



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Enzimas relacionadas con los procesos metabólicos del  
fósforo en plantas micorrizadas de (*Platymiscium  
pinnatum*) en el bosque seco insular de la península de  
Macanao, estado Nueva Esparta**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por El bachiller Arneld A. Sulbaran como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutora: Profa. Alicia Cáceres.

CARACAS, VENEZUELA  
Marzo, 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Adiós por darme una segunda oportunidad en este mundo y protegerme en cada momento. Agradezco a mi madre y mi abuela por todas las enseñanzas para lograr tantas metas en mi vida.

A la Universidad Central de Venezuela por darme la oportunidad de formarme como profesional.

A la profesora Alicia Cáceres, más que una tutora fue una amiga y una segunda madre gracias por toda la paciencia durante este trabajo de investigación y entenderme por cada uno de las dificultades que pasamos, dios la bendiga.

A la profesora Karla Cáceres fuiste una pieza fundamental en este trabajo te agradezco toda tu enseñanza y dedicación en el laboratorio me guiaste en cada etapa de este trabajo y gracias por esos grande consejos que me ayudaron mucho y en tu nueva etapa vas hacer una excelente profesora.

Al profesor Ismael Hernández, gracias a usted y sus cátedras pude entender aún más la importancia de nuestros recursos naturales y poder inclinarme a la botánica.

A la profesora Milagros Lovera, agradecido por su apoyo en el IVIC y su asesoría.

Al equipo del Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas Superiores Yamilet Lira y Maoly Márquez por toda la colaboración prestada.

A mi bella esposa Carla Acevedo por apoyarme y aconsejarme durante todo este tiempo eres el pilar fundamental en mi vida, tu amor incondicional ha sido inseparable, gracias por la paciencia te amo mi cachi. También a mis dos bellos hijos Diego y David cuando lean esto ustedes son lo que me motiva cada día a luchar más y no rendirme nunca, los amo en cada momento dios lo bendiga.

A Waleska Panizzo, mi hija por ayudarme en las primeras etapas de este trabajo, gracias por tu apoyo y mantener viva nuestra amistad.

A la familia Paniz, Alex y José Figueroa he tenido la gran suerte de disfrutar tanto momento significativo gracias por todo su apoyo y consejo.

A Vanesa, Olga Figuera, Jamilet More, Rosa, Denys Lugo, por su apoyo durante mi carrera.

A mi equipo de trabajo Katherine Rosales, Maikel Parra, Kevin Camacho, Cesar Silva, Angyp Betancourt gracias por toda su paciencia en cada momento que me ausente.

A todas esas personas que están a mi lado en cada momento mil gracias a todos

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Página.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>ANTECEDENTES</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	24
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	24
<b>ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	25
<b>METODOLOGÍA</b> .....	27
- <b>Material vegetal</b> .....	27
- <b>Suelos e inóculos</b> .....	28
- <b>Fase de invernadero</b> .....	28
- <b>Determinaciones</b> .....	29
- <b>Análisis estadísticos</b> .....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	36
<b>DISCUSIÓN</b> .....	53
<b>CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	68
<b>ANEXOS</b> .....	85
<b>Anexo 1.</b> Características químicas del suelo del Bosque Macanao, Isla de Margarita.....	
<b>Anexo 2.</b> Listado de especies y morfotipos por especie de la zona de Bosque en la Península de Macanao, isla de Margarita.....	

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página.</b>
Figura 1. Localidad del Bosque seco tropical.....	25
Figura 2. Plántulas de <i>P. pinnatum</i> sembradas en bolsas de 3kg y utilización del inoculo de bosque.....	28
Figura 3. Valores de altura durante el crecimiento de plántulas de <i>P. pinnatum</i> hasta los 240 DDS.....	36
Figura 4. Valores de números de hojas durante el crecimiento de plántulas de <i>P. pinnatum</i> hasta los 240 DDS.....	36
Figura 5. Altura de <i>P. pinnatum</i> a los 120 DDS y 240 DDS.....	37
Figura 6. Números de hojas <i>P. pinnatum</i> a los 120 DDS Y 240 DDS.....	37
Figura 7. Peso seco de <i>P. pinnatum</i> a los 120 DDA y 240 DDS. biomasa foliar, peso seco tallo y peso seco raíz.....	38
Figura 8. Biomasa total y relación VIR de <i>P. pinnatum</i> a los 120 DDS y 240 DDS. ....	39
Figura 9 Planta de <i>P. pinnatum</i> aspectos del crecimiento de la especie en la primera cosecha 120 DDS y segunda cosecha 240 DDS en ambos tratamientos.....	40
Figura 10. Colonización micorrízica en plantas de <i>P. pinnatum</i> a los 120 y 240 DDS.....	43
Figura 11. Aspectos de los vesículas, hifas y arbusculos producidas por los tratamientos inoculados en la raíces de plantas de <i>P. pinnatum</i> .....	44
Figura 12. Números de espores de plantas de <i>P. pinnatum</i> a los 240 DDS.....	46
Figura 13. Contenido de fósforo y nitrógeno foliar en plantas de <i>P. pinnatum</i> a los 120 DDS y 240 DDS. ....	49
Figura 14. Tasa de crecimiento relativo en plantas de <i>P. pinnatum</i> en suelo de bosque..	50

Figura15. Actividad enzimática de la fosfatasa acida y alcalina en plantas de *P. pinnatum*  
a los 120 DDS Y 240 DDS.....51

### ÍNDICE DE TABLA

	<b>Página.</b>
Tabla 1. Condiciones de inoculación en suelos de bosques no estéril.....	28
Tabla 2. Valores de longitud radical y longitud especificas en plantas inoculadas.....	43

## RESUMEN

La extracción de arena en minas a cielo abierto en la península de Macanao (Isla de Margarita, Estado Nueva Esparta, Venezuela) es considerado un tipo de perturbación severa donde los procesos de regeneración natural se ven severamente afectados, debido a la remoción total de las capas superficiales del suelo (eliminación del banco semillas, fragmentos de raíces y microorganismos del suelo), aunado a periodos de sequía prolongados que pueden afectar drásticamente el establecimiento de plántulas. En los bosques secos, existe una alta proporción de especies pertenecientes a la familia leguminosas entre las cuales *Platymiscium pinnatum* habita en la zona de bosque seco de Macanao. El creciente deterioro de la biodiversidad producto de este tipo de perturbación, ha generado en las últimas décadas, investigaciones orientadas al estudio de las especies vegetales desde el punto de vista de sus características ecofisiológicas y sus asociaciones simbióticas, de manera de generar información básica sobre los factores bióticos y abióticos que podrían estar afectando el establecimiento y crecimiento de las especies vegetales en ambientes perturbados. En este sentido, y como parte de este estudio, las micorrizas arbusculares (MA) podrían estar jugando un papel importante en los procesos de recuperación natural o asistida; no sólo porque el 90 % de las especies vegetales se encuentran asociadas a éstas, sino por ser parte importante de los mecanismos naturales de reciclaje de nutrientes en los suelos. Actualmente, el uso de inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), ha tomado una relevancia especial en el desarrollo de protocolos de inoculación, como herramienta importante en los estudios orientados a recuperación de áreas degradadas. El objetivo de este trabajo fue validar la eficiencia de inóculo de HMA nativo, a través de la evaluación de la actividad de las enzimas involucradas con el metabolismo de fósforo (fosfatasa ácida y alcalina) y relacionar esta actividad con la respuesta de crecimiento y contenidos foliar de fósforo y nitrógeno en *P. pinnatum*. En el ensayo fue realizado bajo condiciones de invernadero, la inoculación favoreció el

crecimiento de esta especie, siendo la altura, y la acumulación de biomasa, significativamente mayores en plantas inoculadas con HMA proveniente del suelo nativo del bosque, con respecto a las plantas cultivadas en el suelo de bosque sin inocular (control). Los resultados obtenidos durante 4 y 8 meses del ensayo demostraron que el uso de inóculos nativos de HMA del bosque seco incrementó la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina, evidenciando la existencia de una colonización funcional y el mejoramiento en la incorporación de P a las plantas, lo que podría constituir una estrategia favorable para incrementar el crecimiento de *Platymiscium pinnatum*, y representar un factor determinante en su posterior establecimiento en localidades perturbadas por la actividad minera.

## INTRODUCCIÓN

Los bosques secos tropicales representan el 50 % de las áreas boscosas de Centroamérica y un 22 % en Sur América, y se considera que en la actualidad sólo un 2 % de la extensión original de estos ecosistemas en el Neotrópico, con grandes áreas fragmentadas y bajo la presión constante de desarrollos urbanísticos, explotación maderable y actividad agropecuaria (Murphy & Lugo, 1986, Fajardo *et al.*, 2005).

En Venezuela, los bosques secos ocupan cerca de 50.000 km<sup>2</sup> del territorio. Constituyen comunidades de árboles que crecen en climas cálidos con una pronunciada estacionalidad de lluvia presentando de 2 a 6 meses de sequía cada año. Son categorizados como bosques deciduos, que incluyen comunidades arbóreas con cierto grado de caducifolia (Huber & Alarcón, 1988; Olivares & Medina, 1992; González, 2003).

En Venezuela las continuas perturbaciones antrópicas de los bosques secos y la vegetación asociada ha producido que extensas áreas, sean consideradas en la categoría de riesgo de eliminación más alta (en peligro o en peligro crítico), según los criterios establecidos en el Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela (Oliveira - Miranda *et al.*, 2010). En la Península de Macanao, ubicada al oeste de la Isla de Margarita, la explotación de minas de arena a cielo abierto se ha llevado a cabo durante cinco décadas (Sanz, 2004). Este tipo de perturbación, implica el movimiento de la superficie del suelo;



lo cual ha alterado radicalmente la matriz suelo-vegetación, tanto en el sector norte como en el sector sur de la península (González, 2007).

La vegetación predominante en la isla, es de matorrales xerofitos, que representan la principal comunidad de plantas (González, 2007). Muchos 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 (González, 2007).

La amenaza sobre estos bosques, ha generado un impacto directo a un gran número de especies nativas de la zona de Macanao, entre las cuales tenemos a *Platymiscium pinnatum* (Jacq.) Dugand, de la familia Leguminosae que se encuentra en comunidades más complejas como bosques y matorrales maduros. Es importante señalar, que en esta zona de estudio, las leguminosas constituyen el grupo de plantas más numeroso en términos de especies (21 especies) (Fajardo, 2005).

La presencia de la simbiosis tripartita (rizobios y micorriza) en especies nativas utilizadas como promisorias en los procesos de recuperación de áreas perturbadas, reviste una gran importancia, debido a que después de las perturbaciones, los suelos pueden presentar deficiencias de nutrientes tan importantes, como el fósforo y el nitrógeno y esta simbiosis incrementaría la entrada de N y P al sistema (Barea, 2013).

Estudios realizados en diferentes localidades sucesionales de la península después de la perturbación, señalan la disminución en algunas características químicas de los suelos, en especial de P y N (Kalinhoff, 2012) aunado esto, a los prolongados períodos de sequía, que afectan la disponibilidad de nutrientes, especialmente de aquellos que son poco móviles en los suelos, como es el P.

En ecosistemas naturales, las perturbación es pueden generar desequilibrios transitorios que afectan la capacidad de regeneración de éstos. Es por ello, que los planes de recuperación de áreas degradadas se han postulado como una alternativa viable para enfrentar este problema; donde la selección de las especies vegetales a utilizar y las características del área a recuperar deben ser evaluadas. Dentro de los puntos importantes a estudiar después de una perturbación se encuentran los microorganismos del suelo, los cuales tiene un papel primordial en el ciclaje de nutrientes, que permiten la incorporación de nutrientes como el P y N entre otros, específicamente nos referiremos a los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA).

Los HMA pertenecen al *phylum* Glomeromycota forman micorrizas arbusculares (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 arbusculos y las vesículas (Álvarez & Peña, 2009). Los arbusculos son

estructuras intrincadas y ramificadas que se forman a partir de ramificaciones dicotómicas de las hifas y funcionan como sitios de transferencia de carbono, agua y minerales entre el hongo y la planta hospedera (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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ ), 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 *et al.*, 2010), y aumentan su sobrevivencia bajo condiciones abióticas estresantes, como el déficit hídrico (Augé, 2001; Caravaca *et al.*, 2003; Porcel & Ruiz-Lozano, 2004).

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 hospederas 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).

La contribución de las MA en el mejoramiento de la nutrición de elementos como el P está relacionada con los mecanismos de incorporación de P desde el suelo hasta la planta hospedera asociado a la presencia de enzimas que

incrementen la absorción del mismo ó su intervención en los procesos metabólicos del P dentro de la planta. Durante los procesos de transporte del P a la planta hospedera, se ha encontrado que gran parte del fósforo inorgánico que entra a las hifas durante el proceso de absorción desde la solución del suelo es acumulado en vacuolas y transformado en polifosfatos por las *polifosfato quinatas*. El polifosfato puede representar entre el 16% y el 40% del P total en la MA. Estos gránulos de polifosfato, una vez que llegan al arbúsculo son degradados mediante polifosfatasas, liberándose de nuevo Pi para ser transportado a la planta (Gianinazzi – Pearson *et al.*, 1986, 1991). Las evidencias muestran que existen variaciones, en la actividad de enzimas polifosfatasas entre las hifas extraradicales e intraradicales dependiendo del HMA utilizado (Esawa *et al.*, 2001, Tarafdar & Clarseen, 1988; Smith & Read, 1997).

Experimentos llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que las MA por medio de las hifas externas que se desarrollan en el suelo a partir de la raíz colonizada, pueden absorber fosfato soluble y transportarlo a través de distancias relativamente largas a los tejidos de la raíz (Abbott & Robson, 1985). El micelio externo, del hongo profusamente ramificado, incrementa el número de sitios de absorción de P que permite a la raíz explorar un volumen de suelo mucho mayor, además hay que considerar que el diámetro de las raíces o pelos radicales es mayor de 10  $\mu\text{m}$  comparado con el de las hifas que es 2-4  $\mu\text{m}$ . Este menor diámetro incrementa el área superficial de las hifas y en segundo lugar permite la entrada en los poros del suelo y la materia orgánica que los pelos radicales no lo logran por tener un mayor diámetro (Jakobsen & Rosendahl, 1990).

La proporción de P en suelos naturales, si bien varía ampliamente, es por lo general bajo. Se señala que los niveles de fosfatos disponibles totales en suelos, escasamente sobrepasa el 0,6 % (Marschner, 1995). El P en el suelo puede encontrarse tanto en forma inorgánica ( $P_i$ ) como orgánica ( $P_o$ ). Aunque en la solución del suelo el fósforo inorgánico ( $P_i$ ) constituye sólo una pequeña proporción del fósforo total (<1%), las plantas derivan la mayoría de sus requerimientos de esta fuente. Gran parte del  $P_i$  liberado es adsorbido en las superficies del suelo o precipitado formando fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos y como fosfatos de calcio y magnesio en suelos calcáreos, constituyendo la fracción del P no disponible (Bolan, 1991). La distribución relativa y la disponibilidad de estas formas dependen principalmente del pH del suelo (Marschner, 1995). Cambios en el pH de la rizósfera poseen un papel importante en modificar la disponibilidad de las diferentes formas de P, la producción de agentes quelantes tales como aniones orgánicos (citrato y oxalato) pueden incrementar la disponibilidad de P a partir de fuentes no disponibles (Tarafdar & Marschner, 1994). Por otro lado, las formas orgánicas de fósforo se presentan como fósforo soluble en la solución del suelo y como formas insolubles adsorbidas en las partículas del suelo o como componentes de la materia orgánica. Aunque más de 30 compuestos orgánicos de P han sido aislados de los suelos, el inósitol fosfato, fosfolípidos y ácidos nucleicos son los compuestos predominantes (Dalal, 1977). El fósforo orgánico representa del 30 al 80 % del fósforo total, y se considera que no es disponible para las plantas a menos que

sea mineralizado por enzimas que tienen su origen en los microorganismos o las raíces de las plantas (Bolan, 1991).

La mineralización del fósforo es un proceso enzimático mediado por las fosfatasas (Eivazi & Tabatabai, 1977), las cuales catalizan la hidrólisis de enlace éster C-O- P característico de los compuestos orgánicos. Estas enzimas son inducibles y se producen predominantemente bajo condiciones de baja disponibilidad de P. Las fosfatasas han sido clasificadas en alcalinas y ácidas de acuerdo a su pH óptimo en la reacción de hidrólisis que llevan a cabo por debajo o por encima de pH 7. Las fosfatasas alcalinas (**FAI**) son secretadas principalmente por bacterias, mientras que las fosfatasas ácidas (**FA**) son secretadas tanto por bacterias, como por hongos saprofitos y micorrizas. Igualmente las fosfatasas son ubicuas en las plantas y se encuentran localizadas principalmente en el citoplasma y vacuolas mientras que la denominadas extracelulares se encuentran localizadas en las superficies externas de las raíces especialmente en su zona apical, estando asociadas a la hidrólisis y movilización de  $P_i$  a partir de fosfatos orgánicos (Marschner, 1995; Dracup *et al.*, 1984; Duff *et al.*, 1991).

