueden tomar suficiente fosfato con sus raíces en suelos con niveles de P extremadamente altos, por lo que en estas condiciones las plantas no necesitan P a través de las hifas del hongo que consumen C derivadas de la planta huésped; por ende, es posible que la planta suprima la

colonización micorrízica en condiciones tan altas de fósforo con el fin de evitar un asociación parasitaria (Tawaraya, 2003). Esto podría explicar los valores obtenidos de dependencia en *C. mollis*, que aun cuando no son comparables a los obtenidos en suelos ácidos, es un valor que concuerda con lo encontrado en zonas áridas (Alarcon & Cuenca, 2005)

La importancia de conocer la DM y los factores que podrían estarla afectando radica en que podría brindar información de cómo podría ser la respuesta a la micorrización de una especie vegetal en su desarrollo en campo, bajo ciertas condiciones. Esta importancia aumenta en el estudio de áreas degradadas, ya que el IDM podría representar el punto de partida para la elaboración de un protocolo que permita determinar la respuesta de las especies vegetales de interés en los diferentes planes de restauración en los que se desea utilizar la inoculación con HMA como alternativa.

Por otro lado, la respuesta micorrízica (RM) de *C. mollis* fue determinada en condiciones naturales en el campo. La RM se puede estimar en base a los parámetros determinados, como la biomasa y el contenido foliar de P y N (Van der Heijden & Kuyper, 2001); en este caso, la capacidad de respuesta fue medida en base al peso seco de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. Igualmente, es importante tomar en cuenta que el IRM sólo puede ser calculado a partir de tratamientos con plantas inoculadas y no inoculadas en suelos no estériles. Este tipo de diferenciación es bastante confusa en la literatura ya que la IDM y el IRM son considerados similares y en muchos casos se utilizan suelos

estériles los cuales no reflejan las condiciones naturales y son poco adecuados cuando se establecen protocolos de restauración.

El índice de respuesta micorrízica (IRM) obtenido indicó que *C. mollis* presenta una muy baja respuesta a la inoculación con HMA provenientes de la localidad sucesional de 20 años (11,4%), con respecto a la inoculación con HMA provenientes del matorral (47,1 %). Esta respuesta al inóculo proveniente del matorral xerófito sin perturbar podría ser el resultado de una mayor compatibilidad funcional de esta planta con las especies de HMA más abundantes en dicho inóculo. Hay estudios que 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). La respuesta a la micorrización depende de la duración del experimento y del potencial infectivo del inóculo, por lo que en la primera cosecha realizada en el campo en plantas con 120 DDS no se observó ninguna respuesta a la inoculación. Es entonces en la segunda cosecha (248 DDS) donde se comienza a observar la respuesta a la micorrización, en donde es el inóculo de matorral el que favorece el crecimiento de la planta, lo cual también se ve reflejado en una mayor tasa de crecimiento relativo (TCR). Estas diferencias se vieron también expresadas cuando observamos la colonización micorrízica, ya que para la primera cosecha realizada a los 120 días no se observó colonización, mientras que para la segunda cosecha la colonización micorrízica produjo no sólo una respuesta de crecimiento sino que esta no varió entre los inóculos.

En los procesos de restauración de ecosistemas deteriorados, el establecimiento y sobrevivencia de las especies vegetales se convierte en un punto clave. La influencia de la inoculación con HMA sobre el desarrollo vegetativo de *C. mollis*, en condiciones de campo, es notable en el crecimiento del plantones más vigorosos, lo cual favorece el establecimiento vegetal. El efecto positivo de la inoculación con HMA provenientes del matorral sin perturbar que se refleja en una mayor TCR en comparación con los otros dos tratamientos, indica que su colonización micorrízica podría minimizar el tiempo en el que la planta permanece en un tamaño vulnerable, aumentando así la probabilidad de sobrevivir al siguiente período de sequía (Rincón *et al.*, 2000). El mantenimiento de una TCR cercana al valor máximo que puede ser mantenido 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). Por ejemplo, una mayor TCR de las raíces conlleva a una mayor tasa de absorción de P por unidad de longitud de raíz o una mayor eficiencia de utilización de P en una etapa temprana de crecimiento, lo que se hace necesario para satisfacer los altos requerimientos de nutrientes (Tawaraya, 2003).

