# UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

**Programa de Postgrado en Ciencias de Recursos Naturales**


# BIODIVERSIDAD Y EFECTIVIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN ECOSISTEMAS AGRO-FORESTALES DEL CENTRO SUR DE CHILE

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


**CLAUDIA GIOVANNA CASTILLO RUBIO**



**TEMUCO – CHILE**
**2005**

**“Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agro-forestales del Centro Sur de Chile”**

Esta tesis fue realizada bajo la supervisión del Director de Tesis, Dr. FERNANDO BORIE B., del Departamento de Ciencias Químicas y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

**CLAUDIA GIOVANNA CASTILLO RUBIO**

| | |
|---|---|
| **.....**<br>**DIRECTOR**<br>**POSTGRADO EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES** | **.....**<br>**Dr. FERNANDO BORIE B.** |
| | **.....**<br>**Dr. ROBERTO GODOY B.** |
| **.....**<br>**DIRECCIÓN DE POST GRADO**<br>**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA** | **.....**<br>**Dr. ERIC ZAGAL V.** |
| | **.....**<br>**Dr. HELLMUTH LEAL L.** |
| | **.....**<br>**Dra. ÁNGELA MACHUCA H.** |

## DEDICATORIA

***A mis Padres, Rosita y Carlos***

***A Javier, Paolita y Eduardo.***

**AGRADECIMIENTOS**

Al Proyecto Fondecyt 1020306 por financiar la mayor parte de este estudio.

Al Proyecto Fundación Andes C-13755(28) por facilitar una Pasantía en la cual se realizó parte de esta tesis en los Laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Estación Experimental del Zaidín, Granada, España; bajo la supervisión de los doctores José Miguel Barea y Rosario Azcón.

Al Proyecto Forecos PO4-065-F y Cefor-UACH, por facilitar la realización del muestreo en San Pablo de Tregua.

Al Proyecto de Cooperación Científica internacional por permitir la venida del doctor Ewald Sieverding (Sttutgart, Alemania) a nuestros laboratorios.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS


| | | Página |
|---|---|---|
| **Capítulo 1** | **Antecedentes generales** | 1 |
| | Resumen | 2 |
| | Abstract | 3 |
| | 1.1 Introducción | 5 |
| | 1.2 Hipótesis | 8 |
| | 1.3 Objetivos | 9 |
| | 1.4 Referencias bibliográficas | 9 |
| **Capítulo 2** | **Ocurrencia de especies de hongos micorrízicos arbusculares en una zona de bosque lluvioso templado del Sur de Chile** | 12 |
| | Resumen | 13 |
| | Abstract | 14 |
| | 2.1 Introducción | 15 |
| | 2.2 Materiales y métodos | 20 |
| | 2.2.1 Descripción del área de estudio | 20 |
| | 2.2.1.1 *Suelos* | 20 |
| | 2.2.1.2 *Topografía* | 20 |
| | 2.2.1.3 *Clima* | 20 |
| | 2.2.1.4 *Formaciones vegetacionales* | 21 |
| | 2.2.1.5 *Flora* | 21 |
| | 2.2.2 Selección del sitio de estudio | 22 |
| | 2.2.3 Muestreo de suelo y vegetales | 23 |
| | 2.2.4 Análisis | 23 |
| | 2.2.4.1 *Análisis químico de los suelos* | 23 |
| | 2.2.4.2 *Análisis de propágulos de HMA* | 24 |
| | 2.2.4.2.1 *Colonización por HMA* | 24 |
| | 2.2.4.2.2 *Esporas de HMA* | 24 |
| | 2.2.4.2.3 *Identificación de HMA mediante técnicas moleculares* | 25 |
| | 2.2.5 Medidas de diversidad | 25 |
| | 2.2.6 Análisis estadístico | 25 |

2.3 Resultados 25

2.3.1 Parámetros químicos 25

2.3.2 Distribución de las especies de plantas y colonización por HMA 26

2.3.3 Especies de HMA y su distribución en los ecosistemas 29

2.3.4 Relaciones entre el número de esporas y parámetros del suelo 36

2.4 Discusión 36

2.5 Conclusiones 40

2.6 Referencias bibliográficas 40

**Capítulo 3 Efecto temprano del manejo y rotación de cultivos sobre los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares en un Ultisol del Centro Sur de Chile** 46

Resumen 47

Abstract 48

3.1 Introducción 49

3.2 Materiales y métodos 61

3.2.1 Ensayo en campo 61

3.2.2 Muestreo del suelo 62

3.2.3 Parámetros del suelo 63

3.2.4 Parámetros biológicos 63

3.2.5 Parámetros del HMA 63

3.2.5.1 *Colonización* 63

3.2.5.2 *Esporas* 64

3.2.5.3 *Longitud de micelio total* 64

3.2.5.4 *Densidad de hifas metabólicamente activas* 65

3.2.6 Análisis estadístico 65

3.3 Resultados 65

3.3.1 Efecto del manejo y rotación de cultivos con hospedero continuo 65

3.3.1.1 *Propágulos de HMA* 65

3.3.1.2 *Parámetros del suelo* 71

3.3.1.3 *Correlaciones entre propágulos de HMA y algunos parámetros del suelo* 73

3.3.2 Efecto del manejo y rotación de cultivos con hospedero discontinuo 74

3.3.2.1 *Propágulos de HMA* 74

3.3.2.2 *Parámetros del suelo* 76

3.3.2.3 *Correlaciones entre propágulos de HMA y algunos parámetros del suelo* 78

3.3.3 Efecto del manejo y rotación de cultivos sobre el número de esporas de HMA a través del perfil de suelo 79

3.3.3.1 *Propágulos de HMA: número de esporas* 79

3.3.3.2 *Parámetros del suelo* 79

3.3.3.3 *Correlaciones entre esporas y algunos parámetros del suelo* 82

3.4 Discusión 82

3.5 Conclusiones 88

3.6 Referencias bibliográficas 88

**Capítulo 4 Compatibilidad y efectividad comparativa de *Glomus claroideum*, *Glomus etunicatum* y *Paraglomus occultum* sobre *Triticum aestivum* L. y *Avena sativa* L. en condiciones de invernadero** 97

Resumen 98

Abstract 99

4.1 Introducción 100

4.2 Materiales y métodos 102

4.2.1 Preparación de inóculos puros de HMA 102

4.2.2 Establecimiento del bioensayo 104

4.2.3 Análisis estadístico 104

4.2.4 Parámetros evaluados 105

4.3 Resultados 106

4.3.1 Rendimiento y contenido nutricional de las plantas 106

4.3.2 Parámetros HMA 109

4.3.3 Parámetros químicos y biológicos del suelo 111

4.3.4 Correlaciones entre parámetros fúngicos con algunos parámetros del suelo 113

4.4 Discusión 114
4.5 Conclusiones 118
4.6 Referencias bibliográficas 119

**Capítulo 5 Conclusiones generales y proyecciones** 122
5.1 Conclusiones generales 123
5.2 Proyecciones 124

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página


Figura 2.1 Colonización por HMA en raíces de hospederos del predio San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 24

Figura 2.2 Especies de HMA pertenecientes al orden Diversisporales aisladas desde los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 31

Figura 2.3 Especies de HMA pertenecientes a los órdenes Archaeosporales, Glomerales y Paraglomerales aisladas desde los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 32

Figura 2.4 Porcentaje de esporas de cada género en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 34

Figura 3.1 Consecuencias de la preparación del suelo sobre la degradación y pérdida de productividad, así como efectos externos de la LC. 52

Figura 3.2 Rotación de cultivo en un Ultisol bajo CL y LC, Temuco, Centro Sur de Chile. 62

Figura 3.3 Densidad de micelio total y activo afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 66

Figura 3.4 Proporción de hifas viables (A) y esporas de HMA (B) afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 67

Figura 3.5 Porcentaje de colonización por HMA en raíces de cultivos, afectado por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 68

Figura 3.6 Proporción de esporas de HMA pertenecientes a los géneros *Acaulospora* (Ac), *Glomus* (Gl) y *Scutellospora* (Sc) afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 69

Figura 3.7 Diversidad de poblaciones de HMA: riqueza (A), índice de Shannon-Wiener (B) y equidad (C) afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 70

Figura 3.8 Parámetros del suelo: humedad (A), pH (B), materia orgánica (C) y P-Olsen (D), afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 72

Figura 3.9 Actividad fosfatásica afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 73

Figura 3.10 Densidad de micelio total y activo afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 74

Figura 3.11 Proporción de hifas viables (A) y esporas de HMA (B) afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 75

Figura 3.12 Porcentaje de colonización por HMA en raíces afectado por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 76

Figura 3.13 Parámetros del suelo: humedad (A), pH (B), materia orgánica (C) y P-Olsen (D), afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 77

Figura 3.14 Actividad fosfatásica afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 78

Figura 3.15 Número de esporas HMA a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum*-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* y *T. aestivum*-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 79

Figura 3.16 Parámetros del suelo: pH (A), materia orgánica (B) y actividad fosfatásica (C) a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum*-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* y *T. aestivum*-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 80

Figura 4.1 Cambios ocurridos en las comunidades de HMA a través del tiempo con dos hospederos *Agrostis capillaris* y *Trifolium repens*. 101

Figura 4.2 Proceso de producción de inóculo de HMA. 103

Figura 4.3 Colonización por HMA en raíces de *A. sativa* (A y B) y *T. aestivum* (C). 105

Figura 4.4 Peso seco de la parte aérea y raíz en: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectados por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. 106

Figura 4.5 Relación tallo/raíz (T/R) en: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectado por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. 107

Figura 4.6 Peso espiga en: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectado por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de espigadura y madurez. 107

Figura 4.7 Contenido de nutrientes: P, Cu y Zn en *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectados por la inoculación de I-1, I-2 e I-3. 108

Figura 4.8 Porcentaje de colonización por HMA en raíces de: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectado por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. 110

Figura 4.9 Longitud total de raíz y longitud de raíz colonizada de: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectadas por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. 110

Figura 4.10 Número de esporas de I-1, I-2 e I-3 en *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), al término del ensayo. 111

Figura 4.11 Parámetros químicos del suelo: pH (A), %MO (B) y P disponible (C) al finalizar ensayo, afectados por la inoculación con I-1, I-2 e I-3. 112

Figura 4.12 Actividad fosfatásica ácida en el suelo con: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B) al finalizar ensayo, afectada por la inoculación con I-1, I-2 e I-3. 113

Tabla 3.5 Coeficiente de correlación lineal (r) entre esporas con parámetros del suelo a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza y labranza convencional con rotación corta *T. aestivum*-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* y *T. aestivum*-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 82

Tabla 4.1 Coeficientes correlación de parámetros del suelo y concentración de nutrientes foliares en *T. aestivum* con algunas características de las poblaciones de HMA. 113

Tabla 4.2 Coeficientes correlación de parámetros del suelo y concentración de nutrientes foliares en *A. sativa* con algunas características de las poblaciones de HMA. 114

## ÍNDICE DE ANEXOS

2.1 Anexo Secuenciación de *Scutellospora calospora* 45

## ÍNDICE DE TABLAS

Página


Tabla 2.1 Clasificación actual de los HMA. 19

Tabla 2.2 Parámetros químicos de los suelos en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 26

Tabla 2.3 Flora y colonización de raíces por HMA en los sitios de estudio de San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 27

Tabla 2.4 Especies Glomeromycota aisladas desde los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 30

Tabla 2.5 Características morfológicas de las esporas no identificadas de especies HMA en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 33

Tabla 2.6 Esquema de distribución de HMA en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 35

Tabla 2.7 Número de esporas e índices de diversidad de HMA en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 35

Tabla 2.8 Ecuación de regresión entre densidad de esporas de HMA (*Y*) con parámetros químicos del suelo (*X*) en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. 36

Tabla 3.1 Tipos de esporas de HMA observadas en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 68

Tabla 3.2 Coeficiente de correlación lineal (r) entre propágulos de HMA y parámetros de un suelo afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 74

Tabla 3.3 Coeficiente de correlación lineal (r) entre propágulos de HMA y parámetros del suelo afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 78

Tabla 3.4 Fraccionamiento de P a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum*-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* y *T. aestivum*-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. 81

## ABREVIATURAS EN EL TEXTO

| | |
|---|---|
| Al | : aluminio |
| AM | : arbuscular mycorrhizal |
| AMF | : arbuscular mycorrhizal fungi |
| BM | : bosque deciduo |
| BS | : bosque siempreverde |
| C | :carbono |
| CL | : cero labranza |
| CT | : conventional tillage |
| Cu | : cobre |
| D | : índice de Simpson |
| EF | : temperate evergreen primary rainforest |
| EM | :micorrizas ectotróficas |
| Fe | : hierro |
| H’ | : índice de Shannon-Wiener |
| HMA | : hongos micorrízicos arbusculares |
| $I_1$ | : *Glomus claroideum* |
| $I_2$ | : *Glomus etunicatum* |
| $I_3$ | : *Paraglomus occultum* |
| INT | : iodonitrotetrazolio |
| K | : potasio |
| LC | : labranza convencional |
| MA | : micorrizas arbusculares |
| MF | : managed deciduous forest |
| MO | : materia orgánica |
| N | : nitrógeno |
| NADH | : adenina nicotinamida dinucleótido reducida |
| NT | : no-tillage |
| OM | : organic matter |
| *p*-NFF | *p*- nitrofenilfosfato |
| *p*-NP | *p*- nitrofenol |
| P | : fósforo |
| PCR | : reacción de la polimerasa en cadena |
| $p_i$ | : abundancia proporcional de la especie i-ésima |
| Pi | : fósforo inorgánico |
| Po | : fósforo orgánico |
| PR | : grassland area; pradera |
| PVLG | : alcohol polivinílico-ácido láctico-glicerina |
| T / R | : relación tallo:raíz |
| Zn | : zinc |

## ABREVIATURAS EN FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|---|
| A | : *A. sativa* |
| Abr | : abril |
| Ac | : *Acaulospora* |
| Ar | : *Archaeospora* |
| B | : barbecho |
| BM | : bosque deciduo |
| BS | : bosque siempreverde |
| CL | : cero labranza |
| Di | : *Diversispora* |
| En | : *Entrophospora* |
| gss | : gramos suelo seco |
| Gl | : *Glomus* |
| HMA | : hongos micorrízicos arbusculares |
| Inv | : invierno |
| L | : *L. albus* |
| LC | : labranza convencional |
| MA | : micorrizas arbusculares |
| mac | : macetas |
| Oct | : octubre |
| Ot | : otoño |
| Pa | : *Pacispora* |
| Pr | : *Paraglomus* |
| PR | : pradera |
| Pri | : primavera |
| Sc | : *Scutellospora* |
| T | : *T. aestivum* |
| Ver | : verano |

## ABREVIATURAS DE UNIDADES

| | |
|---|---|
| $^{o}C$ | : grados Celcius |
| s | : segundo |
| min | : minuto |
| h | : hora |
| nm | : nanómetro |
| µm | : micrómetro |
| mm | : milímetro |
| $cm^3$ | : centímetro cúbico |
| $cm^2$ | : centímetro cuadrado |
| cm | : centímetro |
| m | : metro |
| $m^2$ | : metro cuadrado |
| ha | : hectárea |
| mL | : mililitro |
| L | : litro |
| µg | : microgramo |
| mg | : milígramo |
| g | : gramo |
| kg | : kilógramo |
| Mg | : megagramo |
| rpm | : revoluciones por minuto |
| m.s.n.m. | : metros sobre el nivel del mar |
| mmol | : milimol |
| cmol | : centimol |

# CAPÍTULO 1

# ANTECEDENTES GENERALES

**RESUMEN**

Para la realización de estudios de diversidad fúngica afectadas por el manejo se seleccionó un ecosistema forestal (X Región) y un agroecosistema (IX Región). En el primero se escogieron tres zonas que comprendían un bosque primario templado (BS), un bosque deciduo secundario (BM) y un área de pradera (PR), siendo BM y PR las sucesiones del clareo del bosque primario. El objetivo de este trabajo fue determinar en las tres zonas la diversidad de plantas micorrízicas arbusculares (MA) y especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). En BS se encontró una alta diversidad de plantas (77% MA), sin embargo, en PR un 91% de las especies vegetales eran MA. En total se identificaron 39 especies HMA la mayoría informadas por primera vez en Chile. *Acaulospora* fue el género más abundante, seguido por *Glomus*, *Scutellospora* y *Archaeospora.* Cuatro especies HMA estaban presentes en las tres áreas, mientras que 15 se encontraron sólo en un sitio. Se concluyó que la diversidad de HMA se encuentra fuertemente influenciada por la proporción de especies de plantas MA siendo la biodiversidad de plantas MA y HMA dramáticamente afectada cuando especies de árboles ectomicorrízicos dominan el bosque secundario.

El agroecosistema correspondió a un Ultisol con rotación corta trigo (*Triticum aestivum*)-avena (*Avena sativa*) y trigo (*T. aestivum*)-lupino (*Lupinus albus*). El aporte de este estudio fue determinar la influencia de la labranza convencional (LC) y cero labranza (CL) sobre los propágulos de HMA. Parámetros micorrízicos y químicos se evaluaron desde el segundo al cuarto año de establecido el ensayo. Los muestreos de suelo y raíces se realizaron en barbecho y en floración. En el tercer año, en la rotación con hospedero continuo, se encontraron diferencias en la longitud de micelio entre CL y LC, las que desaparecieron con el tiempo. En *L. albus* con LC, se obtuvo menor longitud hifal y de hifas metabólicamente activas. La colonización de las raíces fue siempre mayor en CL que en LC, al igual que las esporas a través del perfil de suelo en la rotación *T. aestivum-A. sativa*, siendo significativamente menores con *L. albus*. En total se observaron 22 especies HMA siendo las más abundantes *Glomus* spp., *Acaulospora* spp. y *Scutellospora* spp. La mayor abundancia de *Acaulospora* spp. se encontró con *T. aestivum* en LC; mientras que, bajo CL fueron más abundantes *Scutellospora* spp. El número de esporas se podría visualizar como un indicador temprano del efecto del manejo sobre los propágulos micorrízicos en ensayos de campo a corto plazo.

Finalmente, debido al creciente interés económico y ecológico que tienen los HMA para ser utilizados como biofertilizantes, se realizó un ensayo en invernadero con el objetivo de estudiar la compatibilidad y efectividad de tres especies de HMA: *Glomus claroideum* (I-1), *Glomus etunicatum* (I-2) y *Paraglomus occultum* (I-3) aisladas desde el Ultisol sobre dos hospederos agronómicos importantes *T. aestivum* y *A. sativa.* Parámetros micorrízicos y de crecimiento de la planta fueron medidos en tres estadios fenológicos. Las plantas presentaron distintas respuestas a la inoculación, destacando como más efectivo *G. claroideum* con *A. sativa*. En ambos cultivos la colonización por HMA se relacionó con la captación de nutrientes. De este estudio se concluye que, bajo las condiciones edáficas estudiadas, se encontró cierta compatibilidad funcional entre *A. sativa* y *G. claroideum*.

## ABSTRACT

In order to carry out the studies of fungi diversity affected by management practices, a forest ecosystem (X Region) and an agro ecosystem (IX Region) were selected. In the forest system selected three zones that included a primary Mediterranean forest (BS), a secondary and deciduous forest (BM) and a prairie area, (PR), were selected being BM y PR the successions of clearing of the primary forest. The aim of this work was to determine the diversity of arbuscular mycorrhizal plants (AM) and species of arbuscular mycorrhyzal fungi (AMF) in the three zones. In BS it was found high mycorrhizal plant diversity (77% AM). However, in PR a 91% of the vegetal species were AM. A whole of 39 species of AMF were identified, where the bulk were reported by the first time in Chile. The genus *Acaulospora* was the more abundant, followed by *Glomus, Scutellospora* and *Archaeospora.* Four species of AMF were present in the three areas, while 15 species were found in only one site. It was concluded that the diversity of AMF is strongly influenced by the proportion of the species of AM plants, being AM plant biodiversity as well as AMF diversity affected strongly when the ectomycorrhyzal trees of the secondary forest were dominant.

The agroecosystem corresponded to an Ultisol with short-term rotation wheat (*Triticum aestivum*)-oat (*Avena sativa*) and wheat (*T. aestivum*)-lupine (*Lupinus albus*). The aim of this study was to determine the influence of the conventional tillage (CT) and no tillage (NT) on AMF propagules. Mycorrhizal and chemical parameters from the second to the fourth year of

the establishment of trial were studied. Soil and root samplings were carried out in fallow and flowering time. At the third year, in the rotation with continuous host, it was found differences in the mycelium length between CT and NT, which disappeared along time. In *L. albus* with CT, it was obtained the minor hyphal length and also metabolically active ones. Root colonization was always higher in NT than CT, and the spore number through the soil profile in the *T. aestivum-A. sativa* rotation had the same behavior, being significantly smaller with lupine. In whole, 22 species of AMF were observed, being the more abundant *Glomus* spp., *Acaulospora* spp. and *Scutellospora* spp. The major abundance of *Acaulospora* spp. was found with *T. aestivum* under CT, while *Scutellospora* spp. was more abundant under NT. The spore's number could be visualized as an early indicator of the management effect on the mycorrhyzal propagules in the short-term field trial.

Finally, due to the increasingly economical and ecological interest in using AMF as biofertilizers, it was carried out a greenhouse assay with the aim of studying the compatibility and effectiveness of three AMF species isolated from the Ultisol: *Glomus claroideum* (I-1), *Glomus etunicatum* (I-2) y *Paraglomus occultum* (I-3) on two agronomical and important hosts: *T. aestivum* and *A. sativa*. Mycorrhizal and plant growth parameters were measured at three phenologicals stages. The plants showed different responses to the AMF inoculation, being *G. claroideum* as the most effective with *A. sativa*. In both crops AMF colonization was correlated with nutrient uptake. From this study it was concluded that under edaphically studied conditions it was found certain functional compatibility between *A. sativa* and *G. claroideum.*

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Frente a la perturbación del suelo y competencia entre las plantas es muy importante el uso de herramientas biológicas que aseguren el establecimiento exitoso de las especies vegetales, como los microorganismos del suelo, que cumplen un rol preponderante debido a las variadas funciones que realizan (Heredia 2003). Algunos de ellos desarrollan interacciones benéficas como las micorrizas, simbiosis que establecen ciertos hongos del suelo con las raíces de las plantas vasculares (Guadarrama *et al* .2004). Un tipo particular la micorriza arbuscular (MA) es la más abundante en la mayoría de los cultivos agrícolas, encontrándose también en ecosistemas forestales (Smith & Read 1997). La MA influye en la estabilización del suelo y determina la composición vegetal, productividad, diversidad y sustentabilidad en los ecosistemas (van der Heijden *et al.* 1998). El efecto positivo de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se observa en la planta hospedera, al mejorar su adaptación (reproducción y supervivencia) y producción de biomasa (Fisher & Jayachandran 2002).

En ambientes oligotróficos, la asociación de las plantas con HMA es muy importante, ya que las plántulas dependen de la simbiosis para su establecimiento (Cuenca *et al.* 1998). La perturbación del suelo tiene un impacto directo sobre los propágulos de HMA y también un efecto indirecto a través de cambios en las propiedades del suelo, lo que puede reducir la diversidad de especies por disminución en el número de esporas viables junto con la destrucción de las redes hifales disminuyendo así, la cantidad de propágulos para el cultivo siguiente (Jasper *et al.* 1989). Los recursos en el suelo no están homogéneamente distribuidos, lo que representa un alto costo energético para las plantas en búsqueda de nutrientes produciéndose una alta competencia por ellos (Sánchez-Gallén & Guadarrama 2003). La presencia de HMA puede cambiar el balance competitivo entre los hospederos y así aminorar la intensidad (Allen & Allen 1990), al actuar como extensiones del sistema radical, por lo que la planta hospedera puede favorecer la parte epigea (Eissenstat & Newman 1990), debido a la optimización del proceso fotosintético y con ello su crecimiento y supervivencia. De aquí que la presencia de HMA influye en la dinámica de las comunidades y en la composición de especies en diferentes etapas sucesionales.