Las fosfatasas alcalinas de las plantas por lo general muestran especificidad de sustrato mientras que las ácidas normalmente no exhiben una especificidad absoluta de sustrato. (Tarafdar & Marschner, 1994). Se han señalado dos categorías de **FA** que pueden ser separadas, sobre la base de la especificidad relativa de sustrato que está presente en los procesos de hidrólisis, transporte y reciclaje de  $P_i$ . Dado que es conocido el hecho de que las

superficies radicales de muchas plantas acidifican la rizósfera, las **FA** (más que las alcalinas) se encuentren en esta región (Eivazi & Tabatabai, 1977).

El papel de la actividad enzimática en el control bioquímico del metabolismo del fosfato en las MA es aún materia de especulación; sin embargo, las evidencias muestran la acción de varias enzimas en los procesos de nutrición de P. Se ha encontrado actividad de la fosfatasa alcalina dentro de las vacuolas de las hifas que acumulan fosfatos, y particularmente alrededor del tonoplasto del hongo, mientras que la actividad de la fosfatasa ácida se ha encontrado en el citoplasma de las células radicales y en los extremos de las hifas externas del hongo. Su función dentro de las células de la raíz está asociada a la hidrólisis de los polifosfatos a formas Pi para su transferencia a la planta a través del arbusculo. Se sugiere que su función en el micelio externo puede estar asociada a la incorporación de P en la rizósfera (Gianinazzi -Pearson *et al.*, 1986,1991; Fries *et al.*, 1998; Tarafdar & Marschener, 1994).

Las evidencias del papel de las enzimas fosfatasas en el metabolismo de P en las plantas colonizadas, provienen de ensayos de separación y caracterización mediante métodos de electroforesis e inmunocitoquímicos, los cuales han permitido evidenciar que la actividad de las fosfatasas en plantas micorrizadas es muy baja durante las primeras etapas del establecimiento de la colonización, y se encuentra limitada a los ápices de las hifas en desarrollo. Posteriormente, a medida que el micelio prolifera dentro de los tejidos radicales, se han observado incrementos en la actividad de las enzimas fosfatasas que coinciden con el estímulo de crecimiento observado en algunas plantas

(Gianinazzi – Pearson & Gianinazzi, 1979, Esawa *et al.*, 1995, Kojima *et al.*, 1998, Tisserant *et al.*, 1993, 1967, Fries *et al.*, 1998, Cáceres, 2002).

Se ha puesto un gran interés en evidenciar la presencia y posible participación de las fosfatasas en la utilización del P orgánico por parte de las MA. Las evidencias presentadas hasta ahora del papel de las MA en la hidrólisis de P orgánico han sido muy discutidas, sin embargo estudios recientes de Joner & Johansen (2000) demostraron, en dos especies de HMA, que la actividad fosfatásica en las hifas extraradicales representaba más del 70 % de la actividad total de actividad la enzimática evaluada, además las fosfatasas producidas por las hifas externas podían hidrolizar ésteres de fosfato y utilizarlos como fuentes de P disponible. Por otro lado, Koide & Kabir (2000) presentaron evidencias muy importantes en un trabajo realizado con cultivos de Ri –T- ADN transformados de *Daucus carota L*, colonizadas con *Glomus sp*. Los autores señalan que las hifas del hongo son capaces de hidrolizar fuentes orgánicas de P y transferir cantidades significantes de P a las raíces cuando el fitato es la fuente principal de P, en ausencia total de microorganismos. Estudios más recientes, realizados por Aono *et al.*, (2004) han demostrado que las **FAL** se expresa en condiciones simbióticas y debe entonces tener un papel importante en el intercambio de nutriente con la planta hospedera más que en la incorporación de éste en la rizósfera, lo que confirma la hipótesis de la importancia de las **FAL** envueltas en la transferencia de fosfato del hongo a la planta nivel de los arbusculos. Otro importante hallazgo, está relacionado con la adición de P en plantas inoculadas y su efecto en el metabolismo o expresión de las enzimas, se encontró que independiente del P



agregado, no se ve afectada la actividad de las enzimas, en particular las *FAL* (Van Aarle *et al.*, 2002).

En zonas tropicales, donde los suelos después de las perturbaciones, sufren cambios drásticos en sus parámetros fisicoquímicos especialmente encuentra elementos importantes como el fósforo, y adicionalmente sufren prolongados periodos de sequía, la influencia de factores bióticos, como las micorrizas podrían desempeñar un papel fundamental en la incorporación de P (Guerrero, 1996). Por consiguiente el manejo de las micorrizas es una valiosa estrategia en la restauración de suelos degradados en las zonas tropicales ya que permite aumentar la sobrevivencia y establecimiento de las plantas nativas (Kalinhoff, 2012).

## ANTECEDENTES

El papel 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 plántulas en localidades perturbadas a menudo depende de las diferentes especies de HMA con la que se encuentren asociadas y de la capacidad de las plántulas para incorporar rápidamente nutrientes durante su establecimiento (Amaranthus & Perry, 1987; Perry & Molina, 1987; Van den Driessche, 1991; Kalinhoff, 2012)

Una vez son abandonadas las área de extracción de arena, el daño producido en la vegetación y los suelos, no permite en muchos casos restablecer los mecanismos de recuperación natural, 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 (Uhl, 1987). En consecuencia, es probable que la intervención humana sea necesaria para acelerar los procesos de regeneración y reconstrucción de estas comunidades vegetales (Fajardo *et al.*, 2007, 2011).

La explotación de suelo y el deterioro a los bosques secos de la región de la península de Macanao – Isla de Margarita ha ocasionado daños a gran número de especies vegetales que se localizan en esta zona, es por ello que el estudio de

los atributos fisiológicos y ecológicos de las especies que conforman estos bosques se hace prioritario. Los procesos de perturbación podrían incidir sobre los mecanismos naturales de regeneración, y esto va a depender de la intensidad y del tiempo que perdure la perturbación, así como de los diferentes factores ambientales que afectan los procesos de regeneración natural. En este sentido, pocos son los trabajos realizados en bosques secos tropicales en Venezuela (Fajardo *et al.*, 2011) en los cuales se considere realizar una restauración ecológica asistida. Una parte importante de los programas orientados al establecimiento de las especies vegetales promisorias en los procesos de recuperación de áreas degradadas, sería hacerlo en conjunción con sus microorganismos asociados. En este sentido, en los últimos años una alternativa importante ha sido la inoculación con HMA nativos y especies vegetales promisorias que cumplan con ciertos atributos que asegure el éxito de éstas en la recuperación del áreas perturbadas (Kalinhoff, 2012; Cáceres, 2012).

Entre las principales alternativas de inoculación con HMA se encuentra el uso de inóculos nativos, adaptados al clima local y a las condiciones del suelo. En la actualidad se reconoce la importancia del uso de inoculo nativos mixtos (que contengan tres o más especies de HMA) en ensayos de restauración de áreas degradadas, tanto por su mayor adaptación a las condiciones imperantes en el ecosistema, como por la mayor diversidad de respuestas potenciales que varias especies de HMA pueden ejercer sobre una planta hospedera (Barea *et al.*, 2011; Allen *et al.*, 2005; Kalinhoff, 2012).

Los HMA pueden variar su efecto sobre las plantas hospederas en un gradiente de mutualismo-parasitismo que estará básicamente determinado por el balance costo-beneficio en el mantenimiento de la simbiosis, es por ello que durante el establecimiento de ensayos orientados a evaluar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento de las plantas es importante considerar factores como la mayor compatibilidad funcional evaluada a través de una mayor producción de biomasa y una alta sobrevivencia en campo. Por lo tanto, en el momento de establecer los ensayos de inoculación, el éxito de un inóculo determinado de HMA dependerá no sólo de la combinación planta-hongo, sino también de las condiciones ambientales. Particularmente, el suelo impone una fuerte presión de selección sobre la respuesta de la planta a la simbiosis (Helgason & Fitter, 2009), por lo que es necesario evaluar previamente la efectividad de la inoculación en el o los sustratos en los cuales la planta inoculada será introducida (Herrera-Peraza *et al.*, 2010; Kalinhoff, 2012).

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. Entre estos mecanismos se pueden señalar de manera sucinta la protección ante estrés oxidativo, la regulación de la conductancia estomática, el incremento en la conductancia hidráulica radical, el mejoramiento de la eficiencia de uso de agua y un mayor ajuste osmótico (Wu & Xia, 2006; Augé *et al.*, 2007; Goicoechea *et al.*, 2005; Kalinhoff, 2012). Estos mecanismos podrían resultar importantes si tomamos en cuenta la preponderancia de la simbiosis en esta zona donde el déficit de

nutrientes, especialmente de P, no es limitante en el establecimiento de las especies vegetales (Kalinhoff, 2012).

Ante esta alternativa del uso de los HMA autóctonos como herramienta sustancial en los procesos de restauración de áreas degradadas, es importante evaluar la eficiencia de estos inóculos en cuanto a su capacidad de producir crecimiento y mayor incorporación de nutrientes importantes como el P y N, los cuales tendrán una incidencia en el estatus nutricional y la consiguiente mejora en los procesos fotosintéticos de las plantas.

Las relaciones que existen entre el estado nutricional de las plantas y la actividad de las fosfatasas han sido ampliamente estudiadas. Dracup *et al.*, (1984) evaluaron en *Trifolium subterraneum* un incremento en la actividad fosfatásica de 1,5 veces en plantas cultivadas bajo niveles deficientes de fósforo al compararlas con plantas cultivadas con un adecuado suministro de fósforo. Similarmente se encuentra en la literatura una amplia gama de estudios realizados en plantas de cultivo en las cuales el incremento en la actividad de las FA está relacionado con las deficiencias de P en los suelos (Tarafdar & Jungk, 1987; Tadano *et al.*, 1993).

En muchos casos se ha encontrado que la actividad de las fosfatasas disminuye en condiciones en las cuales el estímulo de crecimiento producido por el hongo se ve afectado por la fertilización con P (Tadano & SaKai, 1993; Tadano *et al.*, 1993); sin embargo, en algunos casos la fertilización con P no afecta la expresión en la actividad de las enzimas responsables del metabolismo del P en plantas micorrizadas (Aono *et al.*, 2004).

La caracterización bioquímica y la utilización de métodos histoquímicos para evaluar las enzimas fosfatasas han permitido presentar evidencias que confirman plenamente la presencia de bandas específicas de actividad fosfatásica en hifas intraradicales y extraradicales de HMA (Kojima *et al.*, 1998; Esawa *et al.*, 2001).

Trabajos realizados por Cáceres (2002) y Mora & Cáceres (datos no publicados) mostraron que plántulas de especies arbóreas presentaban una relación positiva entre el incremento de la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina y la respuesta de crecimiento de las especies. Otros trabajos, muestran resultados similares en *Carica papaya* e *Ipomea carnea sp fistulosa* en cuanto al incremento en la actividad de las enzimas fosfatasas en plantas inoculadas (Alarcón *et al.*, 2002; Amaya *et al.*, 2009); sin embargo, es importante señalar, que son pocas las referencias que mencionen la relación entre la actividad enzimática y la inoculación con HMA.

El uso de indicadores biológicos representa hoy en día una herramienta primordial en estudios que consideren la evaluación de la respuesta de crecimiento de plantas inoculadas ya que permite validar la eficiencia de los hongos en los procesos de crecimiento e incorporación de P de los inóculos utilizados.

## HIPÓTESIS

*Platymiscium pinnatum* es una especie arbórea que se encuentra ampliamente distribuida en bosques secos tropicales. Considerando que el periodo de establecimiento de las plántulas en sistemas naturales es una de las etapas más críticas en la supervivencia de las especies, entonces la eficiencia en la absorción de nutrientes del suelo a través del uso de prácticas de inoculación con HMA, podría favorecer el establecimiento y sobrevivencia de plántulas sobretodo en ecosistemas que presentan periodos prolongados de sequía, donde la disponibilidad de nutrientes (específicamente de P) podría ser limitante. Partiendo de esta premisa se espera:

- a) Que el uso de inóculo mixto nativo produzca una respuesta de crecimiento mayor que en las plantas cultivadas en su suelo natural.
- b) Que la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del P en la simbiosis hongo-planta (fosfatasa ácida y alcalina) se relacione con la respuesta de crecimiento de la especie y los contenidos de P foliar.

Para comprobar ésta hipótesis se propone el siguiente objetivo general:

## **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo del fósforo en raíces de plántulas de la especie arbórea *Platymiscium pinnatum*, inoculada con HMA nativos del bosque seco tropical de la Península de Macanao y relacionarlo con los parámetros de crecimiento.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- a) Evaluar la colonización con HMA de plántulas de *Platymiscium pinnatum* a lo largo de un período de crecimiento de 8 meses.
- b) Evaluar los parámetros de crecimiento (altura, número de hojas, biomasa de los diferentes compartimientos (raíz-tallo-hoja) en dos cosechas.
- c) Caracterizar el inóculo de hongos Micorrízicos arbusculares nativos desde el punto de vista de número de esporas y morfotipos.
- d) Determinar la viabilidad de la colonización, el papel de los mecanismos de transporte de P a través de métodos enzimáticos (fosfatasa ácida y alcalina), así como la relación entre la actividad enzimática de las fosfatasas y la respuesta de crecimiento de las plántulas.
- e) Evaluar los contenidos de fósforo y nitrógeno foliar.



## 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 del istmo donde se localiza el Parque Nacional de la Laguna La Restinga.

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



e  $\leq 1$  y  $\geq 20$  años de antigüedad, zonas raras hasta comunidades. Está limitada principalmente por un periodo de sequía, producido por la región (Fajardo, 2007).

ula de Macanao corresponde al

ecosistema de referencia de este trabajo, y se caracteriza por presentar comunidades vegetales de árboles hasta los cinco o seis metros y el dosel de los árboles más grandes, superando a veces los treinta metros de alto. En estas zonas de Macanao se encuentran especies como *Lonchocarpus sp* (Fabaceae), *Beureria cumanensis* (Boraginaceae), *Subpilocereus repandus*, *Acanthocereus tetragonus*, *Stenocereus griceus* (Cactaceae).

**Figura 1.** Bosques secos tropicales de la península de Macanao.

## METODOLOGÍA

Este proyecto fue llevado a cabo bajo condiciones de invernadero en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas Silvestres ubicado en el Instituto de Biología Experimental (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%.

### **Material vegetal:**

*Platymiscium pinnatum* (Jacq.) Dugand, (Fabaceae) se distribuye desde Centroamérica hasta norte de Sudamérica (Hoyos, 1985). En Venezuela crece en lomas o áreas bien drenadas, con pendientes no superiores a 30 % y una precipitación muy baja. Se ha reportado su distribución para los estados Monagas, Nueva Esparta, Sucre y Zulia. Presenta un crecimiento muy lento en los primeros años. Sus flores fragrantas de color amarillentas de 1 a 1,5 cm de largo son producidas en febrero y marzo mientras que sus frutos son producidos en septiembre. Posee una madera dura y muy pesada, presenta una variedad de color entre pardo-rojizo, con líneas rojas y negras atractivas (Hoyos 1985). Su madera se considera una de las más finas en término de comercialización, se utiliza en la fabricación de muebles, pisos y artesanía, por su facilidad para trabajarla.

Entre sus características se destacan: Árbol autóctono, hasta 20 metros de alto. Hojas opuestas, compuestas, imparipinnadas, con 3 a 5 folíolos de más de 6 cm de largo, por 2 a 10 cm de ancho. Flores amarillas, agrupadas en racimos de 7

a 10 cm de largo, amariposadas. Suelen aparecer de marzo a junio; exhalan un aroma muy oloroso y agradable. Fruto una leguminosa elíptica, redondeada en ambos extremos, de unos 9 cm de largo por unos 3 cm de ancho (Hoyos, 1985).

**Suelos e inóculos:**

En macetas con suelo fresco del bosque seco, se cultivaron plantas de *Vigna luteola*, leguminosa herbácea altamente micotrófica (Hernández *et al.*, 2000), para obtener cultivos mixtos de HMA (“potes trampa”) (Bever, 1994). Luego de seis meses de cultivo se eliminó la parte aérea de las plantas se suspendió el riego y se conservaron las raíces y el suelo como parte del inóculo. La mezcla de suelo, raíces colonizadas y esporas de HMA, obtenida en cada tipo de suelo fue utilizada como inóculos de HMA.

**Diseño experimental**

Las condiciones de inoculación fueron las siguientes:

Factor inóculo	SUELO
	SUELO DE BOSQUE (BOSQ)
Control sin micorrizas (Control no estéril, suelo bosque nativo )	BOSQ- C
Inóculo de bosque (IB)	BOSQ-IB

Tabla 1. Condiciones de inoculación en suelos de bosques no estéril



viamente germinadas) fueron sembradas en bolsas de 3 L  
co, a los cuales se les añadieron 100 gr. del inóculo de  
nte al tratamiento indicado (Figura 2).