La TCR para el tratamiento MM fue tres veces mayor con respecto a los otros tratamiento (MV y MC). Con respecto al tratamiento MV, esta diferencia puede ser atribuible, una vez más, a la compatibilidad funcional con los HMA presentes en cada inóculo; mientras que con respecto al tratamiento control, la diferencia se puede atribuir a la densidad del inóculo, ya que el suelo de matorral

en el que fueron cultivadas las plantas presenta propágulos de HMA de forma natural, los cuales aumentan con la inoculación en el tratamiento MM. El beneficio de la inoculación con HMA en cuanto a la TCR observado en el presente trabajo, también ha sido reportado por otros autores. Cáceres & Cuenca (2006), por ejemplo, estudiaron la respuesta de dos especies tropicales (*Clusia minor* y *Clusia multiflora*) a la inoculación con HMA en dos suelos con pH diferentes y encontraron que para ambas especies la TCR fue mayor en plantas inoculadas con respecto al control, en suelos ácidos. A su vez, Kalinhoff (2012), en su trabajo realizado en la península de Macanao con *Piscidia carthagenensis*, donde las plantas fueron cultivadas en suelos del matorral xerófito y de dos localidades sucesionales distintas (2 años y 20 años), también encontró mayores TCR en las plantas micorrizadas en comparación con las plantas control en todos los suelos evaluados.

Luego de 248 DDS de realizado el trasplante de *C. mollis* al campo, se observó que la inoculación con HMA incrementó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas en condiciones de campo, en el que los individuos deben sobrevivir a un periodo de sequía y a altas temperaturas. Esto demuestra el beneficio que le confieren los HMA a las plantas, sobre todo en los ambientes áridos, donde juegan un papel cada vez más importante en la sobrevivencia de las plantas (Smith *et al.*, 2010).

Estos resultados de incremento de sobrevivencia de las plantas son relevantes para trabajos de recolonización vegetal con especies nativas en

ecosistemas deteriorados, debido a que prácticamente se duplicó la sobrevivencia de las plantas debido, posiblemente, al importante suministro hídrico que aportan los HMA a su hospedero durante el periodo de sequía (Monroy *et al.*, 2007), ya que las plantas de *C. mollis* estuvieron expuestas aproximadamente 120 DDS a la temporada de sequía de la zona.

Muchos trabajos demuestran el beneficio de la simbiosis planta-HMA en cuanto a la sobrevivencia, como por ejemplo el realizado por Requena *et al.* (2001) en el ecosistema semiárido degradado de Sierra de Filambres, donde las plántulas de *Anthyllis Cytisoides* se cultivaron en condiciones de vivero y después de 6 meses fueron trasplantadas en el ecosistema desertificado elegido. La inoculación con HMA de las plantas aumentó significativamente su sobrevivencia en campo, obteniendo un 85% de sobrevivencia para plantas micorrizadas y un 65% para las no micorrizadas.

Después del trasplante en campo no hubo diferencias significativas en cuanto a la altura entre los tres tratamientos, pero el efecto de la inoculación fue observado en la sobrevivencia, tal como lo obtenido por Ramos-Zapata *et al.* (2006), en un bosque tropical de la península de Yucatán, México, donde realizaron ensayos en dos sitios de diferente edad sucesional, un bosque maduro y un campo con 8 años de abandono, donde la inoculación con HMA de una palma tropical (*Desmoncus orthacanthos*) incrementó en el bosque el área foliar, el contenido de fósforo, pero no la altura, mientras que la probabilidad de

sobrevivencia de las plantas inoculadas introducidas en campo fue de tres veces mayor que las plantas control.

Es evidente que el aumento de los nutrientes y agua en la planta, una mayor y más rápida producción de biomasa, una posible protección contra patógenos de la raíz y una posible mejora en las características físico-químicas del suelo, debido a la inoculación con HMA, se tradujo en una mayor sobrevivencia en campo (Khurana & Singh, 2001).

En conclusión, la inoculación de plántulas de *C. mollis* con HMA provenientes del matorral xerófito sin perturbar, utilizando como sustrato de siembra suelos provenientes de la misma localidad, constituye un estrategia favorable que podría representar un factor determinante en el establecimiento y crecimiento y sobrevivencia de las plántulas de *C. mollis* en las localidades perturbadas por la actividad minera.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían estar explicando el hecho de que *C. mollis* se haya reportado únicamente en los matorrales xerófitos y bosques secos de la península, más no en las localidades sucesionales originadas por la extracción de arena (Fajardo, 2007), pues dicha perturbación parece haber afectado de manera importante las características del suelo, dificultando el crecimiento de esta especie vegetal, a lo que se le suma una baja compatibilidad funcional con los HMA presentes en dichos suelos.