Existen bastantes antecedentes de HMA relacionados con respuestas de la planta a la simbiosis, pero con escasa información sobre la especificidad hospedera, causando la impresión que los HMA serían todos funcionalmente equivalentes. Mientras la mayoría de los HMA pueden asociarse con un amplio rango de hospederos, estudios más recientes sugieren que su asociación depende de la especie de hospedero involucrada y de un cierto grado de preferencia entre el HMA-planta hospedera, lo que estaría relacionado con cierta dependencia de la planta por algunas especies HMA (McGonigle & Fitter 1990).

En Chile, la ecorregión valdiviana de bosques nativos desde el año 1550 a la fecha ha sufrido una notable disminución desde 21 a 10 millones de ha. El tipo forestal Esclerófilo y los bosques de *Nothofagus* han sido los más alterados, entre otras razones, por la sustitución del bosque para uso silvoagropecuario. Esta ecorregión posee una flora única y aproximadamente el 50% de los géneros son endémicos, presentando formaciones boscosas muy inusuales como el olivillo costero (*Aextoxicon punctatum*). El manejo forestal no sustentable, como extracción de madera para astillas y leña (60% del volumen extraído), quemas masivas, conversión a plantaciones exóticas o praderas han reducido en forma drástica los bosques de esta ecorregión. Sólo entre 1985 y 1994, casi el 40% de la superficie deforestada había sido utilizada solamente con plantaciones de *Pinus radiata* y *Eucalyptus* spp. La delicada situación que viven estos ecosistemas exige soluciones urgentes que aseguren la mantención de este excepcional patrimonio natural, con un uso sustentable del bosque, implicando consideraciones tanto de orden ecológico, económico, como socioculturales. Sin un esfuerzo de protección coordinado, el futuro de estos tesoros de la naturaleza se visualiza muy incierto (Fondo Mundial para la Naturaleza *et al.* 2003).

Además, la utilización en los ecosistemas agrícolas de sistemas de manejo tradicionales altera las condiciones edáficas de los suelos; sin embargo, en las últimas décadas en algunos agroecosistemas de la IX Región se están aplicando sistemas de labranza conservacionista, entre ellos, la cero labranza (CL) que produce un mejoramiento de las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, beneficiando la fertilidad con incrementos en la producción y reducción de costos; también, disminuye la contaminación ambiental de aguas residuales por una menor erosión y por la baja cantidad de insumos que requiere. Desciende la evaporación

por mayor cobertura vegetal, aumentando el almacenamiento de agua lluvia; por otra parte, la utilización de maquinaria menos destructiva produce una menor pérdida de suelo, en contraste con el arado de disco que además, daña su estructura (Fainguenbaum 2003).

En Chile, en la actualidad existen escasos antecedentes sobre estudios realizados sobre biodiversidad de HMA en ecosistemas agrícolas y forestales; solamente se han realizado estudios sobre niveles micorrízicos en bosque (Cifuentes 1995), en micorrizas relacionadas con tolerancia a aluminio (Borie & Rubio 1999) y con la adquisición de nutrientes (Rubio *et al*. 2003).

De aquí que se hace necesario investigar los HMA como componentes importantes tanto de los agroecosistemas como ecosistemas forestales y debido a que en Chile existen escasos antecedentes sobre la influencia que tendría el manejo sobre la diversidad fúngica se eligieron dos ecosistemas en distintas regiones:

- Un ecosistema forestal, Predio San Pablo de Tregua (X Región), correspondiente a un bosque lluvioso templado perteneciente a la ecorregión valdiviana de bosque nativo. El estudio comprendió tres áreas: un bosque siempreverde primario, un bosque caducifolio secundario y una pradera antropogénica para estudiar la diversidad vegetal en relación con las comunidades fúngicas y con la presencia de determinadas especies HMA bajo condiciones edáficas extremas del suelo (por ejemplo, acidez). Los antecedentes obtenidos de esta investigación que abarcó un muestreo realizado en enero de 2004 se muestran en el Capítulo 2, y
- Un agroecosistema en el sector Pumalal (IX Región) donde se seleccionó un ensayo iniciado en el año 2000 con el propósito de estudiar a través de dos años (2003-2004) el efecto que tendría el manejo sobre las comunidades fúngicas, comparando prácticas de producción tradicional como la labranza convencional y prácticas sostenibles como cero labranza, en rotaciones cortas de dos años utilizando hospederos continuos trigo-avena y discontinuos trigo-lupino y realizando evaluaciones periódicas de los propágulos micorrízicos (esporas, micelio, raíz colonizada) durante la época de barbecho y en floración de los cultivos, junto con realizar algunas evaluaciones de las propiedades físicas y químicas de los suelos sometidos a los dos tipos de labranza. Al

término del primer año surgió la interrogante del efecto que tendría la profundidad del suelo sobre los propágulos HMA, especialmente sobre las esporas; para responder a esta inquietud durante el barbecho de 2004 se muestreó el agroecosistema a tres profundidades 0-5, 0-10, 10-20 cm. Los antecedentes obtenidos de estos estudios se presentan en el Capítulo 3.

Finalmente, pese a que muchas especies vegetales dependen de los HMA para completar su ciclo de vida, es indudable que existe escasa información referente al manejo y producción de inóculos, siendo imprescindible considerar la importancia de esta asociación simbiótica en programas de manejo tanto en ecosistemas naturales como agroecosistemas; de aquí, que en el Capítulo 4 se muestran los antecedentes obtenidos en un ensayo en invernadero con trigo y avena (los mismos cultivares utilizados en Pumalal) inoculados con tres especies de HMA *Glomus claroideum*, *Glomus etunicatum* y *Paraglomus occultum*, seleccionados y aislados del agroecosistema (IX Región) y reproducidos en invernadero a través de potes trampa. El efecto de la inoculación con las tres especies HMA se midió en tres estadios fenológicos de las plantas (etapa 45, 59 y 75 según escala de Zadoks) como se muestra en el Capítulo 4.

## 1.2 HIPÓTESIS

Existen escasos antecedentes sobre el efecto producido por los sistemas de manejo sobre la actividad y desarrollo de los propágulos micorrízicos. De aquí que, por antecedentes de la literatura, se podría inferir que el acelerado proceso de destrucción de los bosques lluviosos valdivianos como producto del manejo forestal disminuiría la diversidad de plantas afectando las comunidades de especies HMA y reduciendo el potencial de inóculo, lo que impediría el establecimiento de nuevos hospederos en el sotobosque. Por otra parte, en agroecosistemas del país donde se practica la labranza convencional este sistema de manejo afectaría a las comunidades fúngicas produciendo una disminución de los propágulos, en comparación con los sistemas de labranza conservacionista, concentrándose estos inóculos de HMA en el horizonte superficial del suelo; siendo también afectados por rotaciones que incluyen cultivos no hospederos del tipo *Lupinus albus*. Además, cultivos hospederos de interés agronómico en la zona Centro Sur del país presentarían diferentes respuestas de crecimiento frente a la

inoculación con distintas especies de HMA cuando crecen bajo determinadas condiciones edáficas.

## 1.3 OBJETIVOS

Investigar la ocurrencia de especies de plantas MA y HMA en un ecosistema boscoso del Centro Sur de Chile, incluyendo áreas perturbadas y su relación con algunos parámetros químicos del suelo.

Comparar el efecto del sistema de manejo sobre la diversidad de las comunidades fúngicas, número de propágulos micorrízicos y propiedades edáficas en un agroecosistema del Centro Sur de Chile.

Evaluar la compatibilidad y eficiencia de la inoculación con las epítetas *Glomus claroideum*, *Glomus etunicatum* y *Paraglomus occultum* en plantas de *Triticum aestivum* y *Avena sativa*, a través de la evaluación de parámetros fúngicos y de rendimiento de los hospederos.

## 1.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Allen, B.E., Allen, M.F. 1990. The mediation of competition by mycorrhizae in successional and patchy environments. In: Grace, J.B., Tilman, D. (eds.). Perspectives on Plant Competition . Academic Press, London. 484 pp.

Borie, F., Rubio, R. 1999. Effects of arbuscular mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive barley cultivars. J. Plant Nutr. 22: 121-137.

Cifuentes, R. E. L. 1995. Asociaciones Micorrizicas en los Bosques del Centro-Sur de Chile. Tesis Ing. For., Universidad Austral de Chile, Faculdad de Ciencias Forestales, Valdivia, Chile, 95 p.

Cuenca, G., de Andrade, Z., Escalante, G. 1998. Arbuscular mycorrhizae in the rehabilitation of fragile degraded tropical lands. Biol. Fertil. Soils 26: 107 –111.

Fisher, J.B., Jayachandran, K. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance seedling growth in two endangered plant species from south Florida. J. Plant Sci. 163: 559 –566.

Eissenstat, D.M., Newman, E.I. 1990. Seedling establishment near large plants: effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on intensity of plant competition. Functional Ecol.4: 95-99.

Faiguenbaum, H. 2003. Labranza, siembra y oproducción de los principales cultivos de Chile. Impresora y Editora Ograma S.A. Santiago, Chile. 760 p.

Fondo Mundial para la Naturaleza; Administración Parques Nacionales; Centro Ecología Aplicada de Neuquén; Comité Nacional Pro Defensa De Flora y Fauna; Fundación Senda Darwin; Fundación Vida Silvestre Argentina; Instituto Ecología y Evolución Universidad Austral de Chile, Instituto Ecología Universidad de los Lagos; Facultad Ciencias Naturales y Oceanográficas Universidad de Concepción. 2003. Visión para la Biodiversidad de la Ecorregión de los Bosques Templados Lluviosos de Chile y Argentina.

Grime, J.P. 2001. Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties. 2nd Ed. Wiley, J. and Sons (Eds.). West Sussex. 456 pp.

Guadarrama, P., Sánchez-Gallén, I., Álvarez-Sánchez, J., Ramos-Zapata, J. 2004. Hongos y plantas, beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. Ciencias 73:38-45.

Heredia, A.G. 2003. Los hongos microscópicos en la descomposición de las hojas. En: Álvarez-Sánchez, J., Naranjo-García, E. (eds.). Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México. Instituto de Ecología AC, Instituto de Biología y Facultad de Ciencias, UNAM .Xalapa. 316 pp.

Janos, D.P. 1980. Vesicular arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. Ecology 61: 151-162.

Jasper, D.A., Abbott, L.K., Robson, A.D. 1991. The effect of soil disturbance on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. New Phytol. 118: 471-476.

Rubio, R., Borie, F., Schalchli, C., Castillo, C., Azcón, R. 2003. Occurrence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilizar and fungal inoculation. Applied Soil Ecology 23: 245-255.

Sánchez-Gallén, I., Guadarrama, P. 2003. El papel de las asociaciones micorrízicas en el crecimiento y la competencia de plántulas. En: Alvárez-Sánchez, J., Naranjo-García, E.

(eds.). Ecología del Suelo en la Selva Tropical Húmeda de México. Instituto de Ecología AC, Instituto de Biología y Facultad de Ciencias, UNAM. Xalapa.316 pp.

Smith, S., Read, D.A. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. 605 pp.

van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. Nature 396: 69-72.

# CAPÍTULO 2

# OCURRENCIA DE ESPECIES DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN UNA ZONA DE BOSQUE LLUVIOSO TEMPLADO DEL SUR DE CHILE

**RESUMEN**

Para la realización de este estudio se seleccionaron 3 ecosistemas en una zona de los bosques lluviosos valdivianos del sur de Chile: a) un bosque primario templado (BS) con una diversa comunidad de plantas y árboles del tipo *Nothofagus dombeyi*, *Laureliopsis philippiana* y *Podocarpus nubigena*; b) un bosque deciduo secundario (BM) dominado fuertemente por *Nothofagus alpina* y c) un área de pradera con especies de gramíneas y herbáceas (PR). BM y PR son las sucesiones del clareo del bosque primario de hace aproximadamente 60 años. El suelo corresponde a un Andisol ácido con alto contenido de materia orgánica (MO), alto contenido de aluminio (Al) intercambiable y con bajos niveles de fósforo (P) disponible. El objetivo de este estudio fue investigar en los 3 ecosistemas la diversidad de plantas micorrízicas arbusculares (MA) y las especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). En BS se encontró una alta diversidad de plantas con 53 especies, 77% de ellas micorrizadas con MA; mientras que, en PR un 91% de las 20 especies vegetales presentaron MA. BM tuvo solamente 11 especies con la más baja proporción micorrizada (18%). En total se encontraron 39 especies de HMA de los cuales la mayor parte son informados por primera vez en Chile. *Acaulospora* fue el género más abundante, con 13 especies, seguido por *Glomus* con 10 especies, *Scutellospora* y *Archaeospora* con 4 especies, *Pacispora* y *Entrophospora* con 3 especies y *Paraglomus* y *Diversispora* ambas con una especie. PR presentó mayor abundancia de HMA (29 spp.) que BS (20 spp.) ó BM (14 spp.), probablemente relacionado a la alta proporción de plantas MA que no tuvieron competencia con árboles ectomicorrízicos como los encontrados en BS y BM. Cuatro especies de HMA estaban presentes en todos los ecosistemas y 15, fueron bastante específicas por encontrarse sólo en uno de los sitios, entre éstas *Scutellospora* spp. estuvo ausente en BS y BM, observándose sólo en PR. Se concluye que la diversidad de especies HMA en los ecosistemas está fuertemente influenciada por la proporción de especies de plantas con MA y no se relaciona con las propiedades químicas del suelo. Además, la biodiversidad de plantas MA y HMA es dramáticamente reducida cuando especies de árboles ectomicorrízicos dominan el bosque secundario. La optimización de las prácticas de manejo del ecosistema en términos de mantener una alta biodiversidad de plantas y microorganismos benéficos como los HMA es discutida.

**ABSTRACT**

In the Valdivian rain-forest region of the Southern Chilean 3 main ecosystems are found: a) the temperate evergreen primary rain forest (EF) with a diverse plant community and tree species of *Nothofagus dombeyi, Laureliopsis philippiana* and *Podocarpus nubigena*, b) the secondary deciduous forest (MF) strongly dominated by the deciduous tree species *Nothofagus alpina*, and c) grassland area with grass species and herbs (PR). MF and PR are the successions of the clearing of the primary forest some 60 years ago. The soil in the region is an acid Andisol with high organic matter content, high exchangeable aluminum content and with low levels of available phosphorus. The objective of this study was to investigate the diversity of arbuscular mycorrhizal (AM) plants and AM fungal (AMF) species in these 3 ecosystems. The highest diversity with 53 plant species was found in the EF with 77% of them AM, while in PR 91% of the 20 plant species were AM. MF had 11 plant species only and the lowest proportion with AM (18%). Thirty-nine AMF species were found in total, of which most are being reported for the first time from Southern Chile. *Acaulospora* was the most abundant genera with 13 species, followed by *Glomus* with 10 species, *Scutellospora* and *Archaeospora* both with 4 species, *Pacispora* and *Entrophospora* both with 3 species, and *Paraglomus* and *Diversispora* both with one species. AMF species were more abundant in PR (29 spp.) than in EF (20 spp.) or MF (14 spp.) which is likely related to the fact that a higher proportion of AM plant species with no competition of ectomycorrhizal tree species is found in the grassland. Four AMF species were present in all the ecosystems, and 15 species were apparently quite specific as spores were only isolated from one of the ecosystems. Noteworthy was the complete lack of *Scutellospora* spp. in any of the forest ecosystems. It was concluded that the diversity of the AMF species in the ecosystems is strongly influenced by the proportion of AM plant species in each ecosystem and that it is not related with soil chemical properties. It can also be concluded that the biodiversity of AM and AMF is dramatically reduced when an ectomycorrhizal tree species dominates the secondary forest. The optimization of ecosystem management practices in terms of maintaining a high biodiversity of plants and beneficial microorganisms like AMF is discussed.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial cada vez existe mayor preocupación por el tema ambiental y la utilización sostenible de los recursos naturales. Chile no está ajeno a este comportamiento y uno de los recursos renovables que concita mayor interés es el bosque nativo, con sus múltiples bienes y servicios asociados (Oltremari & Thelen, 1999). El bosque cumple un importante rol en la mantención de los recursos hídricos y edáficos, en la estabilidad atmosférica, así como también en la protección de la biodiversidad, de los valores estéticos y recreacionales, lo que conlleva a considerar seriamente su gestión integral (Arroyo *et al.,* 1999; Peña *et al.,* 1999).

La complejidad topográfica y climática de nuestro país, con una longitud que recorre 38º de latitud, más su aislamiento biogeográfico, otorga a los bosques lluviosos templados chilenos una inusual diversidad de especies de plantas de diferentes formas de vida destacándose especialmente las enredaderas y epífitas con numerosos helechos, musgos, hepáticas, líquenes y angiospermas incluyendo 443 especies de plantas vasculares (Galloway, 1996). En estos bosques se encuentra una alta proporción de endemismos que alcanza cerca de un 90% de las especies, un tercio de los géneros y varias familias de plantas; por su contribución única a la biodiversidad mundial es que se considera prioritaria la conservación del bosque valdiviano, considerada dentro de las 200 ecorregiones mundiales. Entre sus principales características se encuentra la alta biomasa, donde las especies más representativas son tepa (*Laureliopsis philippiana)*, luma (*Amomyrtus luma)*, canelo (*Drimys winteri),* tineo *(Weinmannia trichosperma)* (CONAF *et al.*, 1999). Por lo tanto, la cosecha de los bosques siempreverdes causa efectos considerables sobre la flora debido a la reducción del número de especies nativas y al aumento de malezas alóctonas invasoras (Meneses & Gayoso, 1995).

Los bosques valdivianos se encuentran sometidos a una fuerte variación medioambiental extendiéndose por un rango latitudinal de 9º y precipitaciones que alcanzan los 2700 mm, con diferentes materiales de origen como suelos metamórficos, volcánicos y ñadis hasta suelos con elevados contenido de MO (Donoso & Ramírez, 2000), cubriendo una superficie de 4.148.904 ha de las cuales ya se ha perdido un 23%. Esta pérdida preocupante es principalmente causada por la situación actual que enfrentan los bosques nativos como resultado de su escasa valoración la cual, prácticamente se limita a la producción de madera y leña. Otros usos

destructivos de los bosques han sido los incendios, sustitución por plantaciones, habilitación agropecuaria y explotación selectiva mediante floreo, los que representan al menos un 77% de las 46.000 ha de bosque nativo que son intervenidas anualmente (CONAF *et al.,* 1999).

Dentro de estos bosques valdivianos se encuentra el predio San Pablo de Tregua perteneciente a la Universidad Austral de Chile, con una superficie de 2184 ha, dominado principalmente por coigüe (*Nothofagus dombeyi)*-raulí (*Nothofagus alpina)*-tepa (*L. philippiana)* distribuido entre bosque alterado y no alterado, con renovales de roble (*Nothofagus oblicua)*-raulí (*N. alpina)*-coigüe (*N. dombeyi)* que representan el 10% de la superficie total.

Ante el riesgo evidente de la pérdida de diversidad biológica provocada por las actividades humanas, el propósito esencial de las reservas naturales debe ser la protección de la biodiversidad. Para ello se requiere disponer de herramientas confiables capaces de medir su variación en el espacio y en el tiempo como el uso de variados índices que, por la complejidad de lo que pretenden evaluar, tratan de encontrar un patrón de medida de validez universal. Se supone que la diversidad de los individuos entre las especies es consecuencia, sea de las interacciones ecológicas entre ellos o bien de las relaciones entre éstos y su medio ambiente (Lobo, 2001). Se debería considerar no sólo la cantidad de especies, sino su posición relativa en el árbol genealógico, su rareza, su endemicidad o su interés ecológico. Es aconsejable proteger espacios que poseen mayor número de especies, como también aquellos que contienen más especies raras (poblaciones escasas o de distribución geográfica reducida) o los que tienen organismos muy diferentes desde un punto de vista genealógico. Para estudios de biodiversidad el primer paso ineludible es recopilar en un banco de datos la información taxonómica y biogeográfica del grupo elegido; no se trata de medir lo que se conoce, el reto es predecir lo que se desconoce (Lobo, 2001).

La gran mayoría de los métodos propuestos para evaluar la diversidad de especies se refieren a la diversidad dentro de las comunidades. La riqueza específica es la forma más sencilla y se basa en el número de especies presentes, sin tomar en cuenta el valor de importancia de las mismas (Moreno, 2001). Los índices basados en la dominancia son parámetros inversos al concepto de uniformidad o equidad de la comunidad; consideran la representatividad de las

especies con mayor valor de importancia, sin evaluar la contribución del resto de las especies; así, el índice de Simpson (D)

$$\mathbf{D} = \sum \mathbf{p_i^2} \qquad (2.1)$$

$p_i$ = abundancia proporcional de la especie i

manifiesta la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar de una muestra sean de la misma especie, influyendo la presencia de aquellas dominantes (Magurran, 1988). Otros índices se basan en el concepto de equidad, entre ellos el índice de Shannon-Wiener (H')

$$\mathbf{H'} = -\sum \mathbf{p_i \ln p_i} \qquad (2.2)$$

que expresa la uniformidad de todas las especies de la muestra y mide el grado promedio de incertidumbre para predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar en una colección (Baev & Penev, 1995).

Por otra parte, la estructura y estabilidad de las comunidades vegetales nativas o de ambientes conservados se encuentran fuertemente influenciadas por la simbiosis micorrízica. El número de especies vegetales y el grado micotrófico de los individuos dominantes, expresan una mayor o menor dependencia por el tipo de hongo simbionte, relación que puede sufrir cambios cualitativos y cuantitativos en el tiempo (Mayr & Godoy, 1989; Godoy & Mayr, 1989). La estructura y función de los diversos tipos de micorrizas involucradas en una comunidad está determinada por parámetros ambientales como tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, ubicación topográfica y clima, sugiriendo un patrón característico de distribución (Carrillo *et al.,* 1992).

Dentro de las asociaciones micorrízicas más importantes (sección 3.1) se encuentran las MA, en las cuales se hace necesario identificar la especie de hongo asociado con un cultivo o vegetación nativa, no sólo por el beneficio que otorga a la planta, sino que también porque el hongo forma parte del ecosistema participando en los procesos de nutrición y fisiología del vegetal (Bowen, 1980).

Hasta hace unos pocos años atrás los HMA pertenecían a la división Eumycota, clase Zygomicetos (hongos con micelio cenocítico, sin septos, cuyo principal componente estructural de la pared celular es la quitina), orden Glomales y su clasificación se basaba en características morfológicas de la pared de las esporas (asexuales). Esta clasificación permitía describir lo que se denomina morfoespecies fúngicas y en 1990, alrededor de las 150 especies conocidas, se clasificaron en dos subórdenes: Glomineae y Gigasporineae; tres familias: Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae con seis géneros: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* (Schenck & Pérez, 1990).