**Figura 2.** Plántulas de *P. pinnatum* sembradas en bolsas, cultivadas bajo condiciones de invernadero (lado izquierdo). Utilización del inóculo de bosque (lado derecho).

Se realizaron dos cosechas de 10 réplicas por tratamientos a los 120 y 240 días después de la siembra (DDS) (8 meses de crecimiento).

**Determinaciones:**

**Altura:** Se utilizó una cinta métrica para medir altura.

**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, hasta alcanzar peso constante.

**Longitud radical:** Se determinó a través del programa computarizado WinRHIZO Pro v 2003b, disponible en el Laboratorio de Ecología de Suelos del Centro de Ecología del IVIC.

**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):

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

PS<sub>1</sub> = Peso seco en la primera cosecha.

PS<sub>2</sub> = Peso seco en la segunda cosecha.

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

**Índice de respuesta Micorrízica (IRM):** El índice de respuesta micorrízica se define como el grado en el cual una planta se beneficia de la inoculación con el HMA y se determina como:

$$IRM = PS(M) - PS(NM) / PS(M) \times 100$$

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

### ***Aislamiento y conteo de esporas de HMA:***

Las esporas se aislaron a partir de 50 g de suelo en los pots de siembra y en condiciones naturales (por triplicado), según el método de tamizado húmedo, decantado y centrifugación en sacarosa (Sieverding, 1991). Se contaron únicamente las esporas vivas (enteras y con contenido lipídico) con una lupa estereoscópica (40X). Los resultados se expresaron en N° de esporas 100g<sup>-1</sup> de suelo seco

### ***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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 calentaron en baño de María durante 1 hora. Se lavó el KOH con agua corriente y se acidificaron 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 (arbusculos, 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:

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

NI = Total campos no colonizados 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 Kjeltecssystem 1002 distillingunit-TECATOR. Se agregaron aproximadamente 15 mL de NaOH al 40 % p/v a cada solución para liberar el amoníaco, el mismo fue recolectado en una fiola con 10 mL de ácido bórico para formar el borato diácido por cada mol de amoníaco. 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 H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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 & Riley (1962).

### **Análisis enzimáticos:**

Parámetro de la actividad enzimática de las fosfatasas ácida y alcalina.

Procesamiento de las raíces

Se cosecharon 10 plántulas por tratamiento de *Platymiscium pinnatum*; las raíces se separaron y mantuvieron en hielo. Estas raíces se lavaron con abundante agua corriente y se colocaron durante un minuto en un sonicador de manera que desprendan las partículas de suelo adheridas a la superficie radical y evitar la contaminación que podría producirse con las enzimas del suelo (Tabatabai, 1982). Después de lavarlas, se pesaron 100 mg de raíces y se maceraron en frío con 2mL de buffer Borato 0,1 M a pH de 8,8. El macerado obtenido se transfirió a tubos de micro centrifuga para su posterior centrifugación a 48.000\* g durante 20 minutos (Gianinazzi – Pearson & Gianinazzi 1976). Luego se tomó el sobrenadante, y se realizaron de 2 a 3 centrifugaciones durante 20 min a 48.000 \*g hasta obtener un sobrenadante transparente.

### **Análisis cuantitativo de la actividad de las fosfatasas ácida y alcalina:**

El método que fue utilizado en la cuantificación de la actividad de las fosfatasas consistió en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol (pNP) liberado durante la incubación del extracto de raíces con una solución tamponada (pH 4,0 y 8,5) de p-nitrofenilfosfato (pNPP). La estimación del p-nitrofenol liberado

se basó en el hecho que en soluciones alcalinas, el p- nitrofenol muestra un intenso color amarillo (Tabatabai, 1982).

La actividad enzimática se determinó por los siguientes pasos:

Se incubaron a 37°C en un baño de agua circulante por 30 minutos, 50 µL del extracto de raíces con 10 µL de MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 200µL del buffer de reacción (buffer Acetato 0.1 M a pH 4,0 en el caso de la fosfatasa ácida y buffer Tris-ácido cítrico 0.05 M a pH 8,5 en el caso de la fosfatasa alcalina) y 80 µL del substrato pNPP50 mM hasta un volumen final de 400 µL completados con agua desmineralizada. *Todo el procedimiento se realizó en frío.*

La hidrólisis enzimática se detuvo en un tiempo de 30 minutos al adicionar NaOH 0.1N y el color amarillo fue leído en un espectrofotómetro a 410 nm (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi 1976; Thiagarajan & Ahmad, 1994).

***Análisis estadísticos:***

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

## RESULTADOS

El análisis de la dinámica de crecimiento en altura y número de hojas de plantas de *P. pinnatum* a los 240 DDS, se muestran en la figuras 3 y 4 respectivamente. La altura, reflejó un crecimiento significativo a partir de los 90 días. En la primera cosecha realizada a los 120 DDS, la altura de las plantas inoculadas fue de 2,3 veces mayor que las plantas en los tratamientos **NI**; tendencia ésta, que se mantuvo hasta el final del experimento (figura 3). En la figura 4, se observa que a partir de los 60 DDS, el número de hojas incrementó significativamente en el tratamiento inoculado en comparación a las plantas cultivadas en suelo del bosque no inoculado (**NI**); y estas diferencias significativas se mantuvieron hasta los 240 DDS. La pérdida de los cotiledones en esta especie fue a los 30 DDS.

En la figura 5, se muestra la altura alcanzada por las plantas en los tratamientos **I** y **NI** en cada cosecha realizada (120 DDS y 240 DDS). Se observó que en ambas cosechas, las plantas inoculadas (**I**) presentaron valores de altura significativamente mayores en comparación con las plantas no inoculadas (**NI**). Igualmente, el número de hojas presentó la misma tendencia, encontrándose en las plantas **I** el mayor número de hojas, en comparación al tratamiento **NI** (figura 6).

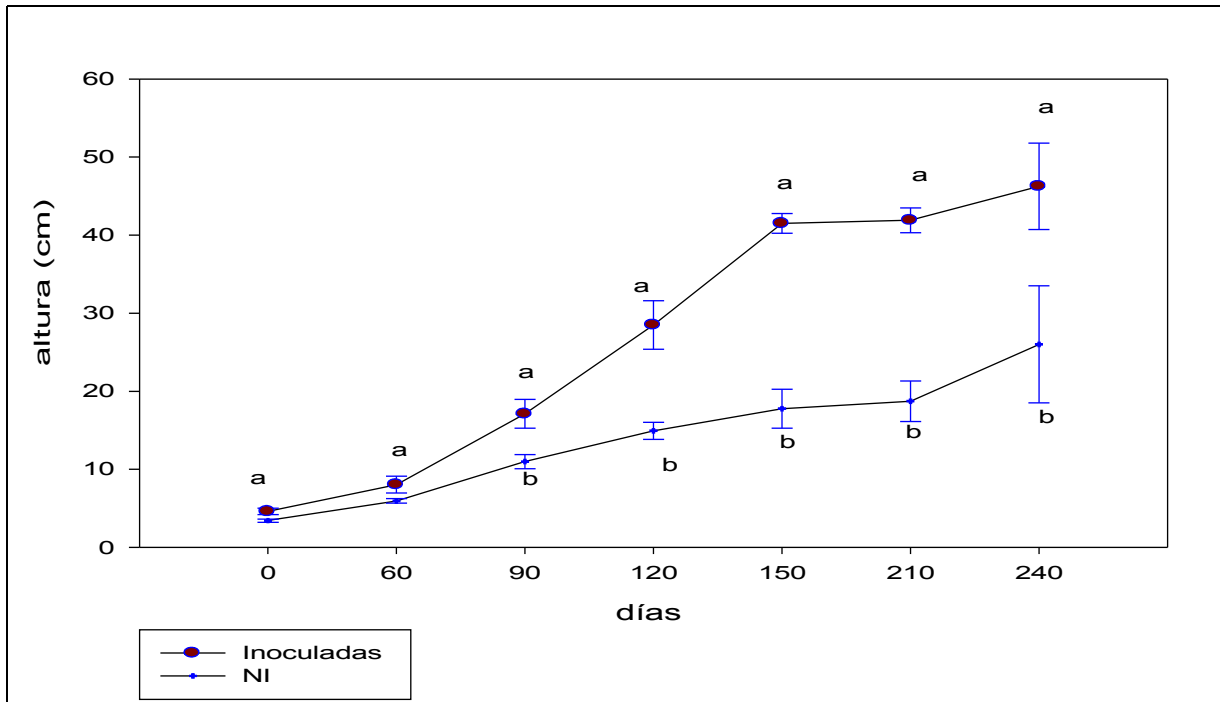
El peso seco de hojas en el tratamiento **I** a los 120 DDS mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento **NI**. La diferencia en el peso seco de la biomasa foliar fue 1,9 veces mayor en plantas inoculadas en comparación al

tratamiento **NI**. Igualmente, en la segunda cosecha (240 DDS), las plantas en el tratamiento **I** presentaron la mayor acumulación de biomasa foliar (figura 7- a).

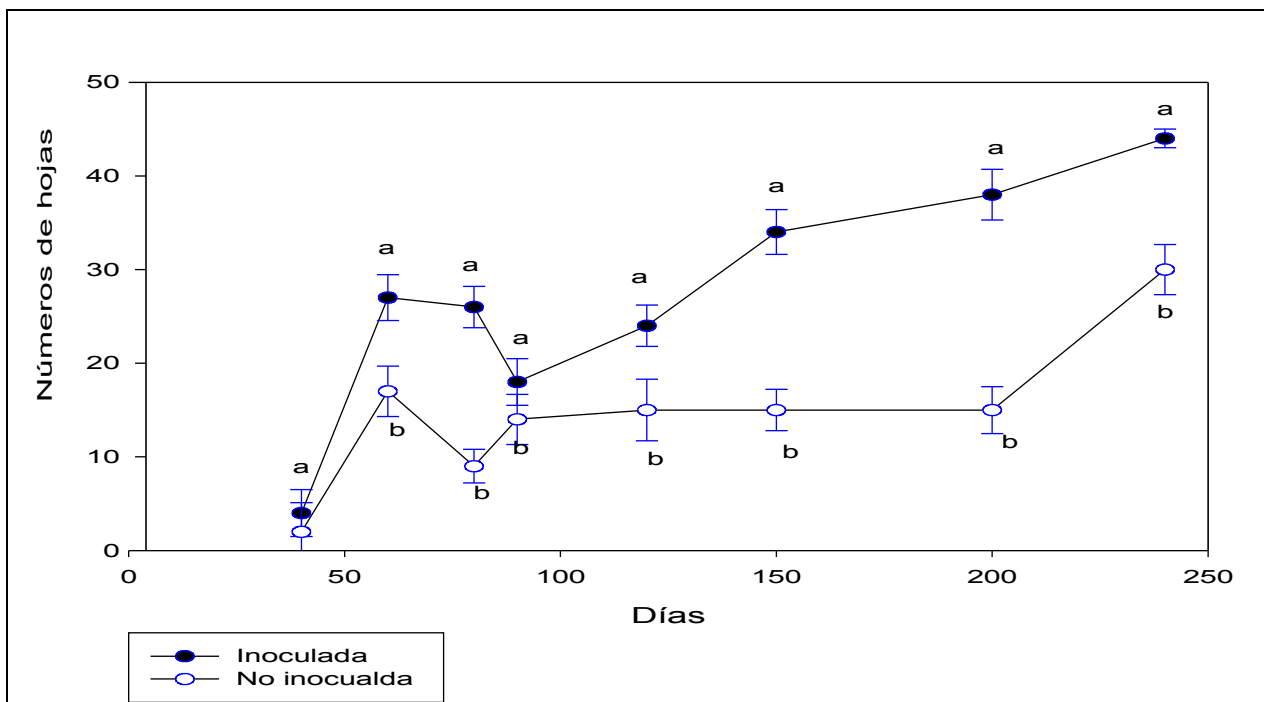
La asignación de biomasa al peso seco del tallo varió significativamente entre tratamientos, siendo 2,2 y 2,1 veces mayor el valor en plantas inoculadas con relación a las **NI** en la primera y segunda cosecha respectivamente (figura 7- b). Similar comportamiento, fue observado en la asignación de biomasa a la producción de raíces, encontrándose que estos valores fueron 2,04 y 1,3 veces mayor en plantas inoculadas en comparación con las plantas en el tratamiento **NI**, en la primera y segunda cosecha respectivamente (figura7-c).

Los valores de biomasa total en el tratamiento inoculado presentaron incrementos significativos en ambas cosechas en comparación a las plantas en el tratamiento **NI** (figura 8 – a), encontrándose que el incremento en biomasa total fue de 1,9 y 1,5 veces mayor en plantas inoculadas que plantas del tratamiento **NI** a los 120 y 240 DDS.

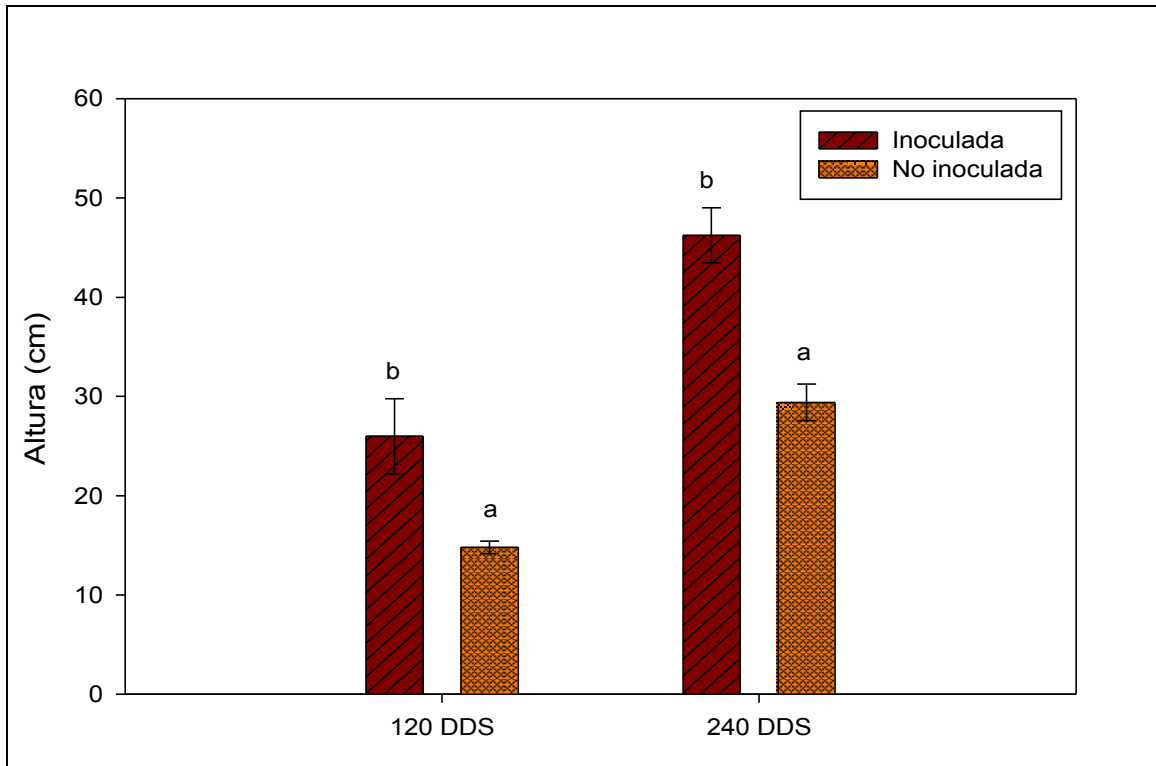
La relación V/R mostró que la asignación de biomasa a los compartimientos hojas –tallos fue significativamente mayor en plantas inoculadas en comparación con las plantas **NI** y este comportamiento se reflejó en ambas cosechas. (Figura 8 – b).