CONCLUSIONES

- Un menor crecimiento y una menor adquisición de nutrientes en las plantas cultivadas en suelo proveniente de la localidad sucesional de 20 años con respecto a las plantas cultivadas en suelo de matorral, podría ser el resultado de la alteración de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, resultante de las actividades mineras llevadas a cabo en la zona.
- Los inóculos nativos provenientes del matorral xerófito sin perturbar produjeron mayores efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas, lo que podría deberse a una mayor variedad de morfotipos de esporas de HMA presentes en este.
- La colonización micorrízica no está relacionada con el crecimiento de la planta, debido a que se encontraron respuestas diferenciales en el crecimiento entre los inóculos utilizados, más no en la colonización.
- Un mayor índice de dependencia observado en las plantas cultivadas en el suelo de matorral inoculadas con HMA provenientes del matorral podría ser el resultado de una mayor compatibilidad funcional de *C. mollis* con las especies de HMA presentes en este inóculo.
- El menor índice de dependencia observado en las plantas cultivadas en suelos sucesionales podría ser el resultado, no sólo a una baja compatibilidad, sino de factores bióticos y abióticos no estudiados en el presente trabajo que podrían estar dificultando el crecimiento de la planta.

- Las especies de HMA presentes en el inóculo de matorral podrían estar presentando una estrategia de colonización más rápida incrementando la tasa relativa de crecimiento de *C. mollis*, disminuyendo el tiempo en el que la planta se encuentra en su fase más vulnerable, lo que posteriormente podría verse reflejado en una más rápida colonización del área.
- Las plantas cultivadas en suelo proveniente del matorral xerófito inoculadas con HMA mostraron una mayor sobrevivencia que las no inoculadas, después de estar expuestas a sequía natural, resaltando la importancia de la reintroducción o reforzamiento de los HMA nativos para disminuir la mortalidad de esta planta en suelos perturbados.
- El uso de un inóculo proveniente de la localidad sucesional de 20 años podría resultar eficiente a largo plazo, aunque su efecto no se refleje en los primeros estadios de desarrollo de la planta.
- El uso de combinaciones adecuadas de suelos e inóculos de HMA durante la etapa de vivero es fundamental para mejorar el crecimiento y sobrevivencia de *C. mollis*, tanto en los primeros meses de crecimiento, como en las etapas posteriores del desarrollo de la planta en suelos degradados, bajo condiciones estresantes.

- El tratamiento de las localidades perturbadas con suelos provenientes del matorral y con inóculos nativos del mismo, podría representar una estrategia favorable para el establecimiento y crecimiento de *C. mollis*, permitiendo la recolonización de la zona intervenida por parte de esta especie vegetal, lo cual representaría un paso a la conservación de la misma, ya que actualmente se encuentra en estado vulnerable.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott K & Gazey C (1994). An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. *Plant Soil* 159: 69-78.
- Abott K & Robson A (1985). Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular mycorrhizal. *New Phytol* 99: 245 – 255.
- Alarcón C & Cuenca G (2005). Arbuscular mycorrhizas in coastal sand dunes of the Paraguaná Península, Venezuela. *Biomedical and Life Sciences Mycorrhiza* 16: (1) 1-9.
- Al-Karabi G, McMichael B, Zak J (2004). Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14: 263-269.
- Allen F (1999). La micorriza y la rehabilitación de suelos áridos perturbados: procesos y prácticas. En: *Ecofisiología vegetal y conservación de recursos genéticos*. Eds. Roger Orellana, José A. Escamilla y Alonso Larqué Saavedra. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. P 151-165.
- Allen E, Violi H, Allen M, & Gómez-Pompa A (2003). Restoration of tropical seasonal forest in Quintana Roo. Pages 587–598 in A. Gómez-Pompa, M. F. Allen, S. L. Fedick, & J. Jimenez-Osornio, editors. *The lowland Maya area: three millenia at the human–wildland interface*. Haworth Press, Binghamton, New York, USA.
- Allen E, Allen M, Egerton-Warburton L, Corkidi 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 non-target organisms on restoration of a seasonal tropical forest in Quintano Roo, Mexico: factors limiting tree establishment. *Restor. Ecol.* 13: 325–533.
- Allen M (2007). Mycorrhizal fungi: Highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone Journal* 6:291-297.
- Allsopp N & Stock W (1993). Mycorrhizal status of plants growing in the Cape Floristic Region, South Africa. *Bothalia* 23:91-104.
- Allsopp N & Stock W (1995). Relationship between seed reserves, seedling growth and mycorrhizal responses in 14 related shrubs (Rosidae) from a low-nutrient environment. *Funct Ecol* 9: 248-254.
- Álvarez J & Peña J (2009). La micorriza arbuscular como una herramienta en la restauración ecológica. En: Álvarez F (Eds). *Ecología de micorrizas arbusculares y restauración de ecosistemas*. 1ª edición. D.R. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México.
- Amaranthus M & Perry D (1987). Effect of soil transfer on ectomycorrhizal formation and the survival and growth of conifer seedlings on old, reforested clear-cuts. *Can. J. For. Res.* 17: 944–950.
- Aristeguieta L (1968). El bosque caducifolio seco de los llanos altos centrales. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales* 27:395-438.
- Aronson J, Floret C, Le Floc'h E, Ovalle C, & Pontanier R (1993). Restoration and rehabilitation of degraded ecosystems in arid and semiarid regions. II. A view from the south. *Restoration Ecology* 41:8-17.