Morton & Redecker (2001), relacionando técnicas moleculares con características morfológicas de las esporas realizaron cambios significativos en la taxonomía de los HMA basados en la ruta filogenética. Con el uso de estas técnicas que involucran secuenciación de ADN, determinaciones de perfiles de ácidos grasos, reacciones inmunológicas hacia anticuerpos monoclonales específicos, junto con la caracterización de la morfología de las esporas y hábitos de colonización de los HMA, se han logrado avances sustanciales en la taxonomía. Las nuevas familias comprenden especies que presentaban características morfológicas atípicas a los géneros en los que estaban ubicados como la nueva familia Archaeosporaceae que incluye tres especies que forman esporas atípicas a las de A*caulospora*, con dos de ellas dimórficas y formando esporas del tipo Glomoide. Esta familia contiene un solo género, *Archaeospor*a. Además, la familia Paraglomaceae incluye dos especies formadoras de esporas que no son distinguibles de aquellas especies del género *Glomus* y su creación se basa en hábitos de colonización siendo su morfología muy similar a los miembros de la familia Archaeosporaceae. La descripción de Paraglomaceae se basó en características moleculares (ácidos grasos y secuenciación de ADNr 18S), lo que permite considerarla como un grupo ancestral de los Glomales. Esta familia incluye un solo género *Paraglomu*s.

Por consiguiente, según la nueva taxonomía los HMA pertenecen al phylum Glomeromycota, clase Glomeromycetes que incluye cuatro órdenes: Glomerales, Paraglomerales, Archaeosporales y Diversisporales, cuyas familias y géneros se muestran en el Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Clasificación actual de los HMA (Schüssler 2004).

| Reino | División | Clase | Orden | Familia | Género |
|---|---|---|---|---|---|
| Fungi | Glomeromycota | Glomeromycetes | Archaeosporales | Archaeosporaceae | *Archaeospora* |
| | | | | Geosiphonaceae | *Geosiphon* |
| | | | Diversisporales | Acaulosporaceae | *Acaulospora* |
| | | | | | *Entrophospora* |
| | | | | Diversisporaceae | *Diversispora* |
| | | | | Gigasporaceae | *Gigaspora* |
| | | | | | *Scutellospora* |
| | | | | Pacisporaceae | *Pacispora* |
| | | | | Glomeraceae | *Glomus* |
| | | | Paraglomerales | Paraglomeraceae | *Paraglomus* |

El género *Acaulospora* se caracteriza por presentar esporas redondas de 30-350 µm de diámetro, se observa la cicatriz pero no el remanente hifal, sus paredes son simples. *Gigaspora* presenta esporas redondeadas, con 143-500 µm de tamaño, se observa el bulbo suspensor y la hifa. El género *Scutellospora* contiene esporas que pueden ser redondas a elipsoides, con 60-500 µm de tamaño, con bulbo suspensor y unión hifal, similar a *Gigaspora. Glomus* contiene esporas redondas con un tamaño que fluctúa entre 10-300 µm, con dos paredes, observándose trozos de hifas remanentes (Schenck & Pérez, 1990).

Por otra parte, el acelerado proceso de destrucción de los bosques lluviosos valdivianos como producto de la actividad forestal para ganancia de terrenos destinados a labores agrícolas disminuiría la diversidad de plantas producto del manejo de estos bosques afectando la comunidad de especies HMA y disminuyendo su potencial de inóculo, lo que impediría el establecimiento de nuevos hospederos en el sotobosque. Debido a lo anterior y que en la actualidad existe un déficit de información relacionada con biodiversidad, el objetivo de este estudio consistió en investigar la ocurrencia de especies de plantas MA y HMA en un ecosistema boscoso siempreverde y dos ecosistemas que se desarrollaron después de su destrucción y si estos cambios podrían estar relacionados con algunos parámetros químicos del suelo. Además, realizar un recuento de especies HMA asociadas con los ecosistemas en estudio; información que podría tener valor para el desarrollo de prácticas de manejo forestal en los bosques lluviosos valdivianos del sur de Chile.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Descripción del área de estudio

El predio San Pablo de Tregua, propiedad de la Universidad Austral, está localizado en la comuna de Panguipulli, Provincia de Valdivia, en la Cordillera de los Andes entre los paralelos 39º30'-39º38' de latitud sur y los meridianos 72º02'-72º09' de longitud oeste, a altitudes entre los 550 y 1600 m.s.n.m.

#### *2.2.1.1 Suelos*

El predio presenta suelos derivados de cenizas volcánicas de diferentes edades (Andisoles), el primer estrato de cenizas finas tiene una profundidad de 0,5-1,2 m y cubre un estrato viejo de material pumicítico con tamaño de partículas de gran diámetro. Más del 90% (2000 ha) del predio se encuentra clasificado dentro de la serie Liquiñe. Son suelos profundos a moderadamente profundos (1,50 a 0,70 m de profundidad efectiva), sueltos, con buenas condiciones de infiltración, buen drenaje y alta capacidad de retención de agua. Son franco limosos a franco arenosos, con alto contenido de MO (>20%), ácidos a moderadamente ácidos; presentan ciertas limitantes ya que al quedar expuestos sufren un rápido secado superficial, permaneciendo susceptibles a la compactación en temporada húmeda producto de su alto volumen de poros; además, presentan riesgo de deslizamientos (Lara *et al.,* 2002).

#### *2.2.1.2 Topografía*

Son terrenos de tipo montañoso y topografía compleja, aunque existe una pequeña superficie de terrenos planos. Un 50% del predio está constituido por lomajes relativamente suaves (0-10º), el otro 50% abarca terrenos con más de 10º de pendiente a terrenos netamente de protección (25º) (Lara *et al.,* 2002).

#### *2.2.1.3 Clima*

El clima se caracteriza por una alta precipitación anual, con veranos muy cortos y secos e inviernos húmedos. En el sistema Köppen está clasificado como clima oceánico costero, con una suave influencia mediterránea. La temperatura anual promedio es de 11ºC, la temperatura mínima promedio del mes más helado (agosto) es de 5ºC y la máxima promedio del mes más cálido (febrero) es 20ºC. El número de heladas durante el año varía entre 30 y 50. La

pluviosidad es alta, anualmente precipitan 4000 a 5000 mm de lluvia. En invierno se producen comúnmente precipitaciones sólidas sobre los 1000 m.s.n.m. Los vientos predominantes varían de acuerdo a la estación del año. En invierno se presentan mayoritariamente vientos de origen norte, mientras que para la época estival son vientos del sur y sudoeste (Lara *et al.,* 2002).

#### *2.2.1.4 Formaciones vegetacionales*

La superficie total corresponde a 2184 ha, donde el bosque adulto es el más extenso con 1936 ha (89%), seguido por renoval con 154 ha (7%), matorral-pradera con 50 ha (2%) y plantación de nativas y exóticas con 24 ha (1%) y 21 ha (1%), respectivamente. El predio se encuentra dominado principalmente por *N. dombeyi-N. alpina-L. philippiana* (83%) distribuido entre bosque alterado y no alterado mientras que, los renovales del tipo forestal *N. obliqua-N. alpina-N. dombeyi* y bosque degradado, ocupan una superficie de 222 ha representando el 10% de la superficie total, distribuidos en distintos subtipos (Lara *et al.,* 2002).

#### *2.2.1.5 Flora*

San Pablo de Tregua, mantiene una interesante muestra de comunidades vegetales a lo largo de una gradiente altitudinal que abarca desde los 600 hasta los 1200 m.s.n.m. Un pequeño sector (10%) fue intensamente alterado por usos anteriores, presentando en la actualidad renovales pertenecientes al tipo forestal *N. obliqua-N. alpina-N. dombeyi*, representado principalmente por renovales de raulí (*N. alpina*). Aparecen como especies acompañantes roble (*N. obliqua*), coigüe (*N. dombeyi*), tineo (*W. trichosperma*), tepa (*L. philippiana*), mañío hembra (*Saxegothaea conspicua*) y ulmo (*Eucryphia cordifolia*). Se observan pequeños rodales de *N. dombeyi* puro que se establecieron en áreas sujetas a alteración reciente, como incendios y deslizamientos de suelo. Este tipo de bosques se encuentran en la zona baja del predio. Alrededor de un 83% de la superficie se encuentra dominado por bosques adultos del tipo forestal *N. dombeyi-N. alpina-L. philippiana*, con bajos grados de alteración. La extensa superficie, cercana a las 2000 ha y la estabilidad ambiental de estos sectores permite que se desarrolle la dinámica natural del bosque en ausencia de perturbaciones de origen antropogénico (Lara *et al.,* 2002).

El sotobosque es muy pobre, aunque la estabilidad permite la presencia de una rica comunidad de epífitas y trepadoras, destacando por su dominancia la canelilla (*Hydrangea serratifolia*), el pipil voqui (*Capsidium valdivianum*), la botellita (*Mitraria coccinea*) y diversas especies de quilineja (*Luzuriaga radicans*). Entre las especies arbustivas destaca la presencia de colihue (*Chusquea culeou*) en sitios abiertos que impiden la regeneración de los bosques. Los helechos más comunes son la palmilla (*Blechnum blechnoides*) y dentro de las herbáceas, el chuponsillo (*Greigea landbecki*) (Lara *et al.,* 2002).

### 2.2.2 Selección del sitio de estudio

Del predio San Pablo de Tregua se seleccionaron 3 sitios:

- *Bosque siempreverde (BS):* comprende un 83% de la superficie total y corresponde a un bosque natural adulto del tipo forestal *N. obliqua-N. alpina-N. dombeyi* dominado por árboles que tienen una edad de más de 200 años. El área basal de los fustes de la vegetación arbórea madura es de 119 $m^2$ por ha, con una distribución de 40 a 100 árboles por ha. El bosque con un bajo grado de perturbación tiene un dosel casi cerrado y dominado por *N. dombeyi, L. philippiana, Podocarpus nubigena* y *S. conspicua* y aunque el sotobosque está pobremente desarrollado tiene una rica comunidad de trepadoras y epífitas.
- *Bosque deciduo (BM):* comprende un pequeño sector del predio (10%) correspondiente a un bosque deciduo secundario del tipo forestal *N. obliqua-N. alpina-N. dombeyi* dominado por *N. alpina*, la cual representa sobre un 90% de los fustes de árboles por ha. Algunas especies acompañantes como *N. obliqua, N. dombeyi, W. trichosperma, L. philippiana, S. conspicua* y *E. cordifolia* se encuentran en baja cantidad. La edad estimada de los árboles es de 50 años y el área basal de los fustes es de 30 $m^2$ por ha con una distribución de 500 a 1000 árboles por ha. El área basal fue evaluada después de practicar un manejo silvícola el año 2002, correspondiente a un raleo que disminuyó en un 40% el área basal original de los fustes por ha.
- *Pradera (PR):* dentro de la misma zona que abarca el ecosistema de bosque nativo se encuentra una pequeña área de pradera antropogénica que presenta una alta diversidad de gramíneas y herbáceas.

### 2.2.3 Muestreo de suelo y vegetales

El muestreo de suelo, plantas y raíces se realizó en mayo 2003. La clasificación taxonómica de las plantas se hizo de acuerdo a Marticorena & Quezada (1985). En cada sitio estudiado, para poder establecer presencia o ausencia de MA en las distintas especies de plantas vasculares, se muestrearon raíces finas de 3 o más individuos de cada especie, a una profundidad de 15 a 30 cm, que se obtuvieron a una distancia de 1 m alrededor del fuste excavando hacia el exterior tanto en árboles jóvenes como adultos. Los arbustos y herbáceas se muestrearon a una profundidad de 0 a 20 cm. En general, la recolección de las muestras de raíces fue muy dificultosa, especialmente en BS, debido a una abundante mezcla de distintos sistemas radicales cerca de la superficie del suelo.

Desde cada área de bosque estudiado, se muestreó suelo proveniente de 3 subparcelas con 5 puntos de muestreo, seleccionadas desde una parcela de 100 $m^2$, con sus bordes intensamente delimitados; en total, de cada parcela se extrajeron aleatoriamente 15 submuestras de suelo con un barreno a 20 cm de profundidad. En las áreas boscosas se eliminó la capa de hojarasca previa al muestreo.

### 2.2.4 Análisis

#### *2.2.4.1. Análisis químico de los suelos*

Se realizaron algunos análisis químicos para determinar la fertilidad de los suelos de cada área. Los indicadores químicos utilizados fueron: a) pH, medido potenciométricamente con un electrodo de vidrio en una suspensión suelo:agua en relación 1:2,5; b) P disponible, extraído con una solución de $NaHCO_3$ 0,5M a pH 8,5 (Olsen & Sommers, 1982); c) P total, realizado según metodología propuesta por Dick & Tabatabai (1977) y d) contenido de MO, analizada por el método húmedo de oxidación con dicromato (Walkley & Black, 1934); Al intercambiable y hierro (Fe) se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica (E.A.A.) previa extracción con ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) a pH 7,3 (según metodología descrita por Sadzawka *et al*., 2000).

### *2.2.4.2 Análisis de propágulos de HMA*

Para estudios relacionados con los HMA, se evaluaron dos aspectos: colonización por HMA en las raíces de las plantas y esporas en el suelo.

#### *2.2.4.2.1 Colonización por HMA*

Se utilizó el método del intercepto de líneas (Tennant, 1975), donde trozos de raíces de 1 cm se tiñeron con azul de tripán (Phillips & Hayman, 1970) y se observaron bajo un microscopio con aumento de 50x, para evaluar la presencia o ausencia de estructuras fúngicas (Figura 2.1).

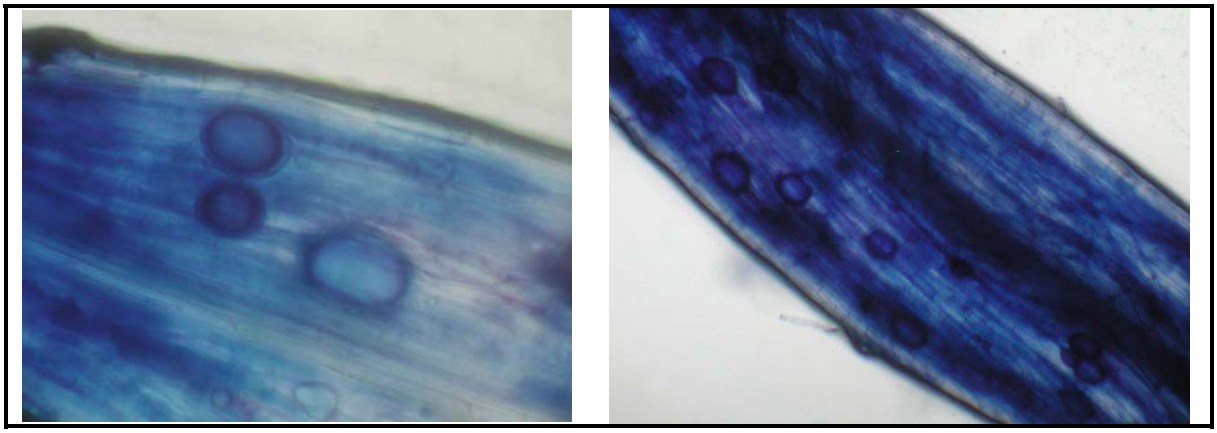

**Figura 2.1.** Colonización por HMA en raíces de hospederos del predio San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile.

#### *2.2.4.2.2 Esporas de HMA*

Las esporas se extrajeron desde el suelo mediante el método del tamizado húmedo en gradiente de sacarosa (Sieverding, 1991) para ser contadas en placas de Doncaster. Se transfirieron a placas Petri, donde bajo microscopio se separaron por grupos semejantes; una espora diferente de cada grupo se montó en un portaobjeto y se fijó con alcohol polivinílico-ácido láctico-glicerina (PVLG) (Koske & Tessier, 1983) y una segunda espora se fijó en una mezcla de PVLG y reactivo de Melzer (Brundrett *et al*., 1994). Finalmente, bajo un microscopio de alta resolución con aumento de 100x y 400x se observaron importantes características taxonómicas como color, diámetro, tipo y número de paredes, morfología y unión de la hifa de sustentación (Schenck & Pérez, 1990).

*2.2.4.2.3 Identificación de HMA mediante técnicas moleculares*

Las técnicas moleculares son otra herramienta de identificación de los HMA basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con capacidad de producir cantidades ilimitadas de un fragmento de ADN particular, a partir de una única copia del mismo y en una sola reacción que permite la caracterización a partir de pequeñas cantidades de material inicial. Mediante los cebadores universales NS31 y AM1 fue posible amplificar pequeñas cantidades de ADNr extraído de una espora de HMA. La determinación de los productos de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel agarosa y el ADN se visualizó usando bromuro de etidio (White *et al*., 1990) y finalmente, se observó mediante exposición del gel a la luz UV (254 nm). Para la purificación del fragmento de agarosa que contiene la banda de interés, se cortó con ayuda de un bisturí y se extrajo utilizando el sistema comercial "Concert Gel Extraction Systems" (GIBCO). El ADN amplificado de las especies de HMA aisladas una vez purificado, se utilizó para su secuenciación.

### 2.2.5 Medidas de diversidad

Las comunidades de HMA fueron descritas por medio de varios índices: a) número total de esporas de HMA (por 100 g de suelo seco) y algunos índices ecológicos como el índice H', equidad y el índice D.

### 2.2.6 Análisis estadístico

Los resultados presentados corresponden a la media de cuatro repeticiones de datos sin transformar, a los cuales se les realizó análisis ANOVA de una vía y posterior prueba de rango múltiple de Duncan. Diferencias con $P \leq 0,05$ se consideraron significativas. Además, se realizaron algunas correlaciones de esporas con los parámetros del suelo usando el programa JMP 5.01.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Parámetros químicos

En la Tabla 2.2, se observa que los resultados de acidez de los suelos provenientes de PR y BM no mostraron diferencias, mientras que los suelos BS fueron significativamente más ácidos, disminuyendo el pH en alrededor de 0,8 unidades con respecto a PR. BM presentó el

mayor contenido de C; por el contrario, PR mostró porcentajes significativamente menores, siguiendo los sitios estudiados la siguiente variación: PR<BS<BM. Los niveles de P disponible alcanzaron valores extremadamente bajos, especialmente en PR; así, BS presentó mayor disponibilidad, siendo la diferencia entre ellos de aproximadamente 2,5 mg $kg^{-1}$. Con respecto a los contenidos de P total, PR tuvo mayores reservas de P, mientras que en las dos áreas boscosas las cantidades fueron significativamente menores, con la secuencia BM<BS<PR. El Al intercambiable de los suelos no presentó diferencias significativas entre los sitios estudiados, pero el contenido de Fe fue significativamente mayor en BS, con aproximadamente un 85% de incremento sobre BM y con 175% sobre PR.

**Tabla 2.2.** Parámetros químicos de los suelos en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. Valores representan la media de 4 repeticiones, las que seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

| Sitio de estudio | pH | C (%) | Al extractable (cmol(+) $kg^{-1}$) | Fe (cmol(+) $kg^{-1}$) | P (mg $kg^{-1}$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Disponible | Total |
| Bosque Siempreverde (BS) | 4,56 b | 12,7 ab | 35,7 a | 0,36 a | 6,11 a | 1763 b |
| Bosque Deciduo (BM) | 5,40 a | 14,5 a | 41,8 a | 0,19 b | 3,64 b | 1487 c |
| Pradera (PR) | 5,37 a | 8,9 b | 37,9 a | 0,13 b | 2,93 b | 2095 a |

### 2.3.2 Distribución de las especies de plantas y colonización por HMA

La vegetación de PR estaba conformada por 22 herbáceas pertenecientes a 20 familias, en la mayoría de ellas las raíces estuvieron colonizadas con MA, a excepción de *Juncus procerus* y *Rumex acetosella*. BS mostró mayor composición botánica con 53 especies en comparación con las 22 de PR, presentando colonización principalmente las raíces de las trepadoras y herbáceas. En árboles del tipo *Nothofagus* no se encontró colonización por HMA, debido a que son colonizados por micorrizas del tipo ectotróficas (EM) (Palfner, 2001). En BM sólo se encontraron 11 especies vegetales, con una baja cantidad de especies arbóreas, trepadoras y herbáceas (Tabla 2.3). En algunas muestras de árboles y arbustos, no se observaron estructuras fúngicas internas de HMA por encontrarse las raíces intensamente pigmentadas, a pesar de su tratamiento previo de decoloración con $H_2O_2$ (Onguene & Kuyper, 2001).

