#### UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

#### Programa de Doctorado y Magíster en Ciencias de Recursos Naturales



# GLOMALINA EN BOSQUES TEMPLADOS Y EN UNA PLANTACIÓN DE Pseudotsuga menziesii EN LA CORDILLERA DE LOS ANDES, CENTRO-SUR DE CHILE

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS
NATURALES

#### PAULINA SOLEDAD ETCHEVERRÍA TOIRKENS

**TEMUCO - CHILE** 

2009

# "Glomalina en bosques templados y en una plantación de *Pseudotsuga*menziesii en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile"

Esta tesis fue realizada bajo la supervisión del director de Tesis, Dr. FERNANDO BORIE B., del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de La Frontera y del co-director de Tesis, Dr. ROBERTO GODOY B., del Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

#### PAULINA SOLEDAD ETCHEVERRÍA TOIRKENS

•••••	•••••
DIRECTOR	Dr. FERNANDO BORIE B.
POSTGRADO EN CIENCIAS DE	
RECURSOS NATURALES	•••••
	Dr. ROBERTO GODOY B.
	Dr. ERICK ZAGAL V.
	Dra. ÁNGELA MACHUCA H.
DIRECCIÓN DE POST GRADO	•••••
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA	Dr. FRANCISCO MATUS.



#### **Agradecimientos**

Al Proyecto Fondecyt 1060372 del Dr. Fernando Borie B., por financiar este estudio y al Proyecto MECESUP FRO 0309 y a CONICYT por haber financiado mi permanencia en este programa.

A la Agencia Internacional Estudiantil Alemana (DAAD) por financiar una pasantía al Laboratorio de Ecología de Plantas de la Freie Universitat de Berlín, Alemania; a cargo del Dr. Matthias Rillig y a CONICYT por financiar la asistencia al "Internacional Symposium on Organic Matter Dynamics in Agro-Ecosystems en Poitiers, Francia.

Quiero agradecer al Dr. Pascal Boeckx y al Dr. Dries Huygens por su colaboración en el desarrollo de parte de esta investigación. Al Dr. Roberto Godoy por todo su colaboración y consejos durante el desarrollo de esta tesis.

No quiero dejar de agradecer a mis amigos, María Paz, Bárbara, Gabriela y Rubén, los cuales estuvieron apoyándome, aconsejando y discutiendo, en todo momento y a los que voluntariamente me ayudaron en la toma de muestras en terreno.

#### Resumen

La capacidad de los ecosistemas boscosos, en especial los bosques templados, para satisfacer necesidades de los seres humanos de manera directa e indirecta es lo que se denomina una función ecosistémica. Una de estas funciones es la regulación gaseosa, donde constituye la principal fuente fijadora de carbono (C). Una manera indirecta de participar en la acumulación de C sería a través de la glomalina, definida metodológicamente como glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP), producida por hongos micorrícicos arbusculares (HMA), que se caracterizan por obtener todo el C necesario de su planta hospedera. Muchas de las especies de los bosques templados de América del sur presentan esta asociación con HMA, por lo que se planteó estudiar las características de la GRSP como un indicador del secuestro de C, en las asociaciones forestales siempreverdes de: *Nothofagus dombeyi*, *Laurelia philippiana y Saxegothaea conspicua*, y caducifolias secundarias de: *N. alpina*, *N. obliqua*, en distinto estadio sucesional (con y sin manejo silvícola) y en una plantación forestal de *Pseudotsuga menziesii*, en la Cordillera de los Andes, centro- sur de Chile.

En la presente investigación se estudió la relación de la diversidad vegetal y abundancia de HMA con los niveles de GRSP y la capacidad de acumulación de ella en el suelo. La diversidad vegetal se realizó por medio de un inventario fitosociológico y la abundancia de HMA a través de un estudio de muestras de suelo. Esto permitió determinar que la mayor cobertura de especies hospederas de HMA se encuentra en el bosque siempreverde, pero sin que se presentaran diferencias en el contenido de micelio extrarradical entre lo sitios. Se observó una disminución en el número de esporas al aumentar el porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA. La presencia tanto de esporas como de micelio activo en la plantación forestal hace replantear la calidad de no hospedero de HMA de *P. menziesii*.

Se cuantificó la fracción de GRSP, así como su aporte de C y N al C y N total del suelo y se comparó con el aporte que hacen los ácidos húmicos y fúlvicos, a dos profundidades de suelo. Además, se determinó si existe una relación de la GRSP en la formación de agregados estables al agua. La GRSP fue la fracción que más contribuyó a la MOS en todos los sitios estudiados, representando hasta un 19% del C y un 20% del N total del suelo, que al formar parte de la materia orgánica más estabilizada, constituye una importante forma de secuestro de C en diferentes ecosistemas. La GRSP no presentó correlación con los agregados estables al agua. Los factores que determinan el contenido de GRSP en el suelo no están muy claros aún; no obstante, el manejo

silvícola produjo una disminución en su contenido en el corto plazo en los bosques de *Nothofagus* estudiados.

Mediante un ensayo *in situ* de acumulación de GRSP se observó que no todos los bosques acumulan la misma cantidad de GRSP en un periodo de tiempo determinado y estas diferencias no tienen relación con la diversidad vegetal o el porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA. La descomposición de la GRSP se estudió mediante la incubación de suelo en condiciones controladas de temperatura y humedad. La fracción más lábil de GRSP disminuyó hasta en un 36% después de 400 días de incubación, mientras que la fracción GRSP aumentó hasta en un 87%. Por otra parte, no se presentaron diferencias en la descomposición de la GRSP al aumentar la temperatura de incubación. Mediante un análisis del contenido de metales de la GRSP, se observó un alto porcentaje de aluminio y hierro, que tendrían una función en la estabilización de la GRSP y permitiría que se encuentre en altos contenidos en los suelos forestales del centro-sur de Chile. Finalmente, se comparó el perfil de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N de la GRSP con el perfil del suelo. GRSP registró un enriquecimiento significativo de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N respecto del suelo. De esta manera, la acumulación en el suelo, contribuiría al enriquecimiento de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N en suelos de ecosistemas boscosos. Sin embargo, mayor información respecto a la relación entre HMA y GRSP, permitiría comprender la magnitud exacta de este proceso.

A pesar de que no es posible relacionar con precisión a los HMA con el contenido de GRSP, es interesante estudiar esta fracción por el alto porcentaje de carbono que representa en el suelo, su relación con la formación de agregados estables en algunos ecosistemas y el potencial que tienen los suelos volcánicos para acumular esta glicoproteína. Además es importante conocer su función y cantidad en otro tipo de ecosistemas forestales como los bosques australes y pantanosos, con diferente dependencia de HMA.

### Summary

An ecosystem function is the capacity of forest ecosystem, specially temperate forest, to satisfy requirement of human been in a direct and indirect way. One of these functions is gas regulation, where forest ecosystem constitute the major carbon (C) sink. An indirect way to contribute in the C accumulation would be through glomalin, defines methodologically as glomalin related soil protein (GRSP), which is produce by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that obtain all their C from the host plant. Many species from the temperate forests in South America have this association with AMF. For that reason it was proposed to study the GRSP characteristic as an indicator of C sequestration, in evergreen forests of *Nothofagus dombeyi*, *Laurelia philippiana* and *Saxegothaea conspicua*, and deciduous secondary forests of: *N. alpina*, *N. obliqua*, with different succession pattern, with and without forest management, and in a forest plantation of *Pseudotsuga menziesii*, in the Cordillera de los Andes, southern Chile.

In the present research, it was studied the relationship between the vegetal diversity and AMF abundance with the levels of GRSP and the accumulation capacity of GRSP in soil. Vegetal diversity was measured by a forest inventory and the AMF abundance by the study of soil samples. These made possible to determine that the highest host cover percentage of AMF was found on the evergreen forest, but no differences on the hyphae content among sites was found. The number of spores decreased with the increase in host cover percentage of AMF. The presence of spores and active mycelium in the forest plantation make redefine the non host of AMF condition of *P. menziesii*.

The GRSP fraction and the contribution of C and N to total soil C and N were quantified and they were compared with the input of humic and fulvic acid at two depth of soil. Furthermore it was studied if GRSP has a relationship with the soil aggregation. GRSP was the most abundant fraction in soil organic matter in all sites. It represents up to 19% of total soil C and 20% of total soil N. It represents a more stabilized fraction of soil organic matter that constituted an important way of C sequestration in different ecosystems. There was not correlation between GRSP and soil aggregation. The factors that determine the GRSP content in soil are not very clear, but forest management in *Nothofagus* forest reduced it content in a short time.

In an *in situ* assay of accumulation of GRSP was observed that not all forests have the same capacity to accumulate GRSP in a determine period. These differences have no relationship with vegetal diversity or host cover percentage of AMF. The decomposition of GRSP was studied by a soil incubation assay at controlled temperature and moisture. The labile fraction of GRSP decreased up to 36% after 400 days, while the GRSP fraction increased up to 87%. By other side, there was no difference on the decomposition of GRSP when the incubation temperature increased. The analysis of metal content in GRSP showed a high content of Al and Fe, which can have a role on the stabilization of GRSP and on the high content of GRSP found in forest soils of southern Chile. Finally, it was compared the <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N patterns GRSP with the soil pattern. GRSP showed significant <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N enrichment relative to bulk soil. Hence, cumulative accumulation in soil, likely contributes to <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N enrichment in soils of forest ecosystems. Further research on the relationship between GRSP and AMF should clarify the exact extent of the process.

Although today is not possible to relate AMF with the GRSP content with precision, it is very interesting to study it because the high percentage of C that represent in soils, their relationship with soil aggregation in some ecosystems and the potential for accumulate this protein that have volcanic soils. It is also important to know their function and amount in other type of forest ecosystems as austral forests and wetland forest, with different dependence of AMF.

# Índice de Contenidos

]	Resumen
1	Abstract
1	1.1 Introducción
1	1.2 Bosques templados de Chile
	1.2.1 Amenazas sobre el bosque nativo
	1.2.2 Manejo forestal del bosque nativo
1	1.3 Micorrizas y el bosque templado
1	1.4 Glomalina asociada a las proteínas de suelo (GRSP)
	1.4.1 Características de la glomalina extraída del suelo
	1.4.2 Niveles de GRSP en diferentes ecosistemas
	1.4.3 Descomposición de la GRSP
	1.4.4 Factores relacionados con los niveles de GRSP en el suelo
	1.4.5 Rol de la GRSP en el secuestro de carbono del suelo
1	1.5 Relación de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) con la GRSP
1	1.6 Hipótesis
1	1.7 Referencias
)	2 Objetivos y descripción del área de estudio
2	2.1 Objetivo general
	2.1.1 Objetivos específicos
1	2.2 Descripción del área de estudio

	2.2.1 Ubicación geográfica
	2.2.2 Clima
	2.2.3 Suelo
	2.2.4 Vegetación
	2.2.5 Sitios experimentales
	2.3 Referencias
osques	3 Características vegetacionales y abundancia de HMA de cuatro nativos y una plantación de Pseudotsuga menziesii en la Cordillera de es, centro-sur de Chile
	Resumen
	Abstract
	3.1 Introducción
	3.2 Materiales y Métodos
	3.2.1 Descripción de los sitios de estudio
	3.2.2 Inventarios fitosociológicos e índices de diversidad vegetal
	3.2.3 Cuantificación de la abundancia de HMA
	3.2.4 Análisis estadísticos
	3.3 Resultados
	3.4 Discusión
	3.5 Conclusiones

4.1 1	ntroducción
	Materiales y Métodos
	4.2.1 Área de estudio
	4.2.2 Extracción y cuantificación de glomalina relacionada con las proteínas de suelo (GRSP)
	4.2.3 Extracción de ácidos húmicos y fúlvicos
	4.2.4 Análisis elemental de C y N
	4.2.5 Determinación del porcentaje de agregados estables al agua
	4.2.6 Análisis estadísticos
4.3 F	Resultados
	4.3.1 Contenido de GRSP
	4.3.2 GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos de la materia orgánica del suelo, aporte de carbono y nitrógeno
	4.3.3 Contribución indirecta de la GRSP al secuestro de carbono del suele
	4.3.4 Correlaciones entre parámetros fúngicos y de suelo con las fracciones de la materia orgánica
4,4 Г	Discusión
4.5 (	Conclusiones
4.6 F	Referencias
ión de	Acumulación y estabilidad de GRSP en bosques templados y un e Pseudotsuga menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-su
	ımen

	5.2.1 Descripción de los sitios experimentales
	5.2.2 Acumulación de GRSP in situ
	5.2.3Estudio de la estabilidad de la GRSP <i>in vitro</i>
	5.2.4 Análisis estadísticos
5.3	Resultados
	5.3.1 Acumulación de GRSP in situ
	5.3.2 Estabilidad de la GRSP proveniente de suelos con diferente vegetación
5.4	Discusión
	5.4.1 Acumulación de GRSP in situ
	5.4.2 Estabilidad de la GRSP proveniente de suelos con diferente vegetación
5.5	Conclusiones
5.6	Referencias
	Abundancia natural de <sup>13</sup> C y <sup>15</sup> N en la GRSP de suelos con bosque
do de	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	l centro-sur de Chile
Res	l centro-sur de Chile
Res	umen
Res Abs	tract  Introducción
Res Abs	tract  Introducción
Res Abs	tract  Introducción  Materiales y Métodos
Res Abs	d centro-sur de Chile  umen  tract  Introducción  Materiales y Métodos  6.2.1 Sitio de estudio

6.3 Resultados	
6.4 Discusión	
6.5 Conclusiones	
6.6 Referencias	
Capítulo 7 Conclusiones generales	
Anexo	
Anexo 1	

# Índice de Figuras

Figura 2.1.	Ubicación geográfica del predio San Pablo de Tregua, Provincia de	24
	Panguipulli, en la cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	24
Figura 3.1.	Densidad de micelio de HMA (m cm³ de suelo) a dos profundidades, en	
	cuatro bosques templados y una plantación de P. menziesii, ubicados en	
	condiciones edafo-climáticas similares, en el predio San Pablo de Tregua,	
	Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	43
Figura 3.2.	Abundancia de esporas de HMA por 100 cm <sup>3</sup> de suelo a dos profundidades	
	en cuatro bosques templados y una plantación de P. menziessi, ubicados en	
	condiciones edafo-climáticas similares en el predio San Pablo de Tregua,	
	Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	44
Figura 4.1.	Contenido de EE-BRSP en cuatro bosques templados y en una plantación de	
	P. menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile, a una	
	profundidad de $0-40$ cm.	60
Figura 4.2.	Contenido de BRSP en cuatro bosques templados y en una plantación de <i>P</i> .	
	menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	61
Figura 4.3.	Aporte de BRSP (Mg ha <sup>-1</sup> ) a dos profundidades de suelo en cuatro bosques	
	templados y una plantación de <i>P. menziesii</i> , en la Cordillera de Los Andes,	
	centro-sur de Chile.	62
Figura 4.4.	Aporte de C (%) hecho por las fracciones GRSP, ácidos húmicos y ácidos	
	fúlvicos al C total del suelo, en cuatro bosques templados y en una	
	plantación de P. menziesii en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de	
	Chile.	66
Figura 4.5.	Aporte de N (%) hecho por las fracciones GRSP, ácidos húmicos y ácidos	
	fúlvicos al N total de suelo, en cuatro bosques templados y en una plantación	
	de <i>P. menziesii</i> en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	66
Figura 4.6.	Porcentaje de agregados de suelo estables al agua, en primeros 20 cm de	
C	profundidad, en cuatro bosques templados y una plantación forestal de <i>P</i> .	
	menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	67
Figura 5.1.	Microfotografía electrónica de la pumicita, ceniza volcánica usada en bolsas	
<i>5</i>	de incubación y obtenida del suelo del bosque de San Pablo de Tregua,	
	Provincia de Panguipulli, centro-sur de Chile.	88

Figura 5.2.	Cámaras de incubación de PVC con sustrato de pumicita (café) y arena de	
	cuarzo y vermiculita, en una relación 1:2 (gris), utilizadas para el ensayo	
	experimental in situ en el bosque siempreverde alterado, San Pablo de Tregua,	
	Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	89
Figura 5.3.	Bolsas trampas para incubación en suelo, usadas para la cuantificación de la	
	GRSP en cuatro bosques templados y en una plantación forestal de P.	
	menziessi en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	90
Figura 5.4.	Contenido de GRSP (mg g <sub>sustrato</sub> -1) en cámaras de incubación, con diámetro	
	de 5; 7,5 y 10 cm, y dos sustratos, después de una incubación in situ de 90	
	días, en un bosque siempreverde alterado, en la Cordillera de Los Andes,	
	centro-sur de Chile.	92
Figura 5.5.	Estimación de la acumulación de GRSP (mg g ss) en suelo de los diferentes	
	bosques templados y una plantación de P. menziesii durante un periodo de	
	90 días, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	93
Figura 5.6.	Variación en el contenido EE-GRSP de suelos de cuatro bosques templados	
	y de una plantación de P. menziesii, de la Cordillera de Los Andes, centro-	
	sur de Chile, a dos temperaturas.	94
Figura 5.7.	Variación en el contenido de GRSP en suelos de cuatro bosques templados y	
	una plantación de P. menziesii, de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de	
	Chile, incubados a dos temperaturas.	95
Figura 5.8.	Comparación entre los cambios producidos en las fracciones GRSP y	
	proteína de suelo inmunoreactiva (IR-SP) luego de 400 días de incubación a	
	9°C, en condiciones controladas.	96
Figura 6.1.	Valores de $\delta^{15}N$ en el suelo y la fracción GRSP, a dos profundidades de	
	suelo y en cuatro bosque templados de la Cordillera de Los Andes, centro-	
	sur de Chile.	113
Figura 6.2	Valores de δ <sup>13</sup> C en el suelo y la fracción GRSP, a dos profundidades de	
	suelo y en cuatro bosques templados de la Cordillera de Los Andes, centro-	
	sur de Chile.	114
Figura 6.3.	Valores de $\delta^{13} C$ en el suelo, ácidos húmicos y GRSP, a dos profundidades de	
	suelo, en el bosque templado siempreverde prístino de la Cordillera de Los	
	Andes, centro-sur de Chile.	115

# Índice de Tablas

Tabla 1.1.	Contenido de GRSP en suelos de diferente origen y con distinto uso.	13
Tabla 2.1.	Características físicas y químicas de los suelos $(0 - 20 \text{ cm})$ de profundidad), en cuatro bosques templados y una plantación de $P$ . $menziesii$ , en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	32
Tabla 2.2.	Características de cuatro bosques templados y una plantación de <i>P. menziesii</i> , en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	33
Tabla 3.1.	Caracterización de la biodiversidad vegetal a través de Índices de dominancia (Índice de Simpson), de equidad (Índice de de Shannon-Wiener) y riqueza específica (S'), en cuatro bosques templados y en una plantación de <i>P. menziesii</i> , en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	43
Tabla 3.2.	Correlaciones entre parámetros químicos de suelo, climáticos y vegetacionales, y parámetros fúngicos de los cuatro bosques templados y la plantación de <i>P. menziesii</i> , en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	45
Tabla 4.1.	Contenido de proteína de suelo inmunoreactiva (IRSP) (mg g <sup>-1</sup> ) en cuatro bosques templados y en una plantación de <i>P. menziesii</i> , en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	62
Tabla 4.2.	Contenido de materia orgánica y las fracciones GRSP, ácidos húmicos y fúlvicos (mg $g_{ss}^{-1}$ ) a $0-20$ cm y $20-40$ cm de profundidad, en cuatro bosques templados y en una plantación de <i>P. menziesii</i> , en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	63
Tabla 4.3.	Contenido de C y N (%) en GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, a dos profundidades de suelo en cuatro bosques templados y en una plantación de <i>P. menziesii</i> de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.	65

Tabla 4.4.	Coeficientes correlación de algunos parámetros de suelo y fúngicos con las
	fracciones de materia orgánica BRSP fácilmente extraíble (EE-BRSP),
	BRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, en cuatro bosques templado y
	una plantación de P. menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur
	de Chile.

68

Tabla 5.1. Concentración de metales en GRSP extraída a dos profundidades de suelo provenientes de cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

97

#### Abreviaturas y símbolos usados en el texto

AF: ácidos fúlvicos AH: ácidos húmicos

Al: aluminio

BSA: Suero de albumina bovina

C: carbono

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

Cu: cobre

CWD: coarse woody debris

ECM: ectomicorrizas

EE-BRSP: Easily extractable BRSP EE-GRSP: Easily extractable GRSP

ELISA: Enzyme link immunosorbent analysis

EEUU: Estados Unidos

Fe: hierro

GRSP: Glomalin related to soil protein

H: hidrógeno

HCl: ácido clorhídrico HF: ácido fluorhídrico

HMA: hongos micorrícicos arbusculares

INT: iodonitrotetrazolio

IRSP: immuno reactive soil protein

MA: micorrizas arbusculares

Mn: manganeso

MOS: materia orgánica del suelo

N: nitrógeno

NADH: adenina nicotinamida dinucleótico reducido

NaOH: hidróxido de sodio

ORG: plantación forestal de P. menziesii

P: fósforo

PVC: polivinil carbonato RC: renoval caducifolio

RCM: renoval caducifolio con manejo forestal

S: azufre

SV: bosque siempreverde prístino

SVA: bosque siempreverde alterado

Zn: zinc

# Capítulo 1

# Antecedentes generales

#### Resumen

Una función ecosistémica se define como la capacidad de ciertos procesos y componentes naturales de proveer bienes y servicios que satisfacen las necesidades de los seres humanos de manera directa e indirecta. Los ecosistemas boscosos, especialmente los bosques templados, constituyen la principal fuente fijadora de C. En estos bosques, además de la biomasa viva, otras forma de aporte a la materia orgánica del suelo (MOS) lo constituyen el material leñoso muerto, la hojarasca y la biomasa radical. La glomalina, definida metodológicamente como glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP), es producida por los hongos micorrícos arbusculares (HMA). Estos hongos obtienen todo el carbono (C) necesario para su desarrollo de la planta hospedera. Muchas de las especies del los bosques templados de América del Sur presentan esta asociación con HMA. Sin embargo, el aporte que el bosque hace a través de la simbiosis con HMA no está considerado y puede llevar a subestimar el aporte que hace al momento de estimar un balance de C. El contenido de GRSP es variable de acuerdo al ecosistema de origen, pero los niveles más altos han sido registrados en suelos con bosque nativo. Con estos antecedentes, se plantearon cuatro hipótesis. (1) Los eventos disruptivos producen cambios en la diversidad y dominancia de las especies vegetales que pertenecen a un ecosistema determinado. Lo que a su vez, altera la abundancia de los hongos micorrícicos arbusculares presentes. (2) La cantidad de C contenido en la GRSP corresponde a la fracción más importante del C orgánico total del suelo, obtenidas en un fraccionamiento químico, en diferentes sucesiones del bosque templado y una plantación de P. menziesii en la Cordillera de Los Andes. (3) Bosques siempreverdes presentan una gran diversidad de especies vegetales que establecen asociaciones simbióticas con HMA, por lo que deberían presentar una mayor cantidad de GRSP que un renoval caducifolio de *Nothofagus*, ya que este género sólo forma simbiosis con hongos ectomicorrízicos. Ambas tipos de bosque presentarán un contenido de GRSP más alto que una plantación monoespecífica de P. menziesii, especie caracterizada por establecer simbiosis con hongos ectomicorrízicos y presentar una nula diversidad de especies vegetales en el sotobosque. (4) El manejo forestal del bosque nativo favorece el crecimiento de los mejores individuos y de las especies del sotobosque, lo que permite un aumento del contenido de GRSP del suelo.

**Palabras claves:** Funciones ecosistémicas, bosques templados, *Pseudotsuga menziesii*, secuestro de carbono, GRSP.

#### Abstract

Ecosystem functions are defined as the capacity of natural processes and components to provide goods and services that satisfy human needs, directly or indirectly. Forest ecosystems, specially temperate forests, are a major carbon (C) sink. The input to soil organic matter (SOM) in these forests are coarse woody debris, leaf litter and root biomass, besides the living biomass. Glomalin, defined methodically as glomalin related to soil protein (GRSP), is produced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). These fungi obtain all the C that they need from the host plant. Many species in the temperate forests of South America have association with AMF. Nonetheless, the forest contribution through AMF symbiosis is not considered and can underestimate the contribution of forest in a C balance. The amount of GRSP changes according to the ecosystem, but the highest level have been found in native forest soil. With these data, four hypothesis were formulated. (1) Disruptive events cause changes in diversity and dominance of vegetal species in a determine ecosystem, which leads to change in the AMF density. (2) The amount of C in the GRSP is the major fraction of total organic C in soil, from a chemist fractionation, in different successions of temperate forest and a Pseudotsuga menziesii plantation in the Los Andes Mountains. (3) Evergreen forests have a high diversity of vegetal species that have symbiotic association with AMF. Then, they should have a bigger amount of GRSP that a Nothofagus deciduous secondary forest, which has symbiosis with ectomycorrhizal fungi. The temperate forests should have more GRSP than a monospecific plantation of *P. menziesii*, which is characterized for having symbiosis with ectomycorrhizal fungi and does not have understory. (4) Forest management of native forests increase the growth of best trees and understory species and that can increase the amount of GRSP in soils of these forests.

**Key words:** Ecosystem functions, temperate forest, *Pseudotsuga menziesii*, carbon sequestration, GRSP.

#### 1.1 Introducción

Una función ecosistémica se define como la capacidad de ciertos procesos y componentes naturales de proveer bienes y servicios que satisfacen las necesidades de los seres humanos de manera directa e indirecta (Norberg 1999; de Groot *et al.* 2002). Los bienes y servicios generados por los bosques templados pueden tener una enorme importancia medio ambiental a nivel local y global, así como un significativo impacto económico (Nahuelhual *et al.* 2007). De acuerdo a de Groot *et al.* (2002), las funciones sostenidas por el ecosistema pueden ser clasificadas en cuatro categorias:

- Regulación, se refiere a la mantención de los procesos esenciales y soporte para la biocenosis.
- Hábitat, provee un medioambiente para el crecimiento y reproducción de plantas, animales, hongos y microorganismos en general.
- Producción, donde a través de la energía solar ocurre la fijacion del CO<sub>2</sub> para ser transformada en alimento y oxígeno, materia prima, recursos genéticos y medicinales.
- Información, genera espacios para el aprendizaje, la recreación y el desarrollo cognocitivo.

Los bosques tienen una función importante dentro del ciclo global del carbono (C), ya que el C contenido en los ecosistemas forestales representa el 80% de todo el C sobre la superficie terrestre y más de un 70% de todo el C orgánico del suelo (Batjes 1996). Pero un aumento en la respiración del suelo, producto del incremento en la temperatura podría aumentar las emisiones de CO<sub>2</sub> desde estos ecosistemas (Jandl *et al.* 2007).

Una de las medidas para mitigar el cambio climático es favorecer el secuestro de C en ecosistemas forestales, ya que los bosques tienen una mayor densidad y capacidad de fijación de C que otros tipos de ecosistemas terrestres. (Bolin *et al.* 2000; Davis *et al.* 2003), y desarrollar estrategias de manejo silvicultural adecuadas, que tiendan a aumentar las fracciones más estables de la materia orgánica del suelo (MOS) (Jandl *et al.* 2007).

De los ecosistemas boscosos, los bosques templados constituyen la principal fuente fijadora de C (Grove 2001). En estos bosques, además de la biomasa viva, el material leñoso muerto tanto sobre como bajo el suelo (detrito leñoso) provee un aporte significativo de materia orgánica (MO) al suelo y representa un importante reserva de C en el ecosistema (Harmon *et al.* 1986), el cual puede permanecer en un ecosistema por más de mil años (Stevens 1997). Además, este material es un componente relevante para la diversidad estructural de los bosques, para la dinámica de nutrientes y MO, para el proceso de regeneración, como hábitat para insectos, hongos y microorganismos (Lara

*et al.* 2003), y una fuente de nutrientes para los ecosistemas boscosos y acuáticos interconectados (Harmon *et al.* 1994; Stewart y Burrows 1994; Stevens 1997).

La hojarasca y el material leñoso grueso (troncos y ramas) constituyen el principal aporte de materia orgánica y nutrientes al suelo. La acumulación de restos orgánicos en la superficie del suelo (mantillo) posee una estructura y composición característica en cada ecosistema. Un alto ingreso de litera mejora la estructura del suelo y su capacidad de retener humedad, condición básica para el potencial productivo de un bosque (Stevens 1997). Este material leñoso grueso tiene fases de degradación, cuya duración varía con la zona biogeoclímatica, el tipo de alteración, las condiciones de humedad y los organismos descomponedores asociados (Stevens 1997), y puede permanecer en el bosque durante décadas (Harmon y Sexton 1996).

La producción de hojarasca (litera fina) para bosques templados de Chile, fluctúa entre 1,7 y 7,3 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>(Donoso 1992; Pérez *et al.* 1998; Leiva y Godoy 2002). La economía de nutrientes tiene un rol preponderante en plantas adaptadas a sitios de baja fertilidad, donde una de las estrategias consiste en minimizar el contenido de nutrientes en las hojas, previo a la absición (Eckstein *et al.* 1999). Pérez *et al.*(1998) estiman que la hojarasca aporta de 10,7 a 22,6 Kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, en bosques dominados por *Fitzroya* y *Nothofagus*, respectivamente. La calidad de la hojarasca en bosques de *N. betuloides* es pobre en nutrientes, con una muy alta relación C/N (Leiva y Godoy 2002)

El material leñoso muerto grueso (CWD: coarse woody debris) constituye el componente más masivo de todo el detrito muerto sobre el suelo. Sin embargo, el suelo forestal y los horizontes superiores del suelo mineral de estos bosques, también constituyen importantes reservorios de C. En bosques templados de Chile, la biomasa radical fina es de 8,6 y 17,2 Mg ha<sup>-1</sup> para *N. pumilio* y *N. betuloide*, respectivamente (Godoy y Opitz 1998). El conocimiento acerca de la distribución (frecuencia y abundancia) de las raíces de las plantas de un ecosistema permite una mejor comprensión del funcionamiento ecosistémico, especialmente sobre los flujos de agua y nutrientes (Canadell *et al.* 1996; Jackson *et al.* 1996). La profundidad de enraizamiento tiene gran importancia para el balance hidrológico del ecosistema, como también para el ciclo del C y nutrientes en general (Jackson *et al.* 1996). En ecosistemas boscosos templados, caracterizados por suelos de pH ácido y de baja fertilidad, el horizonte orgánico constituye la mayor fuente de nutrientes en el suelo y con una alta densidad de raíces finas, aproximadamente un 70% de la biomasa en los primeros 30 cm de profundidad (Godoy y Opitz 1998).

Antecendes científicos de varias décadas permiten hoy en día desarrollar estrategias de manejo silvícola en diversos tipos forestales chilenos (Donoso y Lara 1998). El manejo adecuado de los ecosistemas forestales, que incluyen el manejo territorial, debieran estar orientados a obtener bienes madereros, no madereros y servicios ecosistémicos, incluyendo la regulación de los regímenes hidrológicos y la adecuada protección de la diversidad biológica (Franklin 1995; Lara 1996). Es así como es necesario impulsar manejos silviculturales de cubierta contínua y de composición mixta, de tal manera que se pueda reducir la erosión, la pérdida de nutrientes y de la microbiocenosis del suelo, causantes de la disminución de la productividad boscosa y de la pérdida de servicios ecosistémicos (Lara *et al.* 2003).

La glomalina es una glicoproteína producida por los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Wright et al. 1996). Se encuentra en el suelo, recubriendo esporas, hifas y en raíces con arbúsculos (Treseder y Turner 2007). La fracción que se obtiene desde el suelo está definida metodológicamente como glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP) (Rillig 2004). Corresponde a una fracción de la materia orgánica del suelo abundante y diferente de los ácidos húmicos y fúlvicos (Nichols 2003a; Lovelock et al. 2004a), que se caracteriza por estar presente en diversos ecosistemas y presentar una gran adhesividad, como también resistencia a la degradación (Haddad y Sarkar 2003). Su relación con los HMA, ha sido objeto de numerosos estudios, sobre todo por su participación en el almacenamiento de C. La simbiosis con HMA, es la más abundante y de mayor distribución en todos los ambientes terrestres, ya que aproximadamente dos tercios de las especies vegetales forman esta asociación (Newsham et al. 1995), obteniendo todo el C necesario de su hospedero (Fitter et al. 2000). Se estima, que tienen una gran capacidad para secuestrar C en forma indirecta, debido a la baja tasa de degradación de sus productos (Rillig et al. 2001b) y a su participación destacada en la estabilidad de los agregados del suelo (Miller y Jastrow 1990; Rillig et al. 2002a; Rillig 2004; Rillig y Mummey 2006). A los HMA se les atribuye un rol clave en numerosos fenómenos que determinan la estructura y dinámica de una comunidad, influyendo en el funcionamiento de un ecosistema (Newsham et al. 1995; Van der Heijden et al. 1998), y en la capacidad de las plantas para responder a cambios ambientales (Fitter et al. 2004). Los HMA normalmente incrementan la fotosíntesis del hospedero y utilizan una fracción importante de la producción primaria neta (Bago et al. 2000), favoreciendo el secuestro de carbono al aumentar la producción primaria neta (Allen 1991; Zhu y Miller 2003).

Muchas de las especies vasculares en los bosque templados del sur de América del Sur, presentan micorrizas arbusculares (Carrillo *et al.* 1992; Godoy *et al.* 1994; Castillo *et al.* 2006). Sin embargo,

el aporte del bosque al secuestro de carbono a través de la simbiosis con HMA, no está considerado y puede llevar a subestimar su capacidad de secuestrar este elemento al momento de estimar un balance del carbono. Sin embargo, el descubrimiento de la GRSP como producto relacionado a los HMA puede cambiar este escenario y servir de estimador del aporte de los HMA al carbono del suelo. Los altos niveles de GRSP encontrados en suelos de bosques tropicales en Hawaii >100 mg g<sup>-1</sup> suelo (Rillig *et al.* 2001b) y templados de Chile (Seguel *et al.* 2008), y la importancia que se le ha atribuido a los bosques en el secuestro de carbono, hace necesario determinar el rol que tiene el carbono contenido en la glomalina dentro de la fracción de carbono orgánico total del suelo, así como determinar su importancia en funciones de los ecosistemas forestales.

#### 1.2 Bosques templados de Chile

En el mundo, los bosques templados se encuentran en latitudes superiores a los 30° en ambos hemisferios, entre el nivel del mar y el límite arbóreo de las montañas (Armesto *et al.* 1995; Quintanilla 2001). Si bien estos bosques son menos diversos que los bosques tropicales, tienen una gran importancia por su extensión y alta productividad, que es similar a la de muchos bosques tropicales.