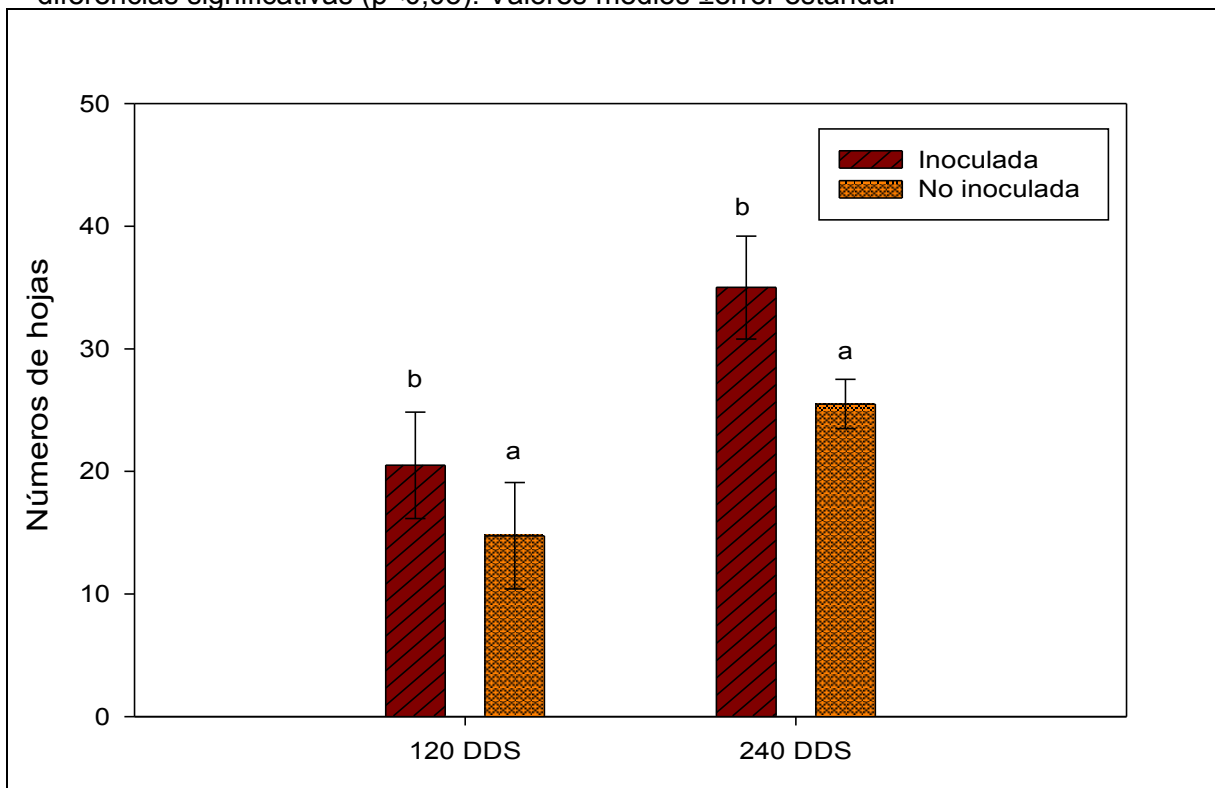
**Figura 3.** Valores de altura durante el crecimiento de plántulas de *P. pinnatum* hasta los 240 DDS. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Valores medios  $\pm$  error estándar.



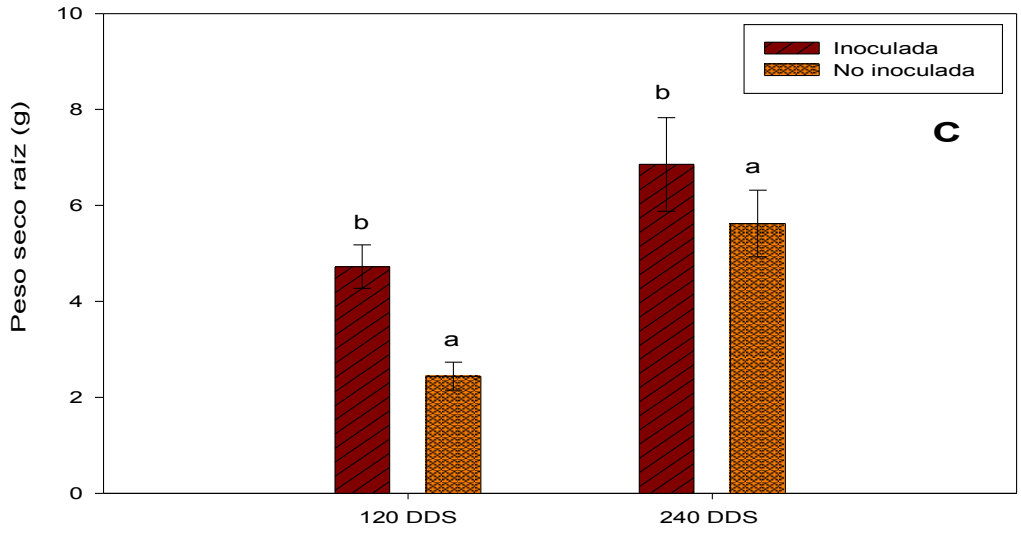
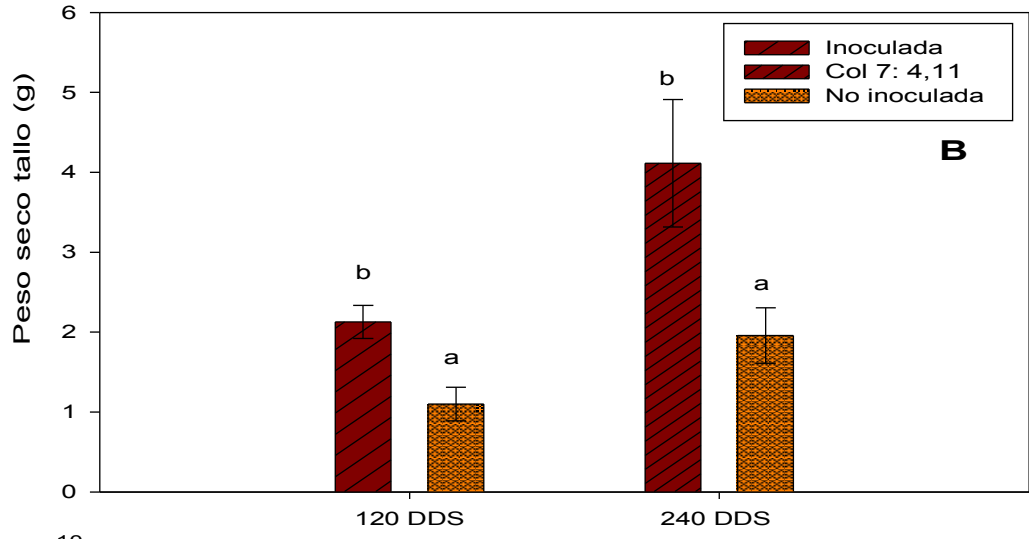
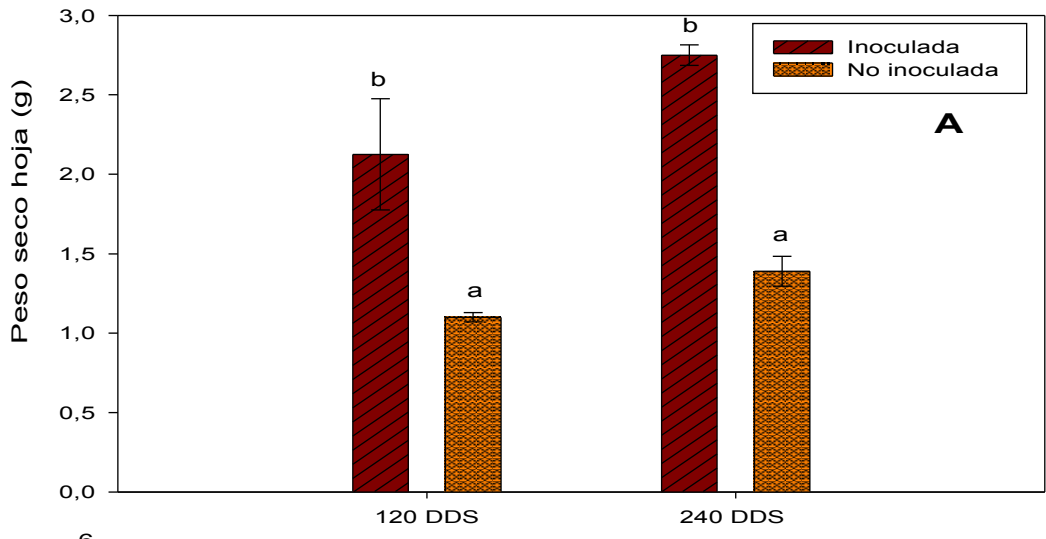
**Figura 4.** Valores de números de hojas durante el crecimiento de plántulas de *P. pinnatum* hasta los 240 DDS. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Altura de *P. pinnatum* a los 120 DDS y 240 DDS. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Valores medios  $\pm$  error estándar



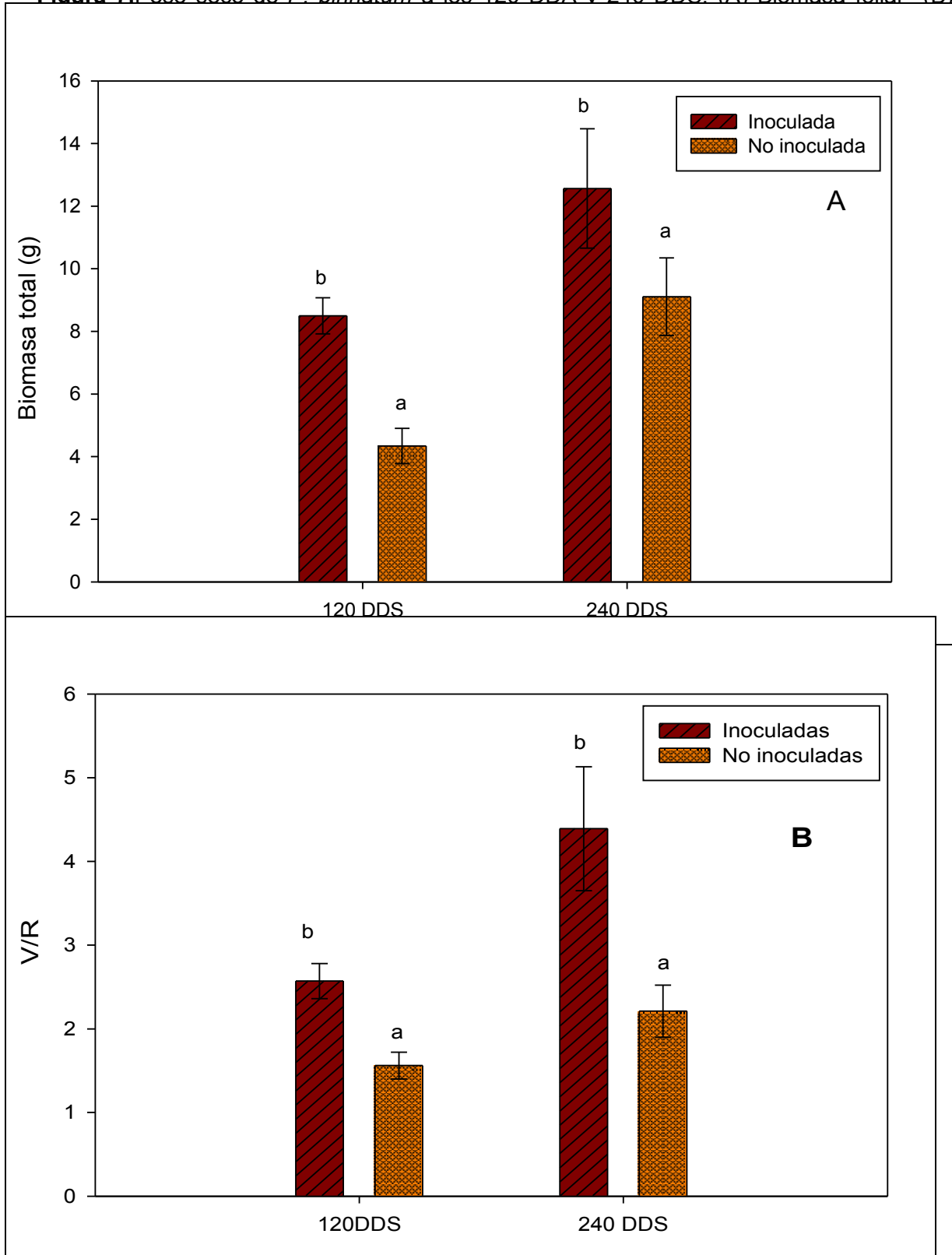
Fi  
inc

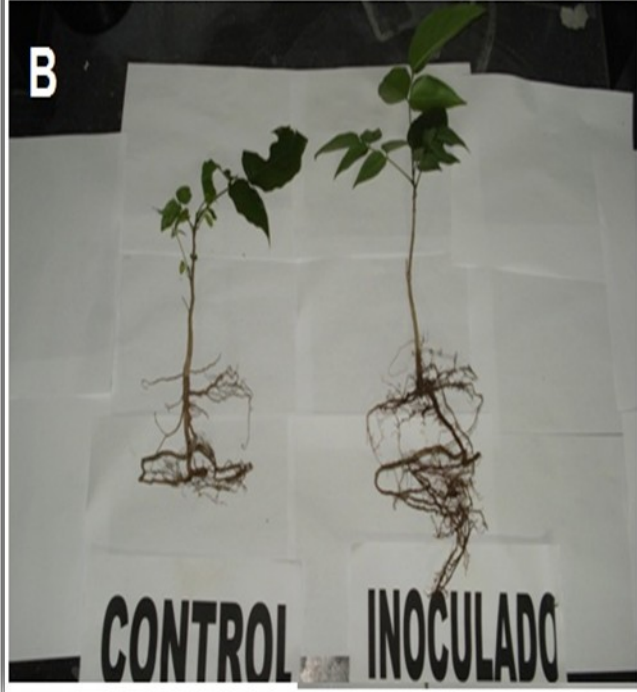
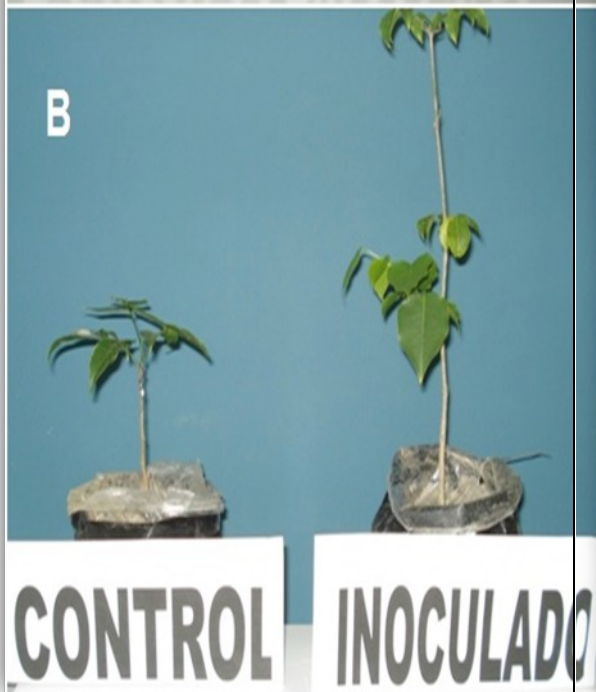


Tratamientos



Figura 7. Peso seco de *P. pinnatum* a los 120 DDS y 240 DDS. (A) Biomasa foliar (B)





**Figura 9.**Planta de *P. pinnatum* aspectos del crecimiento de la especie en la primera cosecha 120 DDS (A) y segunda cosecha 240 DDS (B) en ambos tratamientos: **Control:** suelo no estéril del bosque; **inoculado:** con inóculo nativo del bosque

### Longitud radical y longitud radical específica

En la tabla 2 se muestran los valores de longitud radical (LR) y longitud radical específica (LRE) en plantas inoculadas y no inoculadas.

Los valores de LR fueron significativamente mayores en las plantas de los tratamientos inoculados en ambas cosechas, mientras que la LRE no presentó diferencias significativas entre los tratamientos a los 120 DDS. A los 240 DDS las plantas inoculadas presentaron valores de LRE significativamente mayores

**Tabla 2.** Valores de longitud radical y longitud radical específica en plantas inoculadas. Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,05$ . Valores medios  $\pm$  error estándar

Tratamientos	Longitud radical (cm)		Longitud radical específica (cm/ps raíz)	
	120DDS	240DDS	120DDS	240DDS
<b>Inoculada</b>	400,8 $\pm$ 65b	466,5 $\pm$ 47 b	84,1 $\pm$ 14 a	90,1 $\pm$ 7,0a
<b>No inoculada</b>	248,4 $\pm$ 39 a	356,9 $\pm$ 97 a	101,8 $\pm$ 16 a	63,7 $\pm$ 1,7b

## **Índice de respuesta micorrízica (IRM) y porcentajes de colonización con HMA.**

La contribución de la simbiosis con HMA a la nutrición fosforada de las plantas se evaluó midiendo el grado de respuesta a las MA (IRM) y los porcentajes de colonización de las raíces.