**Tabla 2.3.** Flora y colonización de raíces por HMA en los sitios de estudio de San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. (BS: bosque siempreverde; BM: bosque deciduo PR: pradera; P: presencia; MA: micorriza arbuscular; +: presencia; -: ausencia). [a] La nomenclatura de plantas se basó en Marticorena & Quezada (1985).

| Forma de vida | Nombre científico | Familia | Sitio de estudio[b] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | BS | | BM | | PR | |
| | | | P | MA | P | MA | P | MA |
| Arbórea | *Aextoxicom punctatum* R. et P. | Aextoxicaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Amomyrtus luma (*Mol.*)* Legr. et Kause | Myrtaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Amomyrtus meli* (Phil.) Legr. et kausel | Myrtaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Dasyphyllum diacanthoides* (Less.) Cabr. | Asteraceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Drimys winteri* J.R. et G. Forster | Winteraceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Embothrium coccineum* J.R. et G. Forster | Proteaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Eucryphia cordifolia* Cav. | Eucryphiaceae | + | - | + | - | - | - |
| | *Gevuina avellana* Mol. | Proteaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde | Monimiaceae | + | - | + | - | - | - |
| | *Lomatia dentata* (R. et P.) R. Br. | Proteaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Lomatia ferruginea* (Cav.) R. Br. | Proteaceae | + | - | + | - | - | - |
| | *Lomatia hirsuta* (Lam.) Diels ex Macbr. | Proteaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Luma apiculata* (DC.) Burret | Myrtaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Maytenus magellanica* (Lam.) Hook. f. | Celastraceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Myrceugenia planipes* (H. et A.) Berg | Myrtaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst | Fagaceae | - | - | + | - | - | - |
| | *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst | Fagaceae | + | - | + | - | - | - |
| | *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst | Fagaceae | - | - | + | - | - | - |
| | *Saxegothaea conspicua* Lindl. | Podocarpaceae | + | - | + | - | - | - |
| | *Weinmannia trichosperma* Cav. | Cunoniaceae | + | + | + | + | - | - |
| Arbustiva | *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz | Elaeocarpaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Azara lanceolata* Hook. f. | Flacourtiaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Berberis buxifolia* Lam. | Berberidaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Berberis linearifolia* Phil. | Berberidaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Chusquea culeou* Desv. | Gramineae | + | + | - | - | - | - |
| | *Desfontainia spinosa* R. et P. | Desfontainiaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Drimys andina* (Reiche) R.A. Rodr. et Quez. | Winteraceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Fuchsia magellanica* Lam. | Onagraceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Gaultheria phyllireifolia* (Pers.) Sleumer | Ericaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Griselinia ruscifolia* (Clos.) tabú | Cornaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Myoschilos oblonga* R. et P. | Santalaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Myrceugenia parvifolia* (DC.) Kausel | Myrtaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Ovidia pillo-pillo* (Gay) Meisn. | Thymeleaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Ribes magellanicum* Poir. | Saxifragaceae | + | + | - | - | - | - |
| Trepadora y epífita | *Asteranthera ovata* (Cav.) Hanst. | Gesneriaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Campsidium valdivianum* (Phil.) Skottsb. | Bignoniaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Fascicularia bicolor* (N. et Z.) | Bromeliaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Hydrangea integerrima* | Hydrangeaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Hydrangea serratifolia* (H. et A.) F. Phil. | Hydrangeaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Luzuriaga radicans (*R. et P.) | Philesiaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Mitraria coccinea* Cav. | Gesneriaceae | + | + | - | - | - | - |
| Helecho | *Asplenium dareoides* A.N. Desv. | Aspleniaceae | + | - | + | - | - | - |
| | *Blechnum hastatum* Kaulf. | Blechnaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Blechnum blechnoides* (Keyserl.) | Blechnaceae | + | + | + | + | - | - |
| | *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett. | Blechnaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Hymenophyllum pectinatum* Cav. | Hymenophyllaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Hymenophyllum sp.* | Hymenophyllaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Hypolepis poeppigii* (Kunze) R.A. Rodr. | Dennstaedtiaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Lophosoria quadripinnata* J.F. Gmel.) C. Chr. | Lophosoriaceae | + | - | - | - | - | - |
| Herbácea | *Acaena ovalifolia* R. et P. | Rosaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Achillea millefolium* L. | Asteraceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Agrostis capillaris* L. | Poaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Dichondra sericea* Sw. | Convolvulaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Dysopsis glechomoides* (Rich.) Muell. Arg | Euphorbiaceae | + | + | - | - | - | - |

Tabla 2..3 (*Continuación*)

| Forma de vida | Nombre científico | Familia | Sitio de estudio[b] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | BS | | BM | | PR | |
| | | | P | MA | P | MA | P | MA |
| Herbácea | *Fragaria chiloensis* (L.) Duch. | Rosaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Greigea landbeckii* (Lechlerex Phil.) Phil. Ex F. Phil. | Bromeliaceae | + | - | + | - | - | - |
| | *Holcus lanatus* L. | Poaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Hypericum perforatum* L. | Clusiaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Hypochaeris radicata* L. | Asteraceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Juncus procerus* E. Meyer | Juncaceae | - | - | - | - | + | - |
| | *Loasa sclareifolia* Juss. | Loasaceae | + | - | - | - | - | - |
| | *Lotus uliginosus* Schkuhr. | Fabaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Medicago* sp. | Fabaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Mentha blanca* | Labiatae | - | - | - | - | + | + |
| | *Mentha piperita* L. | Labiatae | - | - | - | - | + | + |
| | *Nertera granadensis* (Mutis ex R.f) Druce | Rubiaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Osmorrhisa chilensis* H. et A. | Apiaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Plantago lanceolata* L. | Plantaginaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Poa annua* L. | Poaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Prunella vulgaris* L. | Lamiaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Ranunculus minutiflorus* Bert. Ex Phil. | Ranunculaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Rumex acetosella* L. | Polygonaceae | - | - | - | - | + | - |
| | *Senecio vulgaris* L. | Asteraceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Solanum* sp. | Solanaceae | + | + | - | - | - | - |
| | *Taraxacum officinale* Weber | Asteraceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Trifolium pratense* L. | Fabaceae | - | - | - | - | + | + |
| | *Trifolium repens* L. | Fabaceae | - | - | - | - | + | + |
| Total | | | 53 | 41 | 11 | 6 | 22 | 20 |

La estabilidad de BS favorece la presencia de comunidades vegetales con alto grado de madurez como *L. philippiana, S. conspicua* y *Dasyphyllum. diacanthoides.* Especies intolerantes del tipo *N. dombeyi* se encuentran presentes como individuos emergentes de gran tamaño en el dosel. De las 18 especies arbóreas un 30% estuvo asociado con MA y del 70% restante no se puede asegurar que todas formen asociaciones ectomicorrízicas, ya que no fueron investigadas.

El sotobosque no es denso, pero la estabilidad del ecosistema permite la presencia de una rica comunidad de 14 especies de helechos, de los cuales 10 estuvieron colonizados por HMA. Algunos arbustos como *Azara lanceolata*, *Fuchsia magellanica* y *Griselinia ruscifolia* no presentaron MA. Las 6 trepadoras presentaron MA, de ellas solamente la epífita *Fascicularia bicolor* no presentó colonización. De los 8 helechos los 3 *Blechnum* spp. estuvieron micorrizados con MA y de las 6 especies herbáceas 4 presentaron colonización por MA (Tabla 2.3).

BM corresponde a un bosque adulto manejado con renovales de *N. obliqua-N. alpina* (EM), con bajo porcentaje de especies acompañantes del tipo *E. cordifolia, L. philippiana, Lomatia ferruginea, W. trichosperma* y *N. dombeyi,* de ellas sólo *W. trichosperma* presentó MA. El sotobosque tiene ausencia casi completa de vegetación, con presencia de algunas herbáceas del tipo *G. landbecki* (Tabla 2.3).

### 2.3.3 Especies de HMA y su distribución en los ecosistemas

En total se identificaron 39 especies de HMA (Tabla 2.4) siguiendo los criterios morfológicos entregados por Schenck & Perez (1990) y por la Colección Internacional de Cultivo de HMA (INVAM). Treinta especies fueron identificadas de acuerdo a las descripciones de la literatura.

En BS, la mayoría de las especies de HMA aisladas se identificaron dentro de las familias *Acaulosporaceae* (con 7 *Acaulospora* y 2 *Entrophospora*) y *Glomeraceae* (con 6 especies). Por el contrario, en PR 13 especies pertenecieron a la familia *Acaulosporaceae* (12 *Acaulospora* y una *Entrophospora*), mientras que 6 especies se identificaron como *Glomeraceae*. Finalmente, en BM, las familias más abundantes fueron *Acaulosporaceae* (4 *Acaulospora* y 2 *Entrophospora*) y *Glomeraceae* (5 especies de *Glomus*) (Tabla 2.4).

En PR se encontró el mayor número de especies de HMA (29), seguido por BS (20), mientras que BM presentó una baja cantidad de morfotipos con sólo 14 especies. En las tres áreas estudiadas se aislaron 4 *Archaeospora* spp., 13 *Acaulospora* spp., 1 *Diversispora* sp., 3 *Entrophospora* spp., 10 *Glomus* spp., 3 *Pacispora* spp., 1 *Paraglomus* sp. y 4 *Scutellospora* spp. (Tabla 2.4); mientras que, no se observó presencia de *Gigaspora* (Figuras 2.2 y 2.3).

**Tabla 2.4.** Especies Glomeromycota aisladas desde los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. (BS: bosque siempreverde; BM: bosque deciduo; PR: pradera). La nomenclatura de HMA del estudio se basó en: Schenck & Perez (1990) y Schüssler (2004).

| Género | Especie | Sitio de estudio | | |
|---|---|---|---|---|
| | | BS | BM | PR |
| *Archaeospora* | *Archaeospora leptoticha* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) J.B. Morton & D. Redecker | - | + | - |
| | *Achaeospora.trappei* (R.N. Ames&Linderman) J.B. Morton & D. Redecker emend Spain | + | - | + |
| | *Archaeospora* sp. morfotipo A | - | + | + |
| | *Archaeospora* sp. morfotipo B | + | - | + |
| *Acaulospora* | *Acaulospora cavernata* Blaszk. | - | - | + |
| | *Acaulospora colossica* P.A. Schultz, Bever & J.B. Morton | + | - | + |
| | *Acaulospora dilatata* J.B. Morton | + | - | + |
| | *Acaulospora koskei* Blaszk. | + | - | + |
| | *Acaulospora laevis* Gerd.&Trappe | + | - | + |
| | *Acaulospora longula* Spain & N.C.Schenck | - | + | + |
| | *Acaulospora mellea* Spain & N.C. Schenck | + | + | + |
| | *Acaulospora paulinae* Blaszk. | - | - | + |
| | *Acaulospora scrobiculata* Trappe | - | - | + |
| | *Acaulospora spinosa* C. Walker & Trappe | + | - | - |
| | *Acaulospora thomii* Blaszk. | - | - | + |
| | *Acaulospora* sp. morfotipo A | + | + | + |
| | *Acaulospora* sp. morfotipo B | - | + | + |
| *Entrophospora* | *Entrophospora infrequens* (I.R. Hall) R.N. Ames & R.W. Schneid. | + | + | - |
| | *Entrophospora schenckii* Sieverd. & S. Toro | + | - | + |
| | *Entrophospora* sp. A | - | + | - |
| *Scutellospora* | *Scutellospora calospora* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders | - | - | + |
| | *Scutellospora weresubiae* Koske & C. Walker | - | - | + |
| | *Scutellospora* sp. morfotipo A | - | - | + |
| | *Scutellospora* sp. morfotipo B | - | - | + |
| *Pacispora* | *Pacispora dominikii* (Blaszk.) Oehl & Sieverd. | - | - | + |
| | *Pacispora* sp. morfotipo A | + | - | - |
| | *Pacispora* sp. morfotipo B | + | + | - |
| *Glomus* | *Glomus brohultii* Herrera, Ferrer & Sieverd. | - | - | + |
| | *Glomus claroideum* N.C. Schenck & G.S. Sm. emend C. Walker & Vestberg | + | + | - |
| | *Glomus diaphanum* J. B. Morton & C. Walker | - | - | + |
| | *Glomus etunicatum* W.N Becker & Gerd. | + | + | + |
| | *Glomus fasciculatum* (Thaxt.) Gerd. & Trappe emend. C. Walker & Koske | - | + | - |
| | *Glomus geosporum* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker | + | - | + |
| | *Glomus invermaium* I.R. Hall | + | - | - |
| | *Glomus laccatum* Blaszk. | - | - | + |
| | *Glomus macrocarpum* Tul. & C. Tul. | + | + | + |
| | *Glomus rubiforme* (Gerd. & Trappe) R.T. Almeida & N.C. Schenck | + | + | - |
| *Diversispora* | *Diversispora spurca* (C.M. Pfeiff., C. Walker & Bloss) C. Walker & A. Schüssler | + | - | + |
| *Paraglomus* | *Paraglomus occultum* (C. Walker) J.B. Morton & D. Redecker | - | - | + |
| Total | | 20 | 14 | 29 |

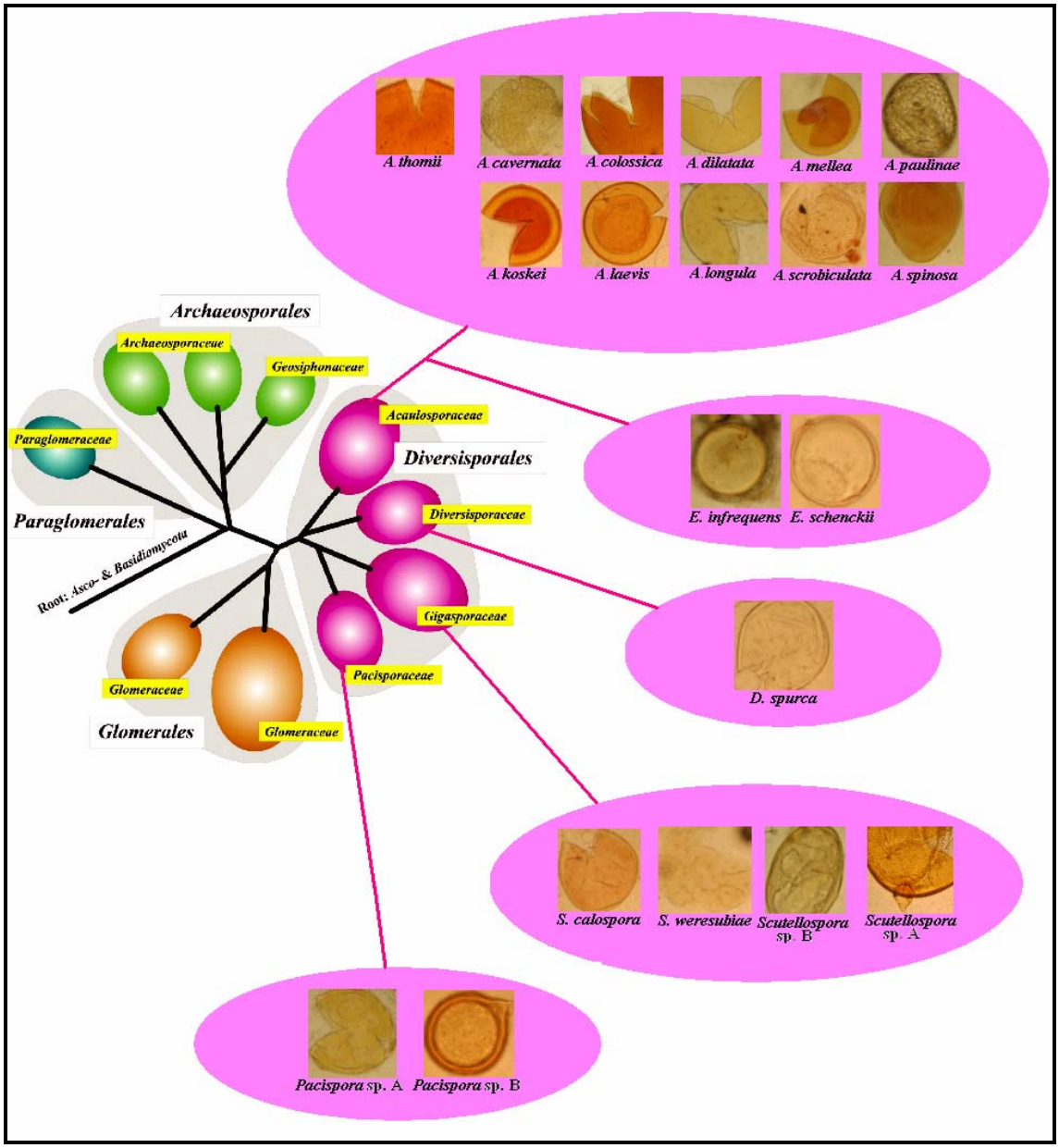


**Figura 2.2.** Especies de HMA pertenecientes al orden Diversisporales aisladas desde los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile.

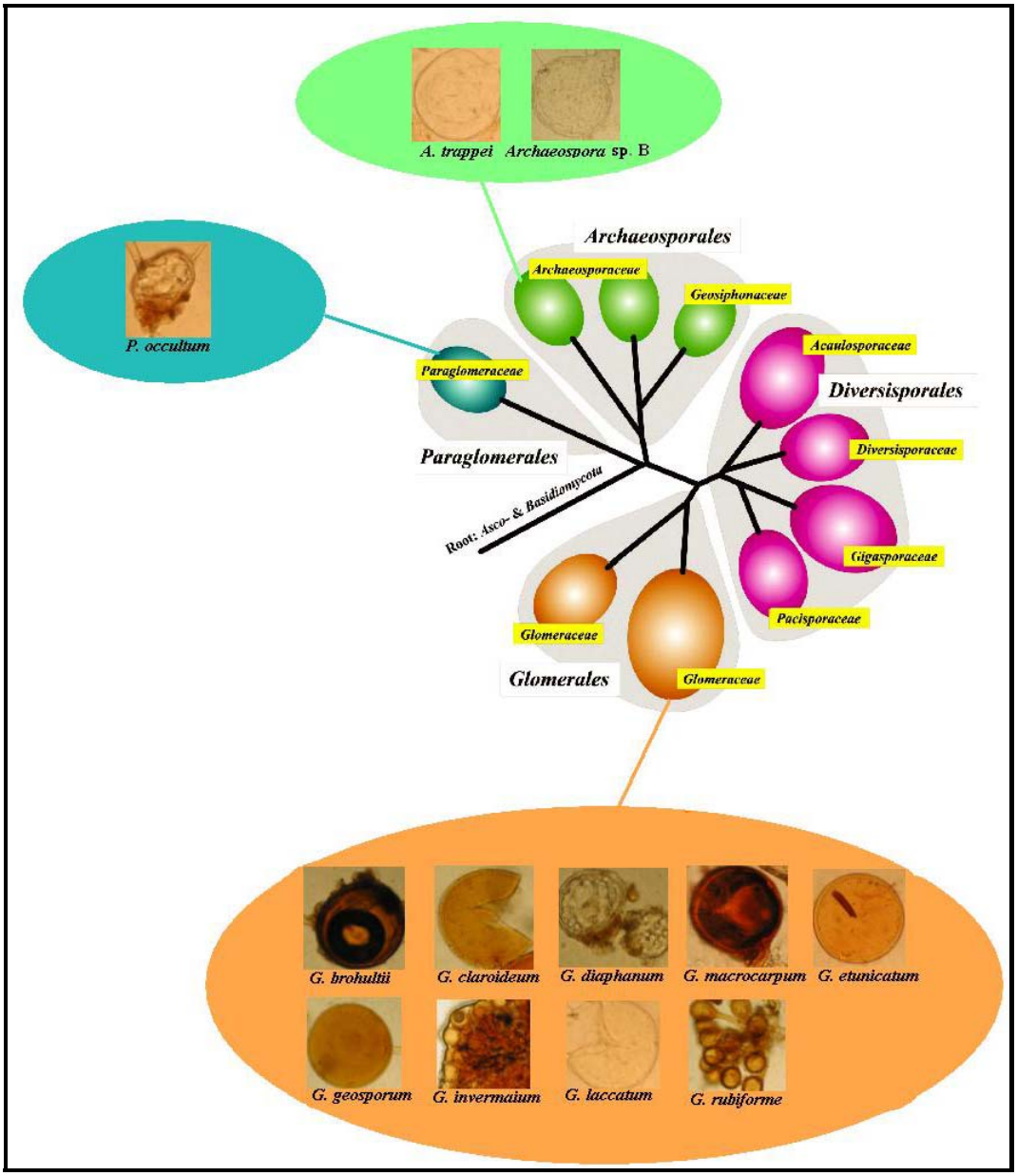


**Figura 2.3.** Especies de HMA pertenecientes a los órdenes Archaeosporales, Glomerales y Paraglomerales aisladas desde los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile.

Nueve especies no pudieron ser clasificadas a nivel de especie; debido a que sus características no correspondieron a las descritas, se consideraron como potenciales especies nuevas y se requiere de mayor investigación para su identificación. Se nombraron como *Acaulospora* spp. morfotipos A y B, *Archaeospora* spp. morfotipos A y B, *Entrophospora* sp. morfotipo A, *Pacispora* spp. morfotipos A y B, *Scutellospora* spp. morfotipos A y B. Una breve descripción de estas nueve especies desconocidas se da en la Tabla 2.5, de acuerdo a características como color, forma y tamaño de la espora, además de considerar el color, tamaño y tipo de pared

estructural y germinativa; en el caso de *Scutellospora* se entregan antecedentes del tamaño y de la pared de la célula esporógena y del escudo germinal.

**Tabla 2.5.** Características morfológicas de las esporas no identificadas de especies HMA en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile.

| Especie | Descripción de las esporas |
|---|---|
| *Acaulospora* sp. A | Esporas amarillas, globosas a subglobosas, de 75-85 µm de diámetro, con una pared externa amarilla de 2-2,5 µm de espesor, ornamentada con cavidades. Las paredes germinales tienen 0,5-3 µm de espesor en total. |
| *Acaulospora* sp. B | Esporas amarillas a café brillantes, globosas, de 100-125 µm de diámetro, con una pared externa amarilla de 2-2,5 µm de espesor ornamentada con cavidades de 1-2 µm de profundidad 2-5 µm de ancho. |
| *Archaeospora* sp. A | Esporas subhialinas a amarillentas opacas, globosas a subglobosas, de 100-120 x 150-160 µm de diámetro, con una pared externa de 1-3 µm de espesor ornamentada con un retículo pentagonal a hexagonal, con aberturas de 5-10 x 10-20 a 27-37 x 25-50 µm de ancho, y con canales de aproximadamente 2-3 µm de ancho y 2-3 µm de alto; con una pared germinal de 3 capas de 1-2,5 µm de espesor. |
| *Archaeospora* sp. B | Esporas blancas opacas, globosas, de 130-180 µm de diámetro, con una pared externa de 5 µm de espesor, ornamentada con pequeñas y delgadas espinas. La pared germinal está ornamentada con una estructura dentada (con perforaciones) de 3-6 µm de espesor. |
| *Entrophospora* sp. A | Esporas subhialinas a pardo amarillentas, globosas a subglobosas, de 125-150 µm de diámetro, con un peridio de 3-8 µm de espesor, una pared externa de 1-2 µm de espesor y una pared germinal de 2 µm de espesor. |
| *Pacispora* sp. A | Esporas amarillo brillante a amarillo anaranjada, globosas a subglobosas, de 100-125 µm de diámetro con una delgada pared externa de 3 capas y una interna de 3 capas. La capa externa ornamentada con afiladas verrugas de 5-10 µm de ancho en la base, y 7,5 µm de alto, formadas a una distancia de 5-7 µm una de la otra. |
| *Pacispora* sp. B | Esporas amarillas a amarillo-anaranjadas, subglobosas semejantes a gotas, de 87-105 x 125-150 µm de diámetro con una pared externa de 3 capas y una interna de 3 capas. La pared externa es hialina a blanca, de 4-5 µm de espesor en total. La pared interna es amarilla brillante con una ornamentación reticulada sobre la capa externa, las aberturas de los retículos tienen 5-7,5 µm de ancho y 2,5 µm de profundidad. |
| *Scutellospora* sp. A | Esporas amarillas a amarillo oro oscuro, globosas a subglobosas, con 250-350 µm a 200-275 x 210-325 µm de diámetro. La pared externa es lisa con 3 capas de 7-10 µm de espesor y la pared interna con 4 capas de 2-3 µm de espesor. El escudo de germinación es de 40-50 x 100-125 µm de ancho. La célula esporógena es de 30-40 x 37-40 µm de diámetro. |
| *Scutellospora* sp. B | Esporas subhialinas a amarillas opacas, oblongas, rara vez globosas a subglobosas, de 100-175 x 190-330 µm en diámetro. La pared externa de superficie lisa con dos capas laminadas amarillo brillante a amarillo oscura, cada una de las capas laminadas de 2,5 µm de espesor. Las paredes germinales con varias subcapas. El escudo germinal de 25-40 x 100-125 µm de diámetro. Células esporógenas de 25-35 x 30-40 µm de diámetro. |

La diferenciación de las esporas de cada especie HMA bajo un estereomicroscopio de baja resolución es dificultosa, ya que algunas especies tienen esporas morfológicamente muy similares. Por lo tanto, se agruparon todas las esporas de cada uno de los géneros y se comparó su ocurrencia relativa en los 3 ecosistemas (Figura 2.4). Mientras en BS el número de *Acaulospora* y *Glomus* correspondió a alrededor de un tercio del número total de esporas, en BM el número relativo de *Acaulospora* disminuyó aumentando en PR. Al contrario, *Glomus* aumentó en BM y en PR disminuyó. El número relativo de los otros géneros fue aproximadamente el mismo, con un 30 a 40% en todos los ecosistemas. Sin embargo, en BM se encontró una mayor proporción de *Entrophospora* que en PR, mientras algunos géneros como *Scutellospora* y *Paraglomus* sólo se detectaron en este último.

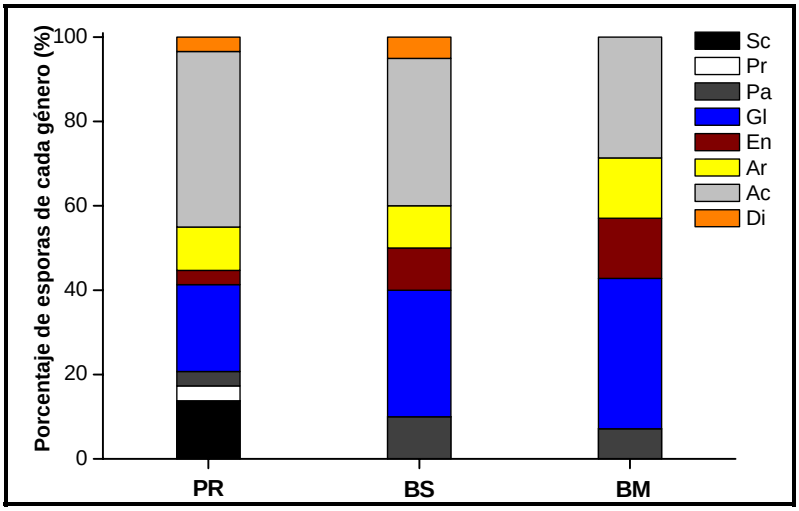


**Figura 2.4.** Porcentaje de esporas de cada género en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile (PR: pradera; BS: bosque siempreverde; BM: bosque deciduo; Sc: *Scutellospora*; Pr: *Paraglomus*; Pa: *Pacispora*; Gl: *Glomus*; En: *Entrophospora*; Ar: *Archaeospora*; Ac: *Acaulospora*; Di: *Diversispora*).