En Chile, el bosque templado se ubica entre el río Maule (35° S) y Tierra del Fuego (55° S) (Armesto *et al.* 1994), y representa aproximadamente un tercio del total de bosques templados prístinos que existen en el mundo (Neira *et al.* 2002; Wilson *et al.* 2005), con un importante significado genético, fitogeográfico y ecológico. El clima de la región, se caracteriza por presentar bajas temperaturas invernales, lo que muchas veces limita el crecimiento de los bosques. Debido a la geografía del país, el bosque templado del sur de América del Sur ha tenido un prolongado aislamiento, que se refleja en un alto endemismo de la biota, y una baja diversidad de especies de vertebrados, como es el caso de las aves frugívoras (Armesto *et al.* 1995).

Los bosques australes se caracterizan por presentar algunas formas de vida raras o ausentes en otros bosques templados, como son enredaderas y epífitas, y una gran diversidad de musgos y líquenes (Rozzi *et al.* 2008). Además, existe una dominancia de angiospermas sobre gimnospermas, a diferencia de muchos bosques en el hemisferio norte. Del total de especies presentes, existen 28 géneros endémicos, que representa aproximadamente un 34% del total de las especies (Arroyo *et al.* 1995).

El clima se caracteriza por una fuerte influencia marítima, que regula las temperaturas (Veblen *et al.* 1983), excepto en los sectores más altos de las montañas, y por presentar precipitaciones limpias de contaminación antropogénica (Armesto *et al.* 1995; Hedin *et al.* 1995; Oyarzún *et al.* 2004; Huygens *et al.* 2007; Huygens *et al.* 2008).

En Chile, aproximadamente 13,5 millones de hectáreas están cubiertas con bosques nativos, de las cuales el tipo forestal siempreverde es el más extenso, con una cobertura superior al 31% de la superficie total del bosque nativo nacional. El tipo forestal coigüe- raulí-tepa ocupa una superficie aproximada de 560.000 hectáreas (CONAF-CONAMA 1999). Ambos tipo forestales se caracterizan por tener un dosel con una alto grado de estratificación (Schlegel y Donoso 2008). Estos tipos forestales, en la Cordillera de Los Andes, son los más productivos y valiosos desde un punto de vista comercial, tanto por la superficie que cubren como por el alto valor maderero y/o el buen mercado de varias de sus especies.

#### 1.2.1 Amenazas sobre el bosque nativo

El bosque nativo chileno ha sufrido constantes alteraciones naturales a través de su historia, debido a erupciones volcánicas, terremotos, deslizamientos de tierra, principalmente (Veblen *et al.* 1977; Veblen *et al.* 1980; Veblen 1995) y en los últimos 200 años ha sido sometido a fuertes cambios por la acción antrópica (Echeverría *et al.* 2007). Si bien las catástrofes naturales inciden en que el bosque no se encuentre en un estado estable, la acción del hombre ha llevado a una seria destrucción del bosque templado en el centro-sur de Chile. Se ha producido un gran reemplazo del bosque nativo por especies exóticas, eliminación del bosque para aumentar la superficies de tierras agrícolas, lo que ha llevado también, a la fragmentación del bosque (Echeverría *et al.* 2007) y a un aumento en el riesgo de la invasión de especies alóctonas (Armesto *et al.* 2009). Debido a esto, la superficie que aún permanece con bosque nativo a los 35°S es menor al 1% (Región del Maule) y alrededor del 32% en la región Valdiviana (40° S) (Armesto *et al.* 2009).

Otra amenaza importante es el uso del bosque para combustible. El uso selectivo de algunas especies vegetales, tiene asociada una pérdida en la calidad del bosque, aparecen especies de menor valor comercial, impidiendo que se alcancen estados sucesionales avanzados y se genera una pérdida en la biodiversidad (Armesto *et al.* 2009).

Como consecuencia de la pérdida de los bosques nativos maduros, se ha producido una reducción la capacidad de almacenar carbono (C) (Harmon *et al.* 1990). Si bien, las plantaciones de rápido crecimiento, o bosques en estados se sucesión primaria, pueden acumular C rápidamente, su importancia en el largo plazo es limitado, ya que los periodos de rotación son cortos (Harmon *et al.* 1990).

Finalmente, los incendios forestales, en su mayoría causados por descuidos humanos, son otra seria amenaza para el bosque nativo en el centro-sur de Chile (Armesto *et al.* 2009).

#### 1.2.2 Manejo silvicultural del bosque templado

De acuerdo a Jandl *et al.* (2007), el manejo de bosques puede producir un aumento en el secuestro de C. Sin embargo, diferentes experimentos han encontrado resultados heterogéneos respecto a los efectos de las actividades del manejo forestal sobre el secuestro de C (Post y Kwon 2000).

Una de las técnicas de manejo utilizadas en los bosques es el raleo. En el largo plazo, el raleo de los bosques tiene escasos efectos sobre el secuestro de C (Hyvönen *et al.* 2007). El objetivo principal es el incremento radial y no maximizar el secuestro de C. Se producen cambios en el microclima, que favorecen momentáneamente la descomposición de la litera. Por otra parte, se reduce el aporte de litera y de C al suelo (Jandl *et al.* 2007). En experimentos realizados en Austria y Noruega, se observó una disminución en el C del suelo, independiente de la intensidad de raleo (Jandl *et al.* 2007). Parece no haber resultados consistentes del efecto de las diferentes técnicas de manejo forestal sobre la fracción de C en el suelo, ya que se han obtenido tanto aumentos como disminuciones, pero la fertilización con N generalmente tiene un efecto positivo en la acumulación de C en el suelo (Hyvönen *et al.* 2007), ya que retardaría la descomposición de la MOS recalcitrante, al suprimir las enzimas lignolíticas de los microorganismos del suelo. El nitrógeno estimula la descomposición de la materia orgánica más fresca, pero suprime la del humus (Jandl *et al.* 2007). Esto concuerda con los resultados obtenido por Vesterdal *et al.* (2002), quienes encontraron una mayor capacidad de almacenamiento de C en suelos más fértiles.

Estudios realizados en bosques templados lluviosos han demostrado que bosques mixtos, estratificados, mejoran la producción de madera gracias a la distinta tolerancia a la luz de las especies arbóreas (Donoso y Lusk 2007).

Por otra parte, se ha observado que los bosques degradados son capaces de secuestrar más C y N en el suelo que bosques manejados, lo que genera un conflicto entre los objetivos de secuestro de carbono y manejo del bosque (Jandl *et al.* 2002).

#### 1.3 Micorrizas y el bosque templado

Muchos bosques que se desarrollan en suelos con limitación de nutrientes, como nitrógeno y fósforo, son capaces de crecer en estas condiciones gracias a una estrecha relación con hongos micorrícicos (Perry 1994). Es así, como en condiciones naturales las coníferas forman siempre micorrizas. De las más de 6500 especies de angiospermas que han sido estudiadas, el 70% forman simbiosis y un 12% parece ser micorrícico-facultativo (Trappe 1987). La importancia de las micorrizas para algunas especies arbóreas ha sido demostrada al no ser capaces de crecer adecuadamente o de sobrevivir en ausencia del hongo simbionte adecuado. Por otra parte, se ha considerado que una comunidad de hongos micorrícicos débil puede estar relacionado con la degradación del paisaje y/o los efectos de la contaminación sobre el bosque (Perry 1994).

De los diferentes tipos de micorriza, las más abundantes son ectomicorrizas (ECM) y micorrizas arbusculares (MA). Las ECM predominarían en ecosistemas forestales (Read 1991; Perry 1994), con una acumulación superficial de litera, a altitudes y latitudes intermedias (Allen 1991). Muchas de las especies que se encuentran en los bosques templados forman asociaciones con hongos ectomicorrícicos, como por ejemplo las familias *Pinaceae, Fagaceae, Myrtaceae* y *Betulaceae*. (Palfner 2001).

De acuerdo a la distribución planteada por Read (1991), las micorrizas arbusculares predominarían en suelos minerales, donde la disponibilidad de N inorgánico no es la principal limitante, estableciendo simbiosis con especies herbáceas, principalmente. La gran mayoría de las especies vegetales forma micorrizas arbusculares, incluyendo especies de los bosques tropicales (Janos 1980; Zangaro et al. 2000), de los bosques templados (Godoy y Mayr 1989; Carrillo et al. 1992) y algunas coníferas (Perry 1994), así como especies del sotobosque, arbustivas, herbáceas epífitas y helechos del bosque templado lluvioso (Castillo et al. 2006). En bosques templados, es común encontrar tanto ECM como MA en árboles como arbustos. Algunas familias de especies arbóreas que establecen simbiosis con HMA en el bosque templado del sur de Sudamérica, son Monimiaceae, Myrtaceae, Podocarpaceae, Aetoxicaceae, Asteraceae, Winteraceae, Eucryphiaceae, Celastraceae, Cunoniaceae (Castillo et al. 2006) y Cupresaceae (Godoy y Mayr 1989; Fontenla et al. 1998).

El estudio de la dependencia de HMA de los bosques templado lluviosos del cono Sur de América no ha sido muy desarrollado y existen pocos trabajos al respecto (Godoy y Mayr 1989; Carrillo *et al.* 1992; Fontenla *et al.* 1998; Castillo *et al.* 2006).

#### 1.4 Glomalina asociada a las proteínas de suelo (GRSP)

La glomalina es una abundante glicoproteína producida por los HMA, pertenecientes al phylum Glomeromycota (Wright *et al.* 1996). A medida que el micelio deja de ser funcional, la glomalina es depositada y acumulada en el suelo (Driver *et al.* 2005), por lo que es posible de encontrar en las paredes de las hifas (Wright y Upadhyaya 1996; Driver *et al.* 2005), recubriendo esporas, en raíces y en agregados de suelo colonizadas por HMA (Wright y Upadhyaya 1999; Comis 2002). Debido a que es extraída desde el suelo, ha sido definida metodológicamente como glomalina asociada a las proteínas de suelo (GRSP) (Rillig 2004). Esta fracción de la MOS se caracteriza por ser de color café rojizo, que se debe a la asociación con hierro (Fe).

La metodología para obtener la GRSP consiste en un extracción en autoclave con una solución de citrato de sodio (Wright *et al.* 1996; Wright y Upadhyaya 1998). De acuerdo a la concentración y pH de la solución de citrato y al tiempo sometido a calor, es posible diferenciar dos fracciones. Una fracción fácilmente extraíble (EE-GRSP) se obtiene al usar citrato de sodio 20 mM a pH 7.0 y extraer en autoclave por 30 minutos a 121°C. La segunda fracción corresponde a la máxima cantidad de GRSP que se puede extraer usando citrato de sodio 50mM a pH 8.0, en ciclos sucesivos de 60 min en autoclave a 121°C, hasta que el sobrenadante quede de color amarillo pálido (Wright y Upadhyaya 1998; Nichols 2003a).

A pesar de la numerosa investigación realizada desde su descubrimiento en 1996 (Wright *et al.* 1996; Wright y Upadhyaya 1996), los principales factores que controlan su distribución y acumulación en los ecosistemas son pocos claros, así como su bioquímica (Rillig 2005).

#### 1.4.1 Características de la glomalina extraída del suelo

La GRSP se caracteriza por ser una glicoproteína insoluble, resistente a la degradación por calor y enzimas proteolíticas, lo que sugiere que se trata de una macromolécula muy estable (Haddad y Sarkar 2003; Nichols 2003a). Además, posee una gran adhesividad. Estas propiedades hacen que sea un constituyente importante de la materia orgánica del suelo (Lovelock *et al.* 2004a).

Esta glicoproteína tiene una composición elemental de C, N e H diferente a la de ácidos húmicos y fúlvicos. A medida que aumenta la edad de la GRSP, disminuye el contenido de C y N. Sin embargo, el contenido de H permanece constante, alrededor de 4,1 a 4,5 %. El contenido de C fluctúa entre un 40% y 30% en GRSP recién producida y más antigua, respectivamente (Nichols 2003a; Lovelock *et al.* 2004a). El porcentaje de N varía de 5% a un 3% en GRSP recién producida y más antigua, respectivamente (Lovelock *et al.* 2004a). La GRSP se caracteriza por poseer un contenido importante de Fe, el que fluctúa desde 0,8 a 8,8% (Wright y Upadhyaya 1998; Rillig *et al.* 2001b). Este porcentaje puede aumentar con el tiempo, ya que el hierro no es un componente importante en la glomalina extraída de las hifas (< 0,3% de Fe) (Rillig *et al.* 2001b; Nichols 2003a).

A través de electroforesis, se observó que la glomalina extraída del suelo, tiene un perfil similar al de la glomalina extraída desde micelio de los HMA (Wright *et al.* 1996; Wright *et al.* 1998), donde se ha sugerido que la molécula tiene una función directa en el ciclo de vida del hongo. Entre ellas, se ha mencionado la protección contra patógenos, disminución de la pérdida de agua y nutrientes durante el transporte de substancias hacia la planta (Nichols 2003b) y por último, reducción de la palatabilidad de las hifas, por la biota del suelo (Driver *et al.* 2005).

#### 1.4.2 Niveles de la GRSP en diferentes ecosistemas

Nichols (2003a) registró que la GRSP es la principal fracción de la materia orgánica del suelo (MOS), ya que la mayor cantidad de glomalina se encuentra recubriendo la superficie de las hifas de los HMA, y el largo total de hifas en el suelo puede llegar a 2000 m g<sup>-1</sup> de suelo (Emhart y Kjoller 1987; Bardgett 1991; Miller *et al.* 1995).

Nichols (2003a) encontró niveles de GRSP cercanos al 20% del C orgánico del suelo en EEUU, mientras que Rillig *et al.* (2003) estimaron que el aporte de la GRSP al carbono orgánico del suelo variaba entre 3,8 y 7,8%. Al considerar la profundidad, las concentraciones de la glicoproteína disminuyen, independiente del uso de suelo (Rillig *et al.* 2003).

Tabla 1.1. Contenido de GRSP en suelos de diferente origen y con distinto uso.

Suelo	Concentración de GRSP (mg g <sup>-1</sup> suelo)	Referencia
Suelos forestales de EEUU	4,4 – 14,8	(Wright et al. 1996)
Suelos agrícolas , Texas, EEUU	2	(Wright y Anderson 2000)
Suelos agrícolas, Chile	1,8 - 3,6	(Borie et al. 2000)
Suelos con bosque templado de <i>Quercus-Carya</i> , Ohio,EEUU	1,3	(Knorr et al. 2003)
Suelos con bosque de <i>Nothofagus</i> , Región de la Araucanía, Chile	27 – 46	(Seguel et al. 2008)
Suelos expuestos a elevado CO <sub>2</sub> ,Nueva Zelanda.	7	(Rillig et al. 2000)
Suelo con bosque templado, Cordillera de Piuché, Chile	$4,9^*$	(Treseder y Turner 2007)
Suelos con bosque templado, Carolina del Norte, EEUU.	5,8*	(Treseder y Turner 2007)
Praderas semiáridas, Nuevo México, EEUU	0,25-0,55	(Bird et al. 2002)
Suelos de bosques tropicales, Hawaii, EEUU.	> 100	(Rillig et al. 2001b)
Suelos de bosque tropical La Selva, Costa Rica	3,9ª	(Lovelock et al. 2004a)
Suelos con bosque de <i>Pinus ponderosa</i> , Montana, EEUU	1,2 – 3,0	(Steinberg y Rillig 2003)

<sup>\*</sup> indica concentraciones de GRSP inmunoreactivas.

#### 1.4.3 Descomposición de la GRSP

Los contenidos de GRSP encontrados en el suelo, son el resultado de la producción y descomposición de esta glicoproteína. Diferentes condiciones medioambientales pueden favorecer alguno de los dos procesos de manera independiente (Rillig 2004).

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> concentración expresada en mg cm<sup>-3</sup> de suelo.

Ensayos de incubación de suelo, han permitido determinar que aproximadamente el 50% de la GRSP, permanecen en el suelo después de un periodo de incubación de suelo mayor a un año, indicando que una porción pertenece a la fracción recalcitrante de C (Rillig *et al.* 2003). Halvorson y Gonzalez (2006), observaron pequeñas disminuciones en el contenido de GRSP (< 10%) después de una incubación de 395 días. A pesar de que la GRSP tiene una lenta descomposición en el suelo, existe una pequeña fracción más lábil, lo que podría relacionarse con los cambios estacionales observados (Lutgen *et al.* 2003).

Lovelock *et al.* (2004a) observaron que en los suelos del bosque tropical de Costa Rica, los altos niveles de GRSP eran comparables a suelos agrícolas y praderas nativas de regiones templadas (Wright y Upadhyaya 1998; Rillig *et al.* 1999); sin embargo, los niveles de GRSP inmunoreactiva encontrados en los bosques de Costa Rica, son de los más altos registrados, sugiriendo una rápida descomposición y evitando una acumulación a los niveles registrados en loa suelos tropicales de Hawaii (Rillig *et al.* 2001b). Estos resultados sugieren que la descomposición de la GRSP se ve favorecida en suelos más fértiles. Steinberg y Rillig (2003), plantean que existe una degradación parcial que disminuye la adsorción de la GRSP a las partículas del suelo, aumentando su solubilidad.

#### 1.4.4 Factores relacionados con los niveles de GRSP en el suelo

Uno de los factores que primero se debe considerar, es la capacidad para producir glomalina de las distintas especies de HMA (Wright *et al.* 1996; Wright *et al.* 1998; Lovelock *et al.* 2004b). Experimentos realizados con diferentes especies de HMA, mostraron que *Gigaspora* spp. puede producir más proteína por miligramo de hifa que *Glomus* spp (Wright *et al.* 1996). Además, la cantidad de glomalina obtenida puede ser afectada por factores ambientales (Rillig y Steinberg 2002).

Las especies de HMA presentan respuestas diferentes al estar en asociación con hospederos distintos (Bever *et al.* 1996; Klironomos 2003), con distintas tasas y formas de colonización (Hart *et al.* 2001; Klironomos *et al.* 2004), y así, diferentes necesidades por carbono del hospedero (Klironomos *et al.* 2004). Esto podría explicar el amplio rango de resultados obtenidos por diferentes investigadores (Borie *et al.* 2000; Rillig *et al.* 2002a; Lutgen *et al.* 2003; Lovelock *et al.* 2004b) y la falta de correlación en otros casos (Augé *et al.* 2003).

Otro factor importante a considerar, es la disponibilidad de plantas hospederas. Knorr *et al.*(2003) encontraron una correlación positiva entre proteínas de suelo inmunoreactivas (IRSP) y la densidad y diversidad de especies hospederas de HMA. Lutgen *et al.* (2003) y Treseder y Cross (2006) señalan una disminución de la GRSP, al disminuir la biomasa de raíces finas. La producción primaria neta, puede poner un límite a la disponibilidad de C a las MA para la biosíntesis de glomalina (Treseder y Turner 2007).

La fertilidad de suelo está muy relacionada con la concentración de GRSP. Altas concentraciones de calcio, fósforo y potasio ha sido relacionado con bajas concentraciones de GRSP (Lovelock *et al.* 2004a). Por el contrario, suelos menos fértiles, con una alta relación C:N, alta disponibilidad de aluminio y hierro disponible, se relacionan con altas concentraciones de GRSP. El hierro parece ser un factor importante en la estabilización de la glicoproteína (Nichols 2003a; Staunton *et al.* 2008). Diferentes estudios han encontrado una correlación negativa entre pH y GRSP (Wright y Upadhyaya 1996; Haddad y Sarkar 2003; Rillig *et al.* 2003).

Otros factores que también han sido correlacionados con la acumulación de GRSP, es el contenido de materia orgánica (Wright y Upadhyaya 1998; Bird *et al.* 2002; Borie *et al.* 2002), el contenido de arcillas (Haddad y Sarkar 2003; Nichols y Wright 2005) y disponibilidad de nitrógeno (DeMars y Boerner 1995; Knorr *et al.* 2003; Rillig *et al.* 2003).

El clima ha sido mencionado como un factor de gran importancia (Wright y Upadhyaya 1996; Rillig *et al.* 2001a). Así también, se ha observado que el tipo de régimen de humedad determina la acumulación de GRSP en el suelo (Knorr *et al.* 2003).

#### 1.4.5 Rol de GRSP en el secuestro de carbono del suelo

La GRSP cumple un rol directo en el secuestro de carbono, a través del C contenido en la molécula y que es de lenta degradación, y otro indirecto, al participar en la formación de agregados de suelo estables al agua (Rillig *et al.* 2002b). Ella puede secuestrar importantes cantidades de C y N a escala global (Treseder y Allen 2000; Treseder *et al.* 2003; Treseder y Turner 2007).

Trabajos previos al descubrimiento de la GRSP, habían señalado la importancia de los HMA en la formación de agregados de suelo (Miller y Jastrow 1992; Jastrow *et al.* 1998). Desde 1979, se ha descrito una correlación positiva entre la biomasa del micelio extraradical y el porcentaje de

agregados de suelo estables al agua (Tisdall y Oades 1979). GRSP, como producto de los HMA, también ha sido positivamente correlacionado con la agregación de suelo, que de esta forma protege a la materia orgánica, de una rápida degradación (Wright y Upadhyaya 1996; Wright y Upadhyaya 1998; Wright y Anderson 2000; Rillig y Steinberg 2002; Rillig *et al.* 2002a; Rillig *et al.* 2002b).

# 1.5 Relación de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) con la GRSP

La cuantificación de la GRSP está basada en la reactividad del extracto de suelo al reactivo de Bradford o al anticuerpo monoclonal 32B11. El anticuerpo fue desarrollado a partir de esporas de *Glomus intraradices* FL208 y se probó sobre extractos de diferentes hongos, no encontrándose reacción significativa fuera de los HMA (Wright *et al.* 1996).

En un principio, se planteó como hipótesis que la metodología de extracción, basada en el uso de buffer citrato y calor, era capaz de destruir todas las proteínas excepto la glomalina, producto de la expresión de uno o varios genes en los HMA (Rillig 2004) por lo que la cuantificación por medio de la metodología de Bradford sólo se referiría a la glomalina. Sin embargo, Rosier *et al.* (2006), observaron que tanto el suero de albúmina bovina (BSA), de tamaño similar que la glomalina, y la mezcla de proteínas con compuestos fenólicos, contenidos en la litera, no eran eliminados en el proceso de extracción. Estos compuestos fueron detectados con la metodología de Bradford, sobreestimando su cantidad (Halvorson y Gonzalez 2006; Rosier *et al.* 2006; Schindler *et al.* 2007; Whiffen *et al.* 2007) y por otra parte, generan interferencia en la prueba de ELISA. La co-extracción de proteínas y ácidos húmicos ya había sido reportada por Nichols y Wright (2005).

Sin embargo, Schindler *et al.* (2007) observaron que existe una correlación directa entre el contenido cuantificado por Bradford y por la técnica de ELISA, indicando la eficacia de la metodología de Bradford en entregar una estimación relativa del contenido de glomalina. Whiffen *et al.*(2007), señalan que no es posible relacionar directamente la glomalina cuantificada por medio de Bradford, con los HMA, lo cual sólo sería posible con la prueba inmunológica. A través de electroforesis Bolliger *et al.*(2008), observaron la presencia de una única molécula proteica en la fracción de GRSP fácilmente extraíble y mediante cromatografía líquida (LC-MS/MS), distinguieron solo trazas de proteínas ajenas a HMA, en la fracción GRSP.

Con estos resultados se concluyó que, la metodología de extracción permitía la co-extracción de proteínas de diferente origen y que la cuantificación por la metodología de Bradford no permitía distinguir el origen de éstas, donde la GRSP sería una mezcla compleja de compuestos proteicos y polifenólicos (Schindler *et al.* 2007). Pero que la mayor proporción de la GRSP está constituida por proteínas de origen HMA (Rillig 2004; Bolliger *et al.* 2008) y que esta fracción responde a aquellas condiciones que favorecen la actividad y biodiversidad de los HMA (Ryan y Graham 2002), como son la baja fertilidad de suelo y técnicas de labranza conservacionista en suelos agrícolas.

Finalmente, considerando la importancia que tienen los bosques templados a nivel global y regional, es relevante destacar los servicios que prestan en el secuestro de C y la producción de agua. Estas funciones van a depender de la productividad y de la biomasa del ecosistema, la cual cambia con la sucesión forestal (Lara *et al.* 2003). Estos bosques presentan especies dominantes colonizadas por HMA, como también lo son una gran diversidad de especies del sotobosque. En investigaciones anteriores, se encontró que en algunos ecosistemas forestales el contenido de GRSP es alto, lo que hace interesante conocer la importancia de esta fracción de la MOS, producida principalmente por los HMA, en los bosques templados y plantaciones forestales de Chile.

#### 1.6 Hipótesis

Para evaluar los aspectos mencionados anteriormente, se plantearon la siguientes hipótesis:

- 1. Los eventos disruptivos, ya sean de origen antrópico o natural, producen cambios en la diversidad y dominancia de las especies vegetales de un ecosistema, que consecuentemente, altera la abundancia de los hongos micorrícicos arbusculares involucrados.
- 2. La cantidad de carbono contenida en la GRSP corresponde a la fracción más importante del carbono orgánico total del suelo, obtenida en un fraccionamiento químico, en diferentes sucesiones de bosques templados y una plantación de *P. menziesii* en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.
- 3. Bosques siempreverdes presentan una gran diversidad de especies vegetales que establecen simbiosis con HMA, por lo que deberían presentar una mayor cantidad de GRSP que un renoval caducifolio de *Nothofagus*, ya que este género sólo forma simbiosis con hongos ectomicorrízicos. Ambos tipos de bosques deberían tener un contenido de GRSP más alto que una plantación monoespecífica de *Pseudotsuga menziesii*, que es caracterizada por establecer

simbiosis con hongos ectomicorrízicos y no presentar sotobosque.

4. El manejo forestal del bosque nativo favorece el crecimiento de los mejores individuos arbóreos y produce la liberación de sitios e ingreso de luz, que favorece la proliferación de especies del sotobosque y el aumento del contenido de GRSP del suelo.

## 1.7 Referencias

- Allen, M. F. (1991). The ecology of mycorrhizae. New York, Cambridge University Press, 184 pp.
- Armesto, J., C. Smith-Ramírez, M. Carmona, J. L. Celis-Diez, I. Díaz, A. Gaxiola, A. G. Gutiérrez, M. Núñez-Avila, C. Pérez y R. Rozzi (2009). Old-growth temperate rain forests of South America: Conservation, plant-animal interactions, and baseline biogeochemical processes. *In*: Old-Growth Forests: Function, Fate and Value. C. Wirth, G. Gleixner y M. Heimann (eds), Springer Verlag. **207**: 490 pp
- Armesto, J., C. Villagrán y C. Donoso (1994). Desde la era glacial a la industrial: La historia del bosque templado chileno. Ambiente y Desarrollo: 66-72.
- Armesto, J. J., P. León Lobos y M. K. Arroyo (1995). Capítulo 1. Los bosques templados del sur de Chile y Argentina: Una isla biogeográfica. *In*: Ecología de los bosques nativos de Chile. C. V. J. Armesto, M. K.Arroyo (eds). Santiago, Chile, Editorial Universitaria: 23-28.
- Arroyo, M., L. Cavieres, A. Peñaloza, M. Riveros y A. M. Faggi (1995). Capítulo 4. Relaciones fitogeográficas y patrones regionales de especies en la flora del bosque lluvioso templado de Sudamérica. *In*: Ecología de los bosques nativos de Chile. C. V. J. Armesto, M. K. Arroyo (eds). Santiago, Chile, Editorial Universitaria: 71-100.
- Augé, R. M., J. L. Moore, K. Cho, J. C. Stutz, D. M. Sylvia, A. K. Al-Agely y A. M. Saxton (2003). Relating foliar dehydration tolerance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae. Journal of Plant Physiology **160**(10): 1147-1156.
- Bago, B., P. E. Pfeffer y Y. Shachar-Hill (2000). Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. Plant Physiology **124**(3): 949-958.
- Bardgett, R. D. (1991). The use of the membrane filter technique for comparative measurements of hyphal lengths in different grassland sites. Agriculture, Ecosystems & Environment 34: 115-119.
- Batjes, N. (1996). Total carbon and nitrogen in the soil of the world. European Journal of Soil Science 47: 151-163.

- Bever, J. D., J. B. Morton, J. Antonovics y P. A. Schultz (1996). Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. Journal of Ecology **84**: 71-82.
- Bird, S. B., J. E. Herrick, M. M. Wander y S. F. Wright (2002). Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. Environmental Pollution **116**: 445-455.
- Bolin, B., R. Sukumar, P. Ciais, W. Cramer, P. Jarvis, H. Kheshgi, C. Nobre, S. Semonov y W. Steffen (2000). Global perspective. *In*: Land Use, Land-Use Change, and Forestry. R. Watson, I. Noble, B. Bolin, N. Ravindranath y D. Dokken (eds). Cambridge, Cambridge University Press: 23-52.
- Bolliger, A., A. Nalla, J. Magid, A. de Neergaard, A. Nalla y T. Bog-Hansen (2008). Re-examining the glomalin-purity of glomalin-related soil protein fractions through immunochemical, lectin-affinity and soil labelling experiments. Soil Biology & Biochemistry 40: 887-893.
- Borie, Redel, Rubio, Rouanet y Barea (2002). Interactions between crop residues application and mycorrhizal developments and some soil-root interface properties and mineral acquisition by plants in an acidic soil. Biology and Fertility of Soils **36**(2): 151-160.
- Borie, F., R. Rubio, A. Morales y C. Castillo (2000). Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. Revista Chilena de Historia Natural **73**(4): 749-756.
- Canadell, J., R. Jackson, J. Ehleringer, H. Mooney, O. Sala y E. D. Schulze (1996). Maximum rooting depth of vegetation at the global scale. Oecologia **108**: 583-595.
- Carrillo, R., R. Godoy y H. Peredo (1992). Simbiosis micorrícica en comunidades boscosas del valle Central en el Sur de Chile. Bosque **13**(2): 57-67.
- Castillo, C., F. Borie, R. Godoy, R. Rubio y E. Sieverding (2006). Diversity of mycorrhizal plant species and arbuscular mycorrhizal fungi in evergreen forest, deciduous forest and grassland ecosystems of Southern Chile. Journal of Applied Botany and Food Quality **80**: 40-47.
- Comis, D. (2002). Glomalin: Hiding Place for a Third of the World's Stored Soil Carbon. Agricultural Research. **50:** 4-7.
- CONAF-CONAMA (1999). Catastro y evaluación de recursos vegetacionales nativos de Chile. Informe nacional con variables ambientales. Santiago, Chile, 27 pp.
- Davis, M. R., R. B. Allen y P. W. Clinton (2003). Carbon storage along a stand development sequence in a New Zeland *Nothofagus* forest. Forest Ecology and Management 177: 313-321.

- de Groot, R. S., M. A. Wilson y R. M. J. Boumans (2002). A typology for the classification, descriptions and valuation of ecosystem functions, goods and services. Ecological Economics **41**: 393-408.
- DeMars, B. G. y R. E. J. Boerner (1995). Mycorrhizal dynamics of three woodland herbs of contrasting phenology along topographic gradients. American Journal of Botany **82**(11): 1426-1431.
- Donoso, C. (1992). Ecología Forestal: El Bosque y su Medio Ambiente. Santiago, Chile, Editorial Universitaria, 369 pp.
- Donoso, C. y A. Lara (1998). Silvicultura de los bosques nativos de Chile. Santiago, Chile, Editorial Universitaria, 424.
- Donoso, P. y C. H. Lusk (2007). Differential effects of emergent *Nothofagus dombeyi* on growth and basal area of canopy species in an old-growth temperate rainforest. Journal of Vegetation Science **18**: 675-684.
- Driver, J. D., W. E. Holben y M. C. Rillig (2005). Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry **37**(1): 101-106.
- Echeverría, C., A. Newton, A. Lara, J. M. R. Benayas y D. A. Coomes (2007). Impacts of forest fragmentation on species composition and forest structure in the temperate landscape of southern Chile. Global Ecology and Biogeography **16**: 426-439.
- Eckstein, R., P. S. Karlsson y M. Weih (1999). Leaf life span and nutrient resorption as determinants of plant nutrient conservation in temperate-artic regions. New Phytologist 143: 177-189.
- Emhart, S. y A. Kjoller (1987). Measurement of the length of fungal hyphae by the membrane filter technique as a method for comparing fungal occurrence in cultivated field soils. Soil Biology and Biochemistry **19**: 679-682.
- Fitter, A. H., A. Heinemeyer, R. Husband, E. Olsen, K. P. Ridgway y P. L. Staddon (2004). Global environmental change and the biology of arbuscular mycorrhizas: gaps and challenges. Canadian Journal of Botany 82: 1133-1139.
- Fitter, A. H., A. Heinemeyer y P. L. Staddon (2000). The impact of elevated CO<sub>2</sub> and global climate change on arbuscular mycorrhizas: a mycocentric approach. New Phytologist **147**: 179-187.
- Fontenla, S., R. Godoy, P. Rosso y M. Havrylenko (1998). Root associations in *Austrocedrus* forest and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas. Mycorrhiza 8: 29-33.
- Franklin, J. (1995). Sustainability of managed temperate forest ecosystems. *In*: Defining and Measuring Sustainability. M. Munasinghe y W. Shearer (eds), The United Nations University and The World Bank.: 355-385.

- Godoy, R. y R. Mayr (1989). Caracterización morfológica de micorrizas vesículo-arbusculares en coníferas endémicas del sur de Chile. Bosque **10**(2): 89-98.
- Godoy, R. y G. Opitz (1998). Estudios de distribución y biomasa radical en bosques de *Nothofagus pumilio*. Noticiero de Biología **6**(5): 114-115.
- Godoy, R., R. Romero y R. Carrillo (1994). Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas. Revista Chilena de Historia Natural **67**: 209 220.
- Grove, S. J. (2001). Extent and composition of dead wood in Australian lowland tropical rainforest with different management histories. Forest Ecology and Management **154**: 35-53.
- Haddad, M. J. y D. Sarkar (2003). Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: Part II--Relationship with soil properties. Environmental Geosciences **10**(3): 99-106.
- Halvorson, J. y J. Gonzalez (2006). Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. Plant and Soil **286**: 339-356.
- Harmon, M. E., W. K. Ferrel y J. F. Franklin (1990). Effects of carbon storage of conversion of old-growth forests to young forests. Science **217**: 699-702.
- Harmon, M. E., F. J. Franklin, P. Swanson, S. V. Sollins, J. D. Gregory, N. H. Latín, S. P. Anderson, N. G. Cline, J. R. Aumen, G. W. Sedell, K. Lienkwemper, J. R. Cromack y K. W. Cummins (1986). Ecology of coarse woody debris in temperate ecosystems. Advance in Ecological Research 15: 133-302.
- Harmon, M. E. y J. Sexton (1996). Guidelines for measurements of woody detritus in forest ecosystems. Publication No. 20s. Long-term Ecological Research (LTER) Network Office, University of Washington, 73 pp.
- Harmon, M. E., J. Sexton, B. A. Caldwell y S. E. Carpenter (1994). Fungal sporocarp mediated losses of Ca, Fe, K, Mg, Mn, N, P, and Zn from conifer logs in the early stages of decomposition. Canadian Journal of Forest Research 24: 1883-1893.
- Hart, M. M., R. J. Reades y J. N. Klironomos (2001). Life-history strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to their successional dynamics. Mycologia **83**: 1184-1196.
- Hedin, L., J. Armesto y A. H. Johnson (1995). Patterns of nutrients loss from unpolluted, old-growth temperate forests: Evaluation of Biogeochemical Theory. Ecology **76**(2): 493-509.
- Huygens, D., P. Boeckx, P. Templer, L. Paulino, O. v. Cleemput, C. Oyarzún, C. Müller y R. Godoy (2008). Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic rainforest soils. Nature Geoscience 1: 543-548.
- Huygens, D., T. Rutting, P. Boeckx, O. Van Cleemput, R. Godoy y C. Müller (2007). Soil nitrogen conservation mechanisms in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest ecosystems. Soil Biology & Biochemistry **29**: 2448-2458.