- 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, 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.
- Azcón R, Gómez M, Tobar R (1992). Effects of nitrogen source on growth, nutrition, photosynthetic rate and nitrogen metabolism of mycorrhizal and phosphorus-fertilized plants of *Lactuca sativa* L. *New Phytol* 121: 227-234.
- Bever J (1994) Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology* 75: 1965-1977.
- Barea J, Azcón-Aguilar C, Azcón R (1992). Mycorrhiza and crops. En: I.C. Tommerup (Ed.). *Advances in plant pathology. Mycorrhiza: A synthesis*. Academic. New York.
- Barea J, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En: *Microorganisms in soil: roles in genesis and functions*. Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, pp: 195-212.
- Barker S, Tagu D, Delp G (1998). Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiology* 116: 1201-1207.

- Barrer S (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura.
- Bevilacqua M & Ochoa J (2001). Conservación de las últimas fronteras forestales de la Guayana Venezolana: propuesta de lineamientos para la Cuenca del Río Caura. *Interciencia* 26: 491–497
- Brundrett M (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv. Ecol. Res.* 21: 171-313.
- Brundett M, Ashwath N, Jarper D (1996). Mycorrhizal in the Kakadu region of tropical Australia. In: Propagulos of mycorrhizal fungi and soil properties in natural Habitats. *Plant and Soil.* 184: 159-171.
- Cáceres A & Cuenca G (1996). Mycorrhizal dependence, phosphorus response and gas exchange of *Clusia minor* L. a tropical woody pioneer plant. In: Azcón C, Barea J (Eds.). *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development. Proceedings of Fourth European Symposium on Mycorrhizas.* European Commission, pp 301-303.
- Cáceres A & Cuenca G (2006). Response of seedlings of two tropical species *Clusia minor* and *Clusia multiflora* to mycorrhizal inoculation in two soils with different pH. *Tree Structure and Function* 20 (5):593-600.
- Cáceres A, Mora G, Marrero B, Kalinhoff C (2008). Compatibilidad funcional de Hongos Micorrízicos- Arbusculares (HMA) introducidos y nativos con *Pachira quinata* especie de interés maderable en Venezuela. *Memorias de las Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencias.*