De acuerdo con Oehl *et al.* (2003, 2004) algunas especies de HMA parecen ser "generalistas" porque se detectaron en los 3 sitios estudiados. De las 39 especies, 4 se pudieron clasificar como generalistas: *A. mellea, Acaulospora* sp. morfotipo A, *G. etunicatum* y *G. macrocarpum*. Otros morfotipos parecen ser "altamente especializados" ya que sólo se los encontró en uno de los sitios. Así, BS presentó 3 especies altamente especializadas *A. spinosa, G. invermaium* y *Pacispora* sp. morfotipo A. En BM también se encontraron 3 especies: *Archaeospora leptoticha*, *Entrophospora* sp. morfotipo A y *G. fasciculatum.* Mientras que, en PR donde la mayoría de las herbáceas estaban micorrizadas, se clasificaron 9 especies como altamente

especializadas: además de *Paraglomus occultum* y las 4 *Scutellospora* spp., *G.* brohultii, *G. diaphanum* y *G. laccatum*. (Tabla 2.6).

**Tabla 2.6.** Esquema de distribución de HMA en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile (Oehl *et al.* 2003),

| Especie | PR | | BS | | BM | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | "Alta especialización" | "Generalista" | "Alta especialización" | "Generalista" | "Alta especialización" | "Generalista" |
| *A. spinosa* | - | - | + | - | - | - |
| *A. mellea* | - | + | - | + | - | + |
| *Acaulospora.* sp. A | - | + | - | + | - | + |
| *Ar leptoticha* | - | - | - | - | + | - |
| *Entrophospora* sp. A | - | - | - | - | + | - |
| *G. brohulti* | + | - | - | - | - | - |
| *G. diaphanum* | + | - | - | - | - | - |
| *G. laccatum* | + | - | - | - | - | - |
| *G. invermaium* | - | - | + | - | - | - |
| *G. fasciculatum* | - | - | - | - | + | - |
| *G. etunicatum* | - | + | - | + | - | + |
| *G. macrocarpum* | - | + | - | + | - | + |
| *P. dominikii* | + | - | - | - | - | - |
| *Pacispora* sp. A | - | - | + | - | - | - |
| *Paraglomus occultum* | + | - | - | - | - | - |
| *S. calospora* | + | - | - | - | - | - |
| *S. weresubiae* | + | - | - | - | - | - |
| *Scutellospora* sp. A | + | - | - | - | - | - |
| *Scutellospora* sp. B | + | - | - | - | - | - |
| Total | 9 | 4 | 3 | 4 | 3 | 4 |

Entre las áreas estudiadas, el número de esporas presentó diferencias significativas entre ellas (Tabla 2.7) con la mayor cantidad de esporas encontradas en BS, con un incremento de 7 veces sobre BM y de 3 veces sobre PR. En PR los valores de los índices de diversidad fueron para H'=2,19 y D=0,15 indicando gran diversidad de HMA (Tabla 2.7); no así en los ecosistemas boscosos donde la dominancia fue mayor con un D que fluctuó entre 0,24 y 0,29.

**Tabla 2.7.** Número de esporas e índices de diversidad de HMA en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile. Valores representan la media de 4 repeticiones, las que seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas, $P \leq 0.05$.

| Sitio de estudio | Nº esporas (por 100 g de suelo) | Indice Shanon-Wiener (H') | Riqueza | Equidad | Indice Simpson (D) |
|---|---|---|---|---|---|
| Pradera (PR) | 1001 b | 2,19 a | 21 | 0.72 | 0.15 |
| Bosque Siempreverde (BS) | 3164 a | 1,82 b | 19 | 0.62 | 0.29 |
| Bosque Deciduo (BM) | 456 c | 1,81 b | 13 | 0.70 | 0.24 |

Por otra parte, mediante los cebadores universales NS31 y AM1 fue posible amplificar pequeñas cantidades de ADNr extraído de una espora de HMA. El ADN amplificado y

purificado, utilizado para su secuenciación dio como resultado la identificación de *S. calospora* (Anexo 2.1).

### 2.3.4 Relaciones entre número de esporas y parámetros del suelo

En el Tabla 2.8, se muestran las regresiones que explican el número de esporas en relación con algunos parámetros químicos del suelo; así, se encontró que tanto el pH (R=0,92) como el P disponible (R = 0,71) son parámetros que explican en un alto porcentaje el número de esporas, a diferencia de la MO (R=0,27) y el P total (R=0,12).

**Tabla 2.8.** Ecuación de regresión entre densidad de esporas de HMA (*Y*) con parámetros químicos del suelo (*X*) en los sitios de estudio en San Pablo de Tregua, Centro Sur de Chile (R = coeficiente de regresión; *n* = número de observaciones. ★Significancia P≤0.05)

| *Y* | *X* | Regresión lineal | $R^a$ | *n* |
|---|---|---|---|---|
| Número de esporas | pH | *Y=17449.1-3113.68X* | 0.92★ | 15 |
| Número de esporas | C | *Y=26.91+73.0X* | 0.27 | 15 |
| Número de esporas | P-disponible | *Y=-14.29+702.01X* | 0.71★ | 15 |
| Número de esporas | P-total | *Y=462.25+0.60X* | 0.12 | 15 |

## 2.4 DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que el ecosistema lluvioso no alterado de la región valdiviana presenta una muy alta diversidad de plantas que incluyen especies arbóreas, arbustivas, trepadoras y helechos las que no difieren mayormente en cantidad y diversidad de otros ecosistemas de bosques lluviosos de Sudamérica, Tasmania o Nueva Zelandia (Hueck, 1978). PR también tuvo una comunidad de plantas diversa, presentando menor número de especies que otras praderas templadas de Europa y Norteamérica, en donde se han realizado estudios similares sobre niveles de micorrizas (Read & Haselwandter, 1981; Miller, 1987; van der Heijden & Sanders, 2002). Sin embargo, la diferencia de los ecosistemas chilenos en comparación a otros ecosistemas de bosque y pradera se debería principalmente a la composición de especies arbóreas y del sotobosque.

Los dos ecosistemas boscosos difieren en la diversidad de plantas y en la composición de las comunidades de hospederos AM (Tabla 2.3) teniendo el bosque manejado silviculturalmente un número inferior de especies de plantas micotróficas y no micotróficas. BS tuvo un 77% de plantas MA con respecto al total, mientras que en PR la proporción fue de un 91%. Sin embargo, en BS casi el 25% de las especies arbóreas como *A. luma*, *Amomyrtus meli*, *D.*

*diacanthoides*, *E. cordifolia* y *L. philippiana* que no fueron colonizadas por HMA, en otros ecosistemas han sido informadas que presentaron MA (Carrillo *et al*., 1992; Godoy *et al*., 1994; Cifuentes, 1995), lo que no podría excluir que algunas formen EM; así como, miembros de la familia Myrtaceae que forman MA y EM (Moyersoen *et al*., 2001). Algunas especies forestales posiblemente tengan ciertas etapas sucesionales de formación de MA y EM o que facultativamente no formen micorrizas, dependiendo del ecosistema o de las condiciones edáficas (St. John & Uhl, 1983; Smith & Read, 1997) como por ejemplo, *Eucalyptus* spp. (dos Santos *et al*., 2001).

El dosel de BS estaba dominado por Fagáceas que presentan ectomicorrizas, mientras en el sotobosque sobrevivieron especies de plantas AM. Lo anterior concuerda con Torti *et al*. (1997) y Torti & Coley (1999) quienes puntualizaron que en bosques tropicales la capacidad de los árboles asociados con ectomicorrizas no es necesariamente para una monodominancia ya que especies de árboles AM son codominantes en el dosel o componentes importantes de la vegetación del sotobosque. Una posible explicación para la coexistencia de ectomicorrizas y MA es que ocupan nichos del suelo diferentes (Moyersoen *et al*., 2001). Además, Lovelook & Miller (2002) encontraron que el potencial de inóculo de HMA puede ser mayor en situaciones cuando árboles con ectomicorrizas dominan el ecosistema boscoso. Por otra parte, es posible que en el sotobosque especies de plantas MA sobrevivan la competencia con plantas ectomicorrízicas, debido a que las raíces de las plantas micorrizadas arbuscularmente pueden conectarse mediante redes fúngicas y así, los carbohidratos podrían ser transportados a plantas con desventajas fotosintéticas (Simard *et al*., 2002; Leake *et al*., 2004).

En BM la alteración antropogénica que sufrió el hábitat producto de prácticas de manejo realizadas con anterioridad como fue el raleo, que provoca la abertura del dosel y aumenta la disponibilidad de luz, podría haber incrementado el número de especies herbáceas, las que frecuentemente presentan MA, como ocurrió en PR (Tabla 2.3); sin embargo, se produjo una disminución notable en el número total de especies vegetales. Por otra parte, la abertura del dosel superior produce disminución de humedad y probablemente debido a la fisiología particular que presentan los helechos de alta sensibilidad a la luz, pudieron ser fácilmente desplazados por vegetación más agresiva causando su disminución (Cronquist, 1981). Por otro

lado, no se puede responder la interrogante si el tiempo entre la práctica de manejo y el muestreo fue corto para la regeneración y establecimiento de una nueva comunidad de plantas micorrizables o si la sombra provocada por el cierre del dosel durante la fase fotosintéticamente activa fue la razón para que no se estableciera el sotobosque. La concentración de esporas HMA (Tabla 2.7) que sirve como indicador del potencial de colonización micorrízica (Sieverding, 1991), en BM fue significativamente menor que en los otros ecosistemas, señalando que este inóculo estaba demasiado bajo para el reestablecimiento de una nueva comunidad de plantas MA (van der Heijden, 2002).

En el área de estudio se encontraron en total 39 especies de HMA, de las cuales un 23% no han sido previamente descritas. Este número de especies desconocidas no es sorprendentemente grande dado que esta fue la primera prospección de especies HMA en el sur de Chile y que actualmente han sido descritas alrededor de 170 especies a través del mundo en el phylum Glomeromycota (ver: www.invam.caf.wvu.edu). El número de nuevas especies es similar al informado por Oehl *et al.* (2003), en 8 agroecosistemas de Europa central, donde detectaron un 20% de especies no descritas de un total de 45. En PR predominó el género *Acaulospora,* en contraste con praderas europeas en donde la mayoría de las comunidades HMA estuvieron representadas por *Glomus* spp. (Blaszkowski, 1993; Oehl *et al*., 2005). De manera similar a los agroecosistemas europeos con monocultivo (Oehl *et al*., 2003) la proporción de *Glomus* spp. incrementó en BM. También aumentó en BM la proporción de *Entrophospora* spp.; existe un estudio de Johnson & Wedin (1997) mostrando que *Entrophospora* spp. solamente se encontró en un ecosistema de bosque nativo tropical y no en pradera.

Solamente 4 de las 39 especies HMA se encontraron en los 3 ecosistemas pudiendo sobrevivir y formar esporas bajo condiciones muy diversas, considerándose como especies ecológicamente "generalistas". En estudios realizados en praderas de Europa por Oehl *et al.* (2004), *Glomus etunicatum* y *G. macrocarpum* también fueron considerados "generalistas". Las otras dos especies pertenecieron al género *Acaulospora* y se encuentran frecuentemente en suelos tropicales ácidos (Sieverding, 1989). Se denominó "especialista" a la especie observada en uno de los 3 ecosistemas y su número fue relativamente alto (15). En este estudio, resulta

interesante que *Scutellospora* se encontró solamente en PR; este género también ha sido informado en suelos ácidos de praderas de Colombia y Venezuela (Sieverding & Toro, 2000; Herrera-Pedraza *et al*., 2001). Así, se puede asumir que *Scutellospora* spp. prefiere vegetación abierta, no sombría. Aquellas especies HMA no categorizadas como generalistas o especialistas se encontraron en al menos 2 de los 3 ecosistemas estudiados (Tabla 2.4). *Acaulospora* spp. prefiere una comunidad de especies de plantas más diversas como el ecosistema BS o PR. Es desconocido todavía qué función juegan en cada ecosistema las diferentes especies de HMA. Es probable que una alta diversidad de especies de HMA sea más benéfica para una comunidad de plantas que para un bajo número (van der Heijden *et al*., 1998). Sin embargo, una población de hongos diversa es muy útil para el establecimiento de nuevas plántulas de sotobosque (Landim, 2003), las cuales pueden frecuentemente sólo sobrevivir a través del transporte de C vía red micorrízica entre sus raíces y aquellas de otras plantas adultas (Leake *et al*., 2004).

Bajo las condiciones de humedad en que se encontraba el área de estudio durante la época del muestreo, muchos tipos de HMA pudieron no esporular o presentar un número reducido de esporas y por tanto, pudieron alterar los cálculos de los índices de diversidad. Probablemente, algunos tipos de HMA están mejor adaptados a condiciones específicas que cambian con la sucesión o intervención del bosque, producido por los cambios que ocurren en el suelo. Así, Johnson *et al.* (1991) encontraron que *Acaulospora* correlaciona inversamente con el pH. También, Johnson & Wedin (1997) encontraron que 2-5 especies de *Acaulospora* correlacionaron negativamente con el pH, mientras que 5 a 9 especies de *Glomus* presentaron una estrecha relación con el contenido de C. De estos estudios se puede concluir que el uso del suelo y las características edafoclimáticas producen efectos sustanciales sobre la diversidad de las comunidades de HMA.

El índice H' fluctuó entre 1,81 y 2,19, valores similares a los encontrados por Blaszowski (1993) en Polonia, para suelos agrícolas que también estuvieron en el rango de 1,8 y 2,2; pero, fueron superiores a los de Franke-Snyder *et al*., (2001) en suelos orgánicos de USA. Si el aumento en la diversidad de las plantas es reflejo de un incremento en la diversidad de HMA, es materia que requiere de mayor investigación, debido a que actualmente no existe suficiente

información sobre los mecanismos que regulan y mantienen la biodiversidad de plantas; recientemente se ha informado que la diversidad de HMA es un factor preponderante para el funcionamiento de un ecosistema incluyendo su productividad (Van der Heidjen *et al.,* 1998; 2003).

## 2.5 CONCLUSIONES

De este estudio se puede concluir que en BS *Acaulospora spinosa, Glomus invermaium* y *Pacispora* sp. A, mostraron habilidad para esporular a bajo pH, lo que hace suponer que estos hongos podrían sobrevivir en suelos ácidos donde la toxicidad por Al es un problema frecuente. En consecuencia, podrían ser morfotipos que servirían para aminorar los efectos de elevados contenidos de Al en los suelos.

La diversidad de especies HMA en cada ecosistema, estuvo muy influenciada por el número de especies de plantas MA, pero no, por las propiedades químicas del suelo. Además, las prácticas de manejo silvícola como el raleo, afectaron negativamente la diversidad de especies vegetales MA y especies de HMA.

Una manera de mantener una alta diversidad de especies de plantas asociadas con una comunidad de plantas MA es mediante la conservación de este ecosistema de bosque lluvioso valdiviano. Praderas con una amplia comunidad de especies de plantas parecen ser una buena alternativa para los bosques lluviosos siempreverdes conservando una alta biodiversidad de HMA, pero a expensas de la diversidad de vegetación del bosque. El bosque secundario deciduo con una casi monoespecífica cubierta de *N. alpina* parece ser económicamente atractivo a primera vista, pero resulta en un ecosistema ecológicamente degradado de baja biodiversidad.

## 2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arroyo, M., Armesto, J., Roíz, R., Peñaloza, A. (1999). Bases de la Sustentabilidad Ecológica y sus implicancias para el manejo y conservación del bosque nativo en Chile. En: Donoso, C., Lara, A. (Eds.). Silvicultura de los Bosques Nativos de Chile. Ed. Universitaria, Santiago. pp. 35-68.

Baev, P.V., Penev, L.D. (1995). BIODIV: program for calculating biological diversity parameters, similarity, niche overlap, and cluster analysis. Version 5.1. Pensoft, Sofia-Moscow. 57 p.

Blaszkowski, J. (1993). Comparative studies on the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. Acta Mycol. 28: 93-140.

Bowen, G.D. (1980). Mycorrhizal roles in tropical plants and Ecosystems, In Tropical Mycorrhiza Research, Mikola, P., Ed., Oxford University Press, Oxford. pp. 165-187.

Brundrett, M., Melville, L., Peterson, L. (1994). Practical Methods in Mycorrhizal Research. Mycologue Publications, Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. 161 p.

Carrillo, R., Godoy, R., Peredo, H. (1992). Simbiosis micorrícica en comunidades boscosas del Valle Central en el sur de Chile. Bosque 13: 57-67.

Cifuentes A., R. E. L. (1995). Asociaciones Micorrizicas en los Bosques del Centro-Sur de Chile. Tesis Ing. For., Universidad Austral de Chile, Faculdad de Ciencias Forestales, Valdivia, Chile. 95 p.

CONAF -CONAMA -BIRF- UACH- PUC- UCT (1999). Catastro y evaluación de los recursos vegetacionales nativos de Chile. Informe Nacional con variables ambientales. Santiago, Chile. 89 p.

Cronquist, A. (1981). The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2 ed. The New York Botanical Garden. N.Y. 1262 p.

Dick, W.A., Tabatabai M.A. (1977). An alkaline oxidation method for determination of total phosphorus in soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 41: 511-514.

Donoso, C., Ramírez, C. (2000). Arbustos nativos de Chile. Marisa Cuneo Ediciones. Valdivia, Chile.119 p.

Dos Santos, V.L., Muchovej, R.M., Borges, A.C., Neves, J.C.L., Kasuya, M.C. 2001. Vesicular-arbuscular-/ecto-mycorrhiza succession in seedlings of *Eucalyptus* spp. Braz. J. Microbiology 32: 81-86.

Franke-Snyder, M., Douds, D.D., Galvez, L., Phillips, J.G., Wagoner, P., Drinkwater, L., Morton, J.B. (2001). Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. Appl. Soil Ecol. 16: 35-48.

Galloway, D. (1996). Los líquenes del bosque templado de Chile. En: Armesto, J., Villagrán C., Arroyo M.K. (Eds.). Ecología de los Bosques Nativos de Chile. Ed. Universitaria. Santiago, Chile. pp. 101-112.

Godoy, R., Mayr, R. (1989). Caracterización morfológica de micorrizas vesículo-arbusculares en coníferas endémicas del sur de Chile. Bosque 10: 89-98.

Godoy, R., Romero, R., Carrillo, R. (1994). Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas del sur de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat. 67: 209-220.

Herrera-Pedraza, R.A., Cuenca, G., Walker, C. (2001). *Scutellospora crenulata*, a new species of Glomales from La Gran Sabana, Venezuela. Can. J. Bot. 79: 674-678.

Hueck, K. (1978). Los Bosques de Sudamérica. Ecología, Composición e Importancia Económica. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica, Ltda. (GTZ), Eschborn. 476 p.

Johnson, N.C., Wedin, D.A. (1997). Soil carbon, nutrients, and mycorrhizae during conversion of dry tropical forest to grassland. Ecol. Appl. 7: 171-182.

Johnson, N.C., Zak, D.R., Tilman, D., Pfleger, F. (1991). Dynamics of vesicular arbuscular mycorrhizae during old field succession . Oecologia 86: 349-358.

Koske, R.E., Tessier, B. (1983). A convenient, permanent slide mounting medium. Mycol. Soc. Am. Newsl. 34:59.

Landim, M.F. (2003). Brazilian Atlantic Rainforest Remnants and Mycorrhizal Symbiosis – Implications for Reforestation. A Case Study in Sergipe, Northeast Brazil. PhD. Dissertation, University of Bremen (UFT), Bremen, Germany.

Lara, A., Altamirano, A., Thiers, O., Tacon, A. (2002). Plan de Manejo proyecto CIPMA-FMAM, unidad demostrativa piloto predio San Pablo de Tregua. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. 67 p.

Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L., Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. Can. J. Bot. 82: 1016-1045.

Lobo, J.M. (2001). Prólogo. En: Moreno, C. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA. Vol. 1. Zaragoza. 84 p.

Lovelook, C.E., Miller, R. (2002). Heterogeneity in inoculum potential and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi. Ecology 83, 823-832.

Magurran, A.E. (1988). Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey. 179 p.

Marticorena, C., Quezada, M. (1985). Catálogo de la flora vascular de Chile. Gayana 42: 1-157.

Mayr, R., Godoy, R. (1989). Seasonal patterns in vesicular-arbuscular mycorrhiza in melic-beech forest. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 281-288.

Meneses, M., Gayoso, J. (1995). Estudio de impacto ambiental proyecto forestal de los predios Tepuhueico y El Canelo. Golden Spring Forestal (Chile) CIA Ltda. Informe de Convenio Nº 221. Serie Técnica Universidad Austral de Chile. Valdivia. 105 p. y Anexos.

Miller, R.M. (1987). The ecology of vesicular arbuscular mycorrhizae in grass- and scrublands. In: Safir, G.R. (Ed.), Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. CRC Press, Boca Raton, pp. 135-170.

Moreno, C. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA. Vol. 1. Zaragoza. 84 p.

Morton, J.B., Redecker, D. (2001). Two new familias of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. Mycologia 93: 181-195.

Moyersoen, B., Becker, P., Alexander, I.J. (2001). Are ectomycorrhizas more abundant than arbuscular mycorrhizas in tropical heath forests? New Phytol. 150: 591-599.

Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mader, P., Boller T., Wiemken A. (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2816-2824.

Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, Boller, T., Wiemken, A. (2004). Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. Oecologia 138: 574-583.

Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Ris, E.A., Boller, T., Wiemken, A. (2005). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. New Phytol. 165: 273-283.

Olsen, S.R., Sommers, L.E. (1982). Phosphorus. In: Page A.L., R.H. Miller, D.R. Keeney (Eds.). Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. (Agronomy monograph nº. 9). Am. Soc. Agron. Soil Sci.Soc. Madison, Wis. pp.403- 430.

Oltremari, J., Thelen, K. (1999). Manual para la formulación de planes de manejo en áreas silvestres protegidas privadas. Informe final. Tomo II. 137 p.

Onguene, N.A, Kuyper, T.W. (2001). Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. For. Ecol. Manage. 140: 277-287.

Palfner, G. (2001). Taxonomische Studien an Ektomykorrhizen aus den *Nothofagus*- Wäldern, Mittelsüdchiles, Bibliotheca Mycologica, Band. 190, 243 p.

Peña, A., Duran, E., Merino, R., Vargas, R. (1999). Funciones y Usos de los Bosques. Bosque Nativo 23: 8-11.

Phillips, J.M., Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 159-161.

Read, D.J., Haselwandter, K. (1981). Observations on the mycorrhizal status of some Alpine plant communities. New Phytol. 88: 341-352.

Sadzawka, A., Grez, R., Mora, M.L., Saavedra, N., Carrasco, M.A., Rojas, C. (2000). Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago. 62 p.