- Hyvönen, R., G. I. Ågren, S. Linder, T. Persson, M. F. Cotrufo, A. Ekblad, M. Freeman, A. Grelle, I. A. Janssens, P. G. Jarvis, S. Kellomäki, A. Lindroth, D. Loustau, T. Lundmark, R. J. Norby, R. Oren, K. Pilegaard, M. G. Ryan, B. D. Sigurdsson, M. Strömgren, M. v. Oijen y G. Wallin (2007). The likely impact of elevated [CO<sub>2</sub>], nitrogen deposition, increased temperature and management on carbon sequestration in temperate and boreal forest ecosystems: a literature review. New Phytologist 173: 463-480.
- Jackson, R. B., J. Canadell, J. R. Ehleringer, H. A. Mooney, O. E. Sala y E. D. Schulze (1996). A global analysis of root distribution for terrestrial biomass. Oecologia **108**: 389-411.
- Jandl, R., M. Lindner, L. Vesterdal, B. Bauwens, R. Baritz, F. Hagedorn, D. Johnson, K. Minkkinen y K. Byrne (2007). How strongly can forest management influence soil carbon sequestration? Geoderma 137: 253-268.
- Jandl, R., F. Starlinger, M. Englisch, E. Herzberger y E. Johann (2002). Long-term effects of a forest amelioration experiment. Canadian Journal of Forest Research 32: 120-128.
- Janos, D. P. (1980). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae Affect Lowland Tropical Rain Forest Plant Growth. Ecology **61**(1): 151-162.
- Jastrow, J. D., R. M. Miller y J. Lussenhop (1998). Contribution of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. Soil Biology and Biochemistry **30**: 905-916.
- Klironomos, J. N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. (Author Abstract) John N. Klironomos. Ecology **84**(9): 2292-2301.
- Klironomos, J. N., J. McCune y P. Moutoglis (2004). Species of arbuscular mycorrhizal fungi affect mycorrhizal responses to simulated herbivory. Applied Soil Ecology **26**(2): 133-141.
- Knorr, M. A., R. E. J. Boerner y M. C. Rillig (2003). Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. Mycorrhiza 13: 205-210.
- Lara, A. (1996). Una propuesta general de silvicultura para Chile. Ambiente y Desarrollo **12**(1): 31-40.
- Lara, A., D. Soto, J. Armesto, P. Donoso, C. Wernli, L. Nahuelhual y F. Squeo, Eds. (2003). Componentes Científicos Clave para una Política Nacional Sobre Usos, Servicios y Conservación de los Bosques Nativos Chilenos. Libro resultante de la Reunión Científica sobre Bosques Nativos realizada en Valdivia, los días 17-18 de julio de 2003. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Iniciativa Científica Milenio del Mideplan.
- Leiva, S. y R. Godoy (2002). Production and descomposition of litterfall in *Nothofagus* forest in Southern Chile. *In*: Comparison of ecosystems functioning and biogeochemical cycles in

- temperate forest in Southern Chile and Flanders. A. de Schrijver, V. Kint y N. Lust (eds). Gent, Bélgica, Academic Press: 103-106.
- Lovelock, C. E., S. F. Wright, D. A. Clark y R. W. Ruess (2004a). Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. Journal of Ecology **92**: 278 –287.
- Lovelock, C. E., S. F. Wright y K. A. Nichols (2004b). Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. Soil Biology and Biochemistry **36**(6): 1009-1012.
- Lutgen, E. R., D. Muir-Clairmont, J. Graham y M. C. Rillig (2003). Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. Plant and Soil **257**: 71-83.
- Miller, R. M. y J. D. Jastrow (1990). Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. Soil Biology and Biochemistry 22: 579-584.
- Miller, R. M. y J. D. Jastrow (1992). Extraradical hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a chronosequence of prairie restoration. *In*: Mycorrhizas in ecosystems. D. J. Read, D. H. Lewis, A. H. Fitter y I. J. Alexander (eds). Wallingford, UK, CAB International: 171-176.
- Miller, R. M., D. R. Reinhardt y J. D. Jastrow (1995). External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. Oecologia **103**: 17-23.
- Nahuelhual, L., P. Donoso, A. Lara, D. Núñez, C. Oyarzún y E. Neira (2007). Valuing ecosystem services of Chilean temperate rainforests. Environment, Development and Sustainability 9: 481-499.
- Neira, E., H. Verscheure y C. Revenga (2002). Chile's frontier forests: conserving a global treasure. Global Resources Institute, CODEF, Universidad Austral de Chile, 57 pp.
- Newsham, K. K., A. H. Fitter y A. R. Watkinson (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. Trends in Ecology & Evolution **10**(10): 407-411.
- Nichols, K. A. (2003a). Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. <u>College of Agriculture and Natural Resources</u>, University of Maryland: 307 pp.
- Nichols, K. A. (2003b). Glomalin (The Scum of the Earth) and Soil Structure. Department of Soil Science, North Dakota State University.
- Nichols, K. A. y S. F. Wright (2005). Comparison of glomalin and humic acid in eight native U.S. soils. Soil Science **170**(12): 985-997.

- Norberg, J. (1999). Linking Nature's services to ecosystems: some general ecological concepts. Ecological Economics **29**: 183-202.
- Oyarzún, C., R. Godoy, A. d. Schrijver, J. Staelens y N. Lust. (2004). Water chemistry and nutrient budgets in an undisturbed evergreen rain forest of southern Chile. Biogeochemistry 71: 107-123.
- Palfner, G. (2001). Taxonomische Studien an Ektomykorrhizen aus den *Nothofagus*-Wäldern Mittelsüdchiles. Berlin Stuttgart, Bibliotheca Mycologica 190, 243 pp.
- Pérez, C., L. Hedin y J. Armesto (1998). Nitrogen mineralization in two unpolluted old-growth forest of contrasting biodiversity and dynamics. Ecosystems 1: 361-373.
- Perry, D. A. (1994). Forest Ecosystems. Baltimore, EEUU, The Johns Hopkins University Press, 649 pp.
- Post, W. M. y K. C. Kwon (2000). Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. Global Change Biology **6**(3): 317-327.
- Quintanilla, V. (2001). Alteraciones del fuego sobre la biodiversidad de bosques templados. El caso del bosque pluvial costero de Chile. Universidad de Granada, 7-21 pp.
- Read, D. J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. Experientia 47: 376-391.
- Rillig, M., S. Wright, B. Kimball, P. Pinter, G. W. all, M. Ottman y S. Leavitt (2001a). Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a *Sorghum* field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. Global Change Biology 7: 333-337.
- Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Canadian Journal of Soil Science **84**(4): 355-363.
- Rillig, M. C. (2005). A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency? Pedobiologia **49**: 395-399.
- Rillig, M. C., 4, P. W. Ramsey, S. Morris y E. A. Paul (2003). Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. Plant and Soil **253**: 293-299.
- Rillig, M. C., C. B. Field y M. F. Allen (1999). Soil biota responses to long-term atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment in two California annual grasslands. Oecologia **119**: 572-577.
- Rillig, M. C., G. Y. Hernández y P. C. D. Newton (2000). Arbuscular mycorrhizae respond to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> after long-term exposure: evidence from a CO<sub>2</sub> spring in New Zeland supports the resource balance model. Ecology Letters **3**: 475-478.
- Rillig, M. C. y D. L. Mummey (2006). Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist **171**(1): 41-53.
- Rillig, M. C. y P. D. Steinberg (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? Soil Biology and Biochemistry **34**(9): 1371-1374.

- Rillig, M. C., S. F. Wright y V. T. Eviner (2002a). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation:comparing effects of five plant species. Plant and Soil 238: 325-333.
- Rillig, M. C., S. F. Wright, K. A. Nichols, W. F. Schmidt y M. S. Torn (2001b). Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. Plant and Soil **233**: 167-177.
- Rillig, M. C., S. F. Wright, M. R. Shaw y C. B. Field (2002b). Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. Oikos **97**: 52–58.
- Rosier, C., A. Hoye y M. Rillig (2006). Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. Soil Biology & Biochemistry **38**: 2205-2211.
- Rozzi, R., J. Armesto, B. Goffinet, W. Buck, F. Massardo, S. Silander, M. T. K. Arroyo, S. Russell, C. Anderson, L. Cavieres y J. B. Callicott (2008). Changing lenses to assess biodiversity patterns of species richness in sub-Antarctic plants and implications for global conservation. Frontiers in Ecology and the Environment 6: 131-137.
- Ryan, M. H. y J. H. Graham (2002). Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? Plant and Soil **244**(1-2): 263-271.
- Schindler, F., E. Mercer y J. Rice (2007). Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. Soil Biology & Biochemistry **39**: 320-329.
- Schlegel, B. y P. Donoso (2008). Effects of forest type and stand strucutre on coarse woody debris in old-growth rainforests in the Valdivian Andes, south-central Chile. Forest Ecology and Management **255**: 1906-1914.
- Seguel, A., R. Rubio, R. Carrillo, A. Espinosa y F. Borie (2008). Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del sur de Chile. Bosque **29**(1): 11-22.
- Staunton, S., T. Woignier, P. Etcheverría, F. Borie, T. Chevallier y H. Quiquampoix (2008). Is Bradford reactive soil protein, glomalin, stabilized by association with allophane in forest soils of Martinique, French West Indies? 5<sup>th</sup> International Symposium of Interaction of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms, Pucón, Chile, Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo 280pp.
- Steinberg, P. D. y M. C. Rillig (2003). Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. Soil Biology and Biochemistry **35**(1): 191-194.

- Stevens, V. (1997). The ecological role of coarse woody debris: an overview of the ecological important of CWD in B.C. forests. Res. Br., B.C. Min. For., Victoria, B.C. Work. Pap 30/1997, 26 pp.
- Stewart, G. H. y L. E. Burrows (1994). Coarse woody debris in old-growth temperate beech (Nothofagus) forests of New Zealand. Canadian Journal of Forest Research 24: 1989-1996.
- Tisdall, J. M. y J. M. Oades (1979). Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. Australian Journal of Soil Science 17: 429-441.
- Trappe, J. M. (1987). Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the Angiosperms from an evolutionary standpoint. *In*: Ecophysiology of the VA Mycorrhizal Plants. G. R. Safir (eds). Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Treseder, K. K. y M. F. Allen (2000). Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen deposition. New Phytologist **147**(1): 189-200.
- Treseder, K. K. y A. Cross (2006). Global Distributions of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Ecosystems 9: 305–316.
- Treseder, K. K., L. M. Egerton-Warburton, M. F. Allen, Y. Cheng y W. C. Oechel (2003). Alteration of Soil Carbon Pools and Communities of Mycorrhizal Fungi in Chaparral Exposed to Elevated Carbon Dioxide. Ecosystems **6**: 786-796.
- Treseder, K. K. y K. M. Turner (2007). Glomalin in Ecosystems. Soil Science Society American Journal **71**(4): 1257-1266.
- Van der Heijden, M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken y I. R. Sanders (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature **396**: 69-72.
- Veblen, T. T. (1995). Tree regeneration responses to gaps along a transandean gradient. Ecology **70**(3): 541-543.
- Veblen, T. T., D. H. Ashton, F. M. Schlegel y A. T. Veblen (1977). Plant succession in a timberline depressed by vulcanism in south-central Chile. Journal of Biogeography 4: 275-294.
- Veblen, T. T., F. M. Schlegel y B. Escobar (1980). Structure and dynamics of old-growth *Nothofagus* forests in the Valdivian Andes, Chile. Journal of Ecology **68**: 1-31.
- Veblen, T. T., F. M. Schlegel y J. V. Oltremari (1983). Temperate broad-leaved evergreen forest of South America. *In*: Temperate Broad-Leaved Evergreen Forest. J. D. Ovington (eds). Amsterdam, Elsevier Science Publishers: 5-31.
- Vesterdal, L., E. Ritter y P. Gundersen (2002). Change in soil organic carbon following afforestation of former arable land. Forest Ecology and Management **169**: 137-147.

- Whiffen, L. K., D. J. Midgley y P. A. McGee (2007). Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. Soil Biology and Biochemistry **39**(2): 691-694.
- Wilson, K., A. Newton, C. Echeverría, C. Weston y M. Burgman (2005). A vulnerability analysis of the temperate forests of south central. Biological Conservation **122**: 9–21.
- Wright, S. F. y R. L. Anderson (2000). Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. Biology and Fertility of Soils **31**: 249-253.
- Wright, S. F., M. Franke-Snyder, J. B. Morton y A. Upadhyaya (1996). Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil **181**: 193-203.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Science **161**(9): 575-586.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae or arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil **198**: 97-107.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1999). Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. Mycorrhiza 8: 283-285.
- Wright, S. F., A. Upadhyaya y J. S. Buyer (1998). Comparison of N-linked oligosaccharides of Glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. Soil Biology and Biochemistry **30**(13): 1853-1857.
- Zangaro, W., V. L. R. Bononi y S. B. Trufen (2000). Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. Journal of Tropical Ecology **16**: 603-622.
- Zhu, Y.-G. y R. M. Miller (2003). Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil–plant systems. Trends in Plant Science **8**(9): 407-409.

# Capítulo 2

Objetivos y descripción del área de estudio

## 2.1 Objetivo general

El objetivo general planteado para la presente tesis fue:

Comparar las características de la glomalina asociadas a las proteínas de suelo (GRSP) como un indicador del secuestro de carbono, en las asociaciones boscosas siempreverdes de: *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst., *Laurelia philippiana* Looser y *Saxegothaea conspicua* Lindl., y caducifolias secundarias de: *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst., *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst., en distinto estadio sucesional (con y sin manejo silvícola) y una plantación forestal de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco, en la Cordillera de los Andes, centro- sur de Chile.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- 1. Determinar la biodiversidad vegetal y abundancia fúngica, en bosques templados siempreverdes y caducifolios (con y sin manejo silvícola) y en una plantación forestal de *P. menziessi*, en condiciones edafo-climáticas similares.
- 2. Cuantificar el aporte de carbono de la GRSP al carbono total del suelo y compararlo con el aporte que hacen los ácidos húmicos y fúlvicos por separado, en los bosques templados y en una plantación de *P. menziesii*, a dos profundidades de suelo.
- 3. Cuantificar la acumulación de GRSP de los bosques templados con y sin manejo forestal, y de una plantación forestal de *P. menziesii*, *in situ*.
- 4. Evaluar en condiciones controladas, la estabilidad de la GRSP producida en suelos bajo bosques templados y en la plantación forestal de *P. menziesii*.

## 2.2 Descripción del área de estudio

#### 2.2.1 Ubicación geográfica

El predio San Pablo de Tregua se encuentra en la Provincia de Panguipulli, Región de Los Ríos, en la Cordillera de Los Andes, sobre la ribera norte del Lago Panguipulli (Veblen *et al*, 1980), 39°30' y 39°38'S y 72°02' y 72°09'O y a una altitud que varia entre los 600 y 1600 msnm. Comprende una superficie de 2184 ha., propiedad de la Universidad Austral de Chile (Figura 2.1). La topografía del

lugar es de carácter montañoso (Donoso y Lusk 2007). Aproximadamente la mitad del predio presenta una pendiente de 10° a 25°, existiendo zonas con pendientes inferiores a 10°.



**Figura 2.1**. Ubicación geográfica del predio San Pablo de Tregua, Provincia de Panguipulli, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

#### 2.2.2 Clima

El clima es clasificado como oceánico con una suave influencia mediterránea, que se caracteriza por presentar las precipitaciones concentradas en los meses de invierno (Veblen *et al.* 1980). Los veranos son cortos y relativamente secos, y los inviernos lluviosos, con una precipitación promedio anual que varía entre 4.000 mm y 5.500 mm y una temperatura media de 11°C (Godoy, 2004 #206;Oyarzún, 2008 #471). La temperatura mínima promedio se registra en el mes de agosto (5°C), y la máxima promedio en febrero (20°C). Los meses más lluviosos son mayo, junio, julio y agosto, los cuales concentran el 50% de las precipitaciones anuales.

#### 2.2.3 Suelo

El predio presenta suelos de origen volcánico de diferentes edades, clasificado como Andisol (FAO, 2007). El primer estrato de cenizas finas tiene una profundidad de 0,5 – 1,2 m, el segundo estrato corresponde a material pumicítico con partículas de gran diámetro sobre sedimentos andesíticos basálticos (Veblen *et al.* 1980). Aproximadamente el 90% del la superficie del predio está clasificado dentro de la serie Liquiñe (Acrudoxic Hapludand) (CIREN 1999), que se caracteriza por ser suelos profundos, con buena capacidad de infiltración y drenaje, tanto como una alta capacidad de retención de agua. La textura del suelo es de naturaleza franco limosa a franco arenosa, rico en materia orgánica (> 20%), con pH ácido a moderadamente ácidos. Las capas superficiales de suelo pueden secarse rápidamente, facilitando la erosión eólica y también puede ser susceptible a la compactación (Lara *et al.* 2002). En la Tabla 2.1 se presentan algunas propiedades físicas y químicas de los suelos en los sitios experimentales de San Pablo de Tregua.

La caracterización química de los suelos se realizó en el Laboratorio de Suelos del Instituto de Agroindustrias, Universidad de La Frontera, Chile. El análisis de textura de suelo, según el sistema U.S.D.A (40" y 120"), se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Nutricional de Suelo y Plantas, de INIA Carillanca, Temuco, Chile.

#### 2.2.4 Vegetación

La mayor parte de la vegetación en el predio San Pablo de Tregua, está constituida por bosques prístinos de altura con *Nothofagus pumilio* (P. et E.) Krasser. Estos bosques dominan sobre los 1100 m s.n.m. Entre los 700 y 1.100 m s.n.m. se encuentran los bosques siempreverdes de *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst, *Laurelia philippiana* Looser y *Saxegothaea conspicua* Lindl.. Bajo los 700 m s.n.m., los renovales deciduos (bosques secundarios) de *N. alpina y N. obliqua*. De acuerdo a Veblen *et al.* (1980), los bosques corresponderían al tipo forestal *N. pumilio*, *N. dombeyi* y *N. alpina*, respectivamente.

El bosque siempreverde se encuentra en una etapa sucesional muy avanzada, que queda bien representada por los escasos y grandes ejemplares de *Nothofagus dombeyi* y una gran cantidad de individuos de diversas edades de *Laurelia philippiana*, *Saxegothaea conspicua* y *Dasyphillum diacanthoides* (Less.) Cabr., por debajo de la línea de las copas de *N. dombeyi* (Donoso 1998).

**Tabla 2.1**. Características físicas y químicas de los suelos (0 − 20 cm de profundidad), en cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio con manejo forestal; ORG: plantación de *P. menziesii*.

Sitio	SV	SVA	RC	RCM	ORG
Densidad (g cm <sup>-3</sup> )	0,37	0,39	0,43	0,44	0,49
Materia orgánica (%)	19	21	21	16	18
pН	4,87	5,41	5,16	5,45	4,83
P (mg/Kg)	6	3	5	2	7
Mg (cmol+ kg <sup>-1</sup> )	0,37	0,43	0,65	0,39	0,33
Ca (cmol+ kg-1)	0,76	0,8	2,02	0,89	0,46
K (cmol+ kg-1)	0,28	0,34	0,19	0,18	0,23
Na (cmol+ kg-1)	0,05	0,09	0,11	0,05	0,09
Al (cmol+ kg-1)	1,57	0,87	1,39	0,49	1,45
Saturación de Al (%)	51,82	34,39	31,88	24,5	56,64
CICE (cmol+ kg-1)	3.03	2,53	4,36	2	2,56
S. Bases (cmol+ kg-1)	1,46	1,66	2,97	1,51	1,11
Fe (ppm)	204	111	128	52	143
Al Ext. (ppm)	3669	4284	3258	3258	4218
Textura	Franco	Franco	Franco	Franco	Franco/franco
Textura	arenoso	arenoso	arenoso	Tranco	arenoso
Arcilla (%)	8,0	8,0	4,0	10,0	12,0
Limo (%)	30,0	26,0	26,0	44,0	36,0
Arena (%)	62,0	66,0	70,0	46,0	42,0

#### 2.2.5 Sitios experimentales

- 1. Bosque siempreverde (SV). Corresponde a un bosque adulto prístino donde las especies dominantes del dosel son *Nothofagus dombeyi*, *Laurelia philippiana* y *Saxegothaea conspicua* (Oyarzún *et al.* 2008).
- 2. Bosque siempreverde alterado (SVA). En este bosque se realizó hace 50 años la extracción de los mejores individuos de *N. dombeyi*, *N. alpina*, por lo que las especies dominantes son *Myrceugenia*

planipes, L. philippiana y S. conspicua. Como especie acompañante aparece Dasyphyllun diacanthoides.

- 3. Renoval caducifolio (RC). Corresponde a un bosque secundario deciduo de *N. alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst *y Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst., de aproximadamente 55 años.
- 4. Renoval caducifolio con manejo forestal (RCM). Corresponde a parte del bosque secundario de *N. alpina y N. obliqua*, que en el año 2002 fue sometido a un manejo silvícola con raleo de copas, reduciendo en un 35% el área basal, del componente arbóreo dominante.
- 5. Plantación monoespecífica de *Pseudotsuga menziesii* (ORG). La plantación de pino Oregón (*P. menziesii*) se realizó en una superficie aproximada de 1 ha., hace 25 años. El rodal no ha recibido manejo forestal hasta la fecha.

Las principales características de los sitios usados en este estudio se presentan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2**. Características de cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio con manejo forestal; ORG: plantación de *P. menziesii*.

	SV	SVA	RC	RCM	ORG
Edad (años)	>200	> 200	50	50	25
Densidad	501	873	1300	1030	
Área basal (m² ha <sup>-1</sup> )	126,9	95,7	50	30,1	
Superficie	72,1	5,0	1,8	4,6	1
microcuenca (ha.)					
Pendiente (%)	12	26	13	27	10
Altitud (m.s.n.m.)	805	734	630	637	700
Precipitación (mm)	4635	4323	3999	4115	4057

### 2.3 Referencias

- CIREN (1999). Estudio Agrológico de la Provincia de Valdivia X Región. Descripciones de suelos. Materiales y Símbolos. Santiago, Chile.
- Donoso, C. (1998). Bosques Templados de Chile y Argentina: Variación, Estructura y Dinámica, Editorial Universitaria.
- Donoso, P. y C. H. Lusk (2007). "Differential effects of emergent *Nothofagus dombeyi* on growth and basal area of canopy species in an old-growth temperate rainforest." Journal of Vegetation Science **18**: 675-684.
- Godoy, R., C. Oyarzún, A. Lara, D. Soto, M. Pino, P. Donoso y M. Barrientos (2004). Estudios experimentales sobre química del agua en microcuencas con bosques de *Nothofagus alpina*, Chile. Simposio Internacional IUFRO, Raulí, Riqueza de los bosques Templados: Silvicultura, Genética e Industria, Valdivia.
- Lara, A., A. Altamirano, O. Thiers y A. Tacón (2002). Proyecto cipma-fmam unidad demostrativa piloto. Predio de San Pablo de Tregua. Valdivia, Chile.
- Oyarzún, C., R. Godoy y N. E. C. Verhoest (2008). Interactions between hydrology and biogeochemical cycles of native vegetated mountain watersheds under different management, southern Chile. Bruthans Kovar-Hrkal (eds.) HydroPredict, Prague, Czech Republic., 49-52.
- Veblen, T. T., F. M. Schlegel y B. Escobar (1980). "Structure and dynamics of old-growth *Nothofagus* forests in the Valdivian Andes, Chile." Journal of Ecology **68**: 1-31.

## Capítulo 3

Características vegetacionales y abundancia de HMA de cuatro bosques nativos y una plantación de Pseudotsuga menziesii en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

#### Resumen

La participación de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en procesos tales como la competencia intra e inter-específica de plantas y sobre la diversidad de especies vegetales, ha sido demostrada por varios autores. Sin embargo, la importancia de la simbiosis en los bosques templados, así como su participación en procesos de sucesión, no ha sido plenamente abordada. A nivel global, se ha observado en bosques templados un patrón micotrófico dominantes, donde las especies arbóreas forman simbiosis preferentemente con hongos ectomicorrícicos y el sotobosque formaría asociación con HMA. No obstante, se ha observado que en Chile, algunas familias de especies arbóreas que predominan en el bosque templado forman simbiosis con HMA; por lo que se planteó estudiar la diversidad vegetal y la abundancia de propágulos de HMA en dos bosques siempreverdes, dos renovales de Nothofagus (con y sin manejo forestal) y una plantación de Pseudotsuga menziesii y establecer si existe relación entre la abundancia de HMA y la diversidad vegetal. A través de un inventario fitosociológico, se observó que la mayor cobertura de especies hospederas de HMA se encuentra en el bosque siempreverde, comparado con el renoval caducifolio, pero sin que se presentaran diferencias significativas en el contenido de micelio extraradical. Se observó una disminución en el número de esporas al aumentar el porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA. La presencia tanto de esporas como de micelio activo en la plantación forestal, hace replantear la calidad de no hospedero de HMA de la pinácea *Pseudotsuga* menziesii.

**Palabras claves**: Bosque siempreverdes, renoval caducifolio, Riqueza específica, propágulos hongos micorrícicos arbusculares.

#### Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have an important role in processes as intra and inter-specific plant competition and vegetal diversity. Nonetheless their presence and participation of succession process in temperate forests is unclear. Worldwide, these forests have a dominant mycotrophic pattern, in which trees species are inform symbiosis with ectomycorrhizal fungi and the understory is in symbiosis with AMF. However, in Chile there are trees families that are capable to establish symbiosis with AMF. For that reason the first aim of this study was to determine the vegetal diversity and propagules AMF abundance in two evergreen forests and two secondary deciduous forests of *Nothofagus* (with and without forest management), and a forest plantation of *Pseudotsuga menziesii*. The second aim was to check a correlation between plants diversity and mycorrhizal

fungi abundance. After a forest inventory it was observed that evergreen forests had the highest host cover percentage but no differences were found at the extraradical mycelium level. A negative correlation was observed between spores number and host cover percentage. The forest plantation had spores and active mycelium which make us to think about the no host condition of pinaceae *Pseudotsuga menziesii*.

**Key Words:** Evergreen forests, deciduous secondary forests, specific richness, propagules arbuscular mycorrhizal fungi.

#### 3.1 Introducción

La simbiosis entre especies vegetales y hongos micorrícos arbusculares (HMA) es ampliamente difundida a nivel global, donde más del 70% de las especies de plantas forman este tipo de asociación micorrícica (Allen 1991). Debido al escaso número de especies de HMA en relación al número de especies vegetales involucrados, se ha sugerido que se trata de una relación poco específica (Eom *et al.* 2000; Burrows y Pfleger 2002b; Rillig 2004). Sin embargo, al ser simbiontes obligados y obtener todo el carbono (C) necesario de su hospedero (Jakobsen y Rosendahl 1990; Jennings 1995), los HMA tienen una función muy importante en la translocación de C al suelo.

A nivel de comunidad vegetal, se ha demostrado que los HMA participan en la competencia vegetal y son co-determinantes en la diversidad de especies vegetales (Van der Heijden *et al.* 1998; Püschel *et al.* 2008). Por ejemplo, una especie vegetal determinada cuando es inoculada con una especie de HMA puede responder con un mayor incremento en su biomasa que cuando lo es con otra, dando como resultado una alta especificidad. Por su parte, la estructura de la comunidad de HMA puede ser fuertemente afectada por una sola especie vegetal, cambiando el crecimiento de las hifas y la tasa de esporulación (Bever *et al.* 1996; Bever 2002). Burrows y Pfleger (2002a) observaron una reducida esporulación y crecimiento de las hifas en parcelas con una baja diversidad vegetal, comparado con los sitios de alta diversidad. Van der Heijden *et al.*(1998) sugieren que alteraciones en comunidades de HMA con una baja diversidad, puede traducirse en una mayor variabilidad en la estructura y composición de la comunidad de plantas, que cuando existe una alta diversidad de HMA.

La baja disponibilidad de fósforo (P) y de otros nutrientes como nitrógeno (N), otorgan las condiciones apropiadas para el desarrollo de micorrizas en los bosques templados desarrollados sobre andisoles. La mayoría de los estudios se ha centrado en los bosques tropicales, donde la dependencia de las especies vegetales por los HMA es variable (Janos 1980b; Zangaro *et al.* 2000; Lovelock *et al.* 2004; Gehring y Connell 2006). Gehring y Connell (2006) observaron una mayor colonización en especies de bosque tropical que en el bosque subtropical. Mientras que en los bosques templados lluviosos a nivel global, se ha observado que las especies arbóreas forman simbiosis con hongos ectomicorrícicos (ECM) y el sotobosque, formaría predominantemente simbiosis con HMA (Smith y Read 2008).

Se ha planteado que en el inicio de una sucesión hay una evolución desde especies no micotróficas a micotróficas obligados (Janos 1980a; Allen 1991). Sin embargo, Zangaro *et al.* (2000) y Siqueira *et al.* (1998) postulan lo contrario, que las especies pioneras son micotróficas obligadas, mientras que las especies del estadío de climax son facultativas, aspecto que estaría fuertemente relacionado con el tamaño de sus semillas.

Las ECM predominan en ecosistemas forestales con acumulación de hojarasca en superficie, mientras que plantas HMA dominarían comunidades de plantas herbáceas y arbóreas, en suelos minerales a bajas latitudes (Read 1991). La dependencia de HMA de los bosques templado lluviosos del cono Sur de América no ha sido muy estudiada, existiendo pocos trabajos al respecto (Godoy y Mayr 1989; Godoy *et al.* 1994; Fontenla *et al.* 1998; Castillo *et al.* 2006), considerando que en Chile, existen aproximadamente 4,1 millones de hectáreas cubiertas con bosque lluvioso siempreverde y alrededor de 1,5 millones de hectáreas con bosque secundario de *Nothofagus* (CONAF-CONAMA 1999). De las familias de plantas vasculares que componen estos bosques, las especies pertenecientes a Fagaceae (*Nothofagus* sp.), establecen simbiosis con hongos ectomicorrícicos (ECM) (Read 1991; Palfner 2001; Smith y Read 2008). Los bosques nativos chilenos, dominados por especies de *Nothofagus* son de baja diversidad en especies arbóreas, pero soportan una muy diversa flora fúngica con la cual forman ECM, con un gran potencial para su utilización mediante programas de producción de plantas en vivero (Garrido 1988; Valenzuela et al. 1999; Palfner 2001; Castillo et al. 2006)

Aunque en los bosques templados del centro-sur de Chile, la descripción de comunidades fúngicas se ha realizado casi exclusivamente de acuerdo a la sistemática micológica tradicional, mediante la colecta de carpóforos para el caso de los hongos ECM (Palfner 2001). Los estudios relacionados con los HMA son escasos y están basados en la clasificación morfológica de esporas (Castillo *et al.* 2006). Solo en los últimos años se ha producido un desarrollo de técnicas moleculares en HMA, que ha permitido observar que los hongos más abundantes no forman esporas o lo hacen muy escasamente. En el bosque lluvioso siempreverde predominan las familias Podocarpaceae, Monimiaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Proteaceae, donde sólo esta última familia no forma simbiosis con HMA, por lo tanto, es designada como no-micotrófica (Castillo *et al.* 2006).

Teniendo cuatro bosques templados diferentes y una plantación de *P. menziesii* (Pinaceae), se planteó como hipótesis que los eventos disruptivos, de origen antrópico o natural, producen cambios en la diversidad y dominancia de las especies vegetales de un ecosistema, que

consecuentemente, altera la abundancia de los HMA involucrados. Para comprobar esta hipótesis, se plantearon tres objetivos:

- Determinar la biodiversidad vegetal en bosques templados siempreverdes y caducifolios ( con y sin manejo silvícola) y en una plantación forestal de *P. menziesii*, en condiciones edafo-climáticas similares en el área de estudio.
- Cuantificar la presencia de HMA a través de propágalos (esporas y micelio) en bosques templados siempreverdes y caducifolios (con y sin manejo silvícola) y en una plantación forestal de *P. menziesii*, en condiciones edafo-climáticas similares en el área de estudio.
- Correlacionar la diversidad vegetal con los propágulos de HMA evaluados.

## 3.2 Materiales y Métodos

#### 3.2.1 Descripción de los sitios de estudio

El sitio experimental está localizado en el bosque experimental San Pablo de Tregua (39°38'S; 72°10'W), en la precordillera de la Provincia de Panguipulli, centro-sur de Chile. El suelo es un Andisol moderadamente profundo, de la serie Liquiñe (Acrudoxic Hapludand), derivado de cenizas volcánicas recientes (Veblen *et al.* 1980).

Se seleccionaron cuatro bosques templados distintos y una plantación forestal: (1) Bosque siempreverde prístino (SV), donde las especies arbóreas dominantes corresponde a *Nothofagus dombeyi, Laurelia phillipiana* y *Saxegothaea conspicua*. (2) Bosque siempreverde alterado (SVA), compuesto por *L. philippiana*, *S. conspicua* y *Myrceugenia planipes*, como especies dominantes y *Dasyphyllum diacanthoides*, como especie acompañante. (3) Renoval caducifolio (RC), corresponde a un bosque secundario de *N. alpina*, complementado por pocas especies acompañantes (*N. obliqua*, *N. dombeyi*, *L. phillipiana*). (4) Renoval caducifolio con manejo forestal (RCM), es un bosque secundario compuesto por *N. alpina*, al igual que RC, pero que fue sometido a un raleo de copas, para reducir el área basal en un 35%. (5) Plantación de pino oregón (*P. menziesii*)(ORG), de 25 años de edad.

Las características físico químicas de los suelos de los diferentes sitios, así como las características climáticas y dasométricas de las parcelas en estudio, se indican en el Capítulo 2.