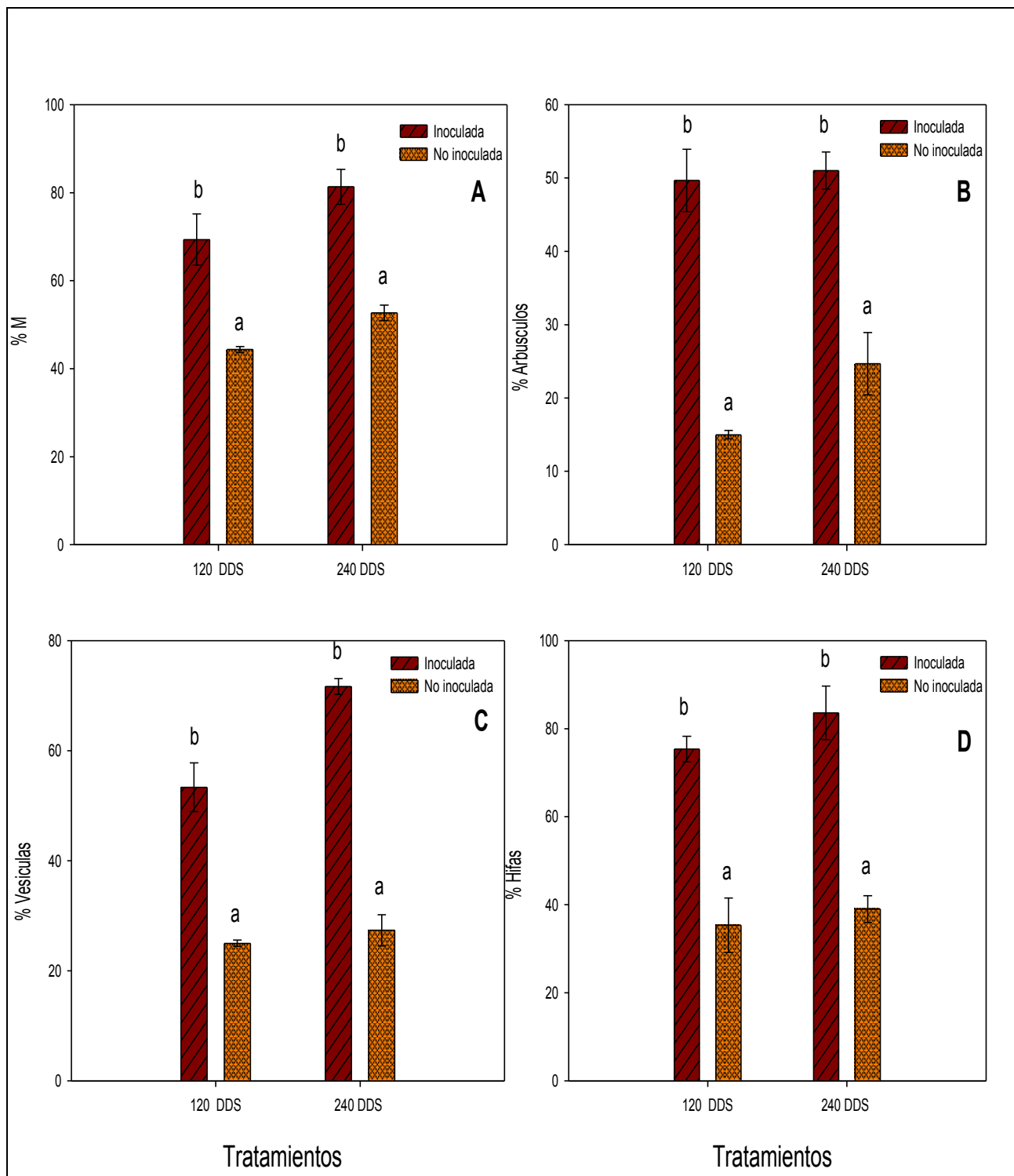
Se observó que existen variaciones en el valor de IRM, el cual disminuye con la edad de la planta desde 51% a los 120DDS meses hasta 37% a los 240 DDS.

La intensidad de la colonización micorrízica (%M) fue significativamente mayor en las plantas inoculadas a los 120 y 240 DDS en comparación a las plantas **NI** (figura 10 – a). Las estructuras micorrízica mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, observándose que todas las estructuras presentaron porcentajes mayores en las plantas inoculadas en ambas cosechas.

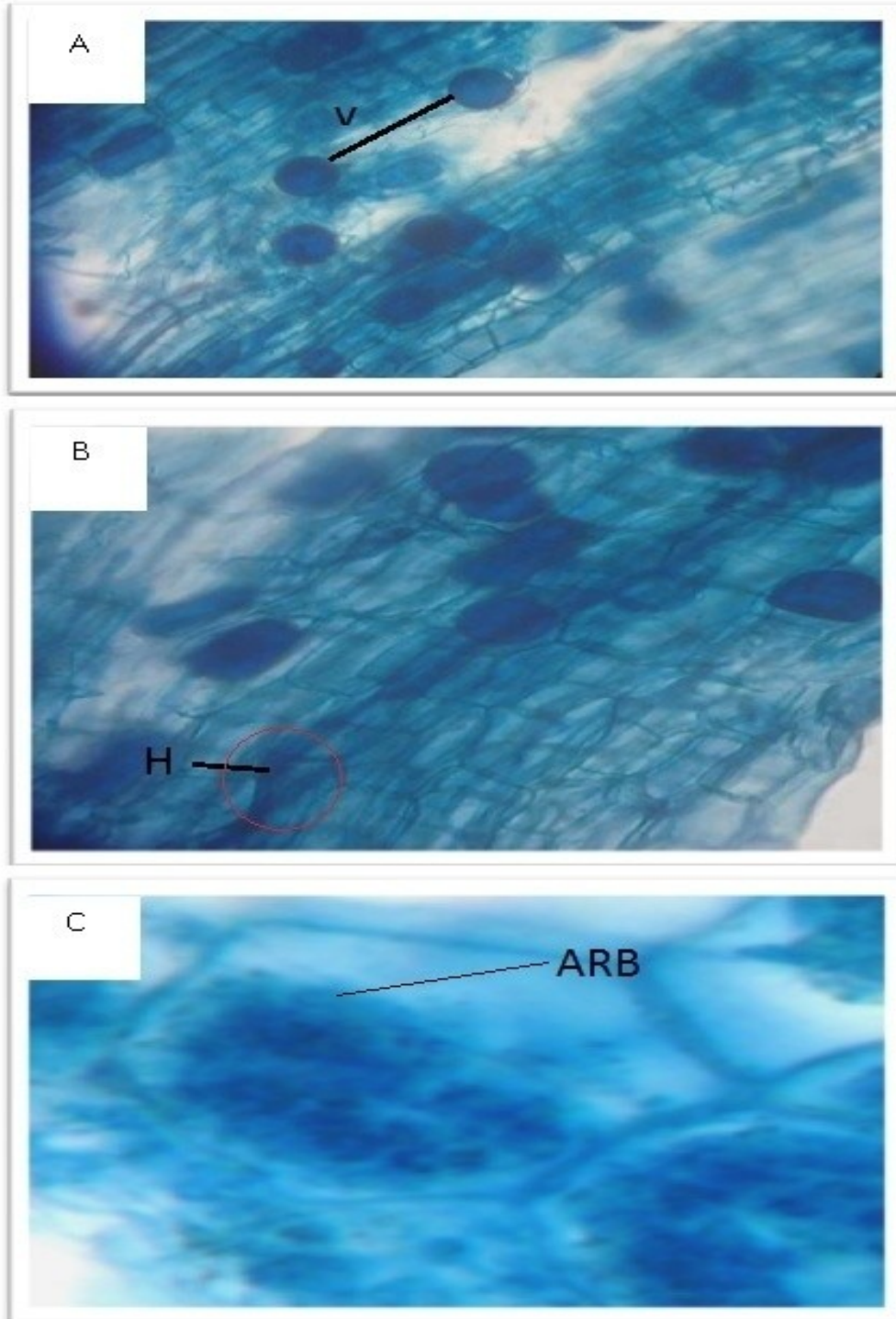
La colonización micorrízica de las plantas inoculadas en ambas cosechas alcanzó valores entre 69% y 81 % a los 120 DDS y 240 DDS respectivamente, mientras que la colonización en las plantas en el suelo nativo fue de 44 % y 53% (figura 10 - a). Los valores en porcentajes de arbusculos mostraron tendencias similares, en cuanto a una mayor proporción de arbusculos en las plantas inoculada en ambas cosechas (49 % y 51 % a los 120 DDS y 240 DDS respectivamente) en comparación a las plantas del tratamiento no inoculado (15 % y 24,6 % a los 120 DDS y 240 DDS respectivamente) (figura 10- b).

El porcentaje de colonización de las plantas inoculadas fue apreciable tanto por las hifas como por vesículas en comparación con las no inoculadas. El

tratamiento de plantas inoculadas presentó valores >del 50 % en ambas cosechas mientras que las plantas no inoculadas presentaron valores < 40 % (figura 10 – c y d).



**Figura 10.** Colonización micorrízica en plantas de *P. pinnatum* a los 120 y 240 DDS. Inoculadas: suelo de bosque con inoculo nativo del bosque; no inoculadas: Suelo de bosque no estéril control. a: % micorrización, b: %arbúsculos c: %vesiculas d: hifas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Valores medios  $\pm$  error estándar



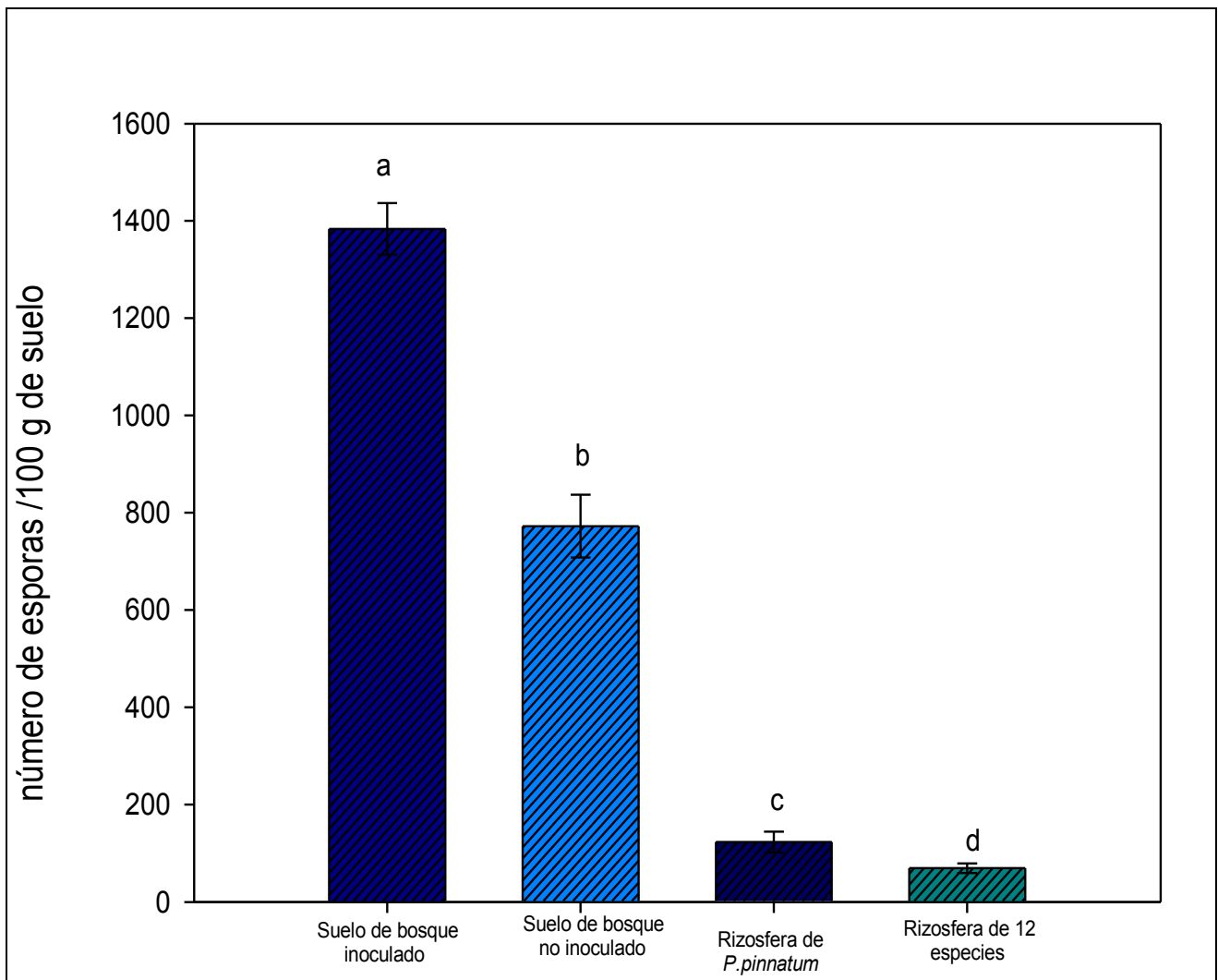
**Figuras11.** Aspectos de los vesículas (A) [V], hifas (B)[H], y arbuscúlos (C) [arb] producidas por los tratamientos inoculados en la raíces de plantas de *Platymiscium pinnatum*.

### **Número de esporas en los suelos utilizados en los ensayos y listado de morfotipos del bosque.**

En la figura 12 se muestran los datos obtenidos en el número de esporas de los diferentes suelos utilizados en los ensayos, que consistió en suelo del bosque inoculado, y el suelo del bosque no inoculado después de la cosecha de *P. pinnatum* a los 240 DDS y se comparan con suelo rizosférico de la especie en condiciones naturales y suelo en el bosque natural (promedio de 12 rizósferas de diferentes especies muestreadas en el bosque) (Kalinhoff, 2012). Cabe señalar que la evaluación del inóculo utilizado en este ensayo no pudo realizarse por razones ajenas a nuestra voluntad.

Los resultados muestran que después de 240 DDS, el suelo del bosque inoculado incrementa significativamente el número de esporas al compararlo con los otros suelos, lo cual indicaría que la especie *P. pinnatum* produce una alta esporulación y que el inóculo utilizado incrementa su potencial infectivo. Igualmente, el bosque sin inocular presentó un incremento de 7 veces mayor al suelo natural, resultado que refleja que bajo condiciones de invernadero, el crecimiento de la especie produce una alta esporulación. El análisis de número de esporas de la rizósfera de la especie en el bosque, mostró que *Platymiscium*

*pinnatum* presentó el mayor número de esporas ( $104,3 \pm 7,3$ ); sin embargo, el valor promedio de la rizósfera de 12 especies diferente del bosque nativos fue de  $69,3 \pm 5,9$  esporas /100g de suelo.

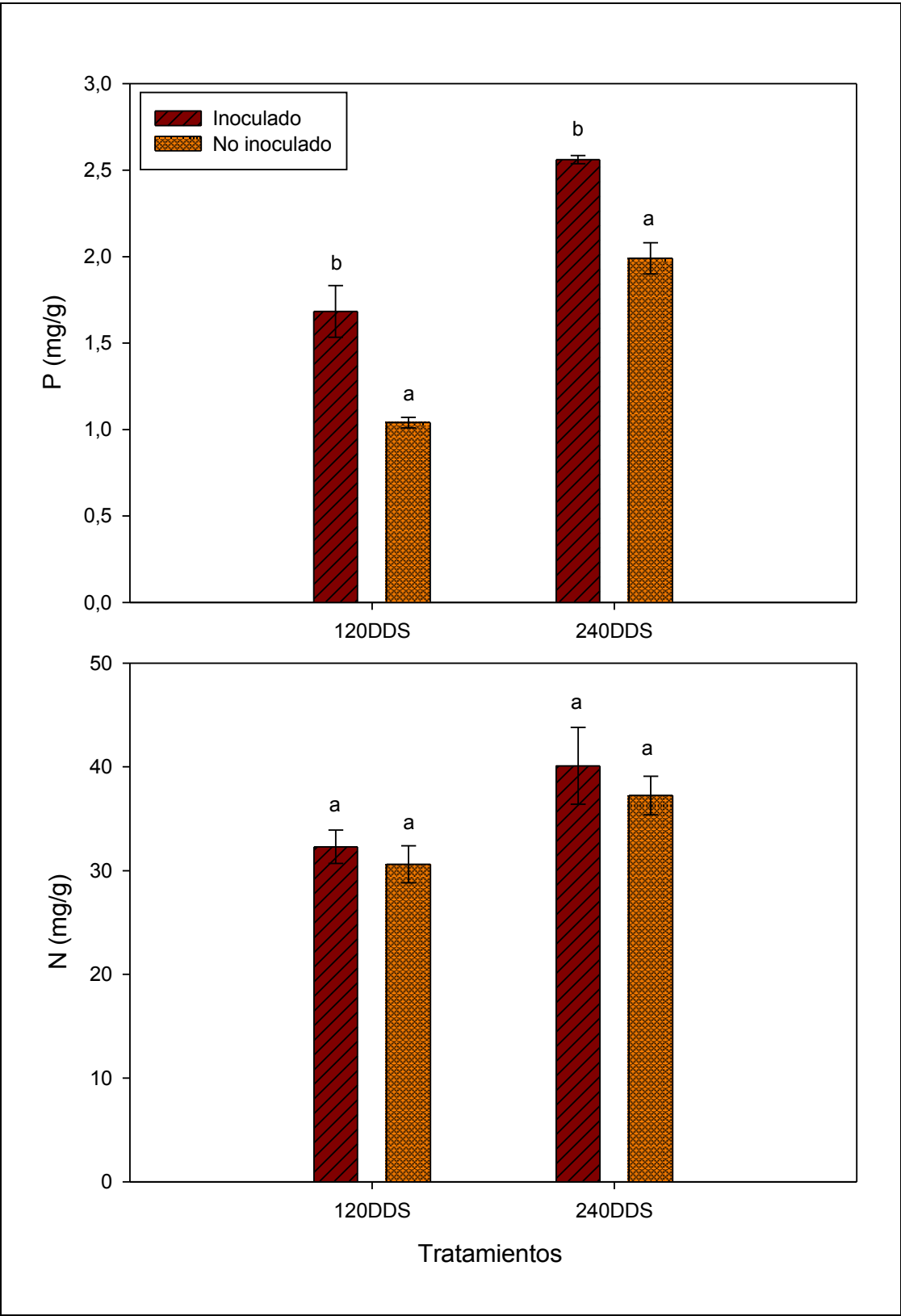


**Figura 12.** Números de espora presente a la rizósfera de plantas de *Platymiscium pinnatum* a los 240 DDS. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Valores medios  $\pm$  error estándar