Schenck, N.C., Pérez, Y. (1990). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi, 3ª ed. Synergistie, Gainesville, Fla, U.S.A. 241 p.

Schüssler, A. (2004). Das fünfte Pilz-Phylum: die Glomeromycota. BIO spektrum 10: 741-742.

Sieverding, E. (1989). Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 369-390.

Sieverding, E. (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. GTZ, Eschborn, Germany, 371 p.

Sieverding, E., Toro, S. (2000). Catálogo de Cepas de Micorrizas Arbusculares. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia.

Simard, S.W., Jones, M.D., Durall, D.M. (2002). Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I. (Eds.), Mycorrhizal Ecology. Ecological Studies, Vol. 157. Springer, Berlin, pp. 33-74.

Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd Edition. Academic Press, London.

St. John, T.V., Uhl, C., 1983. Mycorrhizae in the rain forest at San Carlos de Rio Negro, Venezuela. Acta Cient. Venezolana 34, 233-237.

Tennant, D. (1975). A test of a modified line intersection method of measuring root length. J. Ecol. 63: 995-1001.

Torti, S.D., Coley, P.D. (1999). Tropical monodominance: a preliminary test of the ectomycorrhizal hypothesis. Biotropica 31: 220-228.

Torti, S.D., Coley, P.D., Janos, D.P. (1997). Vesicular-arbuscular mycorrhizae in two tropical monodominant trees. J. Trop. Ecol. 13: 623-629.

van der Heijden, M.G.A., (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi as a determinant of plant diversity. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I.R. (Eds.). Search for Underlying Mechanisms and General Principles. Springer. pp. 243-265.

van der Heijden, M.G.A., Sanders, I.R., 2002. Mycorrhizal ecology: synthesis and perspectives. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I. (Eds.), Mycorrhizal Ecology. Ecological Studies, Vol. 157, Springer, Berlin, pp. 442-456.

van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396: 69-72.

van der Heijden M., Wiemken, A., Sanders, I. (2003). Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. New Phytol. 157: 569-578.

Walkley, A., Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and the proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press. pp 315-322.

**Anexo 2.1. Secuenciación de *Scutellospora calospora***

*Scutellospora calospora*

TATCAAGCCGTCCAATAGGCGTTATATGTAAAGaTTGCTTGCAGCTTAAAAAGCTCGCTACTT
GNAAtTTCGGGGCTTCTTCCgcTTGGTCAGGCTAACAAGtCTGTACTAgCGtGTaGAATCTCTACC
TTCTGGGGAACCATCaTGTTATTAaTTTAGCGTGGTGGGAAACCAGGACCTTTACCTTGAAAA
AATTAGAGTGTTCAAAGCAgGCTTACGTCTGAATACATTAgCATGGAATAAtAAAATAGGACG
GtGGTCCTGTTTTGTTGGtTTCTGAATCACCGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAG
aATTCaATTGTCAgAGGTGAAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAACTtCTGCgAAAGCATTTGCC
AAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAaGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGT
AGTCTTAACCATAAACTATGCCgACTAGGGATCGGACGATGTTAAATTTTATTGACTCGtTCGG
CGCCTTACGGGAAACCAAAGTGTTTGGgTTCCGGGGGGAGTaTGGTCGCAaGGCTGAAACTTA
AAGGAATTGACGGAGGGGCACCACCaGGGGTGGAgCCTGCGGCTTAATTTGACTCACaaCGGG
A

***Scutellospora calospora***

partial 18S rRNA gene, clone pWD162-1-5 Length = 1760 Score = 1047 bits (528), Expect = 0.0 Identities = 540/544 (99%) Strand = Plus / Plus

Query: 86 ttggtcaggctaacaagtctgtactagcgtgtagaatctctaccttctggggaaccatca 145
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||Sbjct: 639
ttggtcaggctaacaagtctgtactagcgtgtagaatccctaccttctggggaaccatca 698
Query: 146 tgttattaatttagcgtggtgggaaaccaggacctttaccttgaaaaaattagagtgttc 205
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||Sbjct: 699
tgttattaatttagcgtggtgggaaaccaggacctttaccttgaaaaaattagagtgttc 758
Query: 206 aaagcaggcttacgtctgaatacattagcatggaataataaaataggacggtggtcctgt 265
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||Sbjct: 759
aaagcaggcttacgtctgaatacattagcatggaataataaaataggacggtggtcctgt 818
Query: 266 tttgttggtttctgaatcaccgtaatgattaatagggatagttgggggcattagaattca 325
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||Sbjct: 819
tttgttggtttctgaatcaccgtaatgattaatagggatagttgggggcattagtattca 878
Query: 326 attgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaacttctgcgaaagcatttgcca 385
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||Sbjct: 879
attgtcagaggtgaaattcttggatttattgaagactaacttctgcgaaagcatttgcca 938
Query: 386 aggatgttttcattaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcg 445
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||Sbjct: 939
aggatgttttcattaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcg 998
Query: 446 tagtcttaaccataaactatgccgactagggatcggacgatgttaaattttattgactcg 505
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||Sbjct: 999
tagtcttaaccataaactatgccgactagggatcggacgatgttaaattttattgactcg 1058
Query: 506 ttcggcgccttacgggaaaccaaagtgtttgggttccgggggagtatggtcgcaaggct 565
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||Sbjct: 1059
ttcggcgccttacgggaaaccaaagtgtttgggttccgggggggtatggtcgcaaggct 1118
Query: 566 gaaacttaaaggaattgacggaggggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttga 625
|||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||Sbjct: 1119
gaaacttaaaggaattgacggaagggcaccaccaggggtggagcctgcggcttaatttga 1178 Query: 626
ctca 629 ||||Sbjct: 1179 ctca 1182

# CAPÍTULO 3

# EFECTO TEMPRANO DEL MANEJO Y ROTACIÓN DE CULTIVOS SOBRE LOS PROPÁGULOS DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN UN ULTISOL DEL CENTRO SUR DE CHILE

**RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue estudiar la temprana influencia que tiene la labranza convencional (LC) y cero labranza (CL) sobre los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). El estudio se realizó en un Ultisol de la IX Región con una rotación corta trigo (*Triticum aestivum* L.)-avena (*Avena sativa* L.)-trigo (*T. aestivum*) y trigo (*T. aestivum*)-lupino (*Lupinus albus* L.)-trigo (*T. aestivum*) desde el segundo al cuarto año de establecido el ensayo.

Se evaluaron parámetros fúngicos como longitud de micelio, colonización de raíces, número de esporas y algunas propiedades del suelo para explicar su influencia sobre los propágulos HMA. Los suelos se muestreaeron a comienzos de otoño (barbecho) y primavera (floración). En el tercer año, se encontraron diferencias significativas entre CL y LC, las que desaparecieron con el tiempo; mientras que, con ambos sistemas de labranza, no se encontraron diferencias en el micelio activo.

La colonización por HMA de las raíces al igual que las esporas fue siempre mayor en CL que en LC, pero siempre fue menor con *L. albus*

en la rotación *T. aestivum-A. sativa-T. aestivum*; mientras que, en la rotación con *L. albus* no hubo diferencias significativas con el sistema de labranza

En LC, cuando en la rotación se incluyó *L. albus* se obtuvo la menor longitud de hifas, junto con una menor densidad de hifas activas. El número de esporas en el perfil de suelo alcanzó los más altos valores con la rotación *T. aestivum-A. sativa-T. aestivum*, siendo significativamente menor en presencia de *L. albus*; entre los 0-5 cm fue mayor con LC, efecto que se invirtió en profundidad (0-10 cm y 10-20 cm) donde la CL presentó el mayor número de esporas. El tratamiento con *L. albus* produjo un descenso dramático de las poblaciones fúngicas, acompañado de un aumento en la actividad fosfatásica, mecanismos que actúan sinérgicamente en el ciclado y aprovechamiento del P. En ambos agroecosistemas, se observaron 22 especies HMA en total, incluyendo 8 *Glomus* spp., 6 *Acaulospora* spp., 4 *Scutellospora* spp., una *Archaeospora* sp., una *Diversispora* sp., una *Entrophospora* sp. y una *Pacispora* sp. El mayor número de esporas del género *Acaulospora* spp. se encontró con *T. aestivum* en LC, mientras que fueron más abundantes las del género *Scutellospora* spp. bajo

CL. De todos los parámetros micorrízicos evaluados, el número de esporas se podría visualizar como un indicador temprano y útil del efecto del manejo sobre los propágulos micorrízicos en ensayos de campo a corto plazo.


## ABSTRACT

The aim of this work was to study the early influence of conventional tillage (CT) and no-tillage (NT) on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) propagules. A short course rotation, succession of a wheat (*Triticum aestivum* L.)-oat (*Avena sativa* L.)–trigo (*T. aestivum*) and wheat (*T. aestivum*)-lupine (*Lupinus albus* L.)-wheat (*T. aestivum*) trial, was studied in a typic Chilean Ultisol from the second to fourth year after the beginning of the experiment. Measurements included the fungus parameters such as mycelium length, root colonization, spore number and some soil properties in order to explain their influence on AMF propagules. Soil samples were yearly taken in autumn (fallow period) and in early spring (flowering). Significant differences in AMF hyphal length were observed between NT and CT in the first year but such differences disappeared thereafter; no differences in metabolically active hyphae were obtained under the two tillage systems. Mycorrhizal root colonization was always higher under NT than CT and the number of AMF spore was also higher under NT, but with *L. albus* was also minor. The treatment with *L. albus* produced the most intense decrease on fungal populations but there was an increase on phosphatase activity. The enzyme activity did not show significant differences between CT and NT, but when lupine was cropped, the phosphatase activity increased, whilst when *T. aestivum* was the brek crop, the enzyme content was low; both mechanisms functioning synergistically in P cycling. Twenty two AMF species including 8 *Glomus* spp., 6 *Acaulospora* spp., 4 *Scutellospora* spp., one *Archaeospora* sp., one *Diversispora* sp., one *Entrophospora* sp. and one *Pacispora* sp. were observed in both agroecosystems. Higher spore number of *Acaulospora* spp. was found under wheat than under oat being higher under CT than NT, whilst more spores of *Scutellospora* spp. were observed under NT than CT. From all mycorrhizal characteristics spore number could be visualized as an early and useful indicator of the effect of tillage systems on mycorrhizal propagules in short-term experiments.

## 3.1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial cada vez es más reconocido el rol que cumple la biodiversidad en el funcionamiento de los ecosistemas agrícolas. En ecosistemas naturales la regulación interna de su funcionamiento es consecuencia de la biodiversidad de plantas a través de flujos de energía, nutrientes y sinergias biológicas entre ellas y con la biota del suelo. Este control se va perdiendo paulatinamente con la intensificación y simplificación agrícola; de aquí que, para el funcionamiento de los monocultivos se deben añadir insumos químicos. La preparación comercial de la semilla en almácigos y la siembra mecanizada han reemplazado a los métodos naturales de dispersión de semillas; los plaguicidas químicos desplazan a los insectos como controles naturales de poblaciones de malezas y la manipulación genética reemplazó el proceso natural de evolución y selección de plantas, incluso la descomposición del vegetal también ha sufrido alteración por su cosecha, manteniéndose la fertilidad del suelo, no a través del reciclado de nutrientes, sino con el uso de fertilizantes (Swift *et al.,* 1996).

La biodiversidad comprende todas las especies de plantas, animales y microorganismos existentes en un ecosistema. En agricultura, el tipo y abundancia de biodiversidad difiere entre ecosistemas según edad, diversidad, estructura y manejo. En general, el grado de biodiversidad depende de la diversidad de plantas dentro y alrededor del ecosistema; duración de los cultivos; intensidad de manejo y distancia de separación del ecosistema con la vegetación natural (Southwood & Way, 1970). Los agroecosistemas que presentan mayor diversidad, que son más permanentes, aislados y manejados con baja tecnología, tienen ventaja sobre los sistemas altamente simplificados con adición de niveles elevados de insumos, como los monocultivos (Altieri, 1995; Altieri & Nicholls, 2004).

Según Vandermeer & Perfecto (1995) en la biodiversidad se pueden distinguir dos componentes: la *biodiversidad planificada*, asociada a los cultivos y ganado y que varía dependiendo del manejo y la *biodiversidad asociada,* que incluye toda la flora y fauna del suelo que coloniza el ecosistema, desde ambientes circundantes y que permanece dependiendo del tipo de manejo agrícola.

Uno de los motivos por los cuales se debe mantener o estimular la biodiversidad natural es que cumple una gran cantidad de roles biológicos. Tanto en un bosque como en una pradera natural, la cubierta vegetal previene la erosión del suelo reabasteciéndolo con agua, controlando las inundaciones y mejorando la infiltración y reducción del escurrimiento. En la medida que la biodiversidad disminuye, aumenta la necesidad de un manejo intensivo, razón por la cual, los monocultivos se deben fertilizar con insumos externos (Altieri & Nicholls, 2004).

En los agroecosistemas las plantas y animales, de presencia natural y espontánea, han sido reemplazados por plantas de cultivo y ganado deliberadamente seleccionados por el agricultor. De allí que el grado de perturbación del sistema natural puede variar entre diferentes tipos de agricultura; prácticas agrícolas de baja intensidad como barbechos en rotación, retienen muchos procesos y composición de flora, fauna y microorganismos de los ecosistemas naturales. Por el contrario, sistemas más intensivos que incluyen el monocultivo, modifican el ecosistema de una manera tan completa que muy poco de la biota y paisaje inicial permanece (Altieri, 1995).

El impacto que tiene la agricultura sobre las funciones del ecosistema está claramente diferenciado y se relaciona a la estructura del suelo, nutrientes y microorganismos; ciclo del agua; propiedades atmosféricas, complejidad biótica y del paisaje. La estructura del suelo y la biota son afectadas por la reducción de la MO incorporada por la biomasa, la compactación y laboreo del suelo. La simplificación por eliminación de vegetación, particularmente árboles y cubierta herbácea del suelo, lo expone a las fuerzas erosivas con la subsiguiente pérdida de la capa arable. La humedad se reduce y los productos químicos lo deterioran aún más, al reducir la presencia de microorganismos responsables de la descomposición y ciclado de nutrientes, entre ellos, hongos de vida libre, hongos micorrízicos y bacterias fijadoras de N. Este deterioro en la calidad del suelo causa reducción en la productividad, junto a los daños que ocasiona en las funciones de los ecosistemas locales (Altieri, 1995).

Los agroecosistemas intensivos que dependen de una baja cantidad de especies y variedades se han hecho más susceptibles a enfermedades, plagas y variaciones climáticas. El trigo (*Triticum*

*aestivum* L.), el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays* L.) aportan más del 50% del consumo de energía de origen vegetal metabolizada en el mundo; sólo 103 especies vegetales aportan casi el 90% de la energía suministrada por los alimentos en el mundo. Así, mientras la agricultura moderna ha tenido incrementos enormes en la producción de alimentos, simultáneamente, es responsable de daños considerables a la diversidad biológica mediante cambios en el aprovechamiento del suelo, introducción de especies y contaminación por sustancias químicas. El uso de la labranza convencional (LC) no ha favorecido la conservación de los recursos productivos, deteriorando el suelo, que ha sido expuesto a una explotación intensiva y muchas veces poco racional, provocando un acelerado avance de la erosión, pérdida de superficie cultivable, contaminación, desertificación y una significativa disminución de los rendimientos productivos (Altieri & Nicholls, 2004).

Los cultivos difieren en su potencial productivo y en la cantidad de nutriente que remueven desde el suelo. La intensidad y diversificación de los sistemas a través de la rotación influyen en la demanda, ciclado y distribución de nutrientes en el perfil de suelo, afectando los requerimientos y dinámica de ellos, junto con influir en la diversidad y actividad de la biomasa microbiana (Grant *et al*., 2002). Cuando estas relaciones no se mantienen se produce una disminución en la producción y calidad vegetal, junto a pérdidas nutricionales, lo que conlleva a una reducción en el uso eficiente de los nutrientes con una potencial degradación de la calidad del aire, agua y suelo (Lupwayi *et al*., 1999).

La mayoría de los agricultores chilenos practica la LC que consiste en remover el suelo e incorporar los residuos del cultivo anterior (Sierra, 1990). El arado corta e invierte total o parcialmente los primeros 15 cm permitiendo que el suelo se suelte, airee y mezcle facilitando el ingreso de agua, la mineralización de materia orgánica (MO) y la reducción de plagas y enfermedades en superficie (Riquelme, 1992). Con este sistema, el suelo se deteriora por pérdida de elementos nutritivos principalmente por erosión, compactación y degradación de la MO (Faiguenbaum, 2003) (Figura 3.1).

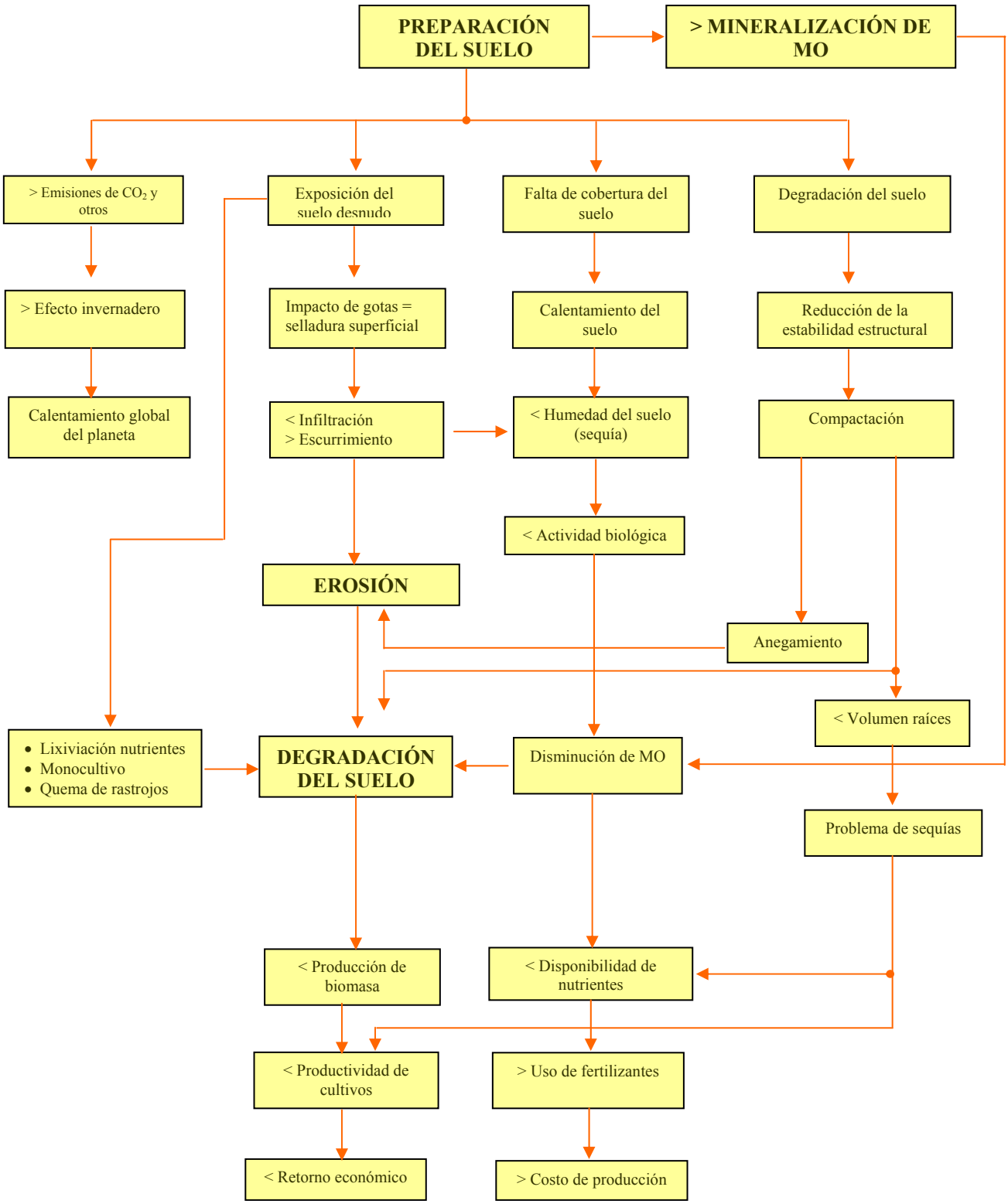


**Figura 3.1.** Consecuencias de la preparación del suelo sobre la degradación y pérdida de productividad, así como efectos externos de la LC (Maturana & Acevedo, 2003).

Como respuesta a la necesidad de preservar el recurso suelo surgió el manejo conservacionista como parte importante de los sistemas de agricultura sostenible que bajo un sistema de mínima o cero labranza (CL) incrementa el potencial de rendimiento de los cultivos (Venegas, 1990), minimizando los niveles de erosión del suelo (Faiguenbaum, 2003). En CL prácticamente todo el rastrojo queda en la superficie con un mínimo de perturbación del suelo, retornando una mayor cantidad de biomasa como residuo superficial o material radicular lo que incrementa el contenido de MO (Derpsch *et al.,* 2000) y de algunos nutrientes aumentando la actividad de los microorganismos rizosféricos (Solar, 2002). Además, disminuye la erosión hídrica y eólica, mejora las propiedades físicas (estructura y densidad aparente); suelos de textura fina y drenaje restringido se comportan de forma diferente a suelos de textura más gruesa y bien drenados (Halvorson *et al*., 1999a).

A nivel mundial existen alrededor de 64.000.000 ha bajo CL; en América Latina, desde 1987 al 2000 se produjo un aumento de 670.000 ha a 29.176.000 ha siendo Brasil, Argentina y Paraguay los países donde ha alcanzado mayor difusión (Derpsch *et al.,* 2000). En Chile, hasta 1994 se habían incorporado a este tipo de manejo aproximadamente 95.000 ha, sólo en la VIII, IX y X Regiones estimándose actualmente en 200.000 ha (Acevedo, 2003).

El manejo de residuos de cosecha es muy importante por la cantidad de nutrientes y micronutrientes que contienen y que no se encuentran en los fertilizantes tradicionales (Solar, 2002). En relación con el efecto que tiene la CL sobre las características químicas, influye notoriamente la ausencia de mezcla del suelo con los residuos orgánicos, la aplicación superficial de fertilizantes y enmiendas y el efecto que tienen los rastrojos sobre la retención de humedad y disminución de temperatura. Además, se produce una disminución de pH en los primeros 5-10 cm de profundidad por aumento en el contenido de MO (Aguilera *et al.,* 1996) siendo la lixiviación de bases de menor magnitud. La acidificación real está relacionada con el N aplicado como fertilizante amoniacal y con la fijación biológica de N, por parte de las leguminosas (Sadzawka, 1994).

En CL, al comienzo la disponibilidad de nutrientes es menor que en LC, pero en ésta con el tiempo disminuye; de manera que, la disponibilidad total resulta menor en este último sistema

(Vidal, 2002). En LC se tiende a producir una distribución homogénea de nutrientes en los primeros 20 cm de suelo, con un contenido total de elementos nutritivos menor, producto de una mayor pérdida por erosión (Sierra, 1990).

Ambos sistemas de labranza difieren en las labores de preparación de suelo; así mientras la CL prepara el rastrojo del cultivo anterior, cortándolo, picándolo y distribuyéndolo en forma homogénea sobre el suelo (2-10 Mg $ha^{-1}$) con una preparación de la cama de semillas mínima y controlando las malezas con herbicidas (Halvorson *et al*., 1999b), la LC generalmente quema el rastrojo antes del proceso de arado y discado. En CL, la fertilización de presiembra, después de algunos años es menos exigente por el aporte de rastrojos (Reyes, 2002).