3.2.2 Inventario fitosociológico e índices de diversidad.

El inventario fitosociológico se realizó en febrero de 2006 en cada uno de los sitios en estudio. En

un área representativa de 50 x 50 m se determinó las especies vasculares presentes en los estratos

arbóreos, arbustivos y herbáceo. El porcentaje de cobertura vegetal se determinó de acuerdo a una

estimación visual del diámetro de copas (Steubing et al. 2002), considerando sólo los estratos

arbóreo y arbustivo.

Las especies vasculares hospederas y su grado de colonización, fue determinada de acuerdo al

análisis de raíces hecho por Castillo et al. (2006) en los sitios en estudio y a reportes previos hechos

en literatura para bosques templados (Fontenla et al. 1998).

Los índices de diversidad, riqueza de especies (S'), Simpson (D') y Shannon-Wiener (H') fueron

calculados con los datos obtenidos del inventario fitosociológico y los porcentajes de cobertura

vegetal.

Índice de Simpson

$$\lambda = \sum p_i^2$$

donde p<sub>i</sub>: abundancia proporcional de la especie i (Moreno 2001).

Índice de Shannon-Wiener

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

3.2.3 Cuantificación de la abundancia de HMA

Largo total de hifas contenido en el suelo, fue medido por medio de la metodología de filtración

modificada por Rubio et al. (2003). Para esto, una muestra de 3 g de suelo húmedo se colocaron en

matraces que contenían glicerol: HCl: agua en una relación 12:1:7, y se agitaron por 30 min a 80°C.

La suspensión se filtró a través de tamices de 250 y 38 µm. El material retenido en el tamiz de 38

μm fue resuspendido en agua destilada, agitada por 30 segundos y se dejó reposar. Una submuestra

de la suspensión se filtró y se tiñó con Azul de Tripán 0,05%, dejando reposar por 10 min.

El largo total de hifas se cuantificado mediante el método de intersección de líneas (Giovannetti y

Mosse 1980).

41

Se utilizó otra submuestra de 3 mL para la cuantificación del micelio activo. La alicuota se tiñó con iodonitrotetrazolio (INT), NADH y buffer Tris pH 7,4 (1:1:1) (Kabir et al. 1997). Se consideró la división dicotómica y la distribución irregular de los septos en las hifas, como criterio para diferenciar el micelio de los hongos micorrícicos arbusculares de muestras de suelo (Rillig et al. 2002).

La extracción de esporas de HMA desde el suelo se realizó por el método de tamizado húmedo y decantación descrito por Sieverding (1991). La cuantificación se realizó en placas Doncaster donde se contaron y separaron por tamaño, color y características de la pared. La cuantificación se realizó en quintuplicado.

#### 3.2.4 Análisis estadísticos

Todas las variables fueron analizadas para determinar la normalidad de los residuales y la homogeneidad de varianza. Para medir el efecto del bosque sobre parámetros fúngicos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, y las comparaciones entre promedios se hicieron con la prueba diferencia mínima significativa (DMS), a un p < 0.05. Se realizaron correlaciones con la prueba de correlación Producto- Momento de Pearson y con la prueba Rho de Spearman ( $\rho$ ) para las variables que no cumplieron con todos los supuestos estadísticos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa computacional SPSS 10.0.

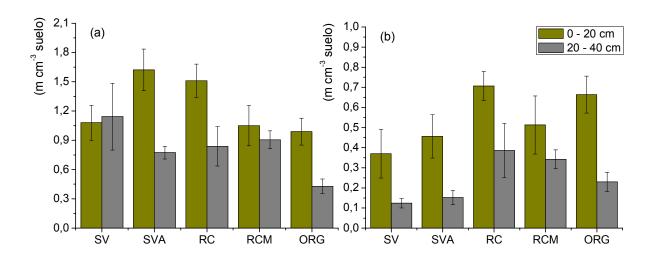
#### 3.3 Resultados

Los cuatro bosques templados y la plantación de *P. menziessi* presentaron diferente riqueza y especies hospederas de HMA, y por lo tanto, una diferente cobertura de especies hospederas de HMA (Tabla 3.1). La plantación de *P. menziesii* (ORG) presentó la menor diversidad, lo que caracteriza a este tipo de plantaciones monoespecíficas y que se refleja en el Índice de Simpson. Además, en la plantación no se encontró especies que establecieran simbiosis con estos hongos. El bosque siempreverde (SV) es el que presenta la mayor cobertura de especies hospederas, principalmente en el bosque alterado hace 50 años (SVA).

El micelio total y activo no fue afectado por la interacción del tipo de bosque y la profundidad. La profundidad afectó la cantidad de micelio total y activo. En los primeros 20 cm de profundidad el micelio total se redujo de  $1,27 \pm 0,45$  m cm<sup>3</sup> a sólo  $0,81 \pm 0,45$  m cm<sup>3</sup> de 20 a 40 cm de profundidad, lo que significa una reducción del 36,2%. Mientras que el micelio activo disminuyó desde  $0,53 \pm 0,24$  m cm<sup>3</sup> en los primeros 20 cm a  $0,25 \pm 0,18$  m cm<sup>3</sup>, a la profundidad mayor.

**Tabla 3.1.** Caracterización de la biodiversidad vegetal a través de Índices de dominancia (Índice de Simpson), de equidad (Índice de de Shannon-Wiener) y riqueza específica (S'), en cuatro bosques templados y en una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. Menziesii*.

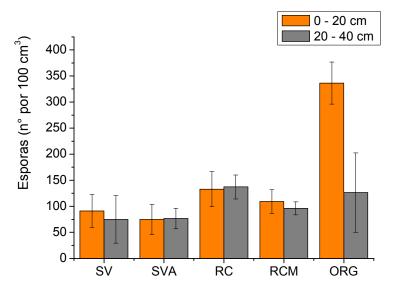
	Riqueza	Especies	Cobertura	Índice de	Índice de
Bosque	específica	hospederas	especies	Simpson	Shannon-
Dosque	(S')	de HMA	hospederas (%)	(λ)	Wiener (H')
SV	21	3	47,2	0,242	1,380
SVA	16	6	83,0	0,395	1,301
RC	30	6	32	0,737	1,668
RCM	26	7	12,5	0,382	0,914
ORG	2	-	-	1	0



**Figura 3.1.** Densidad de micelio de HMA (m cm<sup>3</sup> de suelo) a dos profundidades, en cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziesii*, ubicados en condiciones edafo-climáticas similares, en el predio San Pablo de Tregua, Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. (a) Micelio total. (b) Micelio activo. SV: bosque siempreverde; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

Por otra parte, el micelio activo fue significativamente más abundante en el renoval caducifolio (RC) y la plantación de *P. menziesii* (ORG), respecto al bosque siempreverde.

La interacción de la profundidad y del tipo de bosque, afectó la abundancia de esporas registradas en los diferentes sitios (Figura 3.2). Se puede observar que la mayor cantidad de esporas se encontró en la plantación de *P. menziesii* en los primeros 20 cm de profundidad, mientras que el bosque siempreverde alterado y prístino, y el renoval caducifolio con y sin manejo silvícola, no presentaron diferencia estadística entre ellos ni con la profundidad.



**Figura 3.2**. Abundancia de esporas de HMA por 100 cm³ de suelo a dos profundidades en cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziessi*, ubicados en condiciones edafo-climáticas similares en el predio San Pablo de Tregua, Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio con manejo; ORG: plantación de *P. menziessi*.

De los datos obtenidos se encontró que el porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA estuvo negativamente correlacionado con la abundancia de esporas y el micelio activo. Otros parámetros que presentaron correlación con los parámetros fúngicos evaluados se presentan en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2**. Correlaciones entre parámetros químicos de suelo, climáticos y vegetacionales, y parámetros fúngicos de los cuatro bosques templados y la plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

	Micelio total	Micelio activo	Número de esporas	
Riqueza	-	-	$r=-0.35^*$	
Cobertura especies		$r = -0.29^*$	R= -0,45**	
hospederas HMA (%)	-	10,29	K0,43	
Precipitación	-	$Rho = -0.39^{**}$	Rho=-0,41*	
Contenido de MO	$r=0,42^{**}$	$r=0,44^{**}$	-	
Fósforo total	-	-	$r=0.31^*$	

r: Coeficiente de correlación de Pearson; Rho: Coeficiente de correlación de Spearman, n=5.

#### 3.4 Discusión

Las diferencias tanto en la riqueza de especies vegetales como en el número de especies hospederas entre el bosque siempreverde prístino y alterado, se debe principalmente a la extracción de los mejores ejemplares de *N. dombeyi*, permitiendo que otras especies puedan desarrollarse. El raleo de copas en el bosque secundario deciduo, permitió que el sotobosque esté dominado por *Chusquea* sp., además de la aparición de un mayor número de especies herbáceas. Los índices de dominancia y equidad, muestran sitios forestales con diferente estructura, por lo que permiten realizar las comparaciones establecidas.

Las esporas son uno de las componentes principales en el ciclo de vida de los HMA, le permiten dispersarse y son importantes para la colonización de hábitats (Allen 1991). De los factores que tienen un efecto sobre la producción de esporas e hifas, las especies hospederas son uno de los más importantes. Esta dependencia ha sido demostrada en varios experimentos de maceta (Bever *et al.* 1996; Douds y Millner 1999; Eom *et al.* 2000; Bever 2002). Los resultados obtenidos por Burrows y Pfleger (2002b) muestran un correlación positiva entre cobertura de *Lespedeza* sp. y número de esporas, y una correlación negativa entre cobertura de *Schizachyrium* sp. y número de esporas. Estos mismos autores (2002a), encontraron una reducida esporulación y crecimiento de hifas en parcelas con una baja diversidad específica de plantas vasculares, lo cual es opuesto a lo encontrado en los bosques del presente estudio, con un alto contenido de MO y elevada precipitación anual. La biomasa radical es otro factor relacionado con la abundancia de HMA (Treseder y Cross 2006), ya que estaría relacionado con la disponibilidad de C. De acuerdo a datos sobre biomasa radical fina,

<sup>\*\*</sup> significativo  $p \le 0.01$ ; \* significativo  $p \le 0.05$ .

en los sitios con bosque nativo (R. Godoy, datos no publicados), no hay correlación entre la biomasa radical y la abundancia fúngica. La mayor biomasa radical se registró en el bosque siempreverde alterado, donde el micelio activo y número de esporas son las más bajas después del bosque siempreverde prístino.

Los resultados obtenidos presentaron un patrón opuesto a lo observado en la literatura, ya que al aumentar la riqueza o la cobertura de especies hospederas, el número de esporas disminuyó significativamente (Tabla 3.3). Esta tendencia también se observó entre micelio activo y la cobertura de especies hospederas. No se encontró una disminución en los parámetros fúngicos medidos en la plantación de P. menziesii, como se esperaba, debido a que corresponde a una plantación monoespecífica, asociada con hongos ectomicorrízicos, lo que reduciría el potencial infectivo de los HMA (Koide y Schreiner 1992; Giovannetti y Sbrana 1998; Vestberg et al. 2005; Püschel et al. 2008; Violi et al. 2008). Si no existe un hospedero disponible, HMA solo pueden persistir como propágulos dormantes (Miller et al. 1985). Esto podría explicar, en parte la presencia de esporas producto de la colonización de plantas endomícorízicas en los primeros estadios de establecimiento de la plantación de P. menziessi, pero no la de micelio activo, la cual no difiere de los bosques siempreverde ni deciduo (Tabla 3.2). Matsumura et al. (2007) observó en plantas de rabanito (Paphanus sativus L. Midoribijin) la formación de esporas e hifas, sin la formación de arbúsculos. Este mismo comportamiento fue observado por Cázares y Trappe (1993) en plantas de vivero de Pseudotsuga menziesii. La presencia de HMA en Pinaceae parece ser un fenómeno bastante más común a lo que se pensaba; sin embargo, su importancia ecológica es aún desconocida (Smith et al. 1998). Esto transformaría a esta especie de un hospedero de ECM a hospedero de HMA y ECM, sin que se precise la calidad de este hospedero.

La baja producción de esporas en ambos bosques siempreverdes, que corresponden a bosques maduros, con el mayor porcentaje de cobertura de especies hospederas, se podría deber a que las especies presentes, en estados avanzados de sucesión, son consideradas micotróficas facultativas, como ha sido señalado por lo menos en praderas (Newsham et al. 1995) y en bosques tropicales (Zangaro et al. 2000).

Frecuentemente, la esporulación de estos hongos es considerada como una medida de éxito (Bever *et al.* 1996; Smith y Read 2008). Sin embargo, también podría ser en respuesta a un severo estrés medioambiental y ser por tanto un bioindicador (dispersión en tiempo y espacio) (Allen 1991). Esta

idea concuerda con los resultados de Gemma *et al.* (1989), donde la esporulación es frecuentemente asociada con la muerte de las plantas en ecosistemas agrícolas.

El micelio total y activo en estos sitios es bastante bajo, menor a 2 m de micelio total por mL<sup>-1</sup> de suelo y a 1,2 m de micelio activo, muy inferior a lo reportado por Seguel *et al.* (2008) en suelos forestales del tipo Roble-Raulí- Coigüe, de la Región de la Araucanía (39°S), centro- sur de Chile. En este sitio el micelio total varió entre 3 y 5 m mL<sup>-1</sup>, y el micelio activo entre 1,5 y 4 m mL<sup>-1</sup>, en los primeros 20 cm de profundidad. En agroecosistemas, se han reportados densidades de micelio de 19,3 m cm<sup>-3</sup> en condiciones de cero labranza (Borie et al. 2000). Allen y Allen (1986) señala que el 25% de la biomasa microbiana en la rizósfera puede deberse al micelio de HMA. Esta baja abundancia de esporas y micelio, podría ser reflejo de la calidad micotrófica y estado fenológico de los hospederos.

#### 3.5 Conclusiones

En los sitios estudiados no existe relación entre la diversidad o disponibilidad de hospedero de HMA y la densidad de micelio extraradical y contenido de esporas de HMA. Existe una disminución en el número de esporas al aumentar el porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA, en estos bosques templados de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

La densidad de esporas y micelio de HMA encontrado en la plantación de *P. menziesii*, nos hace replantear su calidad de no hospedero de HMA; así como los mecanismos de dispersión y supervivencia de propágulos, sobre todo al considerar su importancia en eventuales programas de restauración del paisaje.

La intervención del bosque nativo produce cambios estructurales y de composición de las especies vegetales, sin que esto represente una variación significativa en la densidad de esporas y micelio de HMA medidos. De esta forma, una disminución en la disponibilidad de carbono en estos bosques templados, ya sea en el número o porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA, sería compensada mediante algún mecanismo que permite un crecimiento similar del hongo bajo diferentes condiciones vegetacionales.

## 3.6 Referencias

- Allen, E. B. y M. F. Allen (1986). Water relations of xeric grasses in the field: interaction of mycorrhizae and competition. New Phytologist **104**: 559-571.
- Allen, M. F. (1991). The ecology of mycorrhizae. New York, Cambridge University Press, 184 pp.
- Bever, J. D. (2002). Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. Plant and Soil **244**: 281–290.
- Bever, J. D., J. B. Morton, J. Antonovics y P. A. Schultz (1996). Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. Journal of Ecology 84: 71-82.
- Borie, F., R. Rubio, A. Morales y C. Castillo (2000). Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. Revista Chilena de Historia Natural **73**(4): 749-756.
- Burrows, R. L. y F. L. Pfleger (2002a). Arbuscular-mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. Canadian Journal of Botany **80**: 120-130.
- Burrows, R. L. y F. L. Pfleger (2002b). Host responses to AMF from plots differing in plant diversity. Plant and Soil **240**: 169–179.
- Castillo, C., F. Borie, R. Godoy, R. Rubio y E. Sieverding (2006). Diversity of mycorrhizal plant species and arbuscular mycorrhizal fungi in evergreen forest, deciduous forest and grassland ecosystems of Southern Chile. Journal of Applied Botany and Food Quality **80**: 40-47.
- Cázares, E. y J. M. Trappe (1993). Vesicular endophyte in roots of the Pinaceae. Mycorrhiza 2: 153-156.
- CONAF-CONAMA (1999). Catastro y evaluación de recursos vegetacionales nativos de Chile. Informe nacional con variables ambientales. Santiago, Chile, 27 pp.
- Douds, D. D. y P. D. Millner (1999). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. Agricultural Ecosystem and Environment **74**: 77–93.
- Eom, A.-H., D. Hartnett y G. Wilson (2000). Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. Oecologia **122**: 435-444.
- Fontenla, S., R. Godoy, P. Rosso y M. Havrylenko (1998). Root associations in *Austrocedrus* forest and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas. Mycorrhiza 8: 29-33.
- Garrido, N. (1988). Agaricales s. l. und ihre Mykorrhizen in den *Nothofagus*-Wäldern Mittelchiles, Bibliotheca Mycologica 120, 528 pp.

- Gehring, C. y J. Connell (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi in the tree seedlings of two Australian rain forests: occurrence, colonization, and relationships with plant performance. Mycorrhiza 16: 89-98.
- Gemma, J. N., R. E. Koske y M. Carreiro (1989). Seasonal dynamics of selected species of V-A mycorrhizal fungi in a sand dune. Mycological Research **92**: 317-321.
- Giovannetti, M. y B. Mosse (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist **84**: 489-500.
- Giovannetti, M. y C. Sbrana (1998). Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. Mycorrhiza 8: 123-130.
- Godoy, R., R. Carrillo, R. Hildebrandt-Vögel y A. Vögel (1994). Zur Bedeutung der Mykorrhiza in *Fitzroya cupressoides* Wald Südchiles. Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie **23**: 135-141.
- Godoy, R. y R. Mayr (1989). Caracterización morfológica de micorrizas vesículo-arbusculares en coníferas endémicas del sur de Chile. Bosque **10**(2): 89-98.
- Jakobsen, I. y L. Rosendahl (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. New Phytologist 115: 77-83.
- Janos, D. P. (1980a). Mycorrhizae influence tropical succession. Biotropica 12: 56-64.
- Janos, D. P. (1980b). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae Affect Lowland Tropical Rain Forest Plant Growth. Ecology **61**(1): 151-162.
- Jennings, D. H. (1995). The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Kabir, Z., I. P. O'Halloran, J. W. Fyles y C. Hamel (1997). Seasonal changes of arbuscular of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal densities and mycorrhizal root colonization. Plant Soil **192**: 285-293.
- Koide, R. T. y R. P. Schreiner (1992). Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **43**: 557–581.
- Lovelock, C. E., S. F. Wright y K. A. Nichols (2004). Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. Soil Biology and Biochemistry **36**(6): 1009-1012.
- Matsumura, A., S. Horii y T. Ishii (2007). Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Intercropping with Bahiagrass on Growth and Anti-oxidative Enzyme Activity of Radish. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **76**(3): 224-229.

- Miller, R. M., B. A. Carnes y T. B. Moorman (1985). Factors influencing survival of vesicular-arbuscular mycorrhiza propagules during topsoil storage. Journal of Applied Ecology 22: 259-266.
- Moreno, C., Ed. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. Zaragoza, España, 84 pp.
- Newsham, K. K., A. H. Fitter y A. R. Watkinson (1995). Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. Journal of Ecology **83**: 991–1000.
- Palfner, G. (2001). Taxonomische Studien an Ektomykorrhizen aus den *Nothofagus*-Wäldern Mittelsüdchiles. Berlin Stuttgart, Bibliotheca Mycologica 190, 243 pp.
- Püschel, D., J. Rydlová y M. Vosátka (2008). Does the sequence of plant dominants affect mycorrhiza development in simulated succession on spoil banks? Plant Soil **302**: 273–282.
- Read, D. J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. Experientia 47: 376-391.
- Rillig, M., S. F. Wright, R. Shaw y B. Field (2002). Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. Oikos **97**: 52-58.
- Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Canadian Journal of Soil Science **84**(4): 355-363.
- Rubio, R., F. Borie, C. Schalchli, C. Castillo y R. Azcón (2003). Occurence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilization and fungal inoculation. Applied Soil Ecology **23**: 245-255.
- Seguel, A., R. Rubio, R. Carrillo, A. Espinosa y F. Borie (2008). Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del sur de Chile. Bosque **29**(1): 11-22.
- Sieverding, E. (1991). Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems, 367 pp.
- Siqueira, J. O., M. A. C. Carneiro, N. Curi, S. C. da Silva Rosado y A. C. Davide (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, J. E., K. A. Johnson y E. Cazares (1998). Vesicular mycorrhizal colonization of seedlings of Pinaceae and Betulaceae after spore inoculation with Glomus intraradices. Mycorrhiza 7(6): 279-285.
- Smith, S. E. y D. J. Read (2008). Mycorrhizal Symbiosis. San Diego, California, Academic Perss, 800.
- Steubing, L., R. Godoy y M. Alberdi (2002). Métodos de ecología vegetal. Santiago, Editorial Universitaria, 345 pp.

- Treseder, K. K. y A. Cross (2006). Global Distributions of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Ecosystems **9**: 305–316.
- Valenzuela, E., G. Moreno, S. Garnica, R. Godoy y C. Ramírez (1999). Mycosociology in native forests of *Nothofagus* of the X Región of Chile, diversity and ecological role. Mycotaxon **72**: 217-226.
- Van der Heijden, M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken y I. R. Sanders (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396: 69-72.
- Veblen, T. T., F. M. Schlegel y B. Escobar (1980). Structure and dynamics of old-growth *Nothofagus* forests in the Valdivian Andes, Chile. Journal of Ecology **68**: 1-31.
- Vestberg, M., K. Saari, S. Kukkonen y T. Hurme (2005). Mycotrophy of crops in rotation and soil amendment with peat influence the abundance and effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi in field soil. Mycorrhiza 15: 447-458.
- Violi, H. A., A. F. Barrientos-Priego, S. F. Wright, E. Escamilla-Prado, J. B. Morton, J. A. Menge y C. J. Lovatt (2008). Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforests in Veracruz and Chiapas, Mexico. Forest Ecology and Management 254: 276–290.
- Zangaro, W., V. L. R. Bononi y S. B. Trufen (2000). Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. Journal of Tropical Ecology **16**: 603-622.

## Capítulo 4

Aporte de la fracción GRSP a la materia orgánica del suelo y comparación con las fracciones ácidos húmicos y fúlvicos, en bosques templados y una plantación forestal de Pseudotsuga menziesii

#### Resumen

La materia orgánica del suelo (MOS) representa la mayor reserva de carbono (C) en la biósfera. La glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP) puede constituir una fracción importante de esta MOS. La GRSP tiene una función directa en el secuestro de C a través del contenido de este elemento en la molécula y otra indirecta en la formación de agregados de suelo estables al agua. Por lo que se estudió la participación de la GRSP en el secuestro de C, cuantificando su aporte de C y N al C y N total del suelo y se comparó con el aporte que hacen los ácidos húmicos y fúlvicos, en cuatro bosques templados y en una plantación forestal de Pseudotsuga menziesii, a dos profundidades de suelo. Para establecer su aporte indirecto se planteó determinar si existe una relación de la GRSP en la formación de agregados estables al agua. La GRSP fue la fracción que más contribuyó a la MOS en todos los sitios estudiados, representando hasta un 19% y un 20% del C y N total del suelo, respectivamente. Por lo que al formar parte de la MOS más estabilizada, constituye una importante forma de secuestro de C en los diferentes ecosistemas. El aporte indirecto al secuestro de carbono no fue significativo; sin embargo, no se puede descartar, ya que tuvo una correlación negativa con el contenido de arcillas. Finalmente, los factores que determinan el contenido de GRSP en el suelo no están muy claros aún. Sin embargo, el manejo silvícola produjo una disminución en el contenido de GRSP, en el corto plazo para los bosques de Nothofagus estudiados.

**Palabras claves:** Bosques templados, *Pseudotsuga menziesii*, Materia orgánica del suelo, GRSP, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos.

#### Abstract

Soil organic matter (SOM) is the major reserve of carbon (C) in the biosphere. Glomalin relates soil protein (GRSP) is a major constituent of SOM. GRSP has a direct role in the C sequestration because the carbon in the moiety and an indirect role through the participation in the water stable soil aggregates formation. Then, the aims were to study the relationship with C sequestration by the quantification of C and N GRSP contribution to C and N soil and to compare it with the contribution that made humic and fulvic acids, in four temperate forests and in a forest plantation of *Pseudotsuga menziesii*, at two soil depth; and to determine the indirect contribution through the participation of GRSP on the water stable soil aggregates formation. The GRSP was the most abundant fraction in all the study sites. It represented up to 19% and 20% of C and N of total soil, respectively. Hence it forms part of very stabilized SOM and constitutes an important way to sequester C in the ecosystems. Its indirect role was not significant. However, it is not possible to

reject it because the negative correlation with clay content. Finally, the factors involve in soil GRSP amount are not clear until now. Nonetheless forest silvicultural management decreased the GRSP amount in the *Nothofagus* studied forests in a short time.

Key words: Temperate forests, Pseudotsuga menziesii, soil organic matter, GRSP, humic acid, fulvic acid

## 4.1 Introducción

La materia orgánica del suelo (MOS) representa la mayor reserva de carbono (C) en la biósfera, la que se estima en aproximadamente 1600 Pg C (Schlesinger 1997; Batjes 1998; Hedges *et al.* 2000). Está involucrada en múltiples procesos como la estructura y fertilidad del suelo, capacidad de infiltración de agua, resistencia a la erosión, adsorción y degradación de contaminantes (Grinhut *et al.* 2007).

La MOS consiste en una mezcla heterogénea de partículas y moléculas con propiedades físicas y químicas variables (Baldock *et al.* 2004). Ella es el reflejo de la vegetación, microorganismos de suelo, clima, material parental, tiempo de equilibrio y alteraciones antrópicas como naturales (Paul *et al.* 1997). Los componentes más estudiados han sido las sustancias húmicas, que incluyen a los ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas. Estas fracciones han sido metodológicamente definidas, donde los ácidos húmicos son el componente soluble en soluciones alcalinas pero que precipita en condiciones ácidas. Los ácidos fúlvicos son solubles bajo cualquier condición de pH, y las huminas son insolubles en soluciones a cualquier pH (Tan 1995). Se forman por reacciones de síntesis secundarias (humificación) durante los procesos de degradación y transformación de residuos de plantas y animales y organismos muertos en general (Stevenson 1994; Hayes y Clapp 2001), obteniendo una mezcla compleja de moléculas heterogéneas y químicamente muy reactivas (MacCarthy 2001).

Las sustancias húmicas, principalmente ácidos húmicos y huminas, son extremadamente resistentes a la degradación y comprenden sobre el 80% del carbono orgánico del suelo (Hayes y Graham 2000; Hayes y Clapp 2001). Sin embargo, su estabilidad está relacionada con la mineralogía del suelo, observándose que disminuye con la profundidad (Paul *et al.* 1997; Torn *et al.* 1997). Los ácidos fúlvicos se caracterizan por poseer un menor contenido de carbono (C) y nitrógeno (N) y ser más jóvenes que los ácidos húmicos (Campbell *et al.* 1967). En los suelos volcánicos ácidos, donde predominan el alofán y minerales tipo alofán, la microflora está dominada por hongos con una alta capacidad de síntesis de humus (Zunino *et al.* 1982). Esto ha permitido la acumulación de macromoléculas con una alto contenido de C, N, P y S, en ecosistemas no disturbados (Borie y Zunino 1983; Aguilera *et al.* 2000).

La MOS también está constituida, en ocasiones en cantidades significativas, por glomalina (Nichols 2003; Lovelock *et al.* 2004), definida metodológicamente como glomalina asociada a las proteínas

del suelo (GRSP). GRSP es una glicoproteína producida principalmente por los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Wright *et al.* 1996; Wright 2000), los que son simbiontes obligados, obteniendo todo el C necesario de su hospedero (Jakobsen y Rosendahl 1990; Allen 1991; Fitter *et al.* 2000; Smith y Read 2008). Esta proteína se caracteriza por poseer una gran adhesividad, hidrofobicidad, resistencia a la degradación, un alto contenido de hierro y a su interacción con la fracción inorgánica del suelo (Haddad y Sarkar 2003a), lo que permite su acumulación en el suelo (Nichols y Wright 2005). Estas características permiten su extracción sólo al ser expuesta a un buffer alcalino (Citrato de sodio pH 7,0 u 8,0) y altas temperaturas (autoclave a 121°C).

Se ha señalado que la GRSP es una fracción única y distinta de las sustancias húmicas, dentro de la MOS, la cual posee contenidos de C, N y H distintos a los ácidos húmicos y fúlvicos (Nichols 2003). Se le ha asociado una función directa y otra indirecta en la acumulación de C del suelo (Rillig *et al.* 2001a). Su rol directo es a través del C contenido en la molécula, por lo que representa un importante sumidero de C (Treseder *et al.* 2003). Su participación indirecta es mediante la participación en la formación de agregados de suelo estables al agua, protegiendo a la materia orgánica de una rápida degradación (Rillig y Steinberg 2002). GRSP ha sido positivamente relacionada con el formación de agregados de suelo (Wright y Upadhyaya 1996; Wright y Upadhyaya 1998; Wright *et al.* 1999; Franzluebbers *et al.* 2000; Wright y Anderson 2000). Los niveles de GRSP más altos se han encontrado en suelos volcánicos tanto con bosques tropicales en Hawaii (>100 mg g<sup>-1</sup>suelo) (Rillig *et al.* 2001b) como con bosques templados en el sur de Chile (90-113 mg g<sup>-1</sup>suelo) (Morales *et al.* 2005), lo que podría estar relacionado con la mineralogía de estos suelos.

Los HMA se encuentran característicamente en ecosistemas con una gran diversidad vegetal, como son los bosques templados. Sin embargo, su contribución al ciclo del C en estos ecosistemas ha sido largamente ignorada (Fontenla *et al.* 1998; Smith y Read 2008). Los bosques templado lluviosos del sur de Chile, que se han desarrollado sobre suelos de diferente origen como metamórficos, volcánicos y ñadis (Donoso y Ramírez 2000), se caracterizan por presentar una dominancia de especies arbóreas hospederas de HMA, como las familias *Cupresaseae*, *Myrtaceae*, *Podocarpaceae*, entre otras (Godoy *et al.* 1994a; Godoy *et al.* 1994b; Godoy *et al.* 1994c). Por otra parte, el potencial de secuestro de carbono en suelos forestales ha adquirido una particular importancia, especialmente por la relación que tiene con el cambio climático global. Esto ha llevado a desarrollar estrategias que permitan un manejo sustentable del bosque. Las estrategias de manejo aplicadas a los bosques ya existentes pueden producir un incremento en el carbono del suelo; sin

embargo, los resultados han sido contradictorios (Jandl *et al.* 2007). Estos autores señalan que los esfuerzos deberían centrarse en incrementar la fracción de C recalcitrante del suelo, lo cual es un cambio mucho más lento que las ganancias en biomasa vegetal, que toma décadas hasta que ocurran ganancias netas.

En los bosques templados lluviosos del sur de Chile, donde se encuentran especies de plantas vasculares hospederas de HMA, se esperaría encontrar un alto contenido de GRSP, respecto a una plantación monoespeífica de la conífera introducida *P. menziessi*. Por lo tanto, los objetivos planteados en este estudio fueron cuantificar el aporte de carbono y nitrógeno de la GRSP al carbono y nitrógeno total del suelo y compararlo con el aporte que hacen los ácidos húmicos y fúlvicos por separado, en los bosques templados y en la plantación de *P. menziesii*, a dos profundidades de suelo. Por otra parte, se planteó determinar si existe una contribución indirecta a la acumulación de carbono a través de su participación en formación de agregados de suelo estables al agua.

# 4.2 Materiales y Métodos

#### 4.2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en el predio San Pablo de Tregua, (9°38'S; 72°10'W), en la Cordillera de Los Andes, Provincia de Panguipulli, centro-sur de Chile. Se seleccionaron cuatro bosques templados, un bosque siempreverde prístino (SV), bosque siempreverde alterado (SVA), un renoval caducifolio (RC) y un renoval caducifolio con manejo forestal (RCM), más una plantación forestal de *P. menziesii* (ORG), que se encuentran en similares condiciones edafo-climáticas. Las características de los sitios seleccionados se encuentran descritas en el Capítulo 2.

# 4.2.2 Extracción y cuantificación de glomalina relacionada a las proteínas de suelo (GRSP)

La fracción GRSP del suelo se extrajo utilizando la metodología propuesta por Wright y Upadhyaya (1996; 1998). La glomalina fácilmente extraíble (EE-GRSP) se obtuvo con buffer citrato 20 mM, pH 7 a 121°C por 30 minutos. La glomalina total (GRSP) se extrajo en ciclos sucesivos en autoclave (121°C), en buffer citrato 50 mM, pH 8.0 por 60 minutos, hasta que el sobrenadante no presentara color. Los sobrenadantes obtenidos fueron almacenado a 4°C. Para la cuantificación se

utilizó la prueba de medición de proteína total de Bradford (Wright *et al.* 1996). La fracción de glomalina total determinada por la metodología de Bradford se denomina proteínas de suelo reactivas a Bradford (BRSP). La fracción fácilmente extraíble lleva el prefijo EE-BRSP

La purificación de GRSP se realizó con la metodología de Wright *et al.*(1998), la cuál consiste en una precipitación con HCl 0,1 M a pH 2.0, seguido de una resuspensión en un mínimo volumen de NaOH 0,1 M. Posteriormente se realiza una diálisis con agua desionizada y se liofilizó. La glomalina purificada fue cuantificada en forma gravimétrica.

La glomalina purificada fue resuspendida en buffer fosfato (PBS) y cuantificada por medio de la prueba de ELISA. (Wright *et al.* 1996). Para esto se utilizó 50 μL. de muestra en cada pozo de la placa de lectura y se dejó secar durante la noche. Posteriormente se incubó con el anticuerpo monoclonal 32B11 disuelto en PBS, en una relación 1:3, por 1 hora. Después se incubó por 1 hora con el anticuerpo IgM. La enzima fosfatasa alcalina ExtrAvidin pH 9,4 se agrega posteriormente y se incuba por 60 minutos más. Finalmente, se disolvió una tableta (5 mg) de sustrato para fosfatasa Sigma 104 en buffer diethanolamina, se agregó a la placa, se incubó 30 minutos y se midió el contenido de glomalina inmunoreactiva por espectrofotomefría a 410 nm en un lector de microplaca BioRad. Como estándar se utiliza suelo 100% inmunoreactivo, determinado de acuerdo a su valor Bradford y ELISA.

#### 4.2.3 Extracción de ácidos húmicos y fúlvicos

Se utilizó la metodología propuesta por Tan (1995) para la extracción de las sustancias húmicas del suelo. Ésta consiste en una extracción con NaOH 0,1 M, a temperatura ambiente. La solución obtenida se agita por 24 horas y se centrifuga, descartando el precipitado que contiene las huminas y las arcillas del suelo. El sobrenadante se acidifica con HCl pH 2,0 para precipitar los ácidos húmicos (AH). Se separa el sobrenadante que contiene los ácido fúlvicos (AF) y los AH precipitados por centrifugación. Los AH se disuelven en NaOH 0,1 M y posteriormente se precipitan con HCl y HF. Finalmente se lavan con agua destilada y se centrifugan, descartando el sobrenadante. Los AF se purificaron, eluyéndolos a través de una columna de amberlita XAD-8. Los AF retenidos fueron eluídos de la columna con NaOH 0,1 M y se liofilizaron.