### **Contenidos de fòsforo y nitrògeno foliar :**

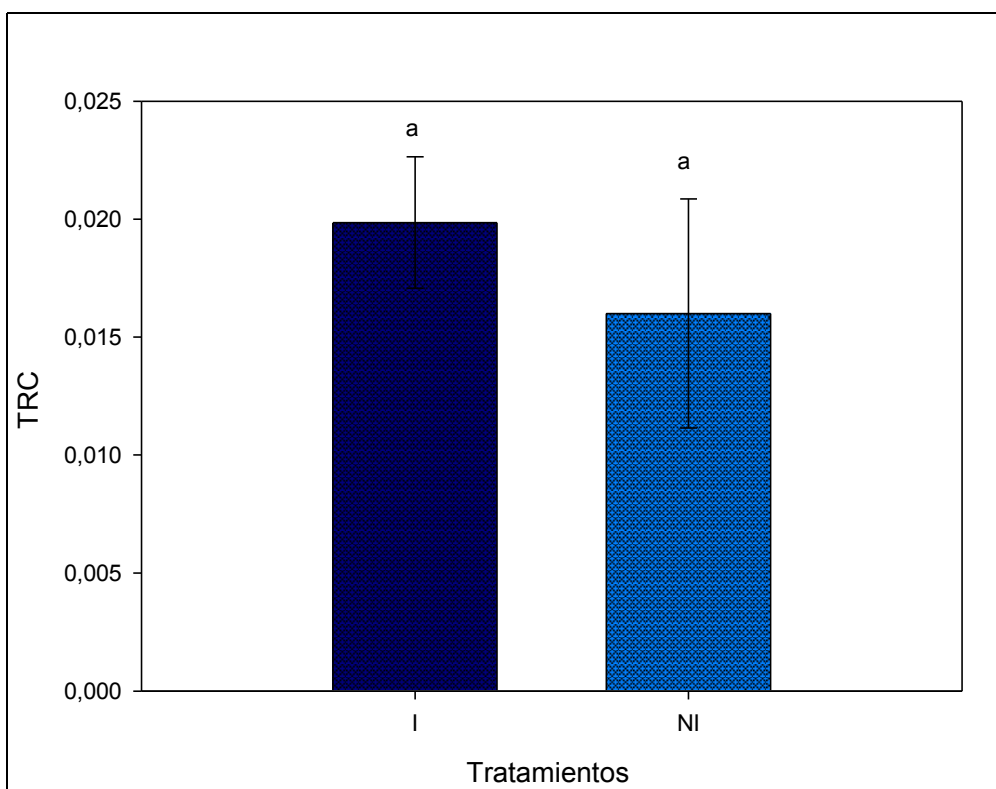
En la figura (13 – A) se muestran los contenidos de P foliar en plantas cultivadas en suelo sin inocular (NI) y plantas inoculadas (I). Se observó un incremento significativo en los contenidos de P foliar en plantas inoculadas en comparación con las plantas cultivadas en suelo del bosque sin inocular, y este comportamiento fue significativamente mayor en ambas cosechas. Por otro lado, los contenidos de N foliar no mostraron variaciones significativas entre tratamientos (Figura 13 - B).



**Figura 13.** Contenido de fósforo y nitrógeno foliar en plantas de *Platymiscium pinnatum* a los 120 DDS y 240 DDS. Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,05$ . Valores medios  $\pm$  error estándar.

### Tasa de crecimiento relativo (TCR):

En la Figura 14 se observa que la TCR no varió significativamente entre el tratamiento inoculado y no inoculado.

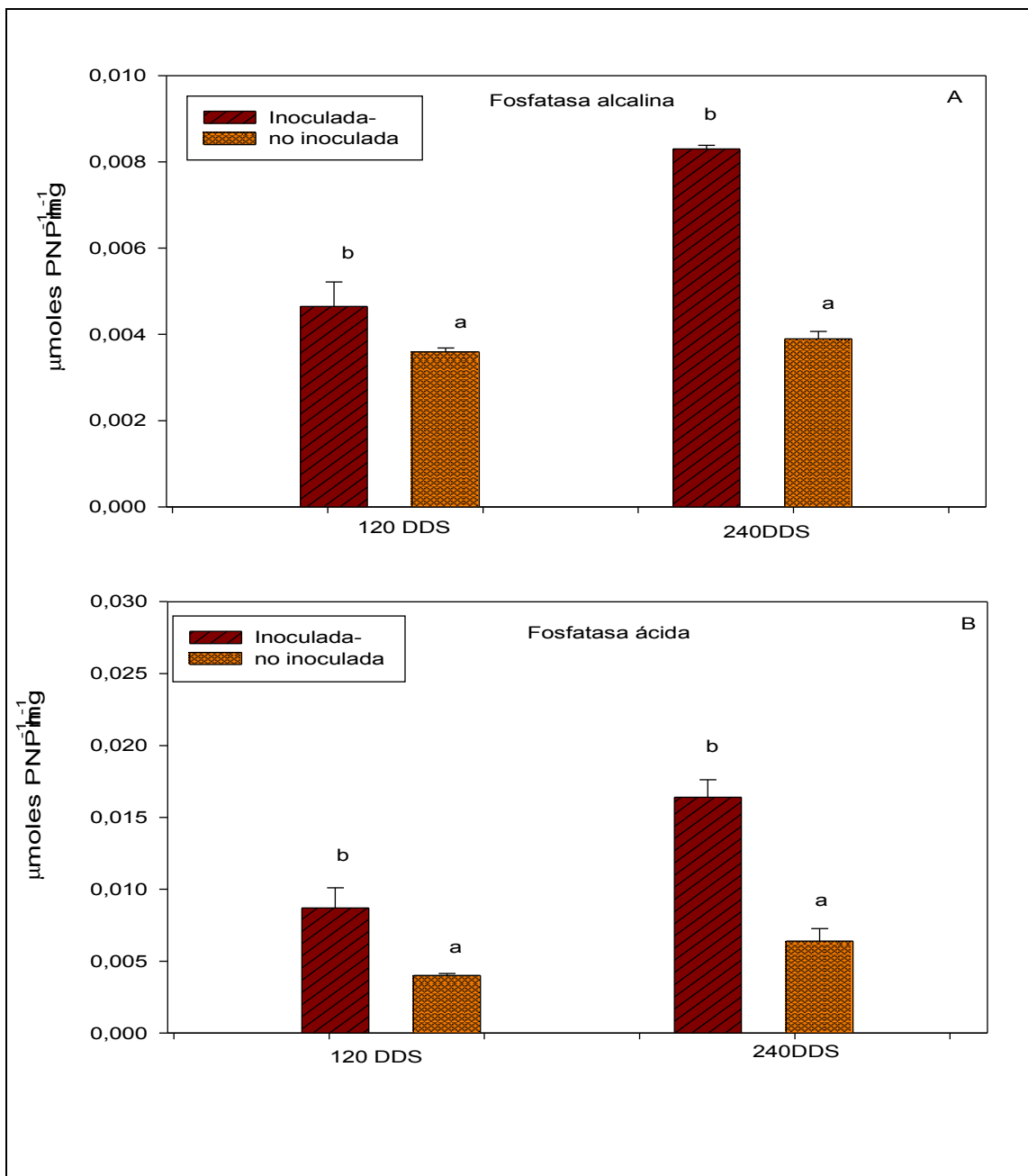


**Figura14.** Tasa de crecimiento relativo en plantas de *P. pinnatum* en suelo de bosque. Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,05$ . Valores medios  $\pm$  error estándar.

### Actividad enzimática

En la figura 15 se observan los valores de actividad enzimática de las plantas en los tratamientos inoculados y no inoculados a los 120 y 240 DDS.

A los 120 DDS la actividad de la enzima fosfatasa ácida (**FAI**) y alcalina (**FAI**) incrementaron significativamente en comparación a las plantas del tratamiento sin inocular. Similar comportamiento se observó a 240 DDS donde los valores de actividad de la enzima fosfatasa alcalina fueron 2,09 veces mayores en plantas inoculadas en comparación con las plantas del tratamiento no inoculado. Igualmente, se encontró que la actividad de la fosfatasa ácida fue 2,5 veces mayor



**Figura 15.** Actividad enzimática de la fosfatasa ácida y alcalina en plantas de *P. pinnatum* a los 120 DDS y 240 DDS. Letras diferentes indican diferencias significativas a  $p < 0,05$ . Valores medios  $\pm$  error estándar

## DISCUSIÓN

Entre las diferentes especies arbóreas, que se han utilizado para la recuperación de áreas degradadas, las leguminosas son una de las familias más importantes, no sólo por ser capaces de formar simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico (rizobios) sino también porque la presencia de ambos simbioses (rizobio-MA) es estrictamente necesaria y se complementan funcionalmente (Herrera *et al.*, 1993). Existen una serie de similitudes en el establecimiento de la colonización de los simbioses, tanto a nivel de la interacción que se produce entre la raíz-suelo (señales: flavonoides), a nivel molecular (activación de genes específicos para la nodulación que estimulan factores que inducen la colonización micorrízica) y a nivel fisiológico, debido a que los procesos de eficiencia y funcionamiento de la nodulación están asociados al mejoramiento de la nutrición fosforada por parte del hongo. El hongo cubriría los requerimientos de P en los procesos de fijación de  $N_2$  atmosférico con el consecuente incremento de los atributos fisiológicos de las plantas. (Xie *et al.*, 1995, Marques *et al.*, 2001, Ruiz-Lozano *et al.*, 2001; Porcel *et al.*, 2003; Goicoechea *et al.*, 2005; Varennes & Gross, 2007; Kalinhoff, 2012).

Estudios relacionados con la simbiosis tripartita, han permitido dilucidar la importancia que tiene la inoculación con HMA en los cambios morfológicos y fisiológicos producidos en la planta hospedera que estimulan el crecimiento y poseen una respuesta exitosa ante las presiones ambientales (Al-Karabi, 1998; Davies *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 1993; Alguacil *et al.* 2004; Requena *et al.*, 1996).

Los resultados de esta experiencia mostraron que aun cuando las plantas de *P. pinnatum* fueron cultivadas en suelos no esterilizados del bosque, la concentración de propágulos y probablemente la diversidad de HMA, a través de la preparación del inóculo, tuvo un efecto significativo en el crecimiento de la especie. Es de notar que los valores de altura y número de hojas (Figura 3 y 4) no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos durante los primeros 60 DDS. Este resultado podría estar asociado a la permanencia de los cotiledones en las plántulas, los cuales actúan no sólo como fuentes de nutrientes en las etapas tempranas del desarrollo, sino también como tejidos fotosintéticos (Siqueira *et al.*, 1998; Marshall & Kozolowski, 1976). En algunos casos, la presencia de los cotiledones previene la colonización con MA, por lo tanto el sistema radical funciona íntegramente como órgano de captación de nutrientes (Zangaro *et al.*, 2000). Después de la senescencia de los cotiledones, las especies se hacen más dependientes a las MA, en etapas de crecimiento más avanzadas (Siquiera *et al.*, 1998). Resultados similares presentados por De Andrade (1991) mostraron que en plántulas de *Acosmiun nitens* (especie arbórea) la colonización con MA se iniciaba a los dos meses de crecimiento, una vez las plántulas perdían los cotiledones.

El efecto positivo de la inoculación con HMA sobre la planta hospedera se pudo observar en la evaluación de los parámetros de crecimiento, donde se observó un incremento significativo en la acumulación de biomasa seca total, del 65% y 50 % a los 120 y 240 DDS respectivamente, en comparación con las plantas no inoculadas. La mayor asignación de biomasa en los compartimientos hoja, tallo y raíz, en el tratamiento inoculado, podría ser considerado un criterio importante para predecir la efectividad del inoculación de un determinado inóculo, siendo éste un parámetro mucho más confiable que el número de esporas o el porcentaje de colonización (Cuenca *et al.*, 2003).

Uno de los principales mecanismos mediante los cuales las plantas se adecúan a la disponibilidad de recursos, es asignando biomasa hacia el órgano más eficiente en incorporar el recurso limitante. Así cuando la planta se encuentra limitada por carbono debido a los altos requerimientos de la simbiosis micorrízica, la planta compensa el requerimiento de carbono produciendo más vástago y menos biomasa radical, favoreciendo un mejor balance de nutrientes y carbono para el crecimiento (Chapin, 1987). En este sentido, la asignación de biomasa a la producción de hojas y tallo (relación vástago/raíz) en plantas inoculadas fue significativamente mayor en relación a las plantas cultivadas en suelo nativo sin inocular. Resultados similares han sido encontrados en especies arbóreas de la misma zona, donde la inoculación con HMA nativos, favoreció la asignación de biomasa al compartimiento del tallo y hojas (Kalinhoff, 2012; Cáceres *et al.*, 2014; Cáceres – Mago, sin publicar).

Numerosos son los trabajos que demuestran el efecto de la inoculación con HMA en especies arbóreas, que crecen en bosques nublados y/o deciduos, observándose incrementos en todos los parámetros de crecimiento y atributos fisiológicos de las plantas (Siqueira *et al.*, 1998, Cáceres & Cuenca, 2007; Mora, 2010; Zangaro *et al.*, 2002). Sin embargo, en condiciones donde los nutrientes no son limitantes, (ver Anexo 1: Tabla de características químicas), el establecimiento de las especies y su respuesta a la inoculación, podría estar asociado a otros factores, como por ejemplo el déficit hídrico, que no sólo afecta la fisiología de las plantas, sino también la disponibilidad de nutrientes esenciales, como el P (Herrera *et al.*, 2010, Kalinhoff, 2012). Aun cuando estas experiencias fueron realizadas en condiciones controladas, es evidente que las plantas en el tratamiento inoculado presentaron una respuesta positiva de crecimiento. Se sugiere que este tipo de respuesta podría estar asociada a una mejora en la incorporación del P del suelo, tal como se ha señalado en otras experiencias, donde la inoculación y fertilización con P produce un incremento en los parámetros de crecimiento y contenidos foliares de P (Cáceres & Cuenca, 2007; Zangaro *et al.*, 2005).

En muchos casos, podría el crecimiento de las especies relacionarse con el mejoramiento en la incorporación de P por parte de las raíces micorrizadas, lo cual puede ser evidenciado por un mayor contenido de fósforo foliar en las plantas en los tratamientos inoculados. En este sentido, aunque en ambos tratamientos se presentó colonización micorrízica, las diferencias en los contenidos de P foliar en plantas inoculadas fue significativamente mayor en ambas cosechas, lo que podría



atribuirse a una mayor eficiencia en la incorporación de P por parte de las especies de HMA que dominan el inóculo. Estos resultados apoyan hallazgos anteriores que indican la importante contribución de las micorrizas arbusculares en el crecimiento vegetal y el aumento de la absorción de P al menos durante algunas etapas de desarrollo de la planta (Huante *et al.*, 1995; Zandavalli *et al.*, 2004; Cáceres & Cuenca, 2007).

Es importante señalar que aunque no se pudo realizar la caracterización del inóculo, el listado de morfotipos del bosque fue realizado en la rizósfera de las diez especies arbóreas con mayor índice de valor de importancia (Fajardo, 2007).en el caso de *P pinnatum*; se observó la presencia 7 morfotipos; con dominio del género *Glomus sp* y *Sclerocistis sp* (Kalinhoff, datos sin publicar). En este caso se podría inferir que existe cierto grado de compatibilidad funcional entre los HMA y la especie en cuestión, debido al mejoramiento de los atributos morfológicos y fisiológicos. Se ha señalado que la posible compatibilidad funcional se puede complementar con muchas o pocas especies de HMA, que incrementaran el crecimiento de las especies (Ravnskov & Jakobsen, 1995)

Los contenidos de N foliar no mostraron diferencias entre las plantas inoculadas y no inoculadas a lo largo del experimento. Estos resultados podrían indicar, que el proceso de fijación biológica de N<sub>2</sub>, tiene un papel importante en la incorporación de N a las plantas, independiente de los tratamientos de inoculación. Cabe señalar que las raíces en ambos tratamientos presentaban una alta cantidad de nódulos (observación personal), que podría incidir en el mejoramiento de la fijación de N<sub>2</sub>. Por el contrario, en otros trabajos, en suelos naturales, se muestra

que especies arbóreas de la familia de las leguminosas, inoculadas con HMA, poseen una mayor fijación biológica de N<sub>2</sub> atmosférico, que se puede traducir en un mayor contenido foliar del mismo, como ha sido señalado en *Piscidia carthagenesis*, *Anthyllis cystisoides*, *Retama sphaerocarpa* (Requena *et al.*, 1996; Aguacil *et al.*, 2004; Kalinhoff, 2002).