Los residuos de plantas aportados por el precultivo sirven para restablecer el pool del N orgánico en el suelo. Generalmente, en las secuencias de rotación de cultivos se incorporan leguminosas anuales para incrementar la cantidad de N disponible para el cultivo siguiente (Vidal, 2002). Este macronutriente forma parte de proteínas (Grant *et al*., 2002) y su captación tardía por parte de la planta puede incrementar el contenido proteico, en comparación a una absorción temprana durante el período de crecimiento (Grant & Flaten, 1998). La cantidad de N fijado depende de la leguminosa y del sistema de manejo; sin embargo, sin fertilización nitrogenada adicional, el N fijado por las leguminosas no puede asegurar altos rendimientos en cultivos de grano. Los rastrojos de leguminosas liberan N en forma más continua que los fertilizantes, a lo largo del período de crecimiento. La CL puede disminuir los niveles de N disponible para el cultivo siguiente en comparación con la LC, que incorpora mejor los rastrojos al suelo. Entre las leguminosas que se están utilizando en rotaciones de cultivo con cereales, en la zona centro sur del país, se encuentra el lupino (*Lupinus albus)* como una buena alternativa para alimentación animal debido a su alto valor proteico (39%), reemplazando a la harina de pescado y de soya. Además, posee bajos requerimientos nutricionales por liberación de P al suelo y alta capacidad fijadora de N (Vidal, 2002).

El manejo y tipo de residuo afecta la disponibilidad de P debido a la disminución en la formación de compuestos insolubles, desorción del P fijado o bloqueo de los sitios de adsorción sobre la superficie de los coloides del suelo (Li *et al*., 1990). El P en el suelo se

encuentra en formas inorgánicas (Pi) y orgánicas (Po) siendo esencial para el crecimiento de las plantas (Borie, 1981). La labranza moviliza material arenoso a la superficie, lo que no cambia el contenido de P total pero, puede variar la cantidad presente en minerales del tipo apatita. Por tanto, prácticas de manejo que incrementan la erosión pueden afectar la cantidad y formas del P presentes en el suelo (Criquet *et al*., 2004). La CL al dejar los rastrojos sobre la superficie del suelo, permite un reciclaje de alrededor de un 30% del P absorbido por el cultivo. De este total, un 70% del Po de los residuos de cosecha se transfiere al pool del Po estabilizado y un 30% al pool de P lábil. El primero se mineraliza a una tasa muy baja, en comparación al pool lábil. La baja concentración de P en los residuos y la baja proporción que queda lábil determina que la mineralización del Po no alcance a ser significativa (Rodríguez, 1993). El uso constante de CL conduce a una mayor eficiencia del fertilizante fosforado, aumentando su concentración y disponibilidad en el suelo superficial (Phillips, 1985). En suelos con aluminio (Al) activo, el aumento de MO disminuye la capacidad de fijación del P del suelo (Sadzawka, 1994).

La mayor parte del P total se encuentra en la MO como inositol fosfatos, nucleótidos y fosfolípidos; sin embargo, son los aniones ortofosfato las formas de P asimiladas por microorganismos y plantas los que son liberados como consecuencia de la mineralización del Po. Estos procesos son catalizados por fosfatasas, enzimas del suelo que son liberadas por microorganismos y raíces de plantas (Rao *et al*., 1996).

Las fosfatasas catalizan reacciones que liberan P por hidrólisis de ésteres y anhídridos de $H_3PO_4$ (Tabatabai, 1994). De acuerdo con Florkin & Stotz (1964) se clasifican en 5 grupos principales:

- Fosfomonoesterasas (E.C 3.1.3.)
- Fosfodiesterasas (E.C. 3.1.4.)
- Trifosfórico monoesterasas (E.C. 3.1.5.)
- Anhídrido fosforil-hidrolasas (E.C. 3.6.1.) y
- Fosfatasas que hidrolizan enlaces P-N (E.C. 3.9.), como fosfoamidasas (E.C. 3.9.1.1.)

En los ecosistemas terrestres, las enzimas más estudiadas han sido las fosfomonoesterasas por ser el tipo de fosfatasas predominante en los suelos (Turner *et al*., 2002a; b) posiblemente por la baja especificidad que presentan con el sustrato. Se clasifican de acuerdo con el pH óptimo de actividad en fosfatasas ácidas (E.C. 3.1.3.2.) y fosfatasas alcalinas (E.C. 3.1.3.1) (Juma y Tabatabai, 1977). En los suelos, compuestos como inositol fosfato, polifosfatos, mononucleótidos y azúcares fosforilados son sustratos naturales de estas enzimas. La actividad de ambas fosfatasas está influenciada por las propiedades del suelo, interacciones de los microorganismos, cubierta vegetal, lixiviados y presencia de inhibidores o activadores (Reid & Wilson, 1971).

Por otra parte, en la rizósfera existe una amplia gama de sustratos carbonados que son exudados por la raíz al suelo circundante en forma de carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, enzimas y nucleótidos haciendo de este sitio una zona ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos que al establecerse, cumplen distintas funciones relacionadas con las plantas. Esta alta riqueza disminuye a medida que se incrementa la distancia a la raíz, lo que se conoce como efecto rizosférico (Azcón & Barea, 1997).

Dentro de estos microorganismos del suelo se encuentran las micorrizas que son asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre las raíces de la mayoría de las plantas (tanto cultivadas como silvestres) y ciertos hongos especializados del suelo, los hongos micorrízicos que son capaces de establecer una relación de intercambio benéfica de nutrientes en los tejidos radicales actuando directamente sobre el equilibrio biológico del suelo, para que las plantas logren un desarrollo sano y vigoroso (Castellano & Molina, 1989).

Existen siete tipos de micorrizas que se han clasificado siguiendo criterios estructurales, funcionales y taxonómicos: ectomicorrizas (EM), MA, ectendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides y orquidioides. Prevalecen dos tipos principales: 1) las EM que se forman con especies de coníferas de la familia Pinaceae y latifoliadas de las familias Fagaceae y Betulaceae, entre otras y 2) las MA que se encuentran ampliamente distribuidas en los ecosistemas terrestres, formando asociaciones simbióticas con la mayoría de las especies vegetales (alrededor de un 95%) tales como pteridófitas, coníferas y angiospermas, incluyendo

plantas de interés agrícola y forestal (Smith & Read, 1997), pero siendo las familias Chenopodiaceae y Cruciferae las excepciones de mayor importancia al no formar simbiosis (Francl, 1993). Aún cuando ambos tipos de micorrizas proporcionan funciones y beneficios muy similares hacia su hospedero, difieren fuertemente respecto al tipo de hongo involucrado, su morfología y sus aplicaciones potenciales en viveros forestales y en cultivos agrícolas.

Los hongos formadores de MA pertenecen a la clase Glomeromycetes y se caracterizan porque producen a lo largo de su ciclo de vida estructuras en el interior del tejido radical conocidas como arbúsculos (en todos los casos) y vesículas (en la mayoría de ellos). Los arbúsculos son las estructuras responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbiontes, realizada en la interfase planta-hongo y las vesículas son estructuras globosas e irregulares que actúan como órganos de reserva de lípidos (Francl, 1993).

Los HMA cumplen variadas funciones en la rizósfera, entre ellas, incrementan significativamente el volumen de suelo explorado por las raíces de las plantas (Kucey & Paul, 1983) en búsqueda de nutrientes (George *et al*., 1995) como N y aquellos de baja movilidad como P (Sylvia y Williams, 1992), Cu (Liu *et* al., 2000) y Zn (Ayling *et al*., 1997) y también, incrementando la absorción de agua (Ruiz-Lozano & Azcón, 1995). El vegetal contribuye con los fotosintatos requeridos por el hongo y a su vez recibe variados beneficios que contribuyen a mejorar la nutrición, crecimiento y supervivencia de las plantas de muchas formas. Además, es sabido que las micorrizas confieren a las plantas una mayor tolerancia a elementos fitotóxicos (Borie & Rubio, 1999; Medeiros *et al*., 1994a; b; Mendoza & Borie, 1998) y protección contra patógenos de las raíces (Hooker *et al*., 1994). Por otra parte, los HMA mejoran la estructura y estabilidad al agua de los agregados del suelo (Miller & Jastrow, 1992), los que son importantes para la conservación de las comunidades naturales. Las hifas extrarradicales aglutinan físicamente partículas del suelo y químicamente por liberación de glomalina, una glicoproteína insoluble producida sólo por los HMA, que contribuye junto con la actividad de otros microorganismos del suelo, a la unión de partículas y con ésto, a la formación de agregados (Wright & Upadhyaya, 1996; 1998). Estos agregados tienen dimensiones mayores (20-200 μm de diámetro) que las partículas originales favoreciendo la

formación de poros de mayor tamaño que retienen agua previniendo deficiencias de humedad alrededor de la raíz en las épocas secas y drenando eficientemente durante las épocas lluviosas (Wright & Upadhyaya, 1998). La respuesta de la planta podría deberse a un incremento en el área efectiva de la raíz, ampliando la zona de exploración y por lo tanto, mejorando la capacidad para captar agua y nutrientes, ya que el micelio extraradical actúa como una extensión natural del sistema radical explorando un mayor volumen de suelo y sirviendo de enlace directo entre las raíces y las reservas nutritivas del suelo (Gil, 1995).

Los propágulos de los HMA generalmente se encuentran concentrados en los primeros centímetros del suelo (Bellgard, 1993) y pueden sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales (Reeves, 1985) e incluso con cultivo de plantas no micotróficas, sobreviviendo como esporas inactivas, segmentos de hifas o de raíces colonizadas declinando con el tiempo su viabilidad (Jasper *et al*., 1993).

Los HMA forman esporas relativamente grandes (30-900 µm de diámetro) solitarias o en grupos y como fuente de inóculo son verdaderos órganos de resistencia que persisten por varios años permaneciendo inalteradas en el suelo, en diferentes edades, estados de dormancia y períodos de germinación (Smith & Read, 1997). Hart & Reader (2002) asociaron los grupos taxonómicos HMA con estrategias de colonización; por ejemplo, los *Glomus* spp. pequeños forman muchas infecciones individuales, mientras que Gigasporaceae tiende a formar micelios externos más largos (Wilson & Tommerup, 1992). Con escasas excepciones, las esporas pequeñas de *Glomus* se dispersan fácilmente, incluyendo la dispersión por el viento en regiones de estepas áridas (Allen *et al*., 1993). *Acaulospora, Scutellospora, Gigaspora* y algunas esporas grandes de *Glomus* se dispersan lentamente, principalmente por vectores animales (Capítulo 2; Tabla 2.1). Otro vector en el suelo es el agua que es un mecanismo de dispersión a largas distancias (Koske & Gemma, 1990). Así, se postuló que al mismo tiempo que plantas y animales migran usando diferentes vectores y debido a que la invasión está relacionada con el estatus sucesional, un proceso similar debería ocurrir para los HMA (Allen *et al.*, 1993).

La otra fuente de inóculo mediante la cual se colonizan las raíces de las plantas es el micelio fúngico extraradical y los fragmentos de raíces colonizadas, lo que ocurre principalmente en los cultivos anuales cuando dichas estructuras permanecen activas desde el cultivo previo (Sylvia, 1992). Sin embargo, a diferencia de las esporas, las hifas fúngicas colapsan tras una permanencia en el suelo de 2 a 4 semanas, si no encuentran una raíz hospedera (Bolan & Abbott, 1983).

De todos los factores en áreas con fines productivos (cultivos) que influyen sobre la dinámica de las comunidades de HMA y su asociación con las plantas, los más importantes son las prácticas agrícolas. Así, el laboreo del suelo o largos períodos de barbecho, como también secuencias de rotación de cultivos incluyendo plantas hospederas y no hospederas afectan el desarrollo, la actividad y diversidad de los HMA (Douds & Millner, 1999; Galvez *et al*., 2001; Jansa *et al*., 2003¸ Oehl *et al*., 2003; 2004; 2005).

El período de barbecho reduce la incidencia de la micorrización, porque la multiplicación de los hongos requiere la presencia de plantas vivas, lo que puede conducir a una disminución de la colonización radical del cultivo siguiente (Kucey & Paul, 1983). Además, el cultivo precedente influye sobre la nutrición fosfatada, por tanto también causa un efecto sobre la dinámica y diversidad de los HMA (Johnson *et al*., 1991a).

El laboreo del suelo puede afectar la colonización de las raíces (McGonigle *et al*., 1990) con la consiguiente absorción de agua y nutrientes. Numerosas investigaciones sustentan la hipótesis de una relación causal entre una alteración del suelo y un crecimiento irregular de las plantas debido a una reducción en la efectividad micorrízica (Fairchild & Miller, 1990). Por otra parte, la red de micelio extrarradical que se extiende varios centímetros alrededor de la raíz es una fuente importante de inóculo para el cultivo siguiente en la rotación. El rompimiento e inversión del suelo provocado por el arado utilizado en LC es un mecanismo que destruye el micelio extrarradical reduciendo el número de propágulos infectivos (Evans & Miller, 1988) produciendo una disminución en la colonización de las raíces y absorción de P para el cultivo siguiente. Además, como hifas, esporas y fragmentos de raíces colonizadas son transportadas a

la capa superficial por la inversión del suelo, se produce una dilución y disminución de su actividad como propágulos viables para el cultivo posterior. Lo opuesto ocurre bajo cero o mínima labranza, ya que el micelio extrarradical permanece intacto desde la estación de crecimiento previa y puede servir como fuente de inóculo para colonizar las raíces de las plántulas. Como resultado, se incrementa la captación de nutrientes por el cultivo (McGonigle & Miller, 1996) a través de un aumento en la colonización (Kabir *et al*., 1997) y mejoramiento en las actividades enzimáticas tales como fosfatasas y arilsulfatasas de las raíces (Deng & Tabatabai, 1997).

En Chile, los suelos volcánicos ocupan más de 5 millones de ha y se caracterizan por poseer una alta capacidad de retención de P lo que requiere la aplicación anual de fertilizantes fosfatados, que se acumulan bajo formas no disponibles (Borie & Zunino, 1983). Durante décadas, en la mayoría de los suelos arables se utilizaron métodos de labranza intensivos pero, en la actualidad están siendo reemplazados por manejos conservacionistas; además, por razones económicas se ha reemplazado la tradicional secuencia de rotación larga de cinco años (dos años de pradera seguida por tres años de cultivos anuales *Avena sativa-L. albus-T. aestivum*), por una secuencia de rotación corta de dos años.

Lo anterior, conlleva a la utilización de prácticas culturales eficientes que incluyan un manejo integrado del cultivo, considerando dentro de las variables, el rol que cumplen los microorganismos simbiontes que ocupan nichos ecológicos en el ecosistema del cultivo, incidiendo favorablemente en el crecimiento de la planta y condición fitosanitaria (Azcón & Barea, 1997).

En el país, existen escasos antecedentes sobre el efecto producido por los sistemas de labranza y secuencias de rotación sobre la actividad y desarrollo de los propágulos micorrízicos. Por tanto, se podría inferir que la LC afecta a los HMA produciendo una disminución de los propágulos existentes en los agroecosistemas especialmente, densidad de esporas y micelio extrarradical, en comparación con los sistemas de labranza conservacionista. Estos propágulos

fúngicos estarían concentrados en el horizonte superficial (0-5 cm) del suelo siendo además, afectados por el establecimiento de un cultivo no micotrófico, como *L. albus,* en la rotación.

Por consiguiente, el objetivo de esta investigación es comparar el efecto temprano del sistema de manejo (CL y LC) sobre el número y diversidad de propágulos micorrízicos en el perfil de suelo, en un ensayo de campo con secuencia de rotación corta de dos años con hospederos continuos y discontinuos en un Ultisol típico del centro sur de Chile.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Ensayo en campo

Para cuantificar las variaciones estacionales de los propágulos de HMA nativos se estudió un ensayo de campo iniciado en el año 2001 (barbecho 2002, 2003, 2004 y floración 2002, 2003) el cual consistió en una rotación corta de dos años con una secuencia de hospederos continuos avena (*Avena sativa* L.) cv. Nehuen-INIA con *T. aestivum* cv. Kumpa-INIA y hospederos discontinuos *L. albus* cv. Rumbo con *T. aestivum* cv. Kumpa-INIA cultivados bajo LC y CL (Figura 3.2). El experimento está localizado en el sector Pumalal, cercano a Temuco (38º40'15''S; 72º31'00''O). El suelo es un mesic Palehumult con material parental derivado de cenizas volcánicas perteneciente a un Ultisol con pendientes entre 4-15%. El clima del área de estudio presenta temperaturas medias anuales de 14,5ºC. Las precipitaciones medias anuales fluctúan entre 1200-1500 mm, con un promedio en primavera de 250-300 mm y de 300-400 mm, en otoño. Al establecimiento del ensayo la caracterización química del suelo inicial fue la siguiente: pH = 5,5; MO = 8,95%; P-Olsen = 8 mg $kg^{-1}$; P total = 2310 mg $kg^{-1}$; P-orgánico = 895 mg $kg^{-1}$; C orgánico total = 4,8%; N orgánico total = 0,41%, S orgánico total = 0,074%. El diseño experimental correspondió a un bloque dividido en franjas con 4 repeticiones, donde la parcela principal fue el sistema de labranza del suelo: a) CL: donde no hubo laboreo y la siembra del cultivo se realizó sobre un barbecho con manejo de 3 Mg $ha^{-1}$ de residuos hasta la próxima estación y b) LC: con quema de rastrojos al final del período de barbecho del verano y remoción con arado a una profundidad de 20 cm. Todas las operaciones realizadas con maquinaria se efectuaron a lo largo de las parcelas correspondientes al bloque

principal. La subparcela fue la rotación, *T. aestivum-A. sativa-T. aestivum* y *T. aestivum-L. albus-T. aestivum*.

| Año | 2001 | | | 2002 | | | | 2003 | | | | 2004 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Estación | | Ver | | Ot | Inv | Prim | Ver | Ot | Inv | Prim | Ver | Ot | Inv |
| Cultivo | *A. sativa/ L. albus* | | | | *T. aestivum* | | | | *A. sativa/ L. albus* | | | *T. aestivum* | |

**Figura 3.2.** Rotación de cultivo en un Ultisol bajo CL y LC, Temuco, Centro-sur de Chile (Ver: verano; Ot: otoño; Inv: invierno; Prim: primavera).

En CL, el barbecho químico consistió en la aplicación (a comienzo de otoño) de 900 g $ha^{-1}$ de glifosato i.a. con 200 L $ha^{-1}$ de agua. El *T aestivum* se fertilizó con 150 kg de N $ha^{-1}$ en forma de urea, 90 kg de P $ha^{-1}$ como superfosfato triple (SFT) y 125 kg de K $ha^{-1}$ a la forma de Sulpomag$^{TM}$ y 600 kg $ha^{-1}$de $CaCO_3$. La *A. sativa* fue fertilizada con 120 kg de N $ha^{-1}$ como urea, 80 kg de P $ha^{-1}$ como SFT, 100 kg de K $ha^{-1}$ a la forma de Sulpomag$^{TM}$ y 600 kg $ha^{-1}$de $CaCO_3$. El 30% del N con los otros nutrientes fueron aplicados a la siembra junto con la semilla y el 70% restante del N, fue aplicado al final de la macolla.

### 3.2.2 Muestreo del suelo

Las muestras de suelo fueron recolectadas a una profundidad de 0-10 cm, desde parcelas de 30 $m^2$ (10m x 3m) durante los períodos de barbecho en abril 2002, 2003, 2004 después de *A. sativa-T. aestivum-A. sativa* y *L. albus-T. aestivum-L. albus* y durante la primavera de octubre 2002 y 2003 cuando *T. aestivum* y *A. sativa-L. albus* se encontraban en floración. En estas estaciones también se muestrearon raíces de *T. aestivum* y *A. sativa* para observar la colonización por HMA. Cada muestra de suelo estaba compuesta de 8 submuestras con 4 repeticiones. Las muestras de suelo se transportaron al laboratorio en bolsas plásticas y se almacenaron a 4ºC, para posterior análisis de parámetros físicos, químicos, biológicos y propágulos de HMA.

Durante el período de barbecho en abril 2004 (después de *A. sativa-L. albus*), muestras de suelo se recolectaron desde parcelas de 30 $m^2$ (10m x 3m) a tres profundidades 0-5 cm, 0-10

cm y 10-20 cm, para poder estudiar los propágulos HMA en profundidad. Cada muestra de suelo también estaba compuesta de 8 submuestras con 4 repeticiones como en los muestreos anteriores.

### 3.2.3 Parámetros del suelo

El pH del suelo se determinó potenciométricamente mediante una suspensión suelo:agua en relación 1:2,5. El P disponible se analizó mediante extracción a pH 8,5 con una solución de $NaHCO_3$ 0,5 M (Olsen & Sommers, 1982). El P total se realizó según metodología propuesta por Dick & Tabatabai (1977). El contenido de MO se midió de acuerdo a metodología de Walkley & Black (1934) y el C, N, S se determinó por combustión seca en el Analizador VARIO/EL. . La densidad del suelo se realizó usando el método del cilindro y el contenido de humedad se determinó gravimétricamente después de secar el suelo a 105º C por 24 h en estufa (Steubing et al., 2002).

### 3.2.4 Parámetros biológicos

La actividad fosfatásica (E.C.3.1.3.2 fosfomonoesterasa) asociada con el suelo se determinó usando *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFF) de acuerdo al procedimiento descrito por Tabatabai & Bremner (1969) con modificaciones informadas por Rubio *et al*. (1990) para suelos volcánicos con altos contenidos de MO. Así, muestras de 1 g de suelo se incubaron con 1 mL de *p*-NFF 50 mM más 4 mL de buffer Tris 0,1 M pH 5,5 durante 1 h a 20ºC en oscuridad. Al término del período de incubación se añadió 1 mL de $CaCl_2$ 0,5 M y los contenidos se filtraron recibiéndose sobre 4 mL de solución de NaOH 0,5 M. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 2500 g por 10 min y la cantidad de *p*-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a 400 nm.

### 3.2.5 Parámetros del HMA

#### *3.2.5.1 Colonización*

Para calcular el porcentaje de colonización por HMA se utilizó el método del intercepto de líneas (Tennant, 1975) luego que trozos de 1 cm de raíces se tiñeron con azul de tripán al

0,05% (Phillips & Hayman, 1970) para observación de las estructuras fúngicas constituidas por arbúsculos, micelio y en algunos casos, esporas.

#### *3.2.5.2 Esporas*

Las esporas de HMA se extrajeron desde el suelo usando el método del tamizado húmedo y decantación con posterior separación en gradiente de sacarosa al 70% descrito por Sieverding (1991). Para su cuantificación después de aisladas se transfirieron a una placa de Doncaster y bajo un estereomicroscopio se observaron los distintos morfotipos que fueron separados y montados sobre portaobjetos conteniendo alcohol polivinílico en lactoglicerol (PVLG) (Koske & Tessier, 1983) y reactivo de Melzer (Brundrett *et al*., 1994); simultáneamente, se tomaron fotografías digitales de las esporas en PVLG y/o PVLG más reactivo de Melzer. Para su identificación se utilizaron características morfológicas como: diámetro de la espora que fue medido con un micrómetro ocular; color de acuerdo a la carta de colores impresa por INVAM (Colección Internacional de Cultivo de HMA, ver página Internet: www.invam.caf.wvu.edu), número y forma de las paredes y unión hifal. Todas estas propiedades morfológicas se estudiaron bajo un microscopio con aumento de 100x y 400x siguiendo para la identificación de las distintas especies las instrucciones dadas por Schenck & Pérez (1990) y el INVAM (Morgantown).