### 4.2.4 Análisis elemental de C y N

La concentración de C y N del suelo y las fracciones GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos fue

determinado en duplicado en un analizador elemental Elementar Vario EL del departamento de Química Inorgánica y Analítica, de la Universidad de Chile.

#### 4.2.5 Determinación del porcentaje de agregados estables al agua.

Para la determinación del porcentaje de agregados estables al agua, de cada una de las cinco repeticiones de los sitios en estudio, se tomó 20g de suelo de los primeros 20 cm de profundidad, se dejó secar por 48 horas a temperatura ambiente y se tamizó a 1 mm. Posteriormente, se pesó 4 g del suelo retenido en el tamiz de 1 mm y se sumergió en agua destilada a una frecuencia de 35 ciclos por minuto. Los agregados estables son sumergidos en una solución dispersante de polifosfato de sodio hasta que solo quedaron partículas de arena en la cápsula. Ambas fracciones, los agregados no estables y estables al agua, se secaron a 110°C por 12 horas (Kemper y Rosenau 1986)

#### 4.2.6 Análisis estadísticos

Todas las variables fueron analizadas para comprobar la normalidad de residuales y homogeneidad de varianza. Para conocer si existía un efecto de la interacción entre sitios forestales y profundidad de muestreo o entre los sitios forestales, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), seguida de la prueba de comparación múltiple de promedios Diferencia Mínima Significativa (DMS) o contrastes ortogonales para la comparación de grupos cuando la interacción entre las variables fue significativa.

Se utilizó la prueba de correlación de Pearson para determinar la correlación entre las variables analizadas.

Para todos los análisis se usó un nivel de significancia de 5%. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS 10.0.

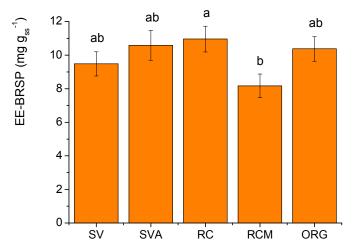
#### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Contenido de GRSP

La concentración de la fracción de EE-BRSP no fue afectada significativamente por la interacción sitio forestal y profundidad de suelo. Sin embargo, la concentración varió significativamente de acuerdo al sitio forestal de procedencia y profundidad de suelo. En los primeros 20 cm de profundidad hubo un promedio de  $11,73 \pm 0,37$  mg g<sup>-1</sup>, mientras que entre 20 y 40 cm se encontró

 $8.03 \pm 0.31$  mg g<sup>-1</sup>, lo que significa una disminución del 31, 6% con la profundidad.

El renoval caducifolio no manejado tuvo el mayor contenido de EE-BRSP,  $10.96 \pm 2.43$  mg g<sup>-1</sup>, junto con el bosque siempreverde alterado (SVA) y la plantación de *P. menziesii* (ORG) 10, 57  $\pm$  2,8 y  $10.38 \pm 2.3$  mg g<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4.1). Todos ellos fueron diferentes del renoval caducifolio con manejo forestal (RCM), el cual presentó el contenido de EE-BRSP más bajo (8,17  $\pm$  2,2 mg g<sup>-1</sup>).

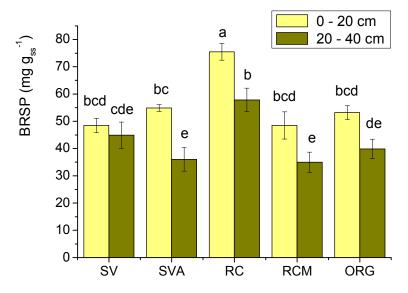


**Figura 4.1.** Contenido de EE-BRSP en cuatro bosques templados y en una plantación de P. menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile, a una profundidad de 0-40 cm. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p \le 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios Diferencia Mínima Significativa (DMS). SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación P. menziesii.

A diferencia de la fracción EE-BRSP, la interacción de sitio forestal y profundidad de suelo fue significativa para el contenido de BRSP (Figura 4.2). El mayor contenido de BRSP se encontró en los primeros 20 cm de profundidad del renoval caducifolio sin manejo forestal y es diferente de todos los demás sitios forestales y profundidades.

En el bosque siempreverde prístino (SV) la concentración de BRSP no disminuyó significativamente al aumentar la profundidad, mientras que todos los demás sitios forestales presentaron una disminución que fluctuó entre 19,0% y 34,4% en el renoval caducifolio con manejo forestal (RCM) y en el bosque siempreverde alterado (SVA), respectivamente.

Al cuantificar la fracción inmunoreactiva de GRSP (IRSP), no se observaron diferencias significativas entre los sitios forestales ni entre profundidades. Se observó una tendencia en los promedios de esta fracción a aumentar con la profundidad (Tabla 4.1.). Sin embargo, los valores obtenidos no superaron el 1,9% del total de BRSP en promedio.

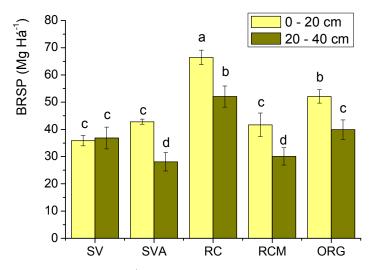


**Figura 4.2**. Contenido de BRSP en cuatro bosques templados y en una plantación de P. menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile, a dos profundidades de suelo. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p \le 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios Diferencia Mínima Significativa (DMS). SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de P. menziesii.

**Tabla 4.1.** Contenido de proteína de suelo inmunoreactiva (IRSP) (mg g<sup>-1</sup>) en cuatro bosques templados y en una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

	IRSP (mg g <sup>-1</sup> )				
	0 – 20 cm	20 – 40 cm			
SV	$0.96 \pm 0.73$	$1,16 \pm 0,79$			
SVA	$0,69 \pm 0,51$	$0.95 \pm 0.32$			
RC	$0,85 \pm 0,64$	$0,74 \pm 0,22$			
RCM	$0,25 \pm 0,13$	$0,54 \pm 0,36$			
ORG	$0,59 \pm 0,42$	$0,90 \pm 0,52$			

Al expresar el contenido de BRSP por unidad de superficie de bosque, se observa que el aporte máximo fue hecho en el renoval caducifolio (RC), donde alcanzó  $66,4 \pm 6,0$  Mg ha<sup>-1</sup> de BRSP en los primeros 20 cm y  $52,1 \pm 8,6$  Mg ha<sup>-1</sup> de BRSP entre 20 y 40 cm de profundidad. Mientras que los menores aportes fueron hechos por el renoval caducifolio con manejo silvícola (RCM) y el bosque siempreverde alterado (SVA) entre los 20 y 40 cm, donde aportaron  $30,1 \pm 7,1$  Mg ha<sup>-1</sup> y  $28,1 \pm 7,5$  Mg ha<sup>-1</sup> de BRSP, respectivamente.



**Figura 4.3**. Aporte de BRSP (Mg ha<sup>-1</sup>) a dos profundidades de suelo, en cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. Letras distintas expresan diferencia significativa ( $p \le 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de contrastes ortogonales para la comparación de grupos. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

# 4.3.2 GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos de la materia orgánica del suelo: aportes de carbono y nitrógeno.

Al comparar el aporte de las fracciones BRSP, ácidos húmicos y fúlvicos a la materia orgánica del suelo, se observó que la contribución a la materia orgánica tuvo el siguiente orden: BRSP > ácidos húmicos > ácidos fúlvicos, en todos los sitios forestales, excepto en el renoval caducifolio con manejo forestal. En este bosque se encontró que en profundidad, el aporte hecho por los ácidos húmicos y fúlvicos fue igual entre si e inferior al producido por BRSP (Tabla 4.2). A mayor profundidad, la cantidad de ácidos húmicos disminuyó un 48,3% en promedio, siendo el renoval caducifolio con manejo forestal donde se cuantificó el menor contenido de ácidos húmicos a ambas profundidades. Al comparar la cantidad de ácidos fúlvicos se encontró que no varió con la profundidad de suelo.

**Tabla 4.2**. Contenido de materia orgánica y las fracciones BRSP, ácidos húmicos y fúlvicos (mg  $g_{ss}^{-1}$ ) a 0-20 cm y 20-40 cm de profundidad, en cuatro bosques templados y en una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

Sitio	Materia orgánica		BRSP		Ácidos Húmicos		Ácidos Fúlvicos	
forestal	0 – 20	20 – 40	0 – 20	20 – 40	0 – 20	20 – 40	0 – 20	20 – 40
SV	192,9	143,1	48,5 <sup>b</sup>	44,9 <sup>b</sup>	30,68 <sup>a</sup>	18,46 <sup>a</sup>	13,33 <sup>n.s.</sup>	15,72 <sup>n.s</sup>
SVA	206,8	154,0	54,9 <sup>b</sup>	$36,0^{b}$	31,45 <sup>a</sup>	10,62 <sup>bc</sup>	15,50	16,22
RC	212,8	189,2	72,9 <sup>a</sup>	57,9 <sup>a</sup>	27,02 <sup>a</sup>	$17,09^{ab}$	16,44	12,43
RCM	156,2	106,7	45,2 <sup>b</sup>	36,6 <sup>b</sup>	14,91 <sup>b</sup>	7,25°	15,69	14,84
ORG	185,3	135,9	53,2 <sup>b</sup>	$39,9^{b}$	34,67 <sup>a</sup>	16,67 <sup>ab</sup>	13,53	13,54

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \le 0.05$ ) entre sitios forestales, para una misma fracción de materia orgánica y profundidad, de acuerdo a la prueba de Diferencia mínima significativa (DMS).

En el análisis elemental no se encontró un efecto significativo de los sitios forestales sobre el porcentaje de carbono (C) y nitrógeno (N) (Tabla 4.3), excepto sobre el porcentaje de N de la GRSP. Tanto el bosque siempreverde prístino como el renoval caducifolio con manejo forestal presentaron el mayor contenido de N, los que fueron estadísticamente diferente solo de la plantación de *P. menziesii*.

Por otra parte, a mayor profundidad se encontró un menor porcentaje de C y N solo en la fracción proteica. El C disminuyó de  $31.4 \pm 3.7$  % a  $24.2 \pm 3.4$  % entre 0 - 20 cm y 20 - 40 cm, y el N

disminuyó de un 2,8  $\pm$  0,4 % a un 2,0  $\pm$  0,7 %, respectivamente.

El porcentaje de C y N en los ácidos húmicos fue en promedio de  $40.7 \pm 4.3\%$  de C y  $3.3 \pm 0.6\%$  de N. Los ácidos fúlvicos presentaron un porcentaje de C y N menor al de los ácidos húmicos, con  $26.9 \pm 5.3\%$  de C y  $0.8 \pm 0.5\%$  de N.

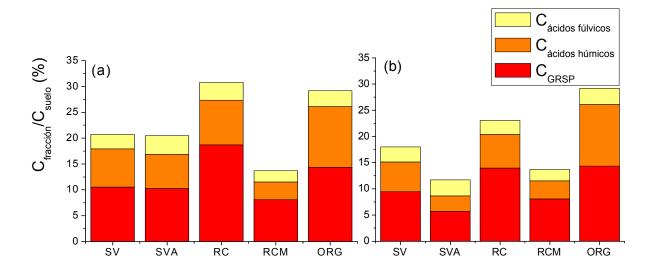
Al considerar el aporte que cada fracción hace al C total del suelo (Figura 4.4), se obtuvo que la GRSP representa un  $12,1 \pm 4,6$  % del C total del suelo en los primeros 20 cm y un  $9,2 \pm 3,7$ % a la mayor profundidad. En las profundidades de 0- 20 cm y 20 - 40 cm, la fracción proteica fue significativamente mayor en el renoval caducifolio, donde aportó un  $18,7 \pm 4,6$ % y un  $14,0 \pm 3,9$ % del C total del suelo, respectivamente. El menor aporte fue hecho en el renoval caducifolio con manejo forestal, donde alcanzó un  $8,1 \pm 2,2$ % y  $7,1 \pm 1,5$ %, respectivamente.

El aporte de los ácidos húmicos disminuyó al aumentar la profundidad de  $7.6 \pm 3.9\%$  a  $3.9 \pm 2.3\%$  del C total del suelo. Mientras que el aporte de C y N hecho por los ácidos fúlvicos no presentó variación entre los sitios forestales a ninguna de las profundidades estudiadas (Figura 4.4 y Figura 4.5).

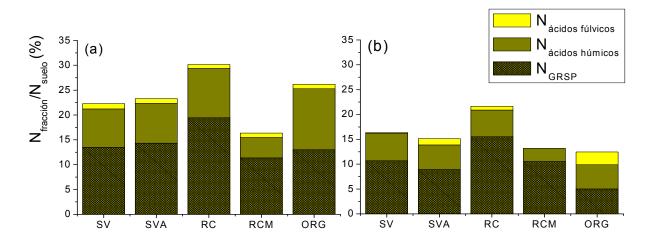
El aporte de N de los ácidos húmicos al N total del suelo disminuyó al aumentar la profundidad, de  $8.4 \pm 4.0\%$  a  $4.9 \pm 1.9\%$ . El sitio forestal que tuvo el menor aporte de N proveniente de los ácidos húmicos fue el renoval caducifolio con manejo forestal, mientras que no hubo diferencias significativas entre los demás sitios. En el aporte hecho por la GRSP se encontró diferencia tanto entre sitios forestales como con la profundidad de suelo. En el renoval caducifolio se observó un aporte significativamente mayor de N proveniente de la GRSP respecto de los demás sitios, siendo de un  $17.5 \pm 4.6\%$  del N total del suelo. Con el aumento en la profundidad de suelo, el aporte de la GRSP disminuyó de un  $14.4 \pm 4.2\%$  a un  $10.2 \pm 4.3\%$  (Figura 4.5).

**Tabla 4.3.** Contenido de C y N (%) en GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, a dos profundidades de suelo en cuatro bosques templados y en una plantación de *P. menziesii* de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

Sitios Profundidad		Suelo			GRSP			Ácidos húmicos			Ácidos fúlvicos		
forestal	(cm)	N (%)	C (%)	C/N	N (%)	C (%)	C/N	N (%)	C (%)	C/N	N (%)	C (%)	C/N
SV	0 - 20	$1,1 \pm 0,1$	$14,4 \pm 0,8$	12,94	$3,1 \pm 0,4$	$31,0 \pm 3,6$	10,1	$3,4 \pm 0,5$	$40,1 \pm 2,8$	11,9	$1,0 \pm 0,5$	$29,1 \pm 5,1$	36,6
SV	20 - 40	$0.8 \pm 0.1$	$10,\!4\pm0,\!4$	11,86	$2,1\pm0,3$	$21,5 \pm 1,9$	10,4	$3,0\pm0,7$	$36,4 \pm 2,8$	12,6	$0.6 \pm 0.6$	$25,4 \pm 7,2$	48,3
CTA	0 - 20	$1,2\pm0,1$	$16,6 \pm 1,3$	14,07	$3,0\pm0,5$	$30,\!4\pm4,\!0$	10,2	$3,2\pm0,3$	$40,3\pm6,0$	12,9	$0.7 \pm 0.3$	$28,9 \pm 4,1$	53,4
SVA	20 - 40	$0.9 \pm 0.1$	$15,7 \pm 1,2$	18,54	$1,9\pm0,3$	$22,2\pm2,2$	10,7	$3,7\pm0,7$	$40,7\pm6,2$	11,1	$0,6 \pm 0,3$	$29,2 \pm 5,1$	50,0
DC	0 - 20	$1,2\pm0,1$	$17,8 \pm 1,5$	14,65	$2,5\pm0,5$	$33,2 \pm 5,3$	13,5	$3,6 \pm 0,6$	$44,0 \pm 3,1$	12,6	$0.8 \pm 0.2$	$28,5\pm0,8$	38,6
RC	20 - 40	$0.9 \pm 0.1$	$13,4 \pm 1,1$	14,89	$2,\!2\pm0,\!2$	$26,2\pm2,9$	12,1	$2,7\pm1,0$	$41,8 \pm 4,6$	12,9	$0,3 \pm 0,3$	$23,4 \pm 7,4$	60,7
DCM	0 - 20	$1,0\pm0,1$	$14,3 \pm 1,4$	14,44	$2,\!8\pm0,\!2$	$29,\!4\pm2,\!2$	10,4	$3,4\pm0,6$	$41,6\pm0,9$	12,4	$1,2\pm0,6$	$23,4 \pm 4,4$	23,0
RCM	20 - 40	$0.8 \pm 0.1$	$11,0\pm0,8$	14,04	$2,8\pm0,5$	$27,1\pm2,2$	9,9	$3,7\pm0,9$	$42,9\pm6,2$	11,7	$0,6\pm0,2$	$26,9 \pm 3,4$	43,0
ODC	0 - 20	$1,1\pm0,1$	$13,2 \pm 1,6$	12,3	$2,5\pm0,3$	$33,2\pm2,8$	13,4	$3,6 \pm 0,5$	$42,6\pm2,8$	12,0	$1,0 \pm 0,5$	$27,\!4\pm7,\!8$	33,6
ORG	20 – 40	$0,9 \pm 0,0$	$10,4 \pm 0,1$	11,3	$1,2 \pm 0,7$	$23,3 \pm 4,1$	14,4	$3,2 \pm 0,5$	$35,1 \pm 4,5$	11,1	$1,2 \pm 0,3$	$26,6 \pm 3,5$	23,3



**Figura 4.4**. Aporte de C (%) hecho por las fracciones GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos al C total del suelo, en cuatro bosques templados y en una plantación de *P. menziesii* en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. (a) 0 – 20 cm de profundidad y (b)20 – 40 cm de profundidad. SV: bosque siempreverde; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

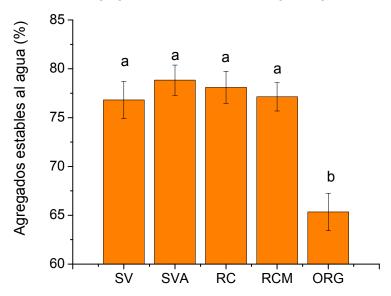


**Figura 4.5.** Aporte de N (%) hecho por las fracciones GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos al N total de suelo, en cuatro bosques templados y en una plantación de *P. menziesii* en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. (a) 0 – 20 cm de profundidad y (b)20 – 40 cm de profundidad. SV: bosque siempreverde; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

#### 4.3.3 Contribución indirecta de la GRSP al secuestro de carbono del suelo.

La contribución indirecta de la GRSP al secuestro de carbono en el suelo, se midió a través de la relación entre el porcentaje de agregados de suelo estables al agua y el contenido de BRSP o EE-BRSP.

Se observó que la plantación monoespecífica de pino Oregón (*P. menziesii*), presentó un porcentaje significativamente menor de agregados de suelo estables al agua (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Porcentaje de agregados de suelo estables al agua, en los primeros 20 cm de profundidad, en cuatro bosques templados y una plantación forestal de P. menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p \le 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de promedios Diferencia Mínima Significativa (DMS). SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de P. menziesii.

La correlación entre los agregados estables de suelo y el contenido de BRSP (r = 0.20; p = 0.38) o el contenido de EE-BRSP (r = 0.04; p = 0.87), fue bastante débil y sin significancia estadística. El contenido de materia orgánica de suelo tampoco presentó una correlación significativa con el porcentaje de agregados de suelo estables al agua. El porcentaje de arcillas del suelo correlacionó negativa y significativamente con el porcentaje de agregados estables de suelo (r = -0.60; p = 0.004; n = 5). A su vez, el aluminio extraíble también presentó una correlación negativa, aunque no significativa (r = -0.39; p = 0.078; n = 5).

# 4.3.4 Correlaciones entre parámetros fúngicos y de suelo con las fracciones de materia orgánica.

Al considerar las fracciones de GRSP, se encontró una estrecha correlación con la materia orgánica del suelo, las fracciones ácidos húmicos, EE-BRSP o BRSP, pero no así con los ácidos fúlvicos (Tabla 4.4). El nitrógeno del suelo, así como los parámetros fúngicos (Capítulo 3), también correlacionaron positivamente con ambas fracciones de GRSP. Sólo pH presentó una correlación negativa con el contenido de EE-BRSP. Los ácidos húmicos mostraron un comportamiento muy similar a BRSP. Contrariamente a lo esperado, los ácidos húmicos correlacionaron positiva y significativamente con el micelio activo, aunque esta correlación fue baja. Así también, se observó que el porcentaje de arcillas tuvo una correlación negativa con la BRSP

**Tabla 4.4**. Coeficientes correlación de algunos parámetros de suelo y fúngicos con las fracciones de materia orgánica BRSP fácilmente extraíble (EE-BRSP), BRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, en cuatro bosques templado y una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centrosur de Chile.(n=10).

	EE-BRSP	BRSP	Ácidos húmicos	Ácidos fúlvicos
Materia orgánica	r: 0,803**	r: 0,807**	r: 0,640**	n.s
pH (agua)	r:-0,311*	n.s.	n.s.	n.s
N suelo	r: 0,699**	r:0,507**	r:0,621**	n.s
C suelo	n.s.	r:0,466**	n.s.	n.s
EE-BRSP	r: 1,00	r: 0,724**	<i>r</i> : 0,745**	n.s
BRSP	<i>r</i> : 0,724**	r:1,00	r: 0,523**	n.s
Ac. húmicos	r:0,745**	r:0,523**	r:1,00	n.s
Ac. fúlvicos	n.s.	n.s	n.s	r:1,00
Micelio total	r: 0,405**	R: 0,338*	n.s.	n.s
Micelio activo	r:0,483**	r: 0,537**	r: 0,290*	n.s
Arcillas (%)	n.s	r:- 0,486**	n.s	n.s

<sup>\*\*</sup> significativo *p*≤0,001;

#### 4.4 Discusión

El contenido de EE-BRSP y BRSP sobre 8 mg g<sup>-1</sup> y 45 mg g<sup>-1</sup> respectivamente, fue superior a los obtenidos en otros ecosistemas de climas templados. En bosques templados de EEUU, Wright *et al* (1996) encontraron entre 4,4 y 14,8 mg g<sup>-1</sup> de BRSP, mientras Steinberg y Rillig (2003) obtuvieron

<sup>\*</sup> significativo *p*≤0,05.

sobre 7 mg g<sup>-1</sup> de BRSP en bosques de *Pinus ponderosa* en Montana. Los niveles encontrados en agroecosistemas son menores a los obtenidos en ecosistemas forestales, variando entre 1,2 – 3,6 mg g<sup>-1</sup> (Wright *et al.* 1999; Borie *et al.* 2000; Nichols 2003). Sólo en suelos volcánicos de bosque tropical en Hawaii (Rillig *et al.* 2001b), se han obtenido concentraciones de BRSP similares a las obtenidas en los bosques templados y en la plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, mayores a 100 mg g<sup>-1</sup> de suelo.

Los altos contenidos de las fracciones de GRSP encontrados en el renoval caducifolio, donde las especies dominantes del género *Nothofagus* establecen simbiosis con hongos ectomicorrícicos exclusivamente (Fontenla *et al.* 1998; Palfner 2001), se debería a la presencia de un diverso y abundante sotobosque. Ambos renovales, al ser deciduos, permiten el crecimiento de otras especies arbóreas y arbustivas que forman micorrizas arbusculares, como *Dasyphyllum diacanthoides* (Less.) Cabr., *Weinmannia trichosperma* Cav., *Chusquea culeou* Desv. y *Ribes magallanicum* Poir. (Castillo *et al.* 2006), que serían las responsables del alto contenido de GRSP encontrado en estos sitios. La densidad de estas especies es diferente en ambos renovales, lo que explicaría en parte la variación en el contenido de GRSP entre el renoval caducifolio con y sin manejo forestal, respectivamente. Por otra parte, el raleo de copas realizado recientemente en el renoval caducifolio pudo haber acelerado la descomposición de la GRSP en este sitio al producir cambios en el microclima (Hyvönen *et al.* 2007) y estructura vegetacional. Por otra parte, se produce un menor aporte de C y litera al suelo (Jandl *et al.* 2007).

La EE-BRSP, considerada como una fracción recién depositada, más lábil de la GRSP (Wright y Upadhyaya 1998; Lovelock *et al.* 2004) fue diferente sólo entre los renovales con y sin manejo forestal (Figura 4.1). Aquí el manejo silvícola se reflejó en una disminución del contenido de carbono total del suelo, así como de las fracciones EE-BRSP, BRSP y ácidos húmicos (Tabla 4.2). Esto podría deberse a que uno de los principales factores que controla la acumulación de materia orgánica es la producción primaria neta (Baldock *et al.* 2004), la que se observó reducida en este renoval, al eliminar especies acompañantes y ejemplares de *Nothofagus*. Se ha señalado que los procesos de cosecha forestal van acompañados por una reducción de la materia orgánica, cambios en la cobertura de plantas y modificación del microclima (Marshall 2000), todos aspectos observados en el renoval con manejo silvícola en estudio (Tabla 3.1; Tabla 4.1). Por otra parte, el bosque siempreverde prístino no se diferenció del bosque siempreverde alterado en cuanto a contenido de EE-BRSP, BRSP, ácidos húmicos o materia orgánica. Solamente entre 20 y 40 cm de profundidad se pudo apreciar una diferencia significativa en el contenido de ácidos húmicos. Sin

embargo, no es posible atribuir esta diferencia a la intervención del bosque ocurrida hace 50 años aproximadamente, ya que en el largo plazo los ecosistemas tienden a recuperarse y aparecen otros factores ejerciendo presión, como es la invasión de especies exóticas y cambios sucesionales (Marshall 2000). De acuerdo con Jandl *et al.* (2007), una manera de minimizar el riesgo de pérdidas de carbono es minimizando las alteraciones tanto en el bosque como en el suelo. También destacan que bosques mixtos incrementan la estabilidad del bosque y de esta manera pueden evitar altas tasas de descomposición de la materia orgánica del suelo. Por lo que el renoval caducifolio, al presentar una mayor diversidad vegetal (Tabla 3.1), podría acumular potencialmente más GRSP que los demás sitios forestales.

No se esperaba encontrar un contenido de GRSP alto en la plantación monoespecífica de P. menziesii, como en los bosques nativos. Sin embargo, se encontró que el contenido de EE-BRSP fue similar al de los demás sitios, tendencia que se repitió con BRSP, que se diferenció sólo del renoval caducifolio (RC). En los bosques templados existen especies hospederas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Tabla 3.1), a diferencia de la plantación de *P. menziesii*, que se caracteriza por ser una especie que forma simbiosis con ectomicorrízas (Harley y Smith 1983; Read 1991; Smith y Read 2008), por lo que se esperaba encontrar la concentración más baja de BRSP y EE-BRSP en este sitio. Sin embargo, en los trabajos realizados por Cázares y Trappe (1993) y Cázares y Smith (1996) han observado que P. menziesii forma simbiosis con HMA en la etapa de vivero. En las muestras obtenidas de campo se observó micelio intraradical sin la presencia de arbúsculos, mientras que en las muestras obtenidas del ensayo de invernadero también fue posible observar arbúsculos. De acuerdo a Cázares (comunicación personal), a medida que se desarrolla la especie, las ectomicorrizas desplazarían a los HMA por competencia. Si bien en este estudio no se observaron estructuras de HMA en las raíces de P. menziesii, no se puede descartar que existan. Esto podría explicar la presencia de EE-BRSP y BRSP, así como de esporas y micelio activo en este sitio.

La cuantificación de GRSP usando el anticuerpo monoclonal contra glomalina 32B11 permite una medición de la GRSP bastante específica, permitiendo separarla de los ácidos húmicos (Nichols y Wright 2005; Rosier *et al.* 2006). Los valores obtenidos en todos los sitios son bastante bajos, no superando el 1,9% de BRSP, en promedio. Knorr *et al.*(2003) encontraron valores de 1,28 mg g<sup>-1</sup> de GRSP inmunoreactiva (IRSP) en bosques deciduos de EEUU. Treseder y Turner (2007) encontraron 4,9 mg g<sup>-1</sup> en la bosques templados del sur de Chile (Cordillera de Piuchué) y entre 9,2 y 13,5 mg g<sup>-1</sup> en bosques tropicales de Hawaii (Rillig *et al.* 2001b; Treseder y Turner 2007). El

porcentaje de IRSP en praderas de climas templados varió entre 25 y 50% de BRSP (Wright y Upadhyaya 1998; Rillig *et al.* 1999; Wright y Anderson 2000) y menores a 50% en suelos forestales de Hawaii (Rillig *et al.* 2001b).

De acuerdo a las limitaciones que presenta la metodología de cuantificación de ELISA, el bajo contenido de IRSP encontrado en todos los sitios estudiados puede ser consecuencia de una degradación de la proteína o interferencia con otros compuestos durante la medición (Rosier *et al.* 2006; Janos *et al.* 2008). Es posible que exista una degradación del sitio inmunoreactivo de la GRSP que se encuentra en el suelo y aumenta con el tiempo de permanencia (Janos *et al.* 2008) o cambios en estos sitios productos de la presencia de metales como Fe, Al u otros cationes (Nichols 2003). La co-extracción de sustancias húmicas, otros compuestos fenólicos como taninos (Halvorson y Gonzalez 2006; Schindler *et al.* 2007; Whiffen *et al.* 2007) y un alto contenido de materia orgánica en el suelo pueden impedir la unión de la glomalina al microplato de PVC, disminuyendo la cuantificación de IRSP (Rosier *et al.* 2006). Condiciones que están presentes en estos sitios.

Otros factores que pueden interferir en la cuantificación de la IRSP podrían estar relacionados con una excesiva exposición al calor durante el proceso de extracción (Nichols 2003; Bolliger *et al.* 2008), reacciones con el citrato, exposición a pH extremos durante el proceso de purificación o la congelación de la solución para la liofilización de la GRSP (Nichols 2003). Esto también explicaría por qué no se encontró diferencias en el contenido de IRSP al aumentar la profundidad de suelo. Sin embargo, Nichols (comunicación personal) plantea que esta metodología permite determinar de manera segura la presencia de material de origen HMA, pero la cuantificación es complicada por los factores antes mencionados.

#### Comparación de las fracciones GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos

En todas las fracciones se observó una disminución en el concentración, con la profundidad, excepto en los ácidos fúlvicos. Sin embargo, la disminución que experimentaron los ácidos húmicos fue mayor que la encontrada en BRSP. Esto concuerda con lo reportado por Gramss *et al.* (1999), quienes encontraron que los ácidos húmicos son más fácilmente degradados que los ácidos fúlvicos. Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que la estabilidad de esta fracción disminuye con la profundidad (Paul *et al.* 1997; Torn *et al.* 1997). Halvorson y Gonzalez (2006) encontraron una disminución significativa en el contenido BRSP al aumentar la profundidad de muestreo, en suelos con diferente uso de EEUU. Los ácidos fúlvicos, al representar una fracción más móvil (Stevenson

1994; Dai *et al.* 2006), permitiría una distribución más homogénea en el perfil de suelo. Incluso se ha observado un aumento en el contenido de ácidos fúlvicos a medida que aumenta la profundidad (López *et al.* 2008).

Independiente de la profundidad del suelo, la fracción más abundante correspondió a la BRSP en los cinco sitios forestales estudiados, al igual que en diferentes suelos con vegetación nativa de los EEUU (Nichols y Wright 2005). Los suelos de la tundra ártica corresponden a ecosistemas limitados en nitrógeno, al igual que los bosques templados del sur de Chile (Huygens *et al.* 2007; Huygens *et al.* 2008), donde la forma predominante de N orgánico es en compuestos proteicos (Weintraub y Schimel 2005), lo que concordaría con los altos niveles de GRSP encontrados en estos suelos.

Stevenson (1994) señala que los suelos forestales se caracterizarían por presentar un mayor contenido de ácidos fúlvicos que húmicos, lo cual no se cumplió en la mayoría de los sitios estudiados. La relación entre ambos fracciones varió 0,5 a 2,6 veces la cantidad de ácidos húmicos sobre ácidos fúlvicos (Tabla 4.3). Schulten y Schnitzer (1997) indican que los ácidos fúlvicos son una pequeña fracción de la MOS, donde los ácidos húmicos representan aproxidamente el 23% y los ácidos fúlvicos solo el 7% (Schnitzer 1978). Esta relación es aún mayor en suelos forestales ácidos de Galicia, donde se encontró que esta relación llega a ser de 10/1 (López *et al.* 2008).

#### Composición química de las fracciones GRSP, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.

Los porcentajes de C y N en la GRSP concuerdan con los reportados en estudios previos (Lovelock *et al.* 2004; Nichols y Wright 2005), pero superiores a los encontrados por Rillig *et al.* (2001b) para los primeros 10 cm de profundidad en suelos volcánicos de Hawaii. En los primeros 20 cm de profundidad se observó una gran homogeneidad en el porcentaje de C y N, que fue inferior al porcentaje de C que se obtuvo en los ácidos húmicos. Nichols y Wright (2005) encontraron que el porcentaje de C, N, H y Fe en la GRSP, es similar dentro de una misma región geográfica y diferente de los ácidos húmicos, que contienen un mayor porcentaje de C y N.

La variación en el porcentaje de C de los ácidos húmicos es bastante amplia y va desde un 22% a un 67% de C en diferentes ecosistemas (Schulten y Schnitzer 1997; Nichols y Wright 2005; Spaccini *et al.* 2006). Sin embargo, la mayoría de los ácidos húmicos analizados posee un porcentaje de C superior al 50% (Stevenson 1994; Trubetskaya *et al.* 1998; Nichols 2003; Filip y Tesarová 2004; Allard 2006; Schindler *et al.* 2007; López *et al.* 2008). El porcentaje de C obtenido para esta

fracción se encuentran en el rango descrito para los ácidos húmicos, no presentándose diferencias entre sitios forestales y no superando el 44% de C. Spaccini *et al.*(2006) tampoco encontraron diferencias en la caracterización elemental en sitios con diferente uso de suelo. El porcentaje de N en los ácidos húmicos varía entre 2 y 5,6% (Schulten y Schnitzer 1997; Nichols y Wright 2005; Schindler *et al.* 2007; López *et al.* 2008), mientras que Borie *et al.* (2002) reportaron contenidos de N muy inferiores a los citados anteriormente en andisoles y ultisoles del sur de Chile, los cuales no superaron el 0,2 % de N. De acuerdo a los modelos presentados por Schulten y Schnitzer (1997), el porcentaje de N varía según la cantidad de material proteínico que está ocluído en los ácidos húmicos, el cual representa aproximadamente un 3,1% de N. Este valor es muy cercano al 3,3 ± 0,6% de N encontrados en los suelos forestales del sur de Chile.