Es importante observar que en *P. pinnatum*, la colonización con MA incrementó tanto la longitud radical de las raíces como la longitud radical específica. Se han señalado varios mecanismos que pueden producir cambios morfológicos en el sistema radical debido a la asociación con MA (Berta *et al.*, 1990; Price *et al.*, 1989). En unos casos se señala que los cambios en la LR y LRE se deben a un aumento en la nutrición fosforada, bien sea la asociación con MA o por la fertilización con fósforo, y en otros casos se señala que las MA producen cambios en el balance hormonal y por lo tanto en el grado de ramificación de las raíces (Yano *et al.*, 1996). Por el contrario, otros estudios señalan la inhibición del crecimiento de raíces en plantas inoculadas, que dependerá básicamente de los hongos utilizados, los cuales afectarán la arquitectura de la raíz. Por lo tanto, este parámetro radical dependería de la combinación planta-hongo (Bressano *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2013)

El análisis de los parámetros de colonización (%M; %A; %H) mostró que durante los primeros 120 días de crecimiento, *P. pinnatum* en el tratamiento inoculado, presentó diferencias significativas con respecto a las plantas cultivadas en suelo nativo sin inocular, y esta diferencia se mantuvo hasta el final del

experimento. Los mayores valores de colonización en el tratamiento inoculado pueden relacionarse, en parte, a una mayor concentración del inóculo en los suelos, los cuales al final de la experiencia duplicaron el valor original (suelo nativo). Es importante destacar que los valores de %A en plantas inoculadas de *P. pinnatum* fueron significativamente mayores en ambas cosechas. Tomando en cuenta que la presencia de los arbusculos en las plantas micorrizadas está asociada a la transferencia de P entre el hongo y la planta hospedera, el desarrollo de mayor cantidad de arbusculos estaría asociado a un mayor beneficio nutricional de la planta, paralelo a una alta demanda de carbohidratos por parte del hongo (Gianinazzi – Pearson *et al.*, 1991). Resultados presentados por Hernández *et al.*; (2000) señalan que la relación entre el contenido de P en el vástago y % A, es un índice que proporciona una medida de la eficiencia del hongo en la incorporación de P en la planta. En este estudio el índice (P contenido / %A), calculado mostró valores de 0,49 y 0,36 en las plantas inoculadas y no inoculadas respectivamente. En otras especies del bosque nublado *Clusia minor* y *Clusia multiflora* inoculadas, se encontraron valores de 0,19 y 0,36 respectivamente. Se tendería a pensar que valores cercanos a 1, estarían relacionados con una alta eficiencia de transferencia de P del hongo a la planta.

Estos resultados sugieren que los HMA que colonizan las raíces de las plantas en los diferentes tratamientos varían en su capacidad infectiva. En este contexto, es importante considerar que no solamente la capacidad infectiva del HMA es un factor que determina las respuestas de crecimiento de las especies sino también la efectividad de los mismos, la cual va a depender de las

combinaciones planta-hongo que se encuentren en condiciones naturales y de algunos factores intrínsecos de las plantas, como la susceptibilidad a la colonización y tasa de crecimiento de la raíz (McGee *et al.*, 1999). La presencia de diferentes HMA en condiciones naturales, varía en su capacidad de colonizar las raíces (infectividad) o incrementar las respuestas de crecimiento de las plantas (efectividad). Aunque la rápida colonización de MA se espera que provea una ventaja competitiva a las plántulas, el grado de colonización no se correlaciona necesariamente con el crecimiento (Hayman 1985, Asbjornsen & Montagnini, 1994). En este trabajo se observó que existe una relación entre el crecimiento y la colonización de la especie. Estos resultados son consistentes, con lo encontrado por Moyersoén *et al.*, (1998), Siquiera *et al.* (1998) y Cáceres (2002), los cuales trabajando con especies arbóreas de suelos con menor P disponible y pH ácidos; encontraron relaciones positivas entre el porcentaje de colonización y el crecimiento de las especies arbóreas y a su vez encontraron una relación positiva entre el porcentaje de colonización y la incorporación de P a las plantas.

Existe una variación considerable entre las especies de plantas en cuanto a la sensibilidad de ser colonizadas que dependerá de las variables ambientales, especialmente, cuando la concentración de P en el suelo es alta (Tawaraya, 2003). Pareciera entonces, que existe un amplio rango de capacidad de respuesta a la colonización por HMA de especies leñosas, que se asocian en parte con la demanda nutricional de las especies; las características, ecofisiológicas y el estado sucesional o grupo funcional (Habtey, 1987; Khalil *et al.*, 1994; Zangaro *et al.*, 2000; Siqueira & Saggin-Junior, 2001).

Las TCR no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, aun cuando la asignación de biomasa a la producción de vástago fue mayor en las inoculadas, que indica que tanto la inoculación como el crecimiento de la especie en condiciones naturales, no tienen efecto sobre los incrementos diarios entre cosechas. Se observó que el incremento en valores de biomasa de las plantas inoculadas fue más constante en el tiempo, mientras que las no inoculadas presentaron variaciones importantes entre las dos cosechas, sin embargo, no alcanzaron acumulación de biomasa similar a las inoculadas.

Por otro lado, es común encontrar trabajos donde se presenta una relación entre la dependencia de las MA y los diferentes tipos de estrategias de crecimiento, los cuales se realizan comúnmente en plántulas de especies arbóreas cultivadas en suelos sin deficiencia de fósforo (Huante *et al.*, 1993; Rincón & Huante, 1994) o con períodos experimentales de crecimiento muy cortos (50-70 días). Por ello, al comparar las TCR de *P. pinnatum* en un lapso 120-240 días, y teniendo en cuenta que la TCR de las especies disminuyen con el tiempo, los valores encontrados de TCR son similares a los reportados en la literatura para especies sucesionales tardías (0.0019- 0.0057 día<sup>-1</sup>). Bajo estas condiciones de trabajo experimental a veces resulta, imposible comparar las TCR de las especies entre sí, cuando los períodos de crecimiento utilizados son tan pequeños y sobre todo cuando se trabaja con especies arbóreas.

El índice de respuesta micorrízica (IRM) determina el grado en el cual una planta se beneficia de la presencia de las MA y es frecuentemente utilizado para comparar la eficiencia simbiótica de distintos inóculos (Plenchette *et al.*, 1983). En

este caso la respuesta fue evaluada en términos de producción de biomasa de plantas creciendo en suelo nativo *versus* plantas creciendo en suelo nativo e inoculadas. Se parte de la premisa, que el uso de inóculos de micorrizas es una herramienta importante en ensayos de restauración y que se debe utilizar no sólo los propágulos nativos del suelo, sino también el suelo donde la planta crece (sin esterilizar) de manera de obtener resultados muchos más cónsonos con el ambiente que se está estudiando.

Los resultados de esta experiencia demostraron que el valor de IRM disminuyó con la edad de la planta desde el 50 % a los 120 DDS a 34 % a los 240 DDS. Tomando en cuenta que los valores de IRM varían con la disponibilidad de P en los suelos (Habte & Manjunath, 1987) se podría inferir que las plántulas de *P. pinnatum* en un periodo de 8 meses de crecimiento presentan un menor grado de respuesta a las MA y esta variación podría estar asociada a los mayores contenidos de P disponible encontrados en los suelos. Al comparar estos resultados de IRM con otras especies propias del bosque seco inoculadas con el mismo inóculo utilizado en esta experiencia; se demostró que tanto *Bulnesia arbórea* (*Zygophillaceae*), *Piptadenia flava* (leguminosa) y *Piscidia carthagenensis* presentaban IRM de 31% 23 % y 27% respectivamente (Kalinhoff 2012; Cáceres –Mago 2014, datos sin publicar). Pareciera entonces que las especies en zonas áridas, donde el único factor que está afectando la disponibilidad de P son los prolongados períodos de sequía, el IRM tiende a valores  $\leq$  al 50 % (considerado como un IRM moderado), mientras que las especies que crecen en suelos ácidos, tanto la dependencia como en la respuesta comprende valores  $\geq$  50% (Mora 2010,

Cáceres, 2002). Cabe acotar que en muchos casos esta respuesta está asociada a la compatibilidad funcional que las especies presenten con determinado inóculo. En este trabajo, aun cuando no se logró caracterizar el inóculo utilizado, la lista obtenida de los principales morfotipos en la rizosfera de la planta en estudio, permite inferir de manera bien general que la producción del inóculo podría haber favorecido el crecimiento de alguna especie o género cuya característica funcional haya sido rápida colonización y eficiencia; como sería el caso de *Glomus* el cual fue el morfotipo más abundante de los siete que presentó la especie (anexo 2). Faltarían estudios más detallados para corroborar de manera más precisa este resultado.

La actividad de la fosfatasa ácida (**FA**) y alcalina (**FAI**) en plantas inoculadas y no inoculadas, incrementó con la edad de la planta. En el caso de la **FA** las plantas inoculadas mostraron valores 2,1 y 2,5 veces mayor que en las plantas no inoculadas a los 120 y 240 DDS respectivamente. En cuanto a la actividad de la **FAI** se reporta un comportamiento similar, alcanzando valores de 1,2 y 2,09 veces mayor la actividad registrada en la raíces de plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas a los 120 y 240 DDS respectivamente. Otros estudios realizados en especies arbóreas de la zona muestran resultados similares, en cuanto que las plantas inoculadas presentan mayor actividad de ambas enzimas que las plantas no inoculadas. Tal es el caso de *Bulnesia arborea* y *Piptadenia flava* las cuales mostraron valores de actividad de **FA** comprendidos entre 0,0031-0,0047  $\mu\text{molesPNPmg}^{-1}\text{hora}^{-1}$  respectivamente a los 240 DDS; mientras que los valores de actividad de **FAI** estuvieron comprendidos entre 0,00739-0,0021  $\mu\text{molesPNPmg}^{-1}\text{hora}^{-1}$  respectivamente (Cáceres-Mago y Cáceres;

sin publicar). En este sentido, es importante destacar que la mayoría de los trabajos donde se evalúa la actividad enzimática son realizados en plantas de cultivo inoculadas en condiciones de invernadero y controles estériles, en nuestro caso las plántulas de especies arbóreas son cultivadas en suelos nativos e inoculadas colonizadas por los HMA nativos de los suelos donde estas especies crecen. Por lo general, los incrementos en la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina en las plantas inoculadas se encuentran asociados con el inicio de las respuestas por parte de las plantas a la micorrización. Este comportamiento ha sido evidenciado en su gran mayoría en plantas cultivadas como *Allium cepa*, *Allium porrum* L., *Trifolium subterraneum* y *Glycine max*, en las cuales se encuentra una relación positiva entre los incrementos de la actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas y los incrementos en los valores de biomasa total acumulada (Tarafdar & Jungk, 1987; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1986, 1991; Tadano *et al.*, 1993; Esawa *et al.*, 1994, Kojima *et al.*, 1998). Se sugiere que este tipo de respuesta podría estar asociada a la eficiencia del HMA que coloniza las raíces de las especies, como ha sido señalado en *Tagetes patula* (Esawa *et al.*, 1995).

Trabajos realizados por Cáceres (2002) y Mora & Cáceres (datos no publicados) mostraron que plántulas de especies arbóreas presentaban una relación positiva entre el incremento de la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina y la respuesta de crecimiento de las especies. Otros trabajos, muestran resultados similares en *Carica papaya* e *Ipomea carnea sp fistulosa* en cuanto al incremento en la actividad de las enzimas fosfatasas en plantas inoculadas (Alarcón *et al.*,



2002; Amaya *et al.*, 2009), sin embargo es importante señalar, que son pocas las referencias que mencionan la relación entre la actividad enzimática y la inoculación con HMA. Estos resultados sugieren la importancia que tiene utilizar la actividad de estas enzimas para evaluar el desempeño o afectividad de los inóculos utilizados.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que *P. pinnatum* presentan incrementos en la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina relacionados con el incremento en la respuesta a la colonización con MA, lo que evidencia la existencia de una colonización funcional producto del mejoramiento en la incorporación de P a las plantas. Igualmente en condiciones naturales el establecimiento y desarrollo de la especie dependerá de la asociación con MA en las condiciones de fertilidad del suelo donde éstas habitan.

## CONCLUSIONES

- 1) El uso de inóculo mixtos nativos en ensayos de inoculación con *P. pinnatum* cultivadas en suelos no esterilizados del bosque, demostraron que el aumento de la concentración de los propágulos de MA, a través de la preparación del inóculo, tuvo un efecto significativo en el crecimiento de la especie.
- 2) El efecto positivo de la inoculación con HMA sobre la planta hospedera se pudo observar en la evaluación de los parámetros de crecimiento, donde hubo un incremento en la acumulación de biomasa seca total en plantas inoculadas del 65% y 50 % a los 120 y 240 DDS, respectivamente, en comparación con las plantas no inoculadas.
- 3) La colonización micorrízica fue significativamente mayor en plantas inoculadas y se reflejó en un mayor crecimiento de la planta.
- 4) Ambos tratamientos presentaron colonización micorrízica, sin embargo, las diferencias en los contenidos de P foliar en plantas inoculadas fue significativamente mayor en ambas cosechas, lo cual podría atribuirse a una mayor eficiencia en la incorporación de P por parte de las especies de HMA que dominan el inóculo.
- 5) Los contenidos de N foliar no mostraron diferencias entre las plantas inoculadas y no inoculadas a lo largo del experimento. Lo que podría indicar, que el proceso de fijación biológica de N<sub>2</sub>, tiene un papel

importante en la incorporación de N a las plantas, independiente de los tratamientos de inoculación.

- 6) El índice de respuesta micorrízica, disminuyó con la edad de la planta desde el 50 % a los 120 DDS a 34 % a los 240 DDS, lo que se considera un IRM moderado; aun cuando se realizó en suelos no estériles
- 7) Los incrementos en la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina en las plantas micorrizadas (inoculadas y no inoculadas) de *P. pinnaatum* estuvieron asociados con la respuesta de crecimiento de la especie.
- 8) .La actividad de la fosfatasa acida y alcalina en plantas inoculadas aumentarán significativamente en comparación a las plantas no inoculadas, y esto estuvo asociado con los incrementos en los contenidos foliares de P y el crecimiento de la planta
- 9) El uso de biomarcadores enzimáticos (fosfatasa ácida y alcalina) relacionados con el metabolismo del P en plantas micorrizadas, constituye una herramienta importante para evaluar el desempeño o efectividad de los inóculos.
- 10) El uso de combinaciones adecuadas de inóculos de HMA efectivo durante la etapa de vivero es fundamental para mejorar el crecimiento y atributos fisiológicos de las plantas de *P. pinnaatum* para su posterior trasplante al campo.

## BIBLIOGRAFIA

- **Abbott L Robson D 1985.** Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **99**: 245-255.
- **Al- Karabi G 1998.** Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* **14**: 263-269.
- **Alarcón A, Frederick T, Davies Jr, Johnatan N, Theodore C, Arturo A, Estrada - Luna & Ronald Ferrera - Cerrato 2002.** Short term effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and root acid phosphatase activity of *Carica papaya L.* under phosphorus stress. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **44**: 31 – 37.
- **Alguacil M, Caravaca F, Díaz G, Marín P, Roldan A 2004.** Establishment of *Retama sphaerocarpa L.* seedlings on a degraded semiarid soil as influenced by mycorrhizal inoculation and sewage-sludge amendment. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **167**: 637-644.
- **Allen M, Allen E, Gómez - Pompa A 2005.** Effects of mycorrhizae and nontarget organisms on restoration of a seasonal tropical forest in Quintana

Roo, Mexico: Factors limiting tree establishment. *Restoration Ecology* **13**:325-333.

- **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 soiltransfer on ectomycorrhizal formation and the survival and growth of conifer seedlings on old, non-reforested clear-cuts. *Can. J. For. Res.* **17**: 944-950.
- **Amaya - Carpio L, Davies F, Fox T, He C 2009:** Arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer influence photosynthesis, root phosphatase activity, nutrition, and growth of *Ipomoea carnea* ssp. *fistulosa*. *Photosynthetica* **47**: 1–10.
- **Aono T, Maldonado - Mendoza I, Dewbre G, Harrison M, Saito M 2004.**  
  
Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **162**: 525-534.
- **Asbjornsen H, Montagnini F 1994.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum potential affects the growth of *Stryphnodendron microstachyum* seedlings in a Costa Rican human tropical lowland. *Mycorrhiza* **5**:45-51.
- **Augé R 2001.** Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**:3- 42.