- Caravaca F, Alguacil M, Díaz G, Roldán A (2003). 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.
- Castillo, A., S. Gómez & O. Moreno. 1992. Aspectos florísticos y fisionómicos de un ecosistema semi-árido del Litoral Central, Municipio Vargas, Distrito Federal. *Acta Biol. Venez.* 13: 94-115.
- Chapin F (1980). The mineral nutrition of wild plants. *Annu Rev Ecol Syst* 11: 233-260.
- Chapin F, Bloom A, Field C, Waring R (1987). Plant responses to multiple environmental factors. *Bio Science* 37: 49-57.
- Crush J (1974). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytology* 73: 743-749.
- Cruz C, Watson C, Wilson F, Martins-Loução A (2004). Functional aspects of root architecture and mycorrhizal inoculation with respect to nutrient uptake capacity. *Mycorrhiza* 14: 177-184.
- Cuenca G & Azcón R (1994). Effects of ammonium and nitrate on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal *Erythrina poeppigiana* O.I. Cook seedlings. *Biology and Fertility of Soils* 18: (3) 249-254.
- 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.
- Cuenca G & Lovera M (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae in disturbed and revegetated sites from La Gran Sabana, Venezuela. *Can. J. Bot.* 10: 73-79.
- Davies F Jr, Svenson S, Cole J, Phavaphutanos 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.
- Dunabeitia M, Rodríguez N, Salcedo I, Sarrionandia E (2004). Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque country. *For. Ecol. Manage.* 195: 129–139.
- Escudero A, Iriondo J (2003). Restauración de poblaciones de plantas amenazadas. En: *Restauración de Ecosistemas Mediterráneos*. p. 113-139.
- Ewel J (1977) Differences between wet and dry sucesional tropical ecosystems. *Geo – Eco – Trop* 1: 103 – 17.
- Ewel, J, Madriz A (1968). *Zonas de Vida de Venezuela*. Ministerio de Agricultura y Cría, Ediciones del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Editorial Sucre, Caracas, Venezuela 264 p.
- Fajardo L (2005). Bases ecológicas para la restauración del bosque seco en la península de Macanao, hábitat de la cotorra cabeciamarilla (*Amazona*

barbadensis), isla de Margarita, estado Nueva Esparta. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC.

- 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.
- Falk A, Millar C, Olwell M (1996). Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants. Island Press. Washington, DC.
- 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.
- Finlay R (2004). Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist* 18 (2) DOI: 10.1017/S0269915XO4002058.
- García R (2011). Diversidad funcional de los hongos micorrízicos arbusculares de islas de recursos del Valle del Mezquital, Hidalgo. Tesis doctoral. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Pp. 125.
- Gentry A (1995). Diversity and floristic composition of neotropical dry forest. En: Bullock, S. H., Mooney, H. A. y E. Medina (Eds.) *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge University Press. 146-194 pp.
- Gerdemann J (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizae. Pp. 575-591. En: J.G. Torrey & D.T. Clarkson (Eds). *The development and Function of Roots*. Academic Press, New York and London.
- Gillespie, T, Grijalva A, Farris C (2000). Diversity, composition, and structure of tropical dry forests in Central America. *Plant Ecology* 147: 37-47.

- 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 (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.
- 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 & Sylvetsen J (1984). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the hydraulic conductivity of roots of two citrus rootstocks. *New Phytol* 97: 277-284.
- Green C (1998). Transpiration of detached leaves from mycorrhizal and nonmycorrhizal cowpea and rose plants varying abscission acid, pH, calcium and phosphorus. *Mycorrhiza* 8: 93-99.
- Grime J (1979). *Plant strategies and vegetation processes*. Wiley, Chichester.
- Habte M & Musoko M (1994). Changes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of *Albizia ferruginea* and *Enterolobium cyclocarpum* in response to soil phosphorus concentration. *J. Plant Nutrition* 17: 1769-1780.
- Harley J & Smith S (1984). *Mycorrhizal symbiosis*. 2^a impresión. Academic Press, Londres, Gran Bretaña. pp: 4-33.
- Hart M & Reader R (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 153: 335-344.

- Haselwandter K (1997). Soil micro-organisms, mycorrhiza and restoration ecology. En: Urbanska K, Webb N, Edwards P (Eds). Restoration ecology and sustainable development. Cambridge University Press, Reino Unido. pp: 65-80.
- 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.
- Hernández G, Cuenca G, Garcia A (2000). Behaviour of arbuscular-mycorrhizal fungi in *Vigna luteola* growth and its effect on the exchangeable (^{32}P) phosphorus of soil. *Biology and Fertility of Soils* 31: 232-236.
- Herrera H, Salamanca C, Barea J (1993). Inoculación 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.
- Holl K (1999). Factors limiting tropical rain forest regeneration in abandoned pasture: seed rain, seed germination, microclimate, and soil. *Biotropica* 31: 229-242.
- Hoyos J (1985). Flora de la Isla de Margarita, Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N 34. Caracas. 927 p.
- Hoyos J (1987). Guía de árboles de Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N 32. Caracas. 350 p.