Los ácidos fúlvicos tuvieron un porcentaje de N y C más bajo que las otras dos fracciones, con valores similares a obtenidos por Nichols (2003). El porcentaje de C no superó el 30% y el de nitrógeno fue como máximo 1,2%. Valores similares a los encontrados en los ácidos húmicos, sobre un 45% de C y hasta un 3,9% de N han sido encontrados en diferentes tipos de suelo (Dai *et al.* 2006; López *et al.* 2008). Mientras que Schulten y Schnitzer (1997) señalan que los ácidos fúlvicos poseen un porcentaje de C menor al de los ácidos húmicos ya que poseen un mayor contenido de grupos carboxílicos y carbohidratos.

Se puede observar en la Tabla 4.3 que la relación C/N de la GRSP fue alrededor de 10 en los ecosistemas forestales nativos, excepto en el renoval caducifolio y en la plantación de *P. menziesii*. Sobre todo en este último sitio se encontró una relación C/N cercana a 13 y 14 a 0 – 20 cm y 20 – 40 cm, respectivamente. Esto podría significar que se trata de una glicoproteína de diferente procedencia y explicaría la alta concentración de BRSP en este lugar. Rillig *et al.* (2007) destacan que la fracción BRSP incluye proteínas de origen distinto a los HMA.

Al observar el aporte que hace cada fracción al carbono del suelo (Figura 4.4) se obtuvo que la fracción más importante, tanto a 0 – 20 cm como a 20 – 40 cm, correspondió a la GRSP. Este aporte varió entre un 5,7% y un 18,7% del C total del suelo. Otros estudios han encontrado que el aporte puede variar entre un 3 y un 8% del C total del suelo (Rillig *et al.* 2001b; Rillig *et al.* 2003; Lovelock *et al.* 2004), llegando hasta un 30% al considerar la GRSP gravimétrico (Treseder y Allen 2000). El aporte de N de GRSP, entre un 5,0 y 19,5%, es superior al 5% reportado por Lovelock *et al.* (2004) y Rillig *et al.* (2001b), el cual correspondería a una fracción de nitrógeno recalcitrante, al menos una parte de él.

La falta de correlación entre los agregados estables de suelo y BRSP o EE-BRSP también ha sido reportada por Borie et al. (2000). Una de las razones para esta observación es el alto contenido de agregados estables al agua y de MOS, encontrados en los agroecosistemas estudiados (Borie et al. 2000). Por otra parte, en andisoles uno de los principales factores relacionados con la estabilidad de los agregados de suelo es la presencia de arcillas no cristalinas y Fe y Al (Torn et al. 1997; Bronick y Lal 2005), ya que un aumento en el contenido de MOS, en la superficie de las arcillas y la capacidad de intercambio catiónico, están positivamente correlacionado con la estabilidad de los agregados. La estabilidad de los agregados es influenciada por numerosos factores, entre los cuales la GRSP no sería uno de los más importantes en este tipo de ecosistemas, caracterizados por un alto contenido de materia orgánica y presencia de arcillas no cristalinas. Por otra parte, la correlación negativa encontrada entre BRSP y el porcentaje de arcilla, no nos permite descartar que exista una relación entre el contenido de GRSP y la estructura del suelo, y de este modo, que tenga una participación indirecta en el almacenamiento de carbono en el suelo. Correlaciones negativas entre estos factores fueron encontradas por Haddad y Sarkar (2003b) y Rillig y Steinberg (2002) en diferentes tipos de suelos de EEUU. Estos resultados sugieren que la GRSP tendría una participación más importante en la formación de agregados estables cuando no existe una buena agregación de suelo (Rillig y Steinberg 2002) y que su importancia, disminuiría al existir una buena agregación de suelo. Por otra parte, la cobertura vegetal, la densidad y diámetro radical y el micelio extraradical, también son factores importantes de considerar (Rillig et al. 2002)

Diversos cuestionamientos ha sufrido la metodología de extracción y cuantificación de la GRSP. Se ha señalado que existe una co-extracción de GRSP y ácidos húmicos en los procesos de extracción (Rosier et al. 2006; Schindler et al. 2007). Sin embargo, Nichols (2003) determinó que existe una co-extracción importante de GRSP en los ácidos húmicos, mientras que la co-extracción de ácidos húmicos en la GRSP es bastante baja. Esto contribuyó a que los ácidos húmicos fueran considerados, junto con la huminas, las principales fracciones de la materia orgánica. Las correlaciones positivas y significativas entre micelio activo y ácidos húmicos, y de los ácidos húmicos con ambas fracciones de GRSP, confirmarían que existe una co-extracción con las metodologías de extracción actualmente usadas. Además, el menor contenido de C de los ácidos húmicos obtenidos en este estudio podría deberse a la presencia de GRSP en esta fracción. Por otra parte, no es factible que se presenten en los ácidos fúlvicos, que son solubles a pH 2, mientras que GRSP precipita. Esto reafirma la importancia de las proteínas del suelo como una forma de almacenar C y N en el sustrato. Así también, las limitantes que existen en las metodologías de extracción y cuantificación (Janos et al. 2008).

## 4.5 Conclusiones

La GRSP es una fracción de la materia orgánica, presente en diversos ecosistemas, incluso sin la presencia de especies vegetales hospederas de HMA, por lo que estarían incluidas proteínas de diferente origen. Su aporte al contenido de carbono y nitrógeno del suelo es mayor, comparado con el de los ácidos húmicos y fúlvicos. Representa hasta un 19% del C y un 20% del N total del suelo, que al formar parte de la materia orgánica más recalcitrante, constituye una importante forma de secuestro de C en diferentes ecosistemas terrestres.

La participación de la GRSP en el secuestro de carbono en el suelo, a través de la formación de agregados estables de suelo, es difícil de determinar en estos suelos volcánicos, ya que poseen un porcentaje de agregados de suelo estables altos y con un alto contenido de materia orgánica. Es posible que existan pequeños cambios en el porcentaje de agregados de suelo estables al agua que se deban a la acción cementante de la GRSP, pero que no es posible detectar con la metodología utilizada.

Los factores que determinan la concentración de GRSP en el suelo no están muy claros aún, pero el manejo silvocultural en los bosques de *Nothofagus* estudiados, produce una disminución en la concentración de GRSP, en el corto plazo.

# 4.6 Referencias

- Aguilera, M., M. d. l. L. Mora y G. Borie (2000). Sulphur dynamics and balance in Chilean Andisol and Ultisol. Proceedings of the Third International Symposium of the Working Group MO, Naples, Italy 78.
- Allard, B. (2006). A comparative study on the chemical composition of humic acids from forest soil, agricultural soil and lignite deposit Bound lipid, carbohydrate and amino acid distributions. Geoderma **130**: 77-96.
- Allen, M. F. (1991). The ecology of mycorrhizae. New York, Cambridge University Press, 184 pp.
- Baldock, J. A., C. A. Masiello, Y. Gélinas y J. I. Hedges (2004). Cycling and composition of organic matter in terrestrial and marine ecosystems. Marine Chemistry **92**: 39-64.
- Batjes, N. H. (1998). Mitigation of atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations by increased carbon sequestration in the soil. Biology and Fertility of Soils **27**: 230-235.

- Bolliger, A., A. Nalla, J. Magid, A. de Neergaard, A. Nalla y T. Bog-Hansen (2008). Re-examining the glomalin-purity of glomalin-related soil protein fractions through immunochemical, lectin-affinity and soil labelling experiments. Soil Biology & Biochemistry **40**: 887-893.
- Borie, F., R. Rubio, A. Morales y C. Castillo (2000). Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. Revista Chilena de Historia Natural **73**(4): 749-756.
- Borie, F. y H. Zunino (1983). Organic matter-phosphorus associations as a sink in P-fixation processes in allophanic soil of Chile. Soil Biology & Biochemistry **15**: 595-603.
- Borie, G., P. Peirano, H. Zunino y M. Aguilera (2002). N-pool in volcanic ash-derived soils in Chile and its changes in deforested sites. Soil Biology & Biochemistry **34**: 1201-1206.
- Bronick, C. J. y R. Lal (2005). Soil structure and management: a review. Geoderma 124(1-2): 3-22.
- Campbell, C. A., E. A. Paul, D. A. Rennie y K. S. McCallum (1967). Applicability of the carbon dating method to soil humus studies. Soil Science **104**: 217-224.
- Castillo, C., F. Borie, R. Godoy, R. Rubio y E. Sieverding (2006). Diversity of mycorrhizal plant species and arbuscular mycorrhizal fungi in evergreen forest, deciduous forest and grassland ecosystems of Southern Chile. Journal of Applied Botany and Food Quality **80**: 40-47.
- Cázares, E. y J. E. Smith (1996). Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Pseudotsuga menziesii* and *Tsuga heterophylla* seedlings grown in Oregon Coast Range soils. Mycorrhiza **6**(1): 65-67.
- Cázares, E. y J. M. Trappe (1993). Vesicular endophyte in roots of the Pinaceae. Mycorrhiza 2: 153-156.
- Dai, J., W. Ran, B. Xing, M. Gu y L. Wang (2006). Characterization of fulvic acid fractions obtained by sequential extractions with pH buffers, waters, and ethanol from paddy soils. Geoderma 135: 284-295.
- Donoso, C. y C. Ramírez (2000). Arbustos nativos de Chile. Valdivia, Chile, Marisa Cuneo Ediciones, 119 pp.
- Filip, Z. y M. Tesarová (2004). Microbial degradation and transformation of humic acids from permanent meadow and forest soils. International Biodeterioration and Biodegradation **54**: 225-231.
- Fitter, A. H., A. Heinemeyer y P. L. Staddon (2000). The impact of elevated CO<sub>2</sub> and global climate change on arbuscular mycorrhizas: a mycocentric approach. New Phytologist **147**: 179-187.
- Fontenla, S., R. Godoy, P. Rosso y M. Havrylenko (1998). Root associations in *Austrocedrus* forest and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas. Mycorrhiza 8: 29-33.

- Franzluebbers, A. J., J. A. Stuedemann y S. F. Wright (2000). Soil aggregation and glomalin under pastures in the Southern Piedmont USA. Soil Science Society of America Journal **64**(3): 1018-1026.
- Godoy, R., R. Carrillo, R. Hildebrandt-Vögel y A. Vögel (1994a). Zur Bedeutung der Mykorrhiza in *Fitzroya cupressoides* Wald Südchiles. Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie **23**: 135-141.
- Godoy, R., R. Carrillo y H. Peredo (1994b). Compatibilidad y eficiencia "in vitro" de *Glomus intraradices* en coníferas nativas del sur de Chile. Bosque **14**(2): 57-63.
- Godoy, R., R. Romero y R. Carrillo (1994c). Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas. Revista Chilena de Historia Natural **67**: 209 220.
- Gramss, G., C. Ziegenhagen y S. Sorge (1999). Degradation of soil humic extract by wood- and soil associated fungi, bacteria, and commercial enzymes. Microbial Ecology **37**: 140-151.
- Grinhut, T., Y. Hadar y Y. Chen (2007). Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. Fungal Biology Reviews **21**(4): 179-189.
- Haddad, M. J. y D. Sarkar (2003a). Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: Part I Environmental significance. Environmental Geosciences **10**(3): 91-98.
- Haddad, M. J. y D. Sarkar (2003b). Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: Part II--Relationship with soil properties. Environmental Geosciences **10**(3): 99-106.
- Halvorson, J. y J. Gonzalez (2006). Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. Plant and Soil **286**: 339-356.
- Harley, J. L. y S. E. Smith (1983). Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press.
- Hayes, M. H. B. y C. E. Clapp (2001). Humic substances: Considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. Soil Science **166**(11): 723-737.
- Hayes, M. H. B. y C. L. Graham (2000). Advances in Procedures for the isolation and fractionation of humic substances. Humic substance Seminar 4 <sup>th</sup>, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 91-109.
- Hedges, J. I., G. Eglinton, P. G. Hatcher, D. L. Kirchman, C. Arnosti, S. Derenne, R. P. Evershed, I. Kogel-Knabner, J. W. de Leeuw, R. Littke, W. Michaelis y J. Rullkotter (2000). The molecularly uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environmets. Organic Geochemistry 31: 945-958.
- Huygens, D., P. Boeckx, P. Templer, L. Paulino, O. v. Cleemput, C. Oyarzún, C. Müller y R. Godoy (2008). Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic rainforest soils. Nature Geoscience 1: 543-548.

- Huygens, D., T. Rutting, P. Boeckx, O. Van Cleemput, R. Godoy y C. Müller (2007). Soil nitrogen conservation mechanisms in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest ecosystems. Soil Biology & Biochemistry **29**: 2448-2458.
- Hyvönen, R., G. I. Ågren, S. Linder, T. Persson, M. F. Cotrufo, A. Ekblad, M. Freeman, A. Grelle, I. A. Janssens, P. G. Jarvis, S. Kellomäki, A. Lindroth, D. Loustau, T. Lundmark, R. J. Norby, R. Oren, K. Pilegaard, M. G. Ryan, B. D. Sigurdsson, M. Strömgren, M. v. Oijen y G. Wallin (2007). The likely impact of elevated [CO<sub>2</sub>], nitrogen deposition, increased temperature and management on carbon sequestration in temperate and boreal forest ecosystems: a literature review. New Phytologist 173: 463-480.
- Jakobsen, I. y L. Rosendahl (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. New Phytologist 115: 77-83.
- Jandl, R., M. Lindner, L. Vesterdal, B. Bauwens, R. Baritz, F. Hagedorn, D. Johnson, K. Minkkinen y K. Byrne (2007). How strongly can forest management influence soil carbon sequestration? Geoderma 137: 253-268.
- Janos, D. P., S. Garamszegi y B. Beltran (2008). Glomalin extraction and measurement. Soil Biology and Biochemistry **40**(3): 728-739.
- Kemper, W. D. y R. C. Rosenau (1986). Aggregate stability and size distribution. *In*: Methods of soils analysis. Part I. Physical and mineralogical methods(eds). Madison, WI, USA, American Society of Agronomy: 425-444.
- Knorr, M. A., R. E. J. Boerner y M. C. Rillig (2003). Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. Mycorrhiza 13: 205-210.
- López, R., D. Gondar, A. Iglesias, S. Fiol, J. Antelo y F. Arce (2008). Acid properties of fulvic and humic acids isolated from two acid forest soils under different vegetation cover and soil depth. European Journal of Soil Science 59: 892–899.
- Lovelock, C. E., S. F. Wright, D. A. Clark y R. W. Ruess (2004). Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. Journal of Ecology **92**: 278 –287.
- Marshall, V. G. (2000). Impacts of forest harvesting on biological processes in northern forest soils. Forest Ecology and Management **133**: 43-60.
- Morales, A., C. Castillo, R. Rubio, R. Godoy, J. L. Rouanet y F. Borie (2005). Niveles de glomalina en suelos de dos ecosistemas del sur de chile. Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal 5: 37-45.

- Nichols, K. A. (2003). Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. College of Agriculture and Natural Resources, University of Maryland: 307 pp.
- Nichols, K. A. y S. F. Wright (2005). Comparison of glomalin and humic acid in eight native U.S. soils. Soil Science **170**(12): 985-997.
- Palfner, G. (2001). Taxonomische Studien an Ektomykorrhizen aus den *Nothofagus*-Wäldern Mittelsüdchiles. Berlin Stuttgart, Bibliotheca Mycologica 190, 243 pp.
- Paul, E. A., R. F. Follet, S. W. Leavitt, A. Halvorson, G. A. Peterson y D. J. Lyon (1997). Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. Soil Science Society American Journal 61: 1058-1067.
- Read, D. J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. Experientia 47: 376-391.
- Rillig, M., B. A. Caldwell, H. Wösten y P. Sollins (2007). Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls and persistence. Biogeochemistry **85**(1): 25-44.
- Rillig, M., S. Wright, B. Kimball, P. Pinter, G. W. all, M. Ottman y S. Leavitt (2001a). Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a *Sorghum* field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. Global Change Biology 7: 333-337.
- Rillig, M. C., 4, P. W. Ramsey, S. Morris y E. A. Paul (2003). Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. Plant and Soil **253**: 293-299.
- Rillig, M. C., C. B. Field y M. F. Allen (1999). Soil biota responses to long-term atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment in two California annual grasslands. Oecologia **119**: 572-577.
- Rillig, M. C. y P. D. Steinberg (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? Soil Biology and Biochemistry **34**(9): 1371-1374.
- Rillig, M. C., S. F. Wright y V. T. Eviner (2002). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. Plant and Soil **238**: 325-333.
- Rillig, M. C., S. F. Wright, K. A. Nichols, W. F. Schmidt y M. S. Torn (2001b). Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. Plant and Soil **233**: 167-177.
- Rosier, C., A. Hoye y M. Rillig (2006). Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. Soil Biology & Biochemistry **38**: 2205-2211.
- Schindler, F., E. Mercer y J. Rice (2007). Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. Soil Biology & Biochemistry **39**: 320-329.

- Schlesinger, W. H. (1997). Biogeochemistry, an analysis of global change. San Diego, California, Academic Press.
- Schnitzer, M. (1978). Humic substance: Chemistry and Reactions. *In*: Soil organic matter. M. Schnitzer y S. U. Khan (eds). Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company. **8:** 1-64.
- Schulten, H. R. y M. Schnitzer (1997). Chemical Model Structures for Soil Organic Matter and Soils. Soil Science **162**(2): 115-130.
- Smith, S. E. y D. J. Read (2008). Mycorrhizal Symbiosis. San Diego, California, Academic Perss, 800.
- Spaccini, R., J. S. C. Mbagwu, P. Conte y A. Piccolo (2006). Changes of humic substances characteristic from forested to cultivated soils in Ethiopia. Geoderma 132: 9-19.
- Steinberg, P. D. y M. C. Rillig (2003). Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. Soil Biology and Biochemistry **35**(1): 191-194.
- Stevenson, F. J. (1994). Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. New York, John Wiley and Sons.
- Tan, K. H. (1995). Soil Sampling, Preparation, and Analysis (Books in soils, plants, and the environment). New York, Marcel Dekker.
- Torn, M. S., S. E. Trumbore, O. A. Chadwick, P. M. Vitousek y D. M. Hendricks (1997). Mineral control of soil organic carbon storage and turnover. Nature **389**: 170-173.
- Treseder, K. K. y M. F. Allen (2000). Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen deposition. New Phytologist **147**(1): 189-200.
- Treseder, K. K., L. M. Egerton-Warburton, M. F. Allen, Y. Cheng y W. C. Oechel (2003). Alteration of Soil Carbon Pools and Communities of Mycorrhizal Fungi in Chaparral Exposed to Elevated Carbon Dioxide. Ecosystems 6: 786-796.
- Treseder, K. K. y K. M. Turner (2007). Glomalin in Ecosystems. Soil Science Society American Journal **71**(4): 1257-1266.
- Trubetskaya, O. E., O. I. Reznikova, G. V. Afanas'eva, L. F. Markova y T. A. Muranova (1998). Amino acid distribution in soil humic acids fractionated by Tandem siza exclusion chromatography polyacrylamide gel electrophoresis. Environment International **24**(5/6): 573-581.
- Weintraub, M. N. y J. P. Schimel (2005). Seasonal protein dynamics in Alaskan artic tundra soils. Soil Biology & Biochemistry **37**: 1469-1475.

- Whiffen, L. K., D. J. Midgley y P. A. McGee (2007). Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. Soil Biology and Biochemistry **39**(2): 691-694.
- Wright, S. F. (2000). A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil **226**(2): 171-177.
- Wright, S. F. y R. L. Anderson (2000). Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. Biology and Fertility of Soils **31**: 249-253.
- Wright, S. F., M. Franke-Snyder, J. B. Morton y A. Upadhyaya (1996). Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil **181**: 193-203.
- Wright, S. F., J. L. Starr y I. C. Paltineanu (1999). Changes in Aggregate Stability and Concentration of Glomalin during Tillage Management Transition. Soil Science Society of American Journal **63**: 1825-1829.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Science **161**(9): 575-586.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae or arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil **198**: 97-107.
- Wright, S. F., A. Upadhyaya y J. S. Buyer (1998). Comparison of N-linked oligosaccharides of Glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. Soil Biology and Biochemistry **30**(13): 1853-1857.
- Zunino, H., F. Borie, M. Aguilera, P. Peirano, M. Caiozzi y J. P. Martín (1982). Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. I. Ecología microbiana y su relación con las propiedades físico químicas de ellos. Agricultura Técnica **42**: 287-292.

# Capítulo 5

Acumulación y estabilidad de GRSP en bosques templados y una plantación de Pseudotsuga menziesii, en la Cordillera de Los Andes, centrosur de Chile.

#### Resumen

La cantidad de glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP) depende tanto de la producción de esta glicoproteína como de su velocidad de descomposición, donde las condiciones medioambientales pueden alterar ambos flujos de manera independiente. Considerando que los suelos forestales son especialmente sensibles a los disturbios y pueden transformarse de reservas a fuentes de carbono (C), se desarrolló un experimento para cuantificar la producción de GRSP mediante el uso de bolsas de incubación in situ, en cuatro bosques templados y en una plantación forestal de P. menziessi, en el centro-sur de Chile. Además, se evaluó la descomposición de la GRSP en los suelos de bosques templados y la plantación forestal mediante la incubación de suelo en condiciones controladas de temperatura y humedad, en ausencia de plantas y raíces. Por otra parte, se determinó el contenido de metales en la GRSP. En la incubación in situ se observó que no todos los bosques acumulan la misma cantidad de GRSP en un periodo de tiempo determinado y que estas diferencias no tienen relación con la diversidad vegetal o el porcentaje de cobertura de especies hospederas de hongos micorrícicos arbusculares. La fracción más lábil de GRSP presentó una disminución de hasta un 36% después de 400 días de incubación, mientras que la fracción GRSP aumentó hasta en un 87% al término de la incubación. No se encontraron diferencias significativas en la descomposición de la GRSP al aumentar la temperatura de incubación, lo que permite concluir que se trata de una fracción altamente estabilizada, de gran importancia en el secuestro de carbono. El alto porcentaje de aluminio y hierro en la GRSP tendrían una función en su estabilización y permitiría que se encuentre en altos contenidos en los suelos de ecosistemas forestales del centro-sur de Chile.

**Palabras claves:** acumulación, descomposición, GRSP, aluminio, hierro, bosques templados, *P. menziesii*.

#### Abstract

The amount of glomalin related to soil protein (GRSP) in soil depends on production as on decomposition rate of glomalin. Both fluxes can be affected in a different way by environmental conditions. Considering that forest soils are specially sensitive to disturbance and can be transformed from sink to carbon (C) source, it was designed an experiment to quantify the production of GRSP *in situ* by incubation bags in four temperate forests and a forest plantation of *P. menziesii*, in southern Chile. Furthermore, the decomposition of GRSP in different temperate forests and forest plantation was measured by incubation of soil under controlled temperature and moisture conditions in the absence of plants and roots. The percentage of metals in purify GRSP were also

measured. After incubation *in situ*, it was observed differences among the forests in the amount of GRSP accumulated. Those differences were not related to vegetal diversity nor host cover percentage of AMF. The labile GRSP decreased as much as 36% after 400 incubation days. While the GRSP fraction increased until 87% at the end of incubation period. No differences were found in GRSP decomposition at different temperatures of incubation, which can conclude that this fraction is very stabilize with a major importance for carbon sequestration. The high percentage of aluminum and iron in GRSP should have a role in their stabilization and could make that the high level of GRSP found in forest soils possible.

**Key Words**: Accumulation, decomposition, GRSP, aluminum, iron, temperate forests, *P. menziesii*.

#### 5.1 Introducción

La materia orgánica del suelo es un reflejo de la vegetación, organismos de suelo, clima, material parental, alteraciones antropogénicas y naturales, entre otros (Paul *et al.* 1997). Los ecosistemas forestales representan una gran reserva de carbono (C), ya que almacenan sobre el 70% de todo el C orgánico del suelo (Batjes 1998). Con el objetivo de mitigar los efectos del cambio climático, se han estado desarrollando estrategias para que el manejo silvícola pueda aumentar el secuestro de C en el suelo e incrementar su capacidad de almacenar carbono (Jandl *et al.* 2007). Sin embargo, se requiere entender los mecanismos que participan en la determinación del tiempo de residencia de la MOS (Mikutta *et al.* 2006).

Para lograr una materia orgánica con un alto tiempo de residencia es necesario que ésta se encuentre estabilizada en el suelo. Se han identificado tres factores que contribuyen a la estabilización de la MOS.

- 1.- Estabilización física relacionada con la acumulación de MO debido a una protección física, que impide el acceso a los microorganismos (Jastrow *et al.* 1998; Six *et al.* 2000; Rillig 2004; Mikutta *et al.* 2006; Kögel-Knabner *et al.* 2008). Este protección solo retardaría la descomposición de compuestos lábiles, mientras que compuestos más recalcitrantes serían indiferentes a la protección física, ya que se descompondrían lentamente de todas maneras (Marschner *et al.* 2008).
- 2.- Estabilización química, a través de interacciones intermoleculares entre compuestos orgánicos e inorgánicos u orgánico y orgánicos, que disminuye la disponibilidad de compuestos orgánicos (Sollins *et al.* 1996; Mikutta *et al.* 2006; Kögel-Knabner *et al.* 2008).
- 3.- Estructuras de la MO muy estables contra la degradación bioquímica, definidos como compuestos recalcitrantes (Mikutta *et al.* 2006), que involucra características a nivel molecular, incluyendo la composición elemental, presencia de grupos funcionales y conformación molecular (Sollins *et al.* 1996).

La glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP), es una fracción importante dentro de la materia orgánica del suelo (Rillig y Allen 1999; Nichols 2003; Lovelock *et al.* 2004a), que puede contribuir en forma significativa a secuestrar una gran cantidad de C y N a escala global (Treseder y Turner 2007). Ella va a estar sujeta a los mismos procesos de estabilización que las otras fracciones de MO. Así, la cantidad de GRSP de un suelo va a depender de la producción de esta glicoproteína y de su velocidad de descomposición, donde condiciones medioambientales pueden alterar ambos flujos en forma independiente (Rillig 2004).

La producción de glomalina debería ser directamente controlada por la abundancia y la composición de la comunidad de HMA, e indirectamente por la biomasa radical, disponibilidad y calidad de la especie hospedera y el balance nutricional de la planta (Treseder y Turner 2007). Por su parte, estas características de las especies hospederas son influenciadas por la disponibilidad de sustancias inorgánicas como CO<sub>2</sub>, fósforo, nitrógeno, microelementos y agua. Su descomposición ha sido poco estudiada, pero al igual que la MO en general, puede ser afectada por la disponibilidad de nutrientes, textura y estructura del suelo y características climáticas, entre otras. Es aquí donde la temperatura tiene un papel fundamental, sobre todo al considerar los posibles efectos del cambio climático (Kirschbaum 2006) y sus potenciales consecuencias en el secuestro de C y N. Los suelos forestales son especialmente sensibles frente a eventos de disturbio y pueden pasar de ser considerados reservas de C a fuentes de C en el ciclo biogeoquímico de ambientes terrestres (Jandl *et al.* 2007).

Diferentes estudios han mostrado que las especies de HMA tienen distinta capacidad para producir glomalina (Wright y Upadhyaya 1999; Lovelock *et al.* 2004b). Estos estudios indican que las especies del género *Glomus* derivan menos recursos para la producción de glomalina que de *Gigaspora* o *Acaulospora*. Esto tendría una posible explicación al considerar que *Glomus* produce menos micelio extraradical que los otros géneros mencionados (Klironomos *et al.* 1998; Smith y Read 2008). Metodologías para cuantificar la producción de glomalina en maceta fueron desarrolladas por el equipo de Wright (1999) y Lovelock *et al* (2004b) desarrollaron una técnica para cuantificar la producción de glomalina en terreno, con buenos resultados en la producción de la glicoproteína, pero con un error estándar muy grande en la cuantificación del micelio de HMA. Aún así, en este estudio se observó una tendencia negativa entre la producción de glomalina y el largo total de hifas de HMA (Lovelock *et al.* 2004b). Otro factor importante que afecta la producción de glomalina es la estructura y textura de suelo (Rillig y Steinberg 2002).

A través de radioisótopos se ha estimado que la GRSP tiene una vida media entre 6 y 42 años (Rillig *et al.* 2001); sin embargo, de acuerdo a lo señalado por Rillig (2004), este tiempo es escasamente usado y se prefiere la metodología de incubación para determinar la vida media de GRSP. Los resultados obtenidos con esta última metodología, muestran un compuesto de lenta descomposición, lo que explicaría que exista en grandes cantidades en el suelo. Otro factor importante que podría estar determinando los altos contenidos encontrados en suelos de diferentes ecosistemas es el mecanismo de estabilización de la materia orgánica involucrado.

Se planteó como hipótesis que bosques con una mayor disponibilidad de plantas hospederas de HMA poseen una mayor capacidad para acumular GRSP. Para probar esta hipótesis, se diseñó un experimento de campo que permitiera determinar si estos sitios forestales tienen distinta capacidad de producción, sin que el factor de textura de suelo pudiera estar interfiriendo. A su vez, se desarrolló una incubación de suelo para cuantificar la descomposición de GRSP en suelos forestales con diferente composición vegetal.

Por lo tanto se plantearon dos objetivos:

- Cuantificar la producción *in situ* de GRSP de bosques templados con y sin manejo forestal, y una plantación forestal de *P. menziesii*.
- Evaluar la estabilidad de la GRSP producida en suelos de bosques templados y en la plantación forestal de *P. menziesii* en condiciones controladas.

# 5.2 Materiales y Métodos

## **5.2.1** Descripción de los sitios experimentales

El sitio experimental está localizado en el bosque experimental San Pablo de Tregua (39°38'S; 72°10'W), en la precordillera de la Provincia de Panguipulli, centro-sur de Chile. El suelo es un Andisol moderadamente profundo, de la serie Liquiñe (Acrudoxic Hapludand), derivado de cenizas volcánicas recientes (Veblen *et al.* 1980).

Se seleccionaron cuatro bosques templados distintos y una plantación forestal: (1) Bosque siempreverde prístino (SV), donde las especies arbóreas dominantes corresponde a *Nothofagus dombeyi, Laurelia phillipiana* y *Saxegothaea conspicua*. (2) Bosque siempreverde alterado (SVA), compuesto por *L. philippiana*, *S. conspicua* y *Myrceugenia planipes*, como especies dominantes y *Dasyphyllum diacanthoides*, como especie acompañante. (3) Renoval caducifolio (RC), corresponde a un bosque secundario de *N. alpina*, complementado por pocas especies acompañantes (*N. obliqua*, *N. dombeyi*, *L. philippiana*). (4) Renoval caducifolio con manejo forestal (RCM), es un bosque secundario compuesto por *N. alpina*, al igual que RC, pero que fue sometido a un raleo de copas, para reducir el área basal en un 35%. (5) Plantación de pino oregón (*Pseudotsuga menziesii*)(ORG), de 25 años de edad.

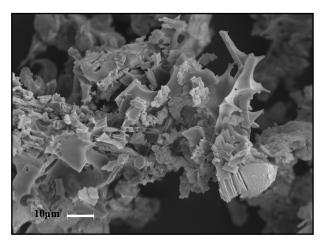
Las características físico químicas de los suelos de los diferentes sitios, así como las características climáticas, están descritas con mayor detalle en el Capítulo 2.

#### 5.2.2 Acumulación de GRSP in situ

#### Primer ensayo temporada 2005 – 2006.

Para desarrollar una metodología de cuantificación de la acumulación de glomalina *in situ*, se realizó un ensayo piloto durante la temporada 2005 – 2006. Este se basó en la metodología usada por Lovelock *et al.* (2004b) en bosques tropicales de Costa Rica, la cual consistía en usar cámaras de incubación de PVC selladas con mallas de abertura igual a 45 μm, de modo de evitar el paso de las raíces, generando una cámara de exclusión hifal. Se usó un sustrato libre de GRSP, que permitió cuantificar la acumulación de GRSP en un tiempo determinado.

Las cámaras de incubación fueron de tres tamaños, usando tubos de PVC de 5; 7,5 y 10 cm de diámetro por 10 cm de longitud, con dos sustratos libres de glomalina: a) vermiculita y arena de cuarzo en una relación 2:1, y b) pumicita: corresponde a una ceniza volcánica porosa, de color naranjo pálido a café-rojizo y descrito como el material parental de la mayoría de los Andes Valdivianos (39°25' – 40°40' S)(Veblen *et al.* 1980) (Anexo 1. Propiedades químicas de la pumicita). Se usó tres repeticiones por cada combinación de sustrato y diámetro de cámara de incubación.



**Figura 5.1.** Microfotografía electrónica de la pumicita, ceniza volcánica usada en bolsas de incubación y obtenida del suelo del bosque de San Pablo de Tregua, Provincia de Panguipulli, centro-sur de Chile.

En la parcela experimental del bosque siempreverde alterado, se depositó horizontalmente en el suelo las cámaras de incubación, a una profundidad de 10 cm. Las cámaras de incubación

permanecieron tres meses en el suelo, de enero a marzo de 2006. Pasado el periodo de incubación, las cámaras fueron extraídas del sitio y transportadas en bolsas plásticas, independientes, en caja refrigerada hasta el laboratorio. Posteriormente, se cuantificó el contenido de GRSP con la metodología de extracción en base a buffer citrato y calor propuesta por Wright y Upadhyaya (1996; 1998). La cuantificación se realizó con la metodología para la medición de proteínas totales de Bradford, de acuerdo a Wright y Upadhyaya (1996; 1998).



**Figura 5.2.** Cámaras de incubación de PVC con sustrato de pumicita (café) y arena de cuarzo y vermiculita, en una relación 1:2 (gris), utilizadas para el ensayo experimental *in situ* en el bosque siempreverde alterado, San Pablo de Tregua, Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

#### Segundo ensayo temporada 2006 – 2007.

Con los resultados obtenidos en el primer ensayo se optó por diseñar bolsas trampas basadas en modelos usados para la estimación del micelio extrarradical en ectomicorrizas por Kjoller (2006). Las trampas consistieron en sacos de una malla de 45µm, de un tamaño aproximado 6 x 6 cm y con pumicita como sustrato. (Anexo 1: propiedades químicas del sustrato). Las cámaras permanecieron *in situ* por un periodo de 92 días en cada uno de los cuatro bosques y la plantación forestal, desde el 30 de octubre 2006 hasta el 31 de enero 2007, a una profundidad de 10 cm. Se utilizaron 10 repeticiones por sitio. Como control, 10 bolsas trampas fueron guardadas en el laboratorio, el cual fue analizado junto con las demás bolsas trampas, posteriormente. Al término del periodo, se extrajo la GRSP y se cuantificó su contenido con la metodología para proteínas totales de Bradford, descrita por Wright y Upadhyaya (1996; 1998).