- **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.
- **Barea J, Palenzuela J, Cornejo P, Sánchez- Castro I, Navarro- Fernández C, López- García A, Estrada B, Azcón R, Ferrol N, Azcón- Aguilar C 2011.** Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Deserts of the World Part IV: Iberian Southeast. Journal of Arid Environment* **75**: 1292-1301.
- **Barker S, Tagu D, Delp G 1998.** Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiology* **116**: 1201-1207.
- **Berta G, Trotta A, Fusconi A, Hooker J, Munro M, Atkinson D, Gianinazzi S 1995.** Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology* **15**: 281-293.
- **Bever J1994.** Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology* **75**:1965-1977.
- **Bolan S 1991.** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* **134**: 189–207.
- **Bressano M, Curetti M, Giachero L, Gil S, Cabello M, March G. Luna M 2010.** Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology* **167**: 1622-1626.
- **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 K 2012.** 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. Tesis de grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias.
- **Caravaca F, Barea J, Palenzuela J, Figueroa D, Alguacil M, Roldan A 2003.** Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* **22**: 103 -111.
- **Chapin F, Bloom A, Field C, Waring R 1987.** Plant responses to multiple environmental factors. *Bio Science* **37**: 49-57.
- **Cuenca G, Cáceres A, Oirdobro G, Hasmy Z, Urdaneta C 2007.** Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, **32**: 23-29.
- **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. Bolivar, Venezuela. *Ecotrópicos* **16**:27-40.
- **Dalal C 1977.** Soil organic phosphorus. *Adv. Agron.*, **29**: 83--113.
- **Davies F, Svenson S, Cole J, Phavaphutanon L, Duray S, Olalde 1996.** Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology* **16**: 985-993.

- **Dracup M, Barret – Lennard E, Grenway H, Robson A 1984.** Effect of phosphorus deficiency on phosphate activity of cell walls from root of subterranean clover. *Journal of Experimental Botany* **35**: 366 – 480.
- **Duff S, Lefebvre D, Plaxton W1991.** Purification, characterization and subcellular localization of an acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvatephosphatase. *ArchBiochem Biophys***286**: 226-232.
- **Eivazi F,Tabatabai M 1977.** Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem* **9**: 167–172.
- **Esawa T, Smith S2001.** Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra and intraradical hyphae of asbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **149**: 555:53
- **Ezawa T, Saito M, Yoshida T 1995.** Comparison of phosphatase localization in the intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus* spand *Gigaspora* sp. *Plant and Soil* **176**: 57–63.
- **Fajardo L. Gonzalez V, Nassar J, Lacabana P, Portillo C, Carrasquel F, Rodriguez J 2005.**Tropical dry forest of Venezuela: Characterization and current conservation status. *Biotrópica* **37**: 531-546.
- **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.



- **Fajardo L, Cuenca G, Arrindell P, Capote R, Hasmy Z 2011.** El uso de los hongos micorrízicos arbusculares en las prácticas de restauración ecológica. *Interciencia*. **36**: 931 -936.
- **Fries M, Pacovsky S, Safir R, 1998.** Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays L.*) roots. *Soil Biol. Biochem* **28**: 981-988.
- **Gianinazzi - Pearson & Gianinazzi 1976.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular – arbuscular mycorrhiza. Effect of mycorrhiza formation and phosphorus nutrition on soluble phosphate activities in onion roots. *Physiologie végétale* **14**: 833.
- **Gianinazzi – Pearson & Gianinazzi 1979.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *glomus mosseae* **82**: (1)127-132.
- **Gianinazzi - Pearson V, Bonfante - Fasolo P, Dexheimer J 1986.** Ultrastructural studies of surface interactions during adhesion and infection by ericoid endomycorrhizal fungi. NATO-ASI, Series H. **4**: 273-282.
- **Gianinazzi - Pearson V, Smith E, Gianinazzi S, Smith A 1991.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhizas. V. Is H + - ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interface. *New Phytologist* **117**: 61 - 76.

- **Goicoechea N, Merino S, Sanchez - Diaz M 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi can contribute to maintain antioxidant and carbon metabolism in nodules of *Anthyllis cytisoides* L. subjected to drought. *Journal of Plant Physiology* **162**: 27-35.
- **González V 2003.** Delta del Orinoco. Pp. 900-917. Biodiversidad de Venezuela Tomo II., Fundación Polar, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Fondo Nacional para la Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT). Editorial ExLibris, Caracas, Venezuela.
- **González V 2007.** La vegetación de la Isla de Margarita y sus interrelaciones con el ambiente físico. Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales **167**: 131- 161.
- **Govindarajulu M, P feffer P, Jin H, Abubaker J, Douds D, Allen J, Bücking H, Lammers P, Hill S 2005.** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Naturedoi: 10.1038/nature03610.
- **Habte M, Manjunath A 1987.** Soil solution phosphorus status and mycorrhizal dependency in *Leucaena leucocephala*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 797-801.
- **Harley J, Smith S 1984.** Mycorrhizal symbiosis. 2ª impresión. Academic Press, Londres, Gran Bretaña. pp: 4 - 33.
- **Hayman S, Tavares M 1985.** Plant Growth Responses To Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza. *New Phytologist* **100**: 367-377.

- **Helgason T, Fitter A 2009.** Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). *Journal of Experimental Botany* **60**: 2465-2480.
- **Hernández G, Cuenca G, García A 2000.** Behaviour of arbuscular-mycorrhizal fungi in *Vigna luteola* growth and its effect on the exchangeable (32P) phosphorus of soil. *Biology and Fertility of Soils*. **31**: 232-236.
- **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* **21**:183-189.
- **Herrera H, Salamanca C, Barea J 1993.** Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover decertified Mediterranean ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:129-133.
- **Hoyos J 1985.** Flora de la Isla de Margarita, Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N 34. Caracas. 927 p.
- **Huante P, Rincon E, Allen E 1993.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on seedling growth of four tree species from the tropical deciduous forest in Mexico. *Mycorrhiza* **2**: 141–145
- **Huante P, Rincon E, Chapin F 1995.** Responses to phosphorous of contrasting successional tree seedling species from the tropical deciduous forest of Mexico. *Functional Ecology* **9**:760-766.
- **Huber O, Alarcón C 1988.** Mapa de Vegetación de Venezuela 1:2.000.000. The Nature Conservancy, MARNR. Oscar Todtmann Editores. Caracas, Venezuela.

- **Hunt R 1982.** Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold Publishers, London.
- **Jackson M 1976.** Análisis Químico del Suelo. 3a ed. Omega. Barcelona, España. 662 p.
- **Jakobsen I, Abbott L, Robson A 1992.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. I. Spread of hyphae. *New Phytologist* **120**: 371-380.
- **Jakobsen I, Rosendahl L 1990.** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115**: 77-83.
- **Johnson N 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.
- **Johnson N, Graham J, Smith F 1999.** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**: 575-586.
- **Joner L, Johansen M 2000.** Arbuscal mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio – labelled inorganic and organic phosphate **22**: 1705 – 1708.
- **Kalinhoff C 2012.** Influencia de las micorrizas arbusculares sobre el crecimiento y respuesta a la sequía de *Piscidia Cartagenensis* Jacq.: Implicaciones en la recuperación de un bosque seco de la península de Macanao.

- **Khalil S, Loynachan T, Tabatabai A 1994.** Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. *Agronomy journal*.**86**: 949-958.
- **Koide T, Kabir Z 2000.**Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist* **148**: 511 – 517.
- **Kojima T, Hayatsuzz M, Saito M 1998.** Intraradical hyphae phosphate of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Biology and fertility of soils***26**: 331-335.
- **Lopes-Leal P, Stürmer S, Siqueira J 2009.** Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**:111-121.
- **Marques S, Pagano M, Scotti R 2001.**Dual inoculation of a woody legume (*Centropogon tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil. *Agroforestry Systems* **52**: 107-117.
- **Marschner H 1995.** Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego, CA92101. 889 p.
- **Marshall P, Kozlowski T 1976.** Importancia de los cotiledones fotosintéticos para el crecimiento inicial de las angiospermas leñosas. *Physiologia Plantarum* **37**: 336 – 340.
- **Mc. Gonigle T, Miller M, Evans D, Fairchild G, Swan J 1990.** A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **115**: 495-501.
- **McGee P 1999.** Variation in propagule numbers of vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi in a semi-arid soil. *Mycol. Res.***92**: 28-33.

- **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* **139**: 311- 320.
- **Murphy J, Riley P 1962.** A modified single solutions method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **271**: 31- 36.
- **Murphy P, Lugo A 1986.** Ecology of tropical dry forest. *Annual Review. Ecology Systematic* **17**: 67-88.
- **Olivares E, Medina E 1992.** Water and nutrient relations os 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-Suarez F & D Giraldo-Hernández (eds.). Provita, Shell Venezuela, Lenovo (Venezuela). Caracas, Venezuela.
- **Perry D, Molina R, Amaranthus M 1987.** Mycorrhizae, mycorrhizospheres, and reforestation: current knowledge and research needs. *Can. J. For. Res.* **17**: 929-940.
- **Phillips J, Hayman D 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158 -161.

- **Picone C 2000.** Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture. *Biotropica* **32**: 734-750.
- **Plenchette C, Fortin J Furlan V 1983.** Growth response of several plant species to mycorrhiza in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* **70**: 191-209.
- **Porcel R, Barea M, Ruiz – Lozano J 2003.** Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytol* **157**: 135 – 43.
- **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.
- **Price S, Roncadori R Hussey R 1989.** Cotton root growth as influenced by phosphorus nutrition and vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **111**: 61-66.
- **Ravnskov S, Jakobsen I 1995.** Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant. *New Phytologist* **129**: 611-618.
- **Requena N, Jefries P, Barea J 1996.** Assessment of Natural Mycorrhizal Potential in a Desertified Semiarid Ecosystem. *Applied and Environment Microbiology* **62**:842-847.
- **Rincón E. Huante P 1994.** Influence of mineral nutrition availability on growth of tree seedlings from the tropical deciduous forest. *Trees* **9**:93-97

- **Ruiz - Lozano J, Azcón R 1995.** Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by fungal species and water status. *Physiologia Plantarum* **95**: 472-478.
- **Ruiz – Lozano J, Collados C, Barea M, Azcón R 2001.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytol* **151**: 493- 502.
- **Sanz V 2001.** “Ecología de *Amazona barbadensis* (Aves: Psittacidae) en la Península de Macanao (Isla de Margarita). Un estudio de las características del hábitat, dinámica de uso y selección”. Seminario de Avance de la Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- **Sanz V 2004.** Ecología de *Amazona barbadensis* (Aves: *Psittacidae*): caracterización y uso del hábitat en la Península de Macanao (Isla de Margarita) a diferentes escalas 190 espaciales y temporales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- **Sieverding E 1991.** Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. In Technical Cooperation Federal Republic of Germany. 371 p.
- **Siqueira J & Saggin - Junior J 2001.** Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza* **11**:245– 255.
- **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, Read D 1997.** Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge. UK. p. 605.
- **Tabatabai M 1982.** Use of p-nitrophenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol.& Biochem* **1**:301-307
- **Tadano T, Sakai H 1993:** Characteristics of response of acid phosphatase secreted by the roots of several crops to various conditions in the growth media. *Soil Sci. Plant Nutr* **39**: 437-444.
- **Tadano T, Ozawa K, Sakai H, Osaki M, Matsui H 1993.** Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deicient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. *Plant and Soil* **155/156**: 95±98.
- **Tarafdar C, Claassen N 1988.** Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biol Fertil soils* **5**: 308-312.
- **Tarafdar J. Marschner H 1994.** Phosphate activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biol. Biochem* **26**: 387 – 395.
- **Tarafdar J, Jungk A 1987.** Phosphatase activity in the rhizosphere of VA – mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil .Biol. Biochem* **26**:387-395.
- **Tawaraya K 2003.** Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**: 655-668.

- **Thiagarajan T, Ahmad M 1994.** Phosphatase activity and cytokinin content in cowpeas (*Vigna unguiculata*) inoculated with a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus. *Biology and Fertility of Soils* **17**: 51–56.
- **Tian H, Drijber A, Zhang J, Li X 2013.** Impact of long-term nitrogen fertilization and rotation with soybean on the diversity and phosphorus metabolism of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi within the roots of maize (*Zea mays* L.). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **164**: 53-61.
- **Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Gollotte A 1993.** In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* **97**: 245-250.
- **Toshihiro A, Ignacio E. Maldonado - Mendoza G, Dewbre R, Maria J. Masanori S 2004.** Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **162**: 525 – 534.
- **Uhl C 1987.** Factors controlling succession following slash-and-burn agriculture in Amazonia. *J Ecol* **75**: 377- 407
- **Van Aarle M, Pal Axel O, Lennart L, Bert B, Hakan W 2002.** Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. **159**: 7 – 10.
- **Van den driessche R 1991.** Effects of nutrients on stock performance in the forest. En: *Mineral nutrition of conifer seedlings*. CRC Press. Florida. United States. PP 229 – 260
- **Varenes A, Gross M 2007.** The tripartite symbiosis between legumes, rhizobia and indigenous mycorrhizal fungi is more efficient in undisturbed soil. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 2603-2607.

- **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.
- **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.
- **Xie P, Staehelin C, Vierheiling H, Wiemken A, Jabbouri S, Broughton W, Vogeli – Large R, Boller T 1995.** Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiology* **108**:1519 – 1525.
- **Yano K, Yamauchi A, Kono Y 1996.** Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **6**: 409-415.
- **Zandavalli R, Dillenburg D 2004.** Responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Appl Soil Ecol.* **25**:245-255.
- **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.
- **Zangaro W, Nishidate F, Camargo F, Romagnoli G, Vandresen J 2005.** Relationships among arbuscular mycorrhizas, root morphology and seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* **21**:529– 540.



# ANEXOS

Anexo 1: Características químicas del suelo del Bosque Macanao, Isla de Margarita.

Suelo	pH	P disponible ppm	% N
Bosque	7,87±0,08	7,37±1,02	0,0745±0,0372

Anexo 2: Listado de especies y morfotipos por especie de la zona de Bosque en la Península de Macanao, isla de Margarita.

Número sp.	Especie arbórea	Familia	Nombre común
1	<i>Bourreriacumanensis</i> (Loefl.) O.E. Schulz	Boraginaceae	Guatacare
2	<i>Lonchocarpusviolaceus</i> (Jacq.) DC	Papilionaceae	Jobito
3	<i>Bulnesiaarborea</i> (Jacq.) Engler	Zygophyllaceae	Palo sano o Vera
4	<i>Piscidiacarthagenensis</i> (Jacq.)	Fabaceae	Cuchibano
5	<i>Morisonia americana</i> L.	Capparaceae	Mucurutú
6	<i>Piptadenia flava</i> (DC.) Benth.	Mimosaceae	Cujicillo
7	<i>Lonchocarpus</i> sp	Fabaceae	Aco
8	<i>Caesalpiniamollis</i> (H.B.K.)	Caesalpinaceae	Durote o Virote
9	<i>Capparislinearis</i> (Jacq.)	Capparaceae	Olivo
10	<i>Platymisciumpinnatum</i> (Jacq.) Dugand	Fabaceae	Roble blanco

Presencia de morfotipos por especie arbórea (identificadas en la hoja anterior)										
Morfotipo de HMA	Especie arbórea									
	sp.1	sp.2	sp.3	sp.4	sp.5	sp.6	sp.7	sp.8	sp.9	sp.10
<i>Diversispora spurca</i>			x	x					x	
<i>Entrophospora infrequens</i>				x						
<i>Funneliformis geosporum</i>			x	x				x	x	
<i>Gigasporaceae 1</i>		x								x
<i>Gigasporaceae 2</i>				x						
<i>Glomus agregatum</i>						x		x		
<i>Glomus cf. tortuosum</i>			x						x	
<i>Glomus deserticola</i>		x	x					x	x	x
<i>Glomus sp. 1 (Marron)</i>	x				x					
<i>Glomus sp. 2 (pared gruesa)</i>			x	x		x				x
<i>Glomus sp. 3 (Roja)</i>								x		
<i>Glomus sp. 4 (hifa gruesa)</i>				x	x	x		x		
<i>Glomus sp. 5</i>		x	x				x			x
<i>Glomus sp. 6</i>				x			x			x
<i>Rhizophagus intraradices</i>	x						x		x	
Rojiza opaca (con pelos)						x				
<i>Sclerocystis sp. 2 (rojo)</i>		x	x			x		x		
<i>Sclerosystis sinuosa</i>					x	x			x	x
<i>Sclerosystis sp. 3 (naranja)</i>	x		x		x					x
<b>Nº total de morfotipos x especie arbórea=</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>7</b>