- Huber O, Alarcón C (1988). Mapa de Vegetación de Venezuela 1:2.000.000. The Nature Conservancy, MARNR. Oscar Todtmann Editores. Caracas, Venezuela.
- Huante P, Rincon E, Allen E (1993). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on seedling growth of four species from the tropical deciduous forest in Mexico. *Mycorrhiza* 2: 141-145.
- Huante P, Rincón 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.
- Jackson L, Lopoukhine N & Hillyard D (1995). Ecological restoration: a definition and comments. *Restoration Ecology* 3:71-76.
- 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 (1993). Vesicular-arbuscular mycorrhizae of epiphytes. *Mycorrhiza* 4, 1-4.
- Jasper D (1994). Management of mycorrhizas in revegetation. En: Robson A, Abbott L, Malajczuk (Eds). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture change. Cambridge University Press, Gran Bretaña. pp: 211-219.
- Johnson N, O'Dell T, Bledsoe C (1999). Methods for ecological studies of mycorrhizae. En: Robertson G, Coleman D, Bledsoe C, Phillip (Eds). Standard soil methods for long-term ecological research. Oxford University Press, Estados Unidos. pp: 378-412.

- Kalinhoff C (2012). Influencia de las micorrizas arbusculares sobre el crecimiento y respuesta a la sequía de *Piscidia Cartaguenensis* Jacq.: Implicaciones en la recuperación de un bosque seco de la península de Macanao, Isla de Margarita. Tesis Doctoral. Instituto de Biología Experimental IBE. 185 p.
- Klironomos J & Hart M (2002). Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12:181-184.
- Koide R (1991). Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal symbiosis. *Funct Ecol* 31: 252-255.
- Khurana E & Singh (2001). Ecology of tree seed and seedlings: Implications for tropical forest conservation and restoration. *Current Science* 80 (6): 748-757.
- Kyllö D, 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.
- Linderman R (1993). Effects of microbial interactions in the micorrhizosphere on plant growth and health. En: Ferrera R, Quintero L (Eds). *Agroecología, sostenibilidad y educación*, Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados Montecillo, Estado México, México. pp: 138-152.
- Llamozas S, Duno R, Meier W, Riina R, Stauffer F, Aymard G, Huberand O, Ortiz R (2003). Libro Rojo de la flora de Venezuela. Provita, Fundación Polar, Fundación Instituto Botánico de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Lopes-Leal P, Stürmer S, Siquiera 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.

- López F (1987). Morfología derivada de la minería a cielo abierto en la Sierra de Cartagena. Anales de la Geografía de la Universidad Complutense, núm. 7. Ed, Univ. Complutense.
- López M, Ramírez N (2004). Composición florística y abundancia de las especies en un remanente de bosque deciduo secundario. Acta Biol. Venez. 24: 29-71. Instituto Botánico de Venezuela, Dr. Tobías Lasser.
- Lott E (1985). Listado florístico de la estación de biología Chamela, México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- MacMahon J (1998). Empirical and theoretical ecology as a basis for restoration: an ecological success story. Pages 220-246 in M.L. Pace and P.M. Groffman, editors. Successes, Limitations, and Frontiers in Ecosystem Science. Springer Verlag, New York.
- Maherali H & Klironomos J (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. Science 316:1746-1748.
- Marschner H (1990). Mineral nutrition of higher plants. 4^a reimpresión. Academic Press, Estados Unidos. pp. 465-476.
- Marulanda A, Azcón R, Ruíz-Lozano J (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. Physiologia Plantarum 119: 522-526.
- Maunder M (1992). Plant reintroduction: an overview. Biodiversity and Conservation 1: 51-61.
- May R, Lawton J, Stork N (1995), in *Extinction Rates* (eds Lawton, J. H. and May, R. M.), Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 1–24.