**Figura 5.3.** Bolsas trampas para incubación en suelo, usadas para la cuantificación de la GRSP en cuatro bosques templados y en una plantación forestal de *P. menziessi* en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

#### 5.2.3 Estudio de la estabilidad de la GRSP in vitro

#### 5.2.3.1 Ensayo de descomposición de GRSP

La metodología usada para estudiar la estabilidad de la GRSP se basó en las usadas por Steinberg y Rillig (2003) y Rillig *et al.*(2003) para cuantificar la descomposición de la GRSP, la cual se fundamenta en la falta de capacidad saprofítica de los HMA.

Se montaron frascos de 1 L de capacidad, con 250 g de suelo proveniente de los primeros 20 cm de profundidad, de los diferentes sitios forestales de San Pablo de Tregua, Provincia de Panguipulli. Previamente, el suelo se tamizó a 2mm, para poder homogenizarlo, y luego se llevó a un porcentaje de humedad igual a 65%.

El suelo fue incubado por un periodo de 400 días, en oscuridad, en ausencia de plantas y raíces gruesas, y en condiciones de humedad y temperatura controlada. Los suelos de los cinco sitios fueron incubados a 9°C (temperatura media anual del predio) y a 20°C, temperatura usada por Steinberg y Rillig (2003).

Las fracciones EE-GRSP y GRSP se cuantificaron cada 100 días, tomando una submuestra de 50 g de suelo. La primera medición se realizó antes de comenzar la incubación, tiempo cero. La metodología usada para la cuantificación de las fracciones EE-GRSP y GRSP correspondió a las usadas por Wright y Upadhyaya (1996; 1998), descritas en el capítulo 4. Algunas muestras fueron

analizadas con la prueba de ELISA (Wright y Upadhyaya 1996; Nichols 2003). Tanto EE-GRSP como GRSP liofilizada, fueron resuspendidas en buffer fosfato (PBS). Se usó 30 μL de muestra en cada pozo de la placa de ELISA y el anticuerpo monoclonal 32B11 disuelto en PBS, en una relación 1:3.

#### 5.2.3.2 Contenido de metales en la fracción GRSP

A la GRSP purificada y liofilizada, obtenida de los cuatro bosques templados y de la plantación forestal y a dos profundidades (0 – 20 cm y 20 – 40 cm) (Capítulo 4), se le midió el contenido de hierro (Fe), aluminio (Al), manganeso (Mn), cobre (Cu) y zinc (Zn) a través de espectrofotometría de absorción atómica. Para esto se utilizaron 5 mg de muestra y cinco réplicas.

#### 5.2.4 Análisis estadísticos

Para analizar los datos obtenidos del ensayo de producción de GRSP en la primera temporada, se realizó un análisis no paramétrico de los datos, al no cumplir con los supuestos estadísticos. En la segunda temporada, al aumentar el número de repeticiones a 10, los datos obtenidos cumplieron con los supuestos estadísticos y se usó un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de promedio de diferencia mínima significativa (DMS), p<0,05.

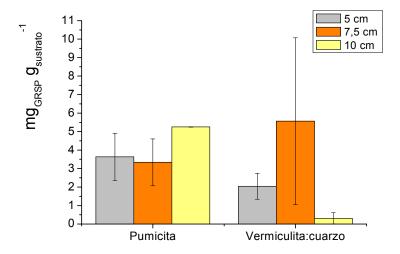
Las incubaciones de suelo se realizaron con 5 réplicas para cada tratamiento. Para comparar las diferencias entre los contenidos finales e iniciales de GRSP, se utilizó la prueba de comparación de promedios T-Student, p<0,05. Para comparar los valores de GRSP entre los sitios forestales en los diferentes momentos de la incubación se realizó un ANDEVA, seguido de la prueba de comparación múltiple de promedios diferencia mínima significativa (DMS). Para determinar diferencias en los contenidos de metales de la GRSP se realizó un ANDEVA, luego de determinar que cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Al encontrar diferencias significativas entre los grupos, se aplicó la prueba de comparación múltiple de promedios DMS. Para determinar si existía diferencias estadísticas por efecto de la profundidad, se aplicó la prueba T- Student. Todos los análisis fueron realizados con el programa SPSS 10.0 (SPSS, USA).

# 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Acumulación de GRSP in situ.

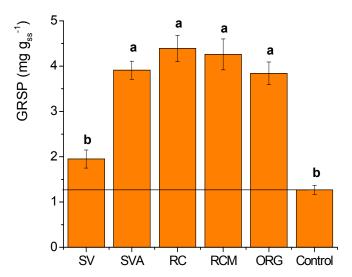
#### Ensayo temporada 2005 – 2006.

En los dos sustratos libres de GRSP utilizados se encontró GRSP al cabo de 90 días (Figura 5.3). Sin embargo, las cámara de exclusión con vermiculita más arena de cuarzo presentaron resultados muy heterogéneos, mientras que pumicita presentó mayores concentraciones, con un menor error estándar y con una menor variación, entre los diferentes diámetros de cámara de incubación utilizados.



**Figura 5.4.** Contenido de GRSP (mg g<sub>sustrato</sub><sup>-1</sup>) en cámaras de incubación, con diámetro de 5.0; 7.5 y 10 cm, y dos sustratos, después de una incubación *in situ* de 90 días, en un bosque siempreverde alterado, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile.

#### Ensayo temporada 2006 - 2007



**Figura 5.5**. Estimación de la acumulación de GRSP (mg g <sub>ss</sub>) en suelo de los diferentes bosques templados y una plantación de *P. menziesii* durante un periodo de 90 días, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

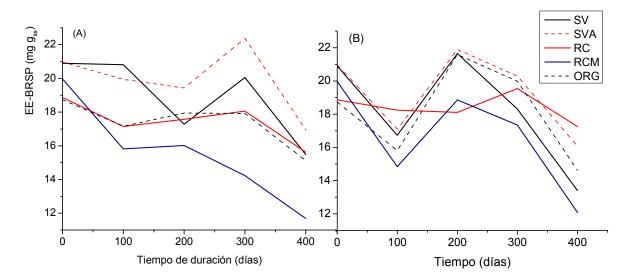
En la segunda temporada, fue posible detectar diferencias entre los bosques en cuanto a su capacidad para producir GRSP. Ambos renovales caducifolios, con y sin manejo, presentaron la mayor acumulación; sin embargo, no fueron diferentes de bosque siempreverde alterado y la plantación de *P. menziesii*. Solamente el bosque siempreverde prístino registró una menor acumulación y no presentó diferencia significativa respecto del control (Figura 5.5).

No se encontró correlación entre la acumulación de GRSP y la riqueza específica del sitio (r= 0.114; p=0.855; n=5), ni el número de especies hospederas (r= 0.535; p=0.353; n=5).

#### 5.3.2 Estabilidad de la GRSP proveniente de suelos con diferente vegetación.

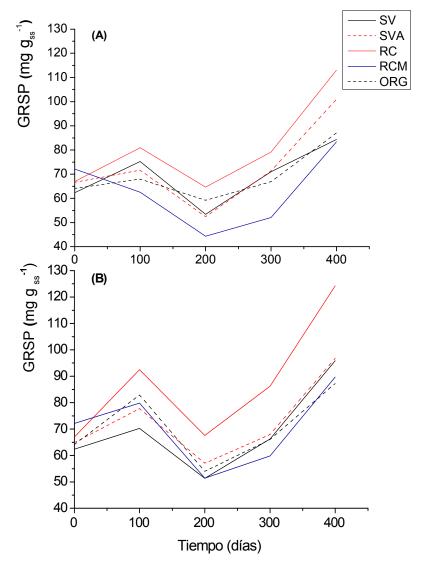
#### 5.3.2.1 Descomposición de la GRSP

Las curvas obtenidas de la incubación de GRSP, muestran una disminución de EE-GRSP al término de la incubación (Figura 5.6). Sin embargo, esta disminución no fue constante durante el periodo de incubación. Fue posible observar que a 9°C existió un aumento en la cantidad de EE-GRSP cuantificada a los 300 días en todos los sitios, excepto en el renoval caducifolio con manejo forestal. A 20°C este aumento en la cantidad de EE-GRSP se observó a los 200 días, a excepción del renoval caducifolio



**Figura 5.6.** Variación en el contenido EE-GRSP de suelos de cuatro bosques templados y de una plantación de *P. menziesii* de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile, a dos temperaturas. (A) 9°C y (B) 20°C. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

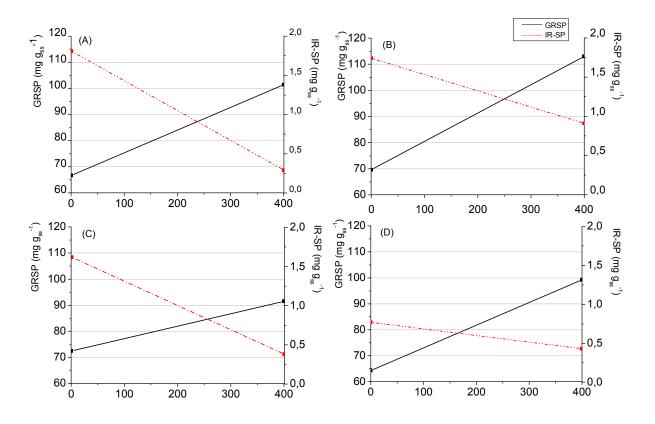
El renoval caducifolio sin manejo no sufrió una disminución significativa al cabo de 400 días, en ambas temperaturas, mientras que los demás sitios forestales presentaron una disminución significativa. El renoval caducifolio con manejo presentó la mayor disminución en el contenido de EE-GRSP, un 36% a 9°C y a 20°C. El bosque siempreverde prístino presentó una disminución de 25 % a 9°C y 31% a 20°C. En el bosque siempreverde alterado y en la plantación de P. menziesii la disminución a 9°C fue de un 19% y un 17% y a 20°C fue de 27% y 22%, respectivamente. A pesar de las diferencias observadas con la temperatura de incubación, éstas no fueron significativas (p<0,05).



**Figura 5.7.** Variación en el contenido de GRSP en suelos de cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziesii* de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile, incubados a dos temperaturas. (A) 9°C (B) 20°C. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio manejado; ORG: plantación de *P. menziesii*.

Contrario a los esperado, al término del periodo de incubación el contenido de GRSP aumentó en todos los sitios forestales (Figura 5.7). El mayor aumento se registró en el renoval caducifolio, con un 86% y un 87% a 9°C y 20°C, respectivamente. El menor aumento se encontró en el renoval caducifolio con manejo forestal, con un 23% a 9°C y 30% a 20°C, respectivamente.

A diferencia de la fracción GRSP, que aumentó durante la incubación, la fracción de proteína inmunoreactiva no sufrió variación, excepto en el bosque siempreverde alterado donde se registró una disminución de un 84% (Figura 5.8). A pesar de no haber una disminución significativa en los demás sitios forestales, si se observó esta tendencia. La plantación forestal de *P. menziesii* disminuyó en promedio un 44%, mientras los renovales caducifolios (con y sin manejo forestal) tuvieron una disminución de un 77% y un 48%, respectivamente.



**Figura 5.8** Comparación entre los cambios producidos en las fracciones GRSP y proteína de suelo inmunoreactiva (IR-SP) luego de 400 días de incubación a 9°C. (A) bosque siempreverde alterado. (B) renoval caducifolio. (C) renoval caducifolio con manejo forestal. (D) plantación de *P. menziesii*.

**Tabla 5.1.** Concentración de metales en GRSP extraída a dos profundidades de suelo provenientes de cuatro bosques templados y una plantación de *P. menziesii*, en la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. SV: bosque siempreverde prístino; SVA: bosque siempreverde alterado; RC: renoval caducifolio; RCM: renoval caducifolio con manejo forestal; ORG: plantación de *Pseudotsuga menziesii*.

Sitio	Profundidad (cm)	Al (%)	Fe (%)	Mn (‰)	Cu (‰)	Zn (‰)
SV	0 - 20	$4,5 \pm 1,7$	$3,9 \pm 0,8$	$0,4 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,2$	$0,15 \pm 0,07$
	20 - 40	$7,2 \pm 0,6$	$6,0 \pm 1,1$	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,06$
SVA	0 - 20	$4,5 \pm 1,1$	$5,3 \pm 0,5$	$0,4\pm0,2$	$0.5 \pm 0.2$	$0,23 \pm 0,09$
	20 - 40	$7,9 \pm 1,3$	$5,5\pm0,5$	$0,4\pm0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,\!28 \pm 0,\!18$
RC	0 - 20	$6,1 \pm 0,8$	$3,4\pm0,7$	$0,5 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,06$
	20 - 40	$6,6 \pm 0,8$	$3,7\pm0,9$	$0,4\pm0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$0,31 \pm 0,21$
RCM	0 - 20	$4,2 \pm 1,6$	$5,1\pm0,8$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,02$
	20 - 40	$7,5 \pm 1,2$	$3,0 \pm 1,9$	$0,2 \pm 0,1$	$0,4\pm0,2$	$0,16 \pm 0,07$
ORG	0 - 20	$4,3 \pm 1,1$	$5,3 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,2$	$0,4\pm0,2$	$0,14 \pm 0,03$
	20 – 40	$7,0 \pm 1,9$	$6,1 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$0,14 \pm 0,03$

El contenido promedio de hierro que se registró en la GRSP aumentó significativamente con la profundidad de un 4,2% a 0 – 20 cm a un 5,0% entre 20 – 40 cm. Por otra parte, el origen de GRSP también influyó en su contenido de Fe. La GRSP proveniente del renoval caducifolio presentó el menor contenido de Fe 3,6%, la cual fue distinta solo de la GRSP del bosque siempreverde alterado, que tuvo en promedio un 5,4% de Fe.

El aluminio representó un porcentaje tan importante o más que el Fe. Aunque no se observaron diferencias según el origen de la GRSP, si se registró una diferencia significativa al aumentar la profundidad. Entre los 0-20 cm, esta glicoproteína presentó en promedio un 4,7% de Al, el cual aumentó a 7,3% entre 20 y 40 cm de profundidad.

El contenido de Mn, Cu y Zn no varió con la profundidad o con el origen de la GRSP y representa una proporción muy baja, ya que en promedio la GRSP tuvo 0,0036‰ de Mn, 0,0040‰ de Cu y 0,0018‰ de Zn.

#### 5.4 Discusión

#### 5.4.1 Acumulación de GRSP in situ

La metodología usada permitió la cuantificación de la acumulación (producción y descomposición) de GRSP en el periodo de 90 días. Un estudio similar fue desarrollado por Lovelock *et al* (2004b) en un bosque tropical de Costa Rica. En el estudio se midió proteína inmunoreactiva (IRSP) y se encontró diferencias entre suelos más fértiles (Inceptisoles) y menos fértiles (Oxisoles). Los valores obtenidos tuvieron una media de  $0,044 \pm 0,013$  ug m<sup>-1</sup> de hifa. En maceta, las concentraciones encontradas fueron menores y variaron entre 0,0068 a 0,036 ug m<sup>-1</sup>. En este estudio no fue posible determinar la correlación con el contenido de hifas, por el limitado volumen de sustrato disponible.

Las concentraciones cuantificadas en los sitios forestales no son comparables a las reportadas por Lovelock *et al.*(2004b), ya que en este estudio se cuantificó GRSP con la metodología para proteínas totales de Bradford. Las diferencias encontradas en la acumulación de GRSP entre los sitios no tuvieron correlación con parámetros vegetales tales como riqueza específica, diversidad de especies hospederas o porcentaje de cobertura de especies hospederas, por lo que la acumulación podría tener relación con parámetros climáticos como las precipitaciones y temperatura y podría ser la causa de las diferencias encontradas por Lovelock *et al.* (2004b) entre los contenidos obtenidos desde el terreno y desde ensayos en macetas.

No se esperaba encontrar una acumulación de GRSP en la plantación de *P. menziesii*, ya que esta especie está clasificada se caracteriza por presentar simbiosis con hongos ectomicorrícicos. (Read 1991). Sin embargo, la presencia de una gran número de esporas de HMA y micelio activo encontrados en este sitio (Figura 3.1 y Figura 3.2) y los resultados obtenidos en plántulas obtenidas de vivero y de campo con la presencia de vesículas, arbúsculos e hifas en sus raíces (Cázares y Trappe 1993; Cázares y Smith 1996; Smith *et al.* 1998), hace suponer que esta especie es hospedera de HMA en algún momento de su vida o a lo largo de ella. Estos antecedentes explicarían la presencia de GRSP en las bolsas de incubación *in situ* colocadas en el suelo de la plantación.

#### 5.4.2 Estabilidad de la fracción GRSP proveniente de suelos con diferente vegetación

Algunos autores han señalado que la GRSP es una fracción muy resistente a la degradación dentro de la materia orgánica del suelo (Haddad y Sarkar 2003; Lutgen *et al.* 2003; Nichols 2003), pero poco se sabe de la tasa de descomposición de esta glicoproteína o cuales son las enzimas y

microorganismos involucrados. Rillig et al. (2001) de acuerdo a estudios de <sup>14</sup>C, determinaron un tiempo mínimo de residencia de 6 años, variando hasta 42 años, llegando a un máximo aproximado de 92 años (Preger et al. 2007). Steinberg y Rillig (2003) observaron una disminución en el contenido de GRSP de un 25% y en la fracción IR-SP fue de un 46% al cabo de 150 días de incubación. Sin embargo, en los muestreos que realizaron después de los 100 días se observó un incremento progresivo en el contenido de GRSP, como se observó en la incubación a 20°C en este estudio. En la Figura 5.7 se puede observar que a los 200 días de incubación se registró el menor contenido de GRSP a ambas temperaturas de incubación, disminuyendo en promedio un 18,6% a 9°C y un 12,6% a 20°C, menor a lo registrado por Steinberg y Rillig (2003). Sin embargo, al termino del periodo de incubación, la concentración de GRSP aumentó. Halvorson y Gonzalez (2006), observaron pequeños cambios en el contenido de GRSP, menores al 10% en los primeros 5 cm de profundidad, pero al aumentar la profundidad (10 - 20 cm) observaron un incremento significativo del 7% al cabo de 395 días, sin entregar alguna explicación del suceso. Contrario a lo obtenido por Halvorson y Gonzalez (2006) o Steinberg y Rillig (2003), Rillig et al. (2003) encontraron una disminución de hasta el 57% de la GRSP, al realizar una incubación a 25°C por 413 días.

Los resultados obtenidos en el ensayo de incubación podrían deberse en las siguientes causas:

a) Artefacto en la incubación o en la cuantificación de la proteína, ya sea por la presencia de taninos, ácidos húmicos u otro tipo de materia orgánica que pueda interferir en la cuantificación por Bradford (Halvorson y Gonzalez 2006; Rosier *et al.* 2006; Whiffen *et al.* 2007), y que se estarían liberando a diferente velocidad que la GRSP.

Los suelos volcánicos del sur de Chile se caracterizan por presentar altos contenidos de materia orgánica en el suelo (Tabla 2.1), donde ácidos húmicos y otros compuestos fenólicos, con distinta forma de estabilización, podrían ser extraídos con la metodología propuesta para la GRSP, luego de un periodo de incubación, y sobreestimar la cuantificación para proteínas totales de Bradford.

b) Los hongos saprófitos, patógenos y ectomicorrícicos también producen proteínas, llamadas hidrofobinas (Nichols 2008), las cuales podrían aumentar al proliferar estos hongos, produciendo proteína positiva en la prueba de Bradford. Dentro de estos dos grupos de hongos, se ha medido la respuesta inmunológica al anticuerpo monoclonal 32B11, no encontrando una cantidad de la magnitud obtenida con la glomalina de hifas de HMA (Wright *et al.* 1996). Sin embargo, cómo

estos hongos y sus productos metabólicos interfieren en la cuantificación de Bradford no ha sido determinada.

c) GRSP altamente estabilizada y/o recalcitrante (Lovelock *et al.* 2004a), ya sea formando complejos con sustancias fenólicas (Janos *et al.* 2008), metales (Fe, Al) o arcillas (Nichols 2008), que no es extraída en un principio, es liberada producto de la incubación. Esto aumentaría la concentración de GRSP extraída y cuantificada.

Si bien las condiciones de incubación *in vitro*, son condiciones artificiales, que no representan en su totalidad las condiciones de campo, la fracción inmunoreactiva podría estimar de manera más efectiva la descomposición de la GRSP, ya que la fracción IRSP, incubada a 9°C, no varió significativamente en los sitios forestales al cabo de 400 días. No se puede dejar de considerar que el aumento de compuestos fenólicos, que sobreestiman la cuantificación por medio de Bradford, tienen el efecto contrario en la cuantificación por el test de ELISA. Estos resultados reafirmarían lo propuesto por diferentes autores (Halvorson y Gonzalez 2006; Rosier *et al.* 2006; Purin y Rillig 2007; Schindler *et al.* 2007; Whiffen *et al.* 2007), quienes señalan que GRSP correspondería a una mezcla de ácidos húmicos y material proteínico o una mezcla con taninos, pero que se trataría principalmente de proteína de HMA (Bolliger *et al.* 2008; Janos *et al.* 2008).

A pesar de la disminución registrada en la concentración de EE-GRSP, no se observaron diferencias entre las temperaturas de incubación. Esto mostraría que GRSP corresponde a una fracción estable y de una estructura bastante compleja dentro de la materia orgánica, porque su descomposición sería independiente de la temperatura, como señalan Liski *et al.* (1999), Giardina y Ryan (2000), y Davidson y Janssens (2006). Por otra parte, Lutgen *et al.*(2003) señalan que una parte de GRSP sería lábil y otra sería bastante recalcitrante, por lo que es posible observar cambios estacionales en el contenido total. Si bien fue posible observar cambios en el contenido de EE-BRSP al cabo de 400 días de incubación, no se encontraron diferencias con la temperatura y estos resultados no permiten hacer estimaciones de la participación de la GRSP en la fracción activa del C del suelo o en la fracción estabilizada.

Las fluctuaciones observadas en las curvas de la EE-GRSP concuerdan con los resultados obtenidos por Steinberg y Rillig (2003). La EE-GRSP no correspondería solo a una fracción de reciente depositación en el suelo (Wright y Upadhyaya 1998; Lovelock *et al.* 2004b), sino más bien a una

fracción más lábil, menos estabilizada en el suelo, ya sea porque ha sido recientemente depositada o porque ha sido liberada por un proceso de desestabilización o descomposición.

Las diferencias entre las curvas de EE-GRSP y GRSP sugieren diferentes formas de estabilización de la proteína en el suelo entre los sitios estudiados. En el análisis de metales de GRSP se observó un porcentaje de Al mayor que de Fe en la GRSP proveniente de todos los sitios forestales evaluados (Tabla 5.1). No existen antecedentes previos sobre el contenido de Al en la GRSP, pero el contenido de hierro puede variar entre un 0,2 y 8,8% de la GRSP (Nichols 2003). Esta variación en el porcentaje de Fe en la GRSP se ha relacionado con una glicoproteína más antigua, va que glomalina obtenida de medios de cultivo tiene un porcentaje de hierro muy bajo (0,2- 07%) (Nichols 2003). Esta incorporación de Fe, posiblemente mediante formación de complejos puede afectar la actividad enzimática, impidiendo su degradación (Mikutta et al. 2006). Posiblemente el Al estaría cumpliendo la misma función que el Fe. Sin embargo, estos valores no se relacionaron con una mayor o menor variación en el contenido de GRSP terminada la incubación. Staunton et al. (2008) mencionan que tanto óxidos de aluminio y hierro podrían proteger a la GRSP y disminuir así su descomposición. Además, estos autores encontraron una buena correlación entre el contenido de alofán y de GRSP en el horizonte A de suelos volcánicos de las islas Martinica. Por lo tanto, el aluminio y hierro presente en la GRSP y la presencia de arcillas no cristalinas como el alofán e (hidr)óxidos de Fe y Al en los suelos volcánicos donde se desarrollan estos bosques, estarían participando en la estabilidad de la molécula, permitiendo una alta acumulación de GRSP y de materia orgánica en general (Zunino et al. 1982; Torn et al. 1997; Six et al. 2000; Mikutta et al. 2006).

Mikutta *et al.* (2006) encontraron que la estabilización de la materia orgánica con minerales no cristalinos e (hidr)óxidos de metales, era la más importante en suelos forestales ácidos, tanto templados como tropicales. Este mecanismo parece ser el más importante en la acumulación de GRSP en suelos forestales templados del sur de Chile. Los mecanismos físicos de protección serían menos importante, ya que la GRSP se ha localizado cubriendo agregados estables al agua y fluctuaciones importantes en la fracción EE-GRSP se han observado en ensayos de incubación como en muestras de campo (Lutgen *et al.* 2003), por lo que podría ser liberada con relativa facilidad. Resultados obtenidos por Mikutta *et al.* (2006) indican que el N encontrado en los suelos estudiados, permanecía principalmente en asociaciones órgano-minerales y no en MO recalcitrante, sugiriendo una abundancia significativa de compuestos proteínicos, lo que estaría avalado por una baja relación C/N. La GRSP representa hasta un 17% del N total del suelo, con una baja relación

C/N, excepto en la plantación forestal, lo que concuerda con Mikutta *et al.* (2006) y confirmaría que la principal forma de estabilización de esta fracción mediante la formación de complejos.

La disminución observada en los contenidos de IRSP en los cuatro sitios forestales analizados concuerda con lo esperado luego de una incubación en ausencia de HMA. Steinberg y Rillig (2003) realizaron un ensayo de descomposición de GRSP con suelo proveniente de un bosque de Pinus ponderosa y Festuca idahoensis, en el cual observaron una disminución de la fracción IRSP del 46% al cabo de 150 días de incubación de suelo a 18°C, por lo que después de 400 días de incubación el porcentaje de esta fracción sería muy cercano a cero. Al realizar la incubación a 9°C, la máxima disminución se registró en el bosque siempreverde alterado, registrando un 84% de disminución pasado 400 días y la menor se obtuvo en la plantación de *Pseudotsuga menziesii*. De acuerdo a K. Nichols (comunicación personal), la prueba de ELISA permite determinar si existe proteína de HMA, lo que concuerda con la especificidad de la prueba de ELISA (Wright et al. 1996; Rillig y Mummey 2006; Bolliger et al. 2008), sin embargo, la cuantificación a través de esta metodología es dificil debido a la degradación del sitio de reacción en el proceso de purificación, ya que Janos et al. (2008) encontraron que no existe degradación durante la extracción; a interferencias con otros compuestos presentes en el extracto, como compuestos fenólicos (Nichols 2003; Rosier et al. 2006), metales, crecimiento de microorganismos en la solución de citrato y la liofilización (Nichols 2003). Además de la subjetividad en el uso de suelo estándar 100% inmunoreactivo.

#### 5.5 Conclusiones

La metodología usada para la determinación de la acumulación de GRSP *in situ* es una buena herramienta para este tipo de ensayos, que permite la cuantificación de GRSP. Pequeñas modificación permitirán mejorar el rendimiento de modo de poder obtener esporas y/o micelio para poder relacionar el producto obtenido con estos parámetros fúngicos.

La acumulación de GRSP no tiene relación con la diversidad vegetal o el porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA en bosques templados y en una plantación forestal del sur de Chile. Pero no se puede descartar que se relacione con la producción primaria neta o la biomasa de raíces finas, ya que esta no fue medida en este estudio. La participación de estos parámetros parece menos importante en la acumulación de GRSP que los factores abióticos como textura de suelo, contenido y tipo de arcillas, fertilidad de suelo, temperatura y precipitación.

La cuantificación de GRSP en la plantación de *P. menziesii*, en el ensayo de acumulación *in situ* de GRSP, refuerza los antecedentes que plantean a esta especie como hospedera de HMA, sin que se conozca las implicaciones ecológicas que esta simbiosis pueda tener para la especie.

La presencia de diferentes formas de aluminio y hierro y arcillas no cristalinas como el alofán, parecen ser los factores principales en la estabilización de la GRSP en estos suelos, lo que permite encontrarla en grandes cantidades o tener el potencial de acumularla en grandes cantidades.

La fracción definida como GRSP, involucra compuestos de origen diferente a la glicoproteína producida por los HMA; lo que queda de manifiesto en las curvas de descomposición obtenidas en este estudio experimental *ex situ*. Además, la metodología usada para cuantificar la descomposición de las fracciones de GRSP, no tiene la sensibilidad suficiente para detectar diferencias estadísticas de manera confiable, en especial en fracción cuantificada por la metodología de proteínas totales de Bradford. Sin embargo, esta fracción tiene un gran potencial en el secuestro de carbono, ya que corresponde a una porción de la materia orgánica del suelo muy estabilizada que hace importante su estudio en diferentes ecosistemas.

# 5.6 Referencias

- Batjes, N. H. (1998). Mitigation of atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations by increased carbon sequestration in the soil. Biology and Fertility of Soils **27**: 230-235.
- Bolliger, A., A. Nalla, J. Magid, A. de Neergaard, A. Nalla y T. Bog-Hansen (2008). Re-examining the glomalin-purity of glomalin-related soil protein fractions through immunochemical, lectin-affinity and soil labelling experiments. Soil Biology & Biochemistry **40**: 887-893.
- Cázares, E. y J. E. Smith (1996). Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Pseudotsuga menziesii* and *Tsuga heterophylla* seedlings grown in Oregon Coast Range soils. Mycorrhiza **6**(1): 65-67.
- Cázares, E. y J. M. Trappe (1993). Vesicular endophyte in roots of the Pinaceae. Mycorrhiza 2: 153-156.
- Davidson, E. A. y I. A. Janssens (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. Nature **440**: 165-173.
- Giardina, C. y M. Ryan (2000). Evidence that decomposition rates of organic carbon inmineral soil do not vary with temperature. Nature **404**: 858-861.
- Haddad, M. J. y D. Sarkar (2003). Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: Part II--Relationship with soil properties. Environmental Geosciences **10**(3): 99-106.

- Halvorson, J. y J. Gonzalez (2006). Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. Plant and Soil **286**: 339-356.
- Jandl, R., M. Lindner, L. Vesterdal, B. Bauwens, R. Baritz, F. Hagedorn, D. Johnson, K. Minkkinen y K. Byrne (2007). How strongly can forest management influence soil carbon sequestration? Geoderma 137: 253-268.
- Janos, D. P., S. Garamszegi y B. Beltran (2008). Glomalin extraction and measurement. Soil Biology and Biochemistry **40**(3): 728-739.
- Jastrow, J. D., R. M. Miller y J. Lussenhop (1998). Contribution of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. Soil Biology and Biochemistry **30**: 905-916.
- Kirschbaum, M. (2006). The temperature dependence of organic-matter decomposition-still a topic of debate. Soil Biology & Biochemistry **38**: 2510-2518.
- Kjoller, R. (2006). Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. FEMS Microbiology Ecolology **58**(2): 214 224.
- Klironomos, J. N., M. Ursic, M. C. Rillig y M. F. Allen (1998). Interspecific differences in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to *Artemisia tridentata* grown under elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. New Phytologist **138**: 599-605.
- Kögel-Knabner, I., K. Ekschmitt, H. Flessa, G. Guggenberger, E. Matzner, B. Marschner y M. v. Lützow (2008). An integrative approach of organic matter stabilization in temperate soils: Linking chemistry, physics, and biology. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 171: 5–13.
- Liski, J., H. Ilvesniemi, A. Mäkelä y C. J. Westman (1999). CO2 emissions from soils in response to climatic warming are overstimated- the decomposition of old soil organic matter is tolerant of temperature. Ambio 28: 171-174.
- Lovelock, C. E., S. F. Wright, D. A. Clark y R. W. Ruess (2004a). Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. Journal of Ecology **92**: 278 –287.
- Lovelock, C. E., S. F. Wright y K. A. Nichols (2004b). Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. Soil Biology and Biochemistry **36**(6): 1009-1012.
- Lutgen, E. R., D. Muir-Clairmont, J. Graham y M. C. Rillig (2003). Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. Plant and Soil 257: 71-83.

- Marschner, B., S. Brodowski, A. Dreves, G. Gleixner, A. Gude, P. M. Grootes, U. Hamer, A. Heim, G. Jandl, R. Ji, K. Kaiser, K. Kalbitz, C. Kramer, P. Leinweber, J. Rethemeyer, A. Schäffer, M. W. I. Schmidt, L. Schwark y G. L. B. Wiesenberg (2008). How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? Journal of Plant Nutrition and Soil Science 171: 91–110.
- Mikutta, R., M. Kleber, M. S. Torn y R. Jahn (2006). Stabilization of soil organic matter: association with minerals or chemical reclacitrance? Biogeochemistry 77: 25-56.
- Nichols, K. A. (2003). Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. College of Agriculture and Natural Resources, University of Maryland: 307 pp.
- Nichols, K. A. (2008). Capítulo 7. Indirect contributions of AM fungi and soil aggregation to plant growth and protection. *In*: Mycorrhizae: sustainable Agriculture and Forestry. Z. Siddiqui, M. S. Akhtar y K. Futai (eds), Springer: 177-194.
- Paul, E. A., R. F. Follet, S. W. Leavitt, A. Halvorson, G. A. Peterson y D. J. Lyon (1997). Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. Soil Science Society American Journal 61: 1058-1067.
- Preger, A., M. Rillig, A. Johns, C. Du Preez, I. Lobe y W. Amelung (2007). Losses of glomalin-related soil protein uner prolonged arable cropping: Achronosequence study in sandy soils of the South African Highveld. Soil Biology & Biochemistry **39**(2): 445-453.
- Purin, S. y M. Rillig (2007). The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. Pedobiologia **51**: 123-130.
- Read, D. J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. Experientia 47: 376-391.
- Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Canadian Journal of Soil Science **84**(4): 355-363.
- Rillig, M. C., 4, P. W. Ramsey, S. Morris y E. A. Paul (2003). Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. Plant and Soil **253**: 293-299.
- Rillig, M. C. y M. F. Allen (1999). What is the role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant-to-ecosystem responses to Elevated atmospheric CO<sub>2</sub>? Mycorrhiza **9**: 1-8.
- Rillig, M. C. y D. L. Mummey (2006). Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist **171**(1): 41-53.
- Rillig, M. C. y P. D. Steinberg (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? Soil Biology and Biochemistry **34**(9): 1371-1374.