- McGee P (1989). Variation in propagule numbers of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid soil. *New Phytologist* 92: 28-33.
- Menge J, Johnson E, Platt R (1978). Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. *New Phytologist* 81: 553-559.
- Miller R, Jastrow J (1992). The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. En: *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Ed. Michael F. Allen. Routledge, Chapman & Hall, Inc. p. 438-467.
- Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables. 1980. Atlas de Venezuela. Dirección General de Investigación del Ambiente. Dirección de Cartografía Nacional. Caracas, Venezuela 329 p.
- Monroy A, Estevez J, García R, Ríos R (2007). Establecimiento de plantas mediante el uso de micorrizas y de islas de recursos en un matorral xerófito deteriorado. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 80: 49-57.
- Moora M, Opik M, Sen R, Zobel M, (2004). Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology* 18:554-562.
- Mora G (2010). Efecto de las micorrizas arbusculares (MA) sobre la fotosíntesis, crecimiento y establecimiento de *Pachira quinata* en la Reserva Forestal de Caparo. Tesis doctoral. Instituto de Biología Experimental IBE. UCV.
- Moyersoen B, Fitter A, Alexander I (1998). Spatial distribution of ectomycorrhizas and arbuscular mycorrhizas in Korup National Park rain forest, Cameroon, in relation to edaphic parameters. *New Phytologist* 135: 311-320.

- Murphy P, Lugo A (1986) Ecology of tropical dry forest. Annual Review. Ecology Systematic 17: 67-88.
- Nelsen C & Safir R (1982). Increased drought tolerance of mycorrhizal onion plants caused by improved phosphorus nutrition. Planta 154: 407-413.
- Olivares E, Medina E (1992). Water and nutrient relations of woody perennials from tropical dry forests. Journal of Vegetation Science 3: 383-92.
- 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. Rodríguez J, Rojas-Suárez F, Giraldo-Hernández (eds). Provita, Shell Venezuela, Lenovo (Venezuela). Caracas, Venezuela.
- Olivieri I, Ronce O, Imbert E, Rousset F, Alleaume-Benharira M (2003). Dispersión chez les plantes. www.isem.univ-montp2.fr/GE/Metapopulations/Meta.php
- Pacheco C, Aguado I, Mollicone D (2011). Las causas de la deforestación en Venezuela: Un estudio retrospectivo. BioLlania Edición Esp. 10:281-292.
- Palenzuela J, Barea J (2009). El uso de hongos micorrícicos arbusculares en la restauración de ecosistemas amenazados de desertificación en España. En: Ecología de micorrizas y restauración de ecosistemas. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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.

- Pennington J, Mahoney K, Kuwahara S, Kolber D, Calienes R, Chavez F (2006). Primary productivity in the eastern tropical Pacific: A review. *Progr. Oceanogr.* 69: 285–317.
- Perry D, Molina R, Amaranthus M (1987). Mycorrhizae, mycorrhizospheres, and reforestation: current knowledge and research needs. *Can. J. For. Res.* 17: 929–940.
- Picket S & Parker V (1994). Avoiding the old pitfalls, opportunities in a new discipline. *Restoration Ecology* 2:75-79.
- Picone C (2000). Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture. *Biotropica* 32: 734-750.
- Plenchette C, Fortin J, Furlan V (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhiza in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil* 70: 191-209.
- Plonczak M (1997). Die Nutzung der Naturwalder in Venezuela. *Allgemeine Forst-und Jagdzeitung.* 168/3-4: 54-58. Sauerlander Verlag. Frankfurt.
- 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 & 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.

- Prosser, I.P. & Roseby, S.J. (1995) A chronosequence of rapid leaching of mixed podsol soil materials following sand mining. *Geoderma*, 64, 297–308.
- 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.
- Quoreishi A (2008). The use of mycorrhizal biotechnology in restoration of disturbed ecosystem. En: *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*. Eds. Zaki Anwar Siddiqui, Mohd. Sayeed Akhtar, Kazuyoshi Futai. Springer Science. pp: 303-320.
- Raju P, Clark R, Ellis R, Maranville J (1988). Benefit and cost analysis and phosphorus efficiency of VA mycorrhizal fungi colonization with sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes grown at varied phosphorus levels. *Plant and Soil* 102 (2): 199-204.
- Ramos-Zapata J, Orellana R, Allen E (2006). Establishment of *Desmoncus orthacanthos* Martius (Arecaceae): effect of inoculation with arbuscular mycorrhizae. *Rev. Biol. Trop.* 54(1): 65-72.
- 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.
- Ravnskov S & Jakobsen I (1995). Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant. *New Phytologist*: 129:611-618.
- Read D (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experimen.* 47: 74–84.