- Rillig, M. C., S. F. Wright, K. A. Nichols, W. F. Schmidt y M. S. Torn (2001). Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. Plant and Soil **233**: 167-177.
- Rosier, C., A. Hoye y M. Rillig (2006). Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. Soil Biology & Biochemistry **38**: 2205-2211.
- Schindler, F., E. Mercer y J. Rice (2007). Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. Soil Biology & Biochemistry **39**: 320-329.
- Six, J., E. T. Elliott y K. Paustian (2000). Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. Soil Biology and Biochemistry **32**(14): 2099-2103.
- Smith, J. E., K. A. Johnson y E. Cazares (1998). Vesicular mycorrhizal colonization of seedlings of Pinaceae and Betulaceae after spore inoculation with Glomus intraradices. Mycorrhiza 7(6): 279-285.
- Smith, S. E. y D. J. Read (2008). Mycorrhizal Symbiosis. San Diego, California, Academic Perss, 800.
- Sollins, P., P. Homann y B. A. Caldwell (1996). Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. Geoderma **74**: 65-105.
- Staunton, S., T. Woignier, P. Etcheverría, F. Borie, T. Chevallier y H. Quiquampoix (2008). Is Bradford reactive soil protein, glomalin, stabilized by association with allophane in forest soils of Martinique, French West Indies? 5<sup>th</sup> International Symposium of Interaction of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms, Pucón, Chile, Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo 280pp.
- Steinberg, P. D. y M. C. Rillig (2003). Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. Soil Biology and Biochemistry **35**(1): 191-194.
- Torn, M. S., S. E. Trumbore, O. A. Chadwick, P. M. Vitousek y D. M. Hendricks (1997). Mineral control of soil organic carbon storage and turnover. Nature **389**: 170-173.
- Treseder, K. K. y K. M. Turner (2007). Glomalin in Ecosystems. Soil Science Society American Journal **71**(4): 1257-1266.
- Veblen, T. T., F. M. Schlegel y B. Escobar (1980). Structure and dynamics of old-growth *Nothofagus* forests in the Valdivian Andes, Chile. Journal of Ecology **68**: 1-31.
- Whiffen, L. K., D. J. Midgley y P. A. McGee (2007). Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. Soil Biology and Biochemistry **39**(2): 691-694.

- Wright, S. F., M. Franke-Snyder, J. B. Morton y A. Upadhyaya (1996). Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil **181**: 193-203.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Science **161**(9): 575-586.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae or arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil **198**: 97-107.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1999). Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. Mycorrhiza 8: 283-285.
- Zunino, H., F. Borie, M. Aguilera, P. Peirano, M. Caiozzi y J. P. Martín (1982). Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. I. Ecología microbiana y su relación con las propiedades físico químicas de ellos. Agricultura Técnica **42**: 287-292.

# Capítulo 6

Abundancia natural de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N en la GRSP de suelos con bosque templado del centro-sur de Chile

#### Resumen

Cada vez existe más evidencia que sugiere que el aumento de los productos de descomposición microbianos es una vía importante para el enriquecimiento isotópico de carbono (C) y nitrógeno de la materia orgánica del suelo (MOS). Sin embargo, la contribución que estarían haciendo los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) al perfil isotópico del suelo es aún poco clara. En este estudio, se comparó el perfil de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N de la glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP), la cual incluye una fracción importante de glicoproteínas de HMA y de el suelo, en cuatro bosques templado lluviosos. GRSP registró un enriquecimiento significativo de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N respecto del suelo. De esta manera, la acumulación en el suelo, de los productos recalcitrantes de los HMA, contribuiría al enriquecimiento de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N en suelos de ecosistemas boscosos. Sin embargo, mayor información respecto a la relación entre HMA y GRSP, permitiría comprender la magnitud exacta de este proceso.

**Palabras claves:** Bosque siempreverde, renoval caducifolio, hongos micorrícicos arbusculares, GRSP, enriquecimiento isotópico, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N.

#### Abstract

Increasing evidence suggests that accretion of microbial turnover products is an important driver for isotopic carbon (C) and nitrogen (N) enrichment of soil organic matter (SOM). However, the exact contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to soil isotopic patterns remains unknown. In this study, we compared <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N patterns of glomalin-related soil protein (GRSP), which includes a main fraction derived from AMF and bulk soil in four temperate rainforests. GRSP showed significant <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N enrichment relative to bulk soil. Hence, cumulative accumulation of recalcitrant AMF turnover products in the soil profile likely contributes to <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N enrichment in soils of forest ecosystems. Further research on the relationship between GRSP and AMF should clarify the exact extent of the process.

**Key words:** Evergreen forest, deciduous secondary forest, arbuscular mycorrhizal fungi, GRSP, isotope enrichment, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N.

#### 6.1 Introducción

El análisis isotópico de carbono (C) y nitrógeno (N) es una valiosa herramienta para explorar los procesos en la ecología del suelo (Nadelhoffer y Fry 1994), planta y microorganismos. La caracterización isotópica de los productos microbiológicos provee información sobre la entrada de nutrientes, basado en los isótopos y de la ecofisiología de los procesos en los ecosistemas terrestres (Hobbie y Hobbie 2008). Por otra parte, la acumulación de productos de degradación microbiana, enriquecidos en <sup>15</sup>N y en algunos casos <sup>13</sup>C, ha sido señalado como el principal mecanismo para explicar el enriquecimiento en el perfil de suelo (Högberg 1997; Dijkstra *et al.* 2006; Lindahl *et al.* 2007; Dijkstra *et al.* 2008).

Especial atención han recibido los hongos saprofíticos y ectomicorrícicos, así como sus productos de degradación en lo concerniente al enriquecimiento en <sup>15</sup>N (Högberg *et al.* 1994; Taylor *et al.* 1997; Taylor *et al.* 2003; Dijkstra *et al.* 2006; Hobbie y Hobbie 2006), ya que poseen mecanismos que pueden degradar y utilizar fracciones orgánicas de N. La composición isotópica de los HMA y su contribución al enriquecimiento isotópico del suelo es bastante desconocido, principalmente porque los HMA no producen cuerpos fructíferos que permitan una fácil toma de muestras e identificación; pequeñas diferencias isotópicas entre plantas micorrizadas y no micorrizadas, lo que sugiere que los HMA tienen una limitada participación en el enriquecimiento isotópico (Handley *et al.* 1993; Azcon-Aguilar *et al.* 1998). Además, los hongos micorricicos arbusculares carecen de enzimas para obtener nitrógeno desde fracciones recalcitrantes u orgánicas (Chalot y Brun 1998), por lo que su participación en el ciclo del nitrógeno sería limitada.

Los HMA tienen una activa participación en el ciclo del carbono, ya que todo el carbono que necesitan lo obtienen de su planta hospedera (Smith y Read 2008), transformándose en una vía de drenaje del carbono fijado fotosintéticamente. Las bosques prístinos dependen grandemente de la simbiosis con HMA para la obtención de agua y nutrientes (Hodge 2001; Smith y Read 2008). Los HMA producen la glicoproteína, que es cuantificada en el suelo como glomalina asociada a las proteínas del suelo (GRSP) (Wright *et al.* 1996; Wright y Upadhyaya 1996; Rillig 2004). De acuerdo con Driver *et al.* (2005), la glomalina estaría fuertemente unida a las paredes celulares de las hifas. En el suelo, correspondería a una fracción muy abundante y de larga persistencia (Nichols 2003; Rillig *et al.* 2003), lo que permitiría su acumulación a niveles elevados en suelos de ecosistemas boscosos (Rillig *et al.* 2001).

Este estudio planteó los siguientes objetivos:

- Comparar la abundancia natural de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N entre el suelo y la fracción GRSP, en cuatro bosques templados del centro-sur de Chile.
- Determinar si existe un enriquecimiento isotópico como función de la profundidad en los ecosistemas boscosos templados de la región.
- Determinar si el patrón de enriquecimiento de la GRSP aporta al enriquecimiento del suelo en ecosistemas boscosos templados.
- Comparar el  $\delta^{13}C$  de la GRSP y los ácidos húmicos entre sitios de bosques templados del centrosur de Chile

# 6.2 Materiales y métodos

#### 6.2.1 Sitio de estudio

Los sitios de estudio se ubicaron en el predio San Pablo de Tregua (39°38'S; 72°10'W), en la Cordillera de Los Andes, provincia de Panguipulli, centro-sur de Chile. El suelo es un Andisol moderadamente profundo, de la serie Liquiñe (Acrudoxic Hapludand), derivado de cenizas volcánicas recientes (Veblen *et al.* 1980). Se seleccionaron cuatro bosques nativos: Bosque siempreverde (SV); Bosque siempreverde alterado (SVA); Renoval caducifolio (RC); Renoval caducifolio con manejo forestal (RCM).

Las muestras de suelo fueron tomadas a 0 - 20 cm y 20 - 40 cm de profundidad, con tres repeticiones en cada sitio. Mayores características de composición vegetal y de las propiedades químicas y físicas de suelo de cada uno de los sitios se presentan en el Capítulo 2.

#### 6.2.2 Extracción y cuantificación de GRSP

La GRSP se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Nichols y Wright (2005). Posteriormente, se cuantificó de acuerdo a la técnica para la cuantificación de proteínas totales de Bradford.

#### 6.2.3 Análisis isotópico

Se determinó el  $\delta^{13}$ C y  $\delta^{15}$ N de suelo proveniente de cuatro bosques nativos a 0-20 cm y 20-40 cm de profundidad, y de GRSP purificada y liofilizada de los mismos sitios y profundidades.

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Física y Química Aplicada de la Universidad de Gent, Bélgica, en un analizador elemental (ANCA-SL, PDZ Europa, UK) acoplado a un IRMS (espectrómetro de masas de relaciones isotópicas) (20-20, SerCon, UK). La abundancia natural (δ) de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N es expresado en partes por mil (‰), relativo a los estándares internacionales de Viena Pee Dee Belemnita (V-PDB) y N<sub>2</sub> atmosférico.

Donde 
$$\delta^{13}$$
C y  $\delta^{15}$ N = [ (R <sub>muestra</sub> - R <sub>estándar</sub>) / R <sub>estándar</sub>] x 1000 (‰)

R es la relación molar de <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C o <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N, respectivamente.

#### 6.2.4 Análisis estadísticos

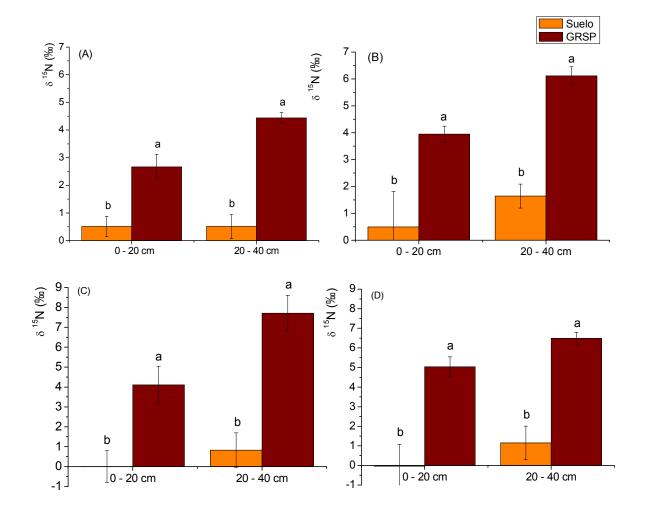
El análisis estadístico se desarrolló con el programa SPSS 10.0 (SPSS, USA). Previo al análisis de las medias, se comprobó la normalidad de los residuales y la homogeneidad de varianza de las variables. Las diferencias entre promedios (p< 0,05) fueron determinadas usando la prueba T para muestras independientes.

#### 6.3 Resultados

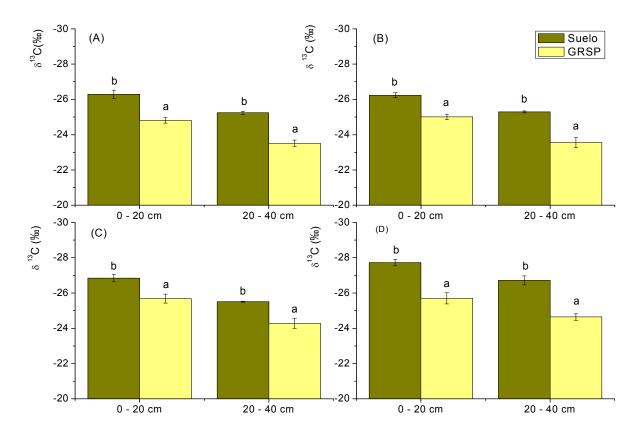
En todos los bosques se observó un incremento significativo en los valores de  $\delta^{15}$ N de GRSP con la profundidad y de la GRSP respecto al suelo a ambas profundidades ( $\Delta\delta^{15}$ N<sub>suelo $\rightarrow$ GRSP</sub>, en promedio 4,6‰ y 4,3‰ para la GRSP extraída a 0 – 20 cm y 20 – 40 cm respectivamente) (Figura 6.1). A pesar de observarse una tendencia a aumentar el  $\delta^{15}$ N en el suelo con la profundidad, esta diferencia no fue significativa en ninguno de los bosques estudiados. Se encontró una correlación negativa significativa entre el contenido de N de la GRSP y el  $\delta^{15}$ N del suelo (r: -0,35; p< 0,05; n=8) y el  $\delta^{15}$ N de la GRSP (r: -0,42; p< 0, 05; n=8).

Así como en el nitrógeno, los valores de  $^{13}$  C de GRSP tuvieron un aumento significativo al aumentar la profundidad. Así también, se observó una disminución en la diferencia entre el suelo y la GRSP al aumentar la profundidad, la cual fue significativa para 0-20 cm (promedio 1,8‰) y 20 -40 cm (diferencia promedio 1,4 ‰) (Figura 6.2). Se encontró una correlación negativa significativa entre el contenido de C de GRSP y el  $\delta^{13}$ C del suelo y el  $\delta^{13}$ C de la GRSP (r: -0,58; p<0,001; n=8), en ambos casos. Además se encontró una correlación positiva entre el  $\delta^{13}$ C del suelo y el  $\delta^{13}$ C de la GRSP (r: 0,51; p<0,001; n=8). Al comparar el  $\delta^{13}$ C del suelo con las fracciones

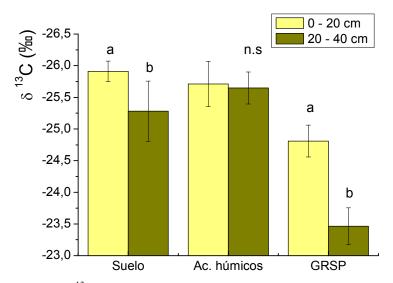
ácidos húmicos y GRSP, se encontró que los ácidos húmicos no presentaron diferencia con la profundidad (Figura 6.3). Mientras que el suelo y la GRSP presentaron un enriquecimiento significativo al aumentar la profundidad. Sin embargo, al comparar las fracciones entre  $o-20~\rm cm$  se observó que no había diferencias significativas entre fracciones. Esto cambió entre  $20-40~\rm cm$ , donde la fracción GRSP fue significativamente enriquecida, respecto al suelo y a los ácidos húmicos.



**Figura 6.1.** Valores de  $\delta^{15}$ N en el suelo y la fracción GRSP, a dos profundidades de suelo y en cuatro bosque templados de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. (A) bosque siempreverde prístino. (B) bosque siempreverde alterado. (C) renoval caducifolio. (D) renoval caducifolio manejado. Diferencias significativas (p< 0,05) entre suelo y GRSP, para una misma profundidad, se indican con letras diferentes.



**Figura 6.2** Valores de  $\delta^{13}$ C en el suelo y la fracción GRSP, a dos profundidades de suelo y en cuatro bosques templados de la Cordillera de Los Andes, centro- sur de Chile. (A) bosque siempreverde prístino. (B) bosque siempreverde alterado. (C) renoval caducifolio. (D) renoval caducifolio con manejo forestal. Diferencias significativas (p< 0,05) entre suelo y GRSP, para una mismo profundidad, se indican con letras diferentes.



**Figura 6.3.** Valores de  $\delta^{13}$ C en el suelo, ácidos húmicos y GRSP, a dos profundidades de suelo, en el bosque templado siempreverde prístino de la Cordillera de Los Andes, centro-sur de Chile. Letras distintas indican diferencias significativas entre profundidades dentro de una fracción.

#### 6.4 Discusión

# Dinámicas de $\delta^{15}N$

Es posible diferenciar cuatro posibles procesos que contribuirían a las diferencias entre el  $\delta^{15}N$  del suelo y de la GRSP:

- (1) Procesos metabólicos intracelulares que están asociados a un fraccionamiento isotópico característico (Taylor *et al.* 1997). Se ha observado que las proteínas microbianas están enriquecidas tanto en <sup>13</sup>C (Blair *et al.* 1985) y <sup>15</sup>N (Macko *et al.* 1987).
- (2) Enriquecimiento isotópico durante el transporte y transferencia de N (Hobbie y Hobbie 2008) y C (Gleixner *et al.* 1993) entre los HMA y las plantas hospederos.
- (3) Absorción selectiva de compuestos enriquecidos en <sup>15</sup>N por parte de los HMA.
- (4) Descomposición de la GRSP asociada con una descomposición selectiva de GRSP isotópicamente empobrecidos (Nadelhoffer y Fry 1994) y/o un fraccionamiento producido por alguna enzima específica en la reacción de despolimerización de la GRSP (Werner y Schmidt 2002) Algunos de estos procesos, si no los cuatro, podrían estar ocurriendo en forma simultánea.

Hobie y Hobie (2006) observaron que el potencial de los HMA para realizar un fraccionamiento a favor de  $^{15}$ N es prácticamente nulo, ya que tanto las plantas hospederas como el suelo poseen un  $\delta^{15}$ N muy similar, a diferencia de lo que ocurre en plantas hospederas de hongos ectomicorrícicos.

Un menor valor de  $\delta^{15}$ N en plantas hospederas de HMA respecto de no hospederas plantea un moderado fraccionamiento de N, al transferir el N del hongo a la planta (Handley *et al.* 1993). Este proceso resultaría en un ligero enriquecimiento de la GRSP respecto al suelo. Si bien este proceso podría dar más antecedentes de la participación de los HMA en la adquisición y transferencia de N en ecosistemas limitados en N, es algo que aún queda por ser discutido, ya que antecedentes demuestran tanto la presencia (Hodge *et al.* 2001; Olsson *et al.* 2002; Rains y Bledsoe 2007) como la ausencia (Reynolds *et al.* 2005) de su contribución a la absorción de N para las plantas.

El tercer proceso que explicaría el contenido isotópico de la GRSP, involucra una absorción selectiva de compuestos enriquecidos en <sup>15</sup>N. De acuerdo a Olsson *et al.* (2002), los HMA absorben principalmente N inorgánico soluble y compuestos orgánicos de N. En bosques limitados en N, el N soluble está principalmente en el nitrógeno orgánico disuelto (DON)(Schimel y Bennett 2004), enriquecido en <sup>15</sup>N (Pörtl *et al.* 2007). De este modo, la absorción selectiva de DON, enriquecido en <sup>15</sup>N, podría resultar en un enriquecimiento de los HMA y de sus productos como la GRSP.

El cuarto mecanismo que podría resultar en un enriquecimiento en <sup>15</sup> N de la GRSP, es el fraccionamiento durante la descomposición, favoreciendo al isótopo más pesado. Sin embargo, se conoce poco sobre la descomposición de la GRSP y sus productos de degradación. Según Högberg (1997), los procesos involucrados en la mineralización microbiana del N, contribuyen mínimamente al enriquecimiento isotópico de los compuestos orgánicos de N.

Sin embargo, los valores de  $\delta^{15}N$  de la GRSP son inferiores a los valores obtenidos de cuerpos fructíferos de ectomicorrizas, lo que pueden llegar en algunas especias sobre 15 % (Taylor *et al.* 1997).

#### Dinámica del <sup>13</sup>C

El enriquecimiento en  $^{13}$ C de la GRSP, al aumentar la profundidad de suelo, muestra una molécula más degradada, ya que existe este enriquecimiento al aumentar la profundidad se atribuye a la discriminación que realizan los microorganismos a favor del  $^{13}$ C (Gleixner *et al.* 1993; Accoe *et al.* 2002; Piao *et al.* 2006). Por esto era de esperar una diferencia en el  $\delta^{13}$ C de los ácidos húmicos con la profundidad. Sin embargo, estos resultados muestran una fracción que no sufrió descomposición al aumentar la profundidad, que sería muy recalcitrante y distinta de la GRSP. Esta última fracción si sufrió una descomposición atribuida a la acción microbiana al aumentar la profundidad de suelo, la que se reflejó en un enriquecimiento en  $^{13}$ C.

La correlación negativa encontrada entre el contenido de C de la GRSP y el  $\delta^{13}$ C del suelo, mostró que el  $\delta^{13}$ C del suelo es capaz de explicar un 58% de la varianza en el contenido de C de la GRSP. Además, una disminución en el contenido de carbono de la fracción proteica significó un enriquecimiento en  $^{13}$ C. Por su parte, la correlación positiva entre el  $\delta^{13}$ C del suelo y de la GRSP hacen suponer que existen procesos de descomposición que afectan a la GRSP que se ven reflejados en el suelo completo.

#### 6.5 Conclusiones

Debido a las dificultades que existen para relacionar a la GRSP con los HMA, no se puede concluir su participación en el enriquecimiento en <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N en estos suelos. Sin embargo, esta glicoproteína participa en el ciclaje de nitrógeno y carbono, aportando N y C de lenta recirculación.

GRSP presenta un  $\delta^{15}$ N mayor al del suelo a 0-20 cm y 20-40 cm de profundidad y en cuatro bosques nativos diferentes.

El  $\delta^{13}$ C no permite caracterizar a la GRSP, ya que solo se encontraron diferencias entre GRSP y los ácidos húmicos entre 20 y 40 cm de profundidad de suelo. El mayor  $\delta^{13}$ C, junto con un mayor  $\delta^{15}$ N encontrado en profundidad, sugieren una alta estabilidad de GRSP en profundidad. Debido a que el estudio se realizó sobre un solo tipo de suelo, no se puede extrapolar los resultados a otras situaciones, por lo que es necesario una mayor profundización en el tema, que involucre distintos tipos de suelo y vegetación.

# 6.6 Referencias

- Accoe, F., P. Boeckx, O. V. Cleemput, G. Hofman, Y. Zhang, R. h. Li y C. Guanxiong (2002). Evolution of the 13C signature related to total carbon contents and carbon decomposition rate constants in a soil profile under grassland. Rapid Communications in Mass Spectrometry **16**(23): 2184-2189.
- Azcon-Aguilar, C., L. L. Handley y C. M. Scrimgear (1998). The δ15N of lettuce and barley are affected by AMF status and external concentration of N. New Phytologist **138**: 19-26.
- Blair, N., A. Leu, E. Muñoz, J. Olsen, E. Kwong y D. Desmarais (1985). Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial-metabolism. Applied and Environmental Microbiology **50**: 996-1001.

- Chalot, M. y A. Brun (1998). Phisiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS Microbiology Reviews 22: 21-44.
- Dijkstra, P., A. Ishizu, R. Doucett, S. C. Hart, E. Schwartz, O. V. Menyailo y B. A. Hungate (2006). 

  <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N natural abundance of the soil microbial biomass. Soil Biology & Biochemistry

  38: 3257-3266.
- Dijkstra, P., C. M. LaViolette, J. S. Coyle, R. R. Doucett, E. Schwartz, S. C. Hart y B. A. Hungate (2008). <sup>15</sup>N enrichment as an integrator of the effects of C and N on microbial metabolism and ecosystem function. Ecology Letters **11**: 389-397.
- Driver, J. D., W. E. Holben y M. C. Rillig (2005). Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry **37**(1): 101-106.
- Gleixner, G., H. J. Danier, R. A. Werner y H. L. Schmidt (1993). Correlation between the <sup>13</sup>C content of primary and secondary plant-products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. Plant Physiology **102**: 1287-1290.
- Handley, L. L., J. Wilson, c. M. Serimgeour, K. Ingleby y M. A. Sattar (1993). Effects of the ectoand VA mycorrhizal fungi *Hydnagium carneum* and *Glomus clarum* on the δ<sup>15</sup>N and δ<sup>13</sup>C values of *Eucaliptus globulus and Ricinus communis*. Plant, Cell and Environment **16**: 375-382.
- Hobbie, E. A. y J. E. Hobbie (2008). Natural abundance of <sup>15</sup>N in nitrogen-limited forests and tundra can estimate nitrogen cycling through mycorrhizal fungi: a review. Ecosystems 11: 815-830.
- Hobbie, J. E. y E. A. Hobbie (2006). <sup>15</sup>N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in artic tundra. Ecology **87**(4): 816-822.
- Hodge, A. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungi influence decomposition of, but not plant nutrient capture from, glycine patches in soil. New Phytologist **151**: 725–734.
- Hodge, A., C. D. Campbell y A. H. Fitter (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. Nature **413**: 297-299.
- Högberg, P. (1997). Tansley review N° 95- <sup>15</sup>N natural abundance in soil-plant systems. New Phytologist **137**: 179-203.
- Högberg, P., T. Näsholm, L. Högbom y L. Stahl (1994). Use of <sup>15</sup>N labelling and <sup>15</sup>N natural abundance to quantify the role of mycorrhizas in N uptake by plants: inmportance of seed N and of change of the <sup>15</sup>N labelling of available N. New Phytologist **127**: 515-519.
- Lindahl, B. D., K. Ihrmark, J. Boberg, S. E. Trumbore, P. Högberg, J. Stenlid y R. D. Finlay (2007). Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. New Phytologist 173(3): 611-620.

- Macko, S. A., M. L. Fogel, P. E. Hare y T. C. Hoering (1987). Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganisms. Chemical Geology **65**: 79-92.
- Nadelhoffer, K. J. y B. Fry (1994). Nitrogen isotope studies in forest ecosystems. Stable isotopes in ecology and environmental science. M. R. Lajtha K. Oxford, Blackwell: 22–44.
- Nichols, K. A. (2003). Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. <u>College of Agriculture and Natural Resources</u>, University of Maryland: 307 pp.
- Nichols, K. A. y S. F. Wright (2005). Comparison of glomalin and humic acid in eight native U.S. soils. Soil Science **170**(12): 985-997.
- Olsson, P. A., I. Jakobsen y H. Wallander (2002). Foraging and resource allocation strategies of mycorrhizal fungi in a patchy environment. Mycorrhizal Ecology. M. G. A. Van der Heijden y I. R. Sanders. Berlin, Alemania, Springer Verlag: 93-115.
- Piao, H. C., J. M. Zhu, G. S. Liu, C. Q. Liu y F. X. Tao (2006). Changes of natural 13C abundance in microbial biomass during litter decomposition. Applied Soil Ecology **33**.
- Pörtl, K., S. Zechmeister-Boltenstern, W. Wanek, P. Ambus y T. W. Berger (2007). Natural <sup>15</sup>N abundance of soil N pools and N<sub>2</sub>O reflect the nitrogen dynamics of forest soils. Plant and Soil **295**: 79-94.
- Rains, K. C. y C. S. Bledsoe (2007). Rapid uptake of <sup>15</sup>N-ammonium and glycine-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N by arbuscular and ericoid mycorrhizal plants native to a Northern California coastal pygmy forest. Soil Biology & Biochemistry **39**: 1078-1086.
- Reynolds, H. L., A. E. Hartley, K. M. Vogelsang, J. D. Bever y P. A. Schultz (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi do not enhance nitrogen acquisition and growth of old-field perennials under low nitrogen supply in glasshouse culture. New Phytologist **167**: 869-880.
- Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Canadian Journal of Soil Science **84**(4): 355-363.
- Rillig, M. C., 4, P. W. Ramsey, S. Morris y E. A. Paul (2003). Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. Plant and Soil **253**: 293-299.
- Rillig, M. C., S. F. Wright, K. A. Nichols, W. F. Schmidt y M. S. Torn (2001). Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. Plant and Soil **233**: 167-177.
- Schimel, J. P. y J. Bennett (2004). Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. Ecology **85**: 591-602.
- Smith, S. E. y D. J. Read (2008). Mycorrhizal Symbiosis. San Diego, California, Academic Perss.

- Taylor, A. F. S., L. Hogbom, P. Högberg, A. J. E. Lyon, T. Näsholm y P. Högberg (1997). Natural <sup>15</sup>N abundance in fruit bodies of ectomycorrhizal fungi from boreal forests. New Phytologist **136**(4): 713-720.
- Taylor, K., P. Fransson, P. Högberg, M. Högberg y A. Plamboeck (2003). Species level patterns in <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. New Phytologist **159**: 757-774.
- Werner, R. A. y H. L. Schmidt (2002). The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. Phytochemistry **61**: 465-484.
- Wright, S. F., M. Franke-Snyder, J. B. Morton y A. Upadhyaya (1996). Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil **181**: 193-203.
- Wright, S. F. y A. Upadhyaya (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Science **161**(9): 575-586.

# Capítulo 7 Conclusiones generales

### 7.1 Conclusiones generales

Los resultados obtenidos de este trabajo permiten concluir que no existe una relación directa entre la diversidad o disponibilidad de hospedero para los HMA y parámetros fúngicos como densidad de micelio extrarradical y contenido de esporas de HMA en suelos forestales de la Cordillera de Los Andes, en el centro-sur de Chile. La intervención del bosque nativo produce cambios estructurales y de composición de las especies vegetales, sin que esto represente una variación significativa en la densidad de esporas y micelio de HMA en el suelo. De esta forma, una disminución en la disponibilidad de carbono en estos bosques templados, ya sea en el número o porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA, sería compensada mediante algún mecanismo que permite un similar crecimiento del hongo bajo diferentes condiciones decomposición y estructura vegetacional.

Pseudotsuga menziesii pertenece a la familia de pinaceae, la cuál es considerada como una especie ectomicorrícica exclusiva. Sin embargo, la mayor densidad de esporas y similar cantidad micelio de HMA y GRSP encontrado en el suelo de esta plantación y los bosque templados siempreverdes y caducifolio estudiados, nos hace replantear su calidad de no hospedero de HMA. Indicios de raíces colonizadas con HMA se han reportado en plantas pequeñas, siendo aún desconocida la importancia ecológica de estos hongos en el crecimiento y desarrollo de la especie.

Si se considera a *P. menziesii* como una especie no hospedera de HMA, estos resultados permiten destacar la importancia de los mecanismo de dispersión y supervivencia de propágalos de HMA, ya que serían la única forma de encontrarlos en esta plantación luego de que el dosel logra una cobertura total. Además, es necesario reconocer su importancia para futuros programas de restauración de paisaje.

La fracción GRSP realiza una contribución mayor al carbono total del suelo que los ácidos húmicos o los ácidos fúlvicos en bosques templados del centro-sur de Chile. Esto hace necesario incorporar a la GRSP en los balances de carbono, ya que la forma de ingresar al suelo es diferente a los ácidos húmicos y fúlvicos y la incorporación de proteínas de origen microbiano es bastante menor, por lo que transformaciones posteriores a su depositación en el suelo son bastante escasas. Además, corresponde a una fracción de la materia orgánica muy estabilizada y recalcitrante.

En los ecosistemas de bosque siempreverde, renoval caducifolio y en la plantación de *P. menziesii*, la GRSP hace una gran contribución al secuestro de carbono, independiente del ecosistema del cual provenga, representando hasta un 19% del C y un 20% del N total del suelo. Este aporte se debe principalmente al carbono contenido en la molécula. La GRSP presentó contenido similar de Al respecto de Fe en estos ecosistemas boscosos templados, lo que estaría favoreciendo su acumulación en el suelo en grandes cantidades. Su rol en la formación de agregados estables es poco clara en estos ecosistemas con un alto contenido de materia orgánica, arcillas no cristalinas e (hidr)-óxidos de hierro y aluminio.

Los ecosistemas no tienen la misma capacidad para acumular GRSP, lo cual se pudo apreciar en el contenido de GRSP medido desde el suelo, en la producción *in situ* y en las curvas de descomposición de EE-BRSP. Sin embargo, estas diferencias no pueden ser explicadas por diferencias en la diversidad vegetal o porcentaje de cobertura de especies hospederas de HMA. Si bien en experimentos de invernadero se ha podido observar un efecto de la especie hospedera, en ecosistemas con una alta biodiversidad, multiestratificados, con una baja intervención antrópica, esta relación no se observó, siendo factores como el contenido de arcillas, materia orgánica, nitrógeno del suelo y micelio de HMA los que mejor se relacionaron con el contenido de GRSP. Otro factor que podría estar influyendo es la producción primaria neta o la biomasa de raíces fines, parámetros no medidos en este estudio, pero reportados en la literatura.

El efecto del manejo forestal sobre el bosque nativo es distinto en el corto y largo plazo. En el largo plazo, la intervención del bosque siempreverde significa una pérdida de especies del bosque, aparecen especies de menor valor forestal y se dificulta la regeneración de *Nothofagus dombeyi*. Sin embargo, el nivel de carbono del suelo se reestablece en el largo plazo. Por otra parte, en el corto plazo, se traduce en una pérdida materia orgánica, de GRSP y ácidos húmicos. Por lo que ciclos cortos de rotación van a llevar a una pérdida de la materia orgánica del suelo y de las fracciones de GRSP y ácidos húmicos. Medidas que favorezcan la acumulación de materia orgánica y no sólo de madera deberían ser consideradas al momento de plantear medidas de manejo del bosque.

A pesar de que no es posible relacionar con precisión a los HMA con el contenido de GRSP, es interesante estudiar esta fracción por el alto porcentaje de carbono que representa en el suelo, su relación con la formación de agregados estables en otros ecosistemas y el potencial que tienen los suelos volcánicos para acumular esta glicoproteína. Además de conocer su función y cantidad en

otro tipo de ecosistemas forestales, como los bosques australes y pantanosos, con diferente dependencia de HMA.

Debido a las dificultades que existen para relacionar a la GRSP con los HMA, no se puede concluir su participación en el enriquecimiento en  $^{13}$ C y  $^{15}$ N en estos suelos. El mayor  $\delta^{13}$ C, junto con un mayor  $\delta^{15}$ N encontrado en profundidad, sugieren una alta estabilidad de GRSP en profundidad. Por lo que esta glicoproteína participa en el ciclaje de nitrógeno y carbono, aportando N y C de lenta recirculación. Debido a que el estudio se realizó sobre un solo tipo de suelo, no se puede extrapolar los resultados a otras situaciones, por lo que es necesario una mayor profundización en el tema, que involucre distintos tipos de suelo y vegetación.

El desarrollo de técnicas de cultivo *in Vitro* que permitan la producción de glomalina en cantidades significativas y el desarrollo de un anticuerpo específico para glomalina, permitirán cuantificar la glomalina en el suelo con mejor exactitud, dimensionar su participación en el secuestro de carbono y descubrir la magnitud de la participación de los HMA en el ciclo del nitrógeno. Por otra parte, la obtención de una glomalina pura desde los HMA, permitirá evitar los cuestionamientos respecto de su origen, metodología de extracción y cuantificación que han surgido en los últimos años.

# Anexo

Anexo 1

Propiedades químicas del sustrato pumicita

Parámetro químico				
N (mg/Kg)	-			
P(mg/Kg)	1			
pH (en agua)	5,75			
Materia orgánica	2			
$K \text{ (cmol}^+/\text{ Kg)}$	0,05			
Na (cmol <sup>+</sup> / Kg)	0,05			
Ca (cmol <sup>+</sup> / Kg)	0,39			
$Mg (cmol^+/Kg)$	0,06			
Al (cmol <sup>+</sup> / Kg)	0,02			
Saturación de Al (%)	3,51			
CICE (cmol <sup>+</sup> / Kg)	0,57			
Suma de bases (cmol <sup>+</sup> / Kg)	0,55			
Fe (ppm)	27,7			
Al extractable (ppm)	1449			