- Requena N, Jeffries P, Barea J (1996). Assessment of Natural Mycorrhizal Potential in a Desertified Semiarid Ecosystem. *Applied and Environment Microbiology* 62: (3) 842-847.
- 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 and Environmental Microbiology* 67: 495-498.
- Rilling M, Mummey D (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171:41-53.
- Rincón 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.
- 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.
- Safir G & Nelsen C (1981). Water and nutrient uptake by vesicular-arbuscular plants. En: R Myers (Ed.). *Role of Mycorrhizal Associations in Crop Production*. Pp. 25-31.
- Saggin-Júnior O, Lovato P. Aplicação de micorrizas arbusculares na propagação de mudas e plantas micropropagadas. En: Siqueira J et al. *Inter-relação fertilidade, biología do solo e nutrição de plantas*. Lavras: SBCS/UFLA, p. 725-774.

- Santana R, Montagnini F, Louman B, Villalobos R, Gómez M (2002). Productos de bosques secundarios del Sur de Nicaragua con potencial para la elaboración de artesanías de Masaya. *Revista Forestal Centroamericana* N° 38: 85-90.
- Schnee L (1960). Plantas comunes de Venezuela. *Rev. Fa. Agron., Alcance*, 3: 1- 663.
- Sieverding E (1991). Vesicular – arbuscular mycorrhizal management in tropical agro systems. GTZ. Eschborn, Germany 371 p.
- Sieverding E (1986). Influence of soil water regimes on VA mycorrhiza. IV. Effect on root growth and water relations of *Sorghum bicolor*. *J. Agron Crop Sci* 157: 36-42.
- Siqueira J, Carneiro M, Curi, N, Rosado S, Davide A (1998). Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management* 107:241-252.
- 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. p. 605.
- Smith S & Read D (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Third Edition. Academic Press, Boston. 800 p.
- Soil Survey Staff (2003). *Keys to Soil Taxonomy*. 9^a ed. Natural Resources Conservation Service. USDA. Washington, DC, EEUU. 332pp.

- Sprent J, James E (2007) Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144: 575-581.
- Subramanian K, Santhanakrshnan 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.
- Tawarayama K (2003). Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* 49: (5) 655-668.
- Tilman D, May R, Lehman C, Nowak M (1994). *Nature*, 371, 65.
- Treseder K & Allen M (2002). Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist* 155: 507-515.
- UNCED (1992). Combating deforestation. *The Forest Chronicle*, 68: 1-7.
- Vallejo R, Cortina J, Vilagrosa A, Seva J, Alloza J (2003). Problemas y perspectivas de la utilización de leñosas autóctonas en la restauración forestal. En: *Restauración de Ecosistemas Mediterráneos*. p. 11-42.
- Van den Driessche R (1991). Effects of nutrients on stock performance in the forest. In: *Mineral nutrition of conifer seedlings*. CRC, Boca Ration, FL/Ann Arbor, MI/Boston, MA, pp. 229–260.
- 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.

- Van der Heijden M & Horton T (2009). Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology*. Volume 97, issue 6, pp. 1139 - 1150.
- Van der Heijden M & Kuyper T (2001). Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis?. *Plant and Soil* 230: (2) 161-174.
- 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.
- White P, Walker J (1997). Approximating nature's variation: selecting and using reference information in restoration ecology. *Restoration Ecology* 5:338-349.
- 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.
- 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.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados del ANOVA de dos vías para los diferentes parámetros determinados en la fase de invernadero.

Anova	Peso seco hoja	Peso seco tallo	Peso seco raíz	Peso seco total	Altura	N
Suelo (S)	***	***	***	***	***	***
Inóculo (I)	***	***	***	***	NS	NS
SxI	***	***	***	***	NS	NS

*** $p < 0,05$

Anexo 2. Características de los suelos del matorral y parcela sucesional de 20 años (arbustal). Fósforo (P), Nitrógeno (N), Materia orgánica (MO). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0.05$) utilizando el test de LSD. Tomado de Kalinhoff, 2012.

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

Anexo 3. Listado de morfotipos de Glomeromycota presentes en los inóculos producidos con los suelos provenientes de matorral y de la parcela sucesional de 20 años. La abundancia está referida al número total de esporas observados en tres aislados de 50 g⁻¹ de suelo: >50 (alta), 20-50 (media), 5-20 (baja), <5 (rara). Tomado de Kalinhoff, 2012.

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