#### *3.2.5.3 Longitud de micelio total*

La longitud de micelio total se determinó de acuerdo a la técnica de Rubio *et al*. (2003) para suelos ácidos derivados de cenizas volcánicas. Muestras de 3 g de suelo se mezclaron con 100 mL de una mezcla de glicerina:HCl:agua en proporción de 12:1:7 y se agitaron por 30 min a 80ºC. La suspensión se filtró a través de tamices de malla 250 y 38 µm. El material que quedó retenido en el tamiz de 38 µm se arrastró con agua destilada y se completó a un volumen de 100 mL; la suspensión se agitó por 1 min y se dejó reposar por 30 s. Finalmente, una alícuota de 3 mL del sobrenadante se transfirió a un filtro de membrana (tamaño poro = 0,45 µm; diámetro = 47 mm; intervalo de línea 3 mm) conectado a un sistema de vacío y se tiñó durante 10 min con azul de tripán al 0,05%. Para la cuantificación se utilizó el método del intercepto de líneas (Giovannetti & Mosse, 1980).

#### *3.2.5.4 Densidad de hifas metabólicamente activas*

De los 100 mL de suspensión obtenidos en 3.2.5.3 se midió una nueva alícuota de 3 mL y se tiñó con una solución que contenía partes iguales de iodonitrotetrazolio (INT), adenina nicotinamida dinucleótido reducida (NADH) y buffer Tris pH 7,4 (Kabir *et al*., 1997). Existen opiniones contrarias para distinguir el micelio HMA de otros micelios desde muestras recolectadas en el campo. En este trabajo se aplicó el criterio utilizado por Rillig *et al*., (2002) basado en el crecimiento dicotómico que presentan sus hifas no septadas.

### 3.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los parámetros fúngicos se correlacionaron entre ellos y con algunos parámetros del suelo ya sea, considerando sólo el tipo de labranza, la rotación de cultivo o ambos en conjunto usando el programa JMP 5.01. Todos los datos presentados corresponden a la media sin transformar de 4 repeticiones con el error estándar.

Los resultados obtenidos por efecto del manejo y rotación de cultivos en profundidad (0-5 cm, 0-10 cm, 10-20 cm) corresponden a la media de tres repeticiones de datos sin transformar, a los cuales se les realizó análisis ANOVA de una vía y posterior prueba de rango múltiple de Tukey. Diferencias con $P \leq 0,05$ se consideraron significativas.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Efecto del manejo y rotación de cultivos con hospederos continuos

#### 3.3.1.1 *Propágulos de HMA*

En las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5 se observan los resultados obtenidos en los muestreos de suelo realizados desde el año 2002 hasta el 2004, para los propágulos del HMA constituidos por longitud de micelio total y longitud de hifas metabólicamente activas, el número de esporas y porcentaje de colonización de raíces, tanto en *T. aestivum* como *A. sativa* y bajo CL o LC.

En la densidad de micelio total, se observaron diferencias significativas al comparar los valores obtenidos en el año 2002, con los obtenidos en los años 2003 y 2004 (Figura 3.3).

Después de la siembra del 2001 con *A. sativa*, durante el barbecho de 2002, en LC se obtuvieron más de 9 m $cm^{-3}$ de micelio, en comparación con los 6,4 m $cm^{-3}$ obtenidos en CL. En octubre del 2002, no se encontraron diferencias entre los dos sistemas de labranza alcanzando el micelio una longitud de alrededor de 4 m $cm^{-3}$. Durante los períodos en barbecho de los años 2003 y 2004, después de *A. sativa* o *T. aestivum* como precultivo, no se observaron diferencias en la longitud hifal, la que alcanzó una extensión comprendida entre 2,2 a 2,7 m $cm^{-3}$. Al comparar los sistemas de labranza, entre CL y LC, no se encontraron diferencias en la longitud micelial.

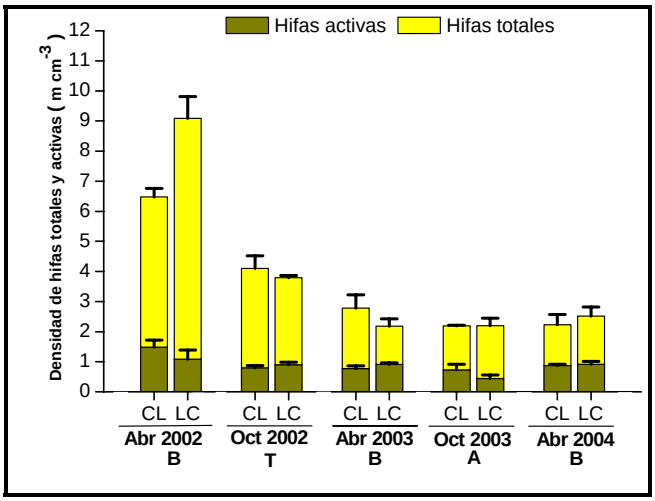


**Figura 3.3.** Densidad de micelio total y activo afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

Con respecto al micelio metabólicamente activo, fue mayor durante el barbecho 2002 con CL, representando un 23% de la longitud total. Durante los distintos muestreos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las hifas activas, con valores que fluctuaron entre 0,5 a 0,9 m $cm^{-3}$ y que representan entre un 20-35% de la longitud total (Figura 3.3). Aunque a través del tiempo, no se encontró un efecto notorio del cultivo o del sistema de labranza sobre la longitud de micelio, lo que sí se observó es que la proporción de hifas viables o metabólicamente activas aumentaron con el tiempo, desde el año 2002 al 2003 (Figura 3.4.A).

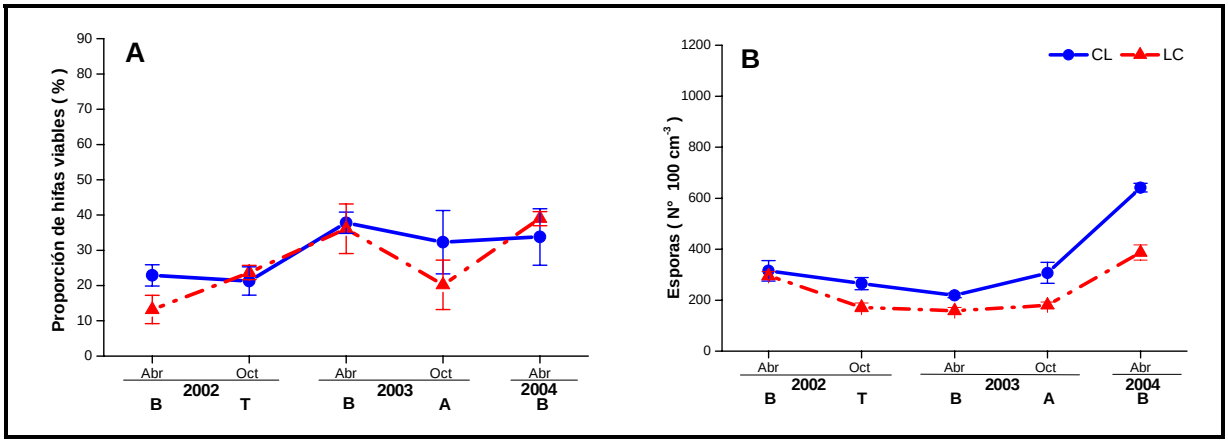


**Figura 3.4.** Proporción de hifas viables (A) y esporas de HMA (B) afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro-sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

El número de esporas fue afectado por los cultivos así como también, por el sistema de laboreo. Al comienzo de este estudio, alcanzó alrededor de 300 unidades por 100 $cm^3$ en ambos sistemas de labranza. En octubre del 2002 durante la época de floración del *T. aestivum*, las esporas disminuyeron en los dos tratamientos, siendo significativamente mayor el descenso con LC que CL (182 versus 280 esporas por 100 $cm^3$). El número de esporas permaneció casi constante hasta el barbecho del año 2003, luego tuvo un gran incremento con cultivo de *A. sativa* después de octubre del mismo año (641 esporas por 100 $cm^3$ con CL, contra 328 esporas bajo LC). Durante este muestreo y en los siguientes se encontraron más esporas bajo CL que en la LC (Figura 3.4.B). En promedio bajo CL durante un ciclo de la rotación de dos años, se encontraron 349 esporas por 100 $cm^3$, comparadas con la LC donde sólo se contabilizaron 238 esporas por 100 $cm^3$.

La colonización de las raíces por HMA fue significativamente mayor en CL que en la LC. Durante el período de floración del *T. aestivum* en el año 2002, las raíces bajo CL estuvieron colonizadas con un 32%, comparado con el 15% que presentó la LC. Después de un ciclo de rotación, las raíces aumentaron a un 40% y un 28% con CL y LC, respectivamente, contribuyendo de esta manera la colonización con un importante incremento en el potencial de propágulos infectivos de HMA para el cultivo siguiente. Los mayores porcentajes se

obtuvieron bajo CL durante la floración de *A. sativa* en 2003, alcanzando un 57,2% de colonización en comparación con un 48% bajo LC al final del ciclo de la rotación (Figura 3.5).

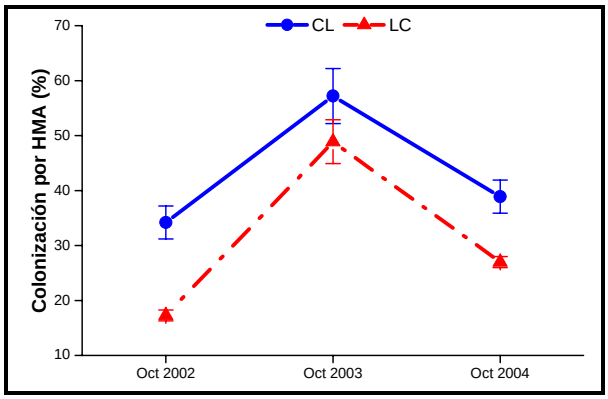


**Figura 3.5.** Porcentaje de colonización por HMA en raíces de cultivos, afectado por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de octubre (Oct) corresponde al suelo con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

En el recuento de esporas realizado en el Ultisol, se pudieron identificar 22 especies de HMA pertenecientes a 7 géneros que incluyeron: *Acaulospora, Archaeospora, Diversispora, Entrophospora, Glomus, Pacispora* y *Scutellospora* (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Tipos de esporas de HMA observadas en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile.

| Género | Especie |
|---|---|
| *Acaulospora* | *A. colossica P.A.*Schultz, Bever & J.B.Morton |
| | *A. dilatata* J.B.Morton |
| | *A. koskei* Blaszk. |
| | *A. laevis* Gerd & Trappe |
| | *Acaulospora* sp. morfotipo I |
| | *Acaulospora* sp. morfotipo II |
| *Archaeospora* J.B.Morton & Redecker | *Archaeospora* sp. morfotipo I |
| *Diversispora* C.Walker & Schussler | *Diversispora spurca* (C.M.Pfeiff., C.Walker & Bloss emend. Kennedy, Stutz & J.B.Morton) C.Walker & Schussler |
| *Entrophospora* Ames & Schneid. | *E. schenckii* Sieverd. & S.Toro |
| *Glomus* Tul. & C.Tul. | *G. coronatum* Giovann. |
| | *G. diaphanum* J.B.Morton & C.Walker |
| | *G. etunicatum* W.N.Becker & Gerd. |
| | *G. intraradices* N.C.Schenck & G.S.Sm. |
| | *G. macrocarpum* Tul. & C.Tul. |
| | *G. rubiforme* (Gerd. & Trappe) R.T.Almeida & N.C.Schenck |
| | *Glomus* sp. morfotipo I |
| | *Glomus* sp. morfotipo II |
| *Pacispora* Oehl & Sieverd. | *Pacispora dominikii* (Blaszk.) Oehl & Sieverd. |
| *Scutellospora* (Trappe & Gerd.) | *S. calospora* (T.H.Nicolson & Gerd.) C.Walker & F.E.Sanders Walker & Sanders |
| | *Scutellospora* sp. morfotipo I |
| | *Scutellospora* sp. morfotipo II |
| | *Scutellospora* sp. morfotipo III |

Ocho morfotipos no pudieron ser clasificados a nivel de especie, pero fueron claramente diferenciados de acuerdo a su morfología y serán tratados en estudios posteriores, como potenciales nuevas especies. Los géneros más abundantes fueron *Glomus* y *Acaulospora* con 8 y 6 especies respectivamente, seguida por *Scutellospora* con 4 especies, mientras que de los otros géneros sólo se encontró una especie para cada uno.

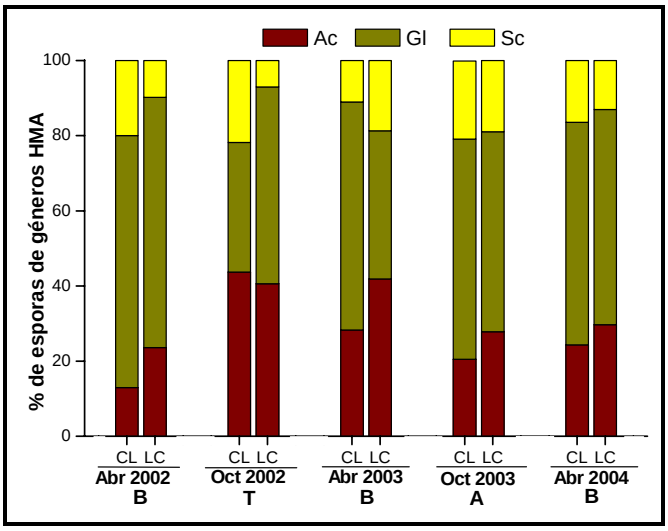


**Figura 3.6.** Proporción de esporas de HMA pertenecientes a los géneros *Acaulospora* (Ac), *Glomus* (Gl) y *Scutellospora* (Sc) afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo.

La mayor densidad de esporas correspondió a los géneros *Glomus, Acaulospora* y *Scutellospora* spp. Al comienzo del ensayo, las esporas pertenecientes al género *Glomus* representaron aproximadamente un 65% del número total en ambos cultivos. Sin embargo, después de *T. aestivum*, las esporas del género *Acaulospora* spp. incrementaron sobre un 42% a expensas de las esporas de *Glomus* spp. Cuando se utilizó *A. sativa* como cultivo, el porcentaje relativo de *Glomus* aumentó con una disminución consecuente en la proporción de *Acaulospora* (Figura 3.6).

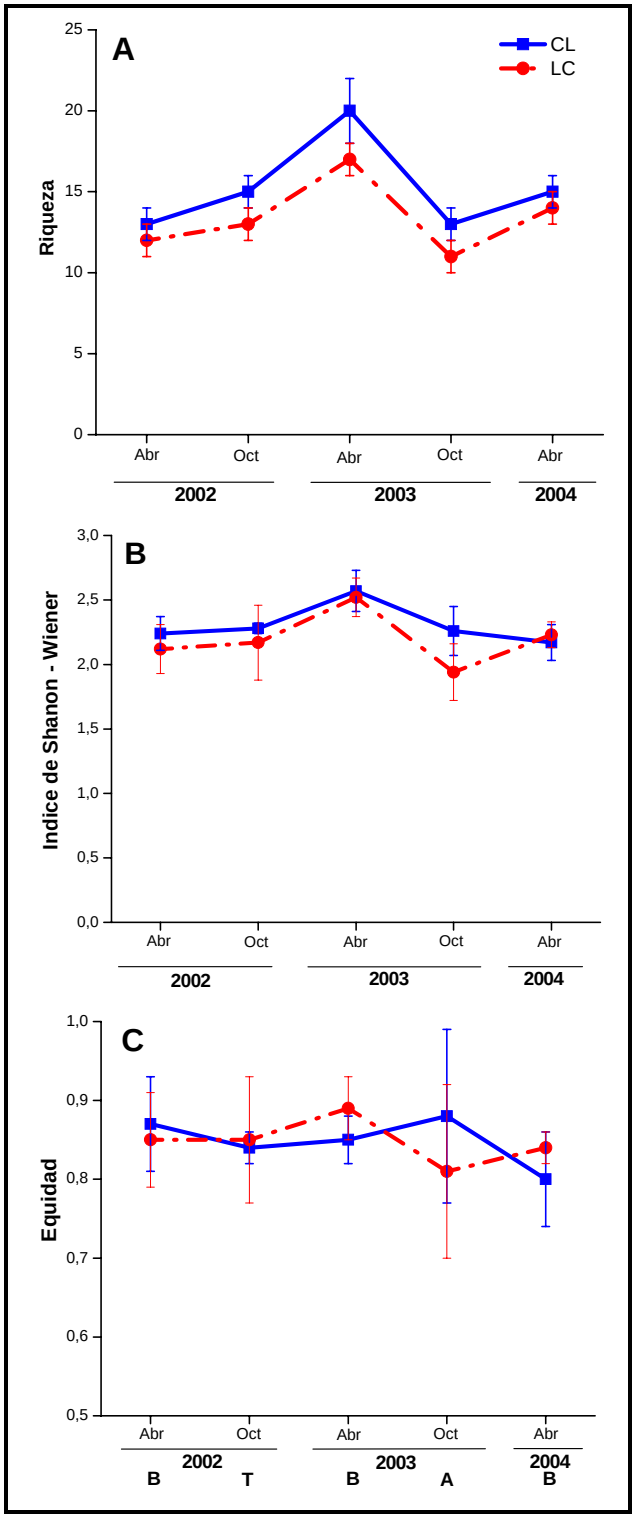


**Figura 3.7.** Diversidad de poblaciones de HMA: riqueza (A), índice de Shannon-Wiener (B) y equidad (C) afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

Resulta interesante observar que existe una tendencia a un aumento relativo de esporas de *Acaulospora* spp. en la LC; mientras que, la CL produjo un efecto positivo sobre la cantidad de esporas de *Scutellospora* spp., especialmente el 2002.

Durante todo el ciclo de la rotación, con CL se encontró una alta riqueza de morfotipos de HMA comparado con la LC, no observándose grandes diferencias cuando se utilizó como precultivo *T. aestivum* o *A. sativa* (Figura 3.7A). Sin embargo, la máxima riqueza de especies de HMA se obtuvo después de la cosecha de *T. aestivum*, en barbecho del 2003, con 20 morfotipos encontrados en CL en comparación con 17 de la LC. La equidad fluctuó entre 0,80 a 0,89 (Figura 3.7.C).

En barbecho del 2003 con LC, se alcanzó una mayor equidad fúngica; mientras que, con CL la máxima equidad se logró en octubre del 2003, con cultivo de *A. sativa*. La diversidad de especies de HMA, representadas por el índice H', siempre fue mayor en CL que en la LC, con valores comprendidos entre 1,94 a 2,54 (Figura 3.7.B); así, la mayor diversidad se alcanzó durante el barbecho del 2003, coincidiendo con la mayor riqueza de especies. Pareciera ser que, por el corto período de evaluación del ensayo, no se observó un efecto notorio del sistema de laboreo o del cultivo sobre la diversidad de las comunidades fúngicas.

#### *3.3.1.2. Parámetros del suelo*

Durante el primer año, la humedad del suelo disminuyó rápidamente bajo CL en comparación con la LC, recuperándose para ambos sistemas de manejo al final del segundo año de muestreo (Figura 3.8.A).

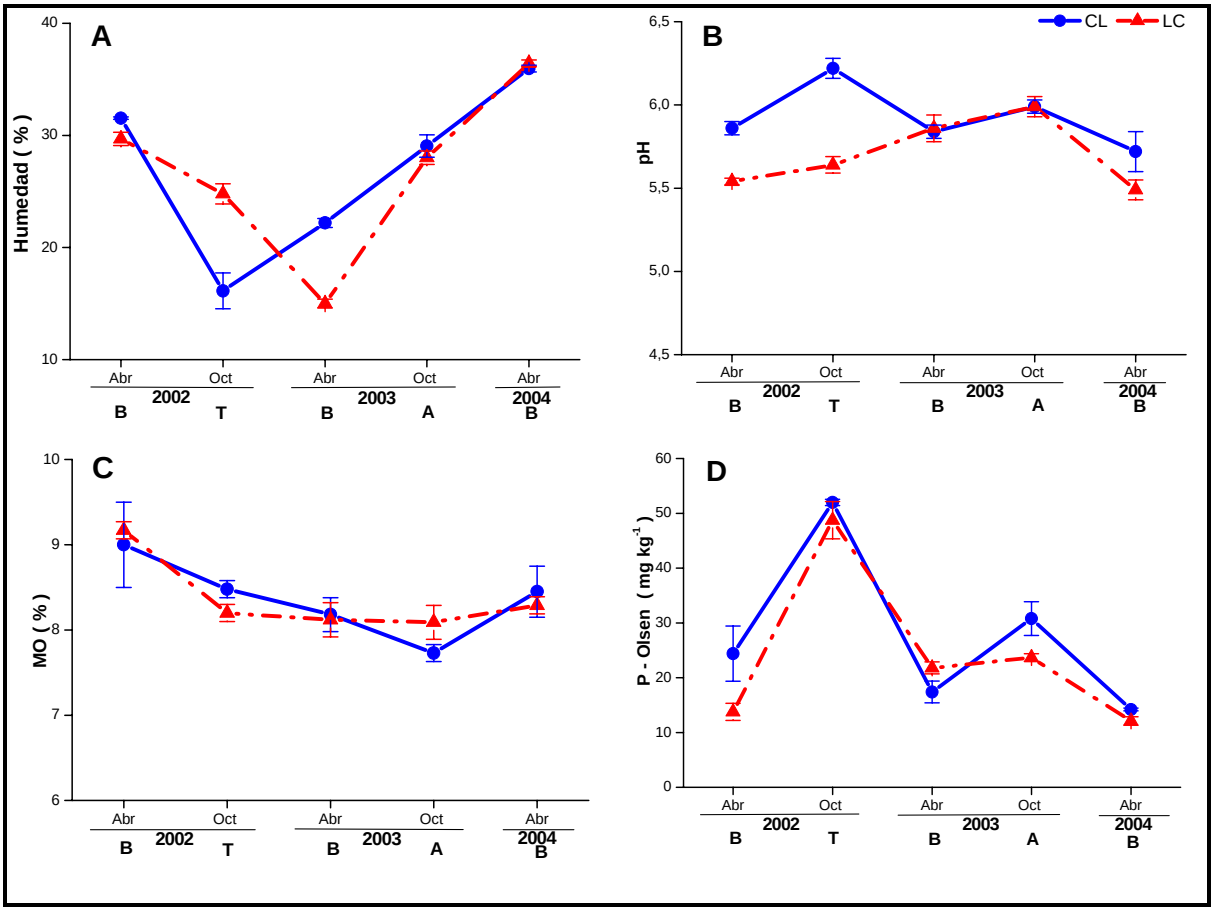


**Figura 3.8.** Parámetros del suelo: humedad (A), pH (B), materia orgánica (C) y P-Olsen (D), afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

El pH del suelo en el primer año registró 0,5 unidades más en CL comparado con la LC, igualándose a pH 5,5 a 5,8 en el segundo año (Figura 3.8.B). El contenido de MO disminuyó levemente durante los dos años del ensayo desde el 2002 al 2004, no encontrándose diferencias significativas entre el comienzo y el final del ciclo, o entre sistemas de cultivos (Figura 3.8.C); la disponibilidad de P, tuvo similar comportamiento no encontrándose mayores diferencias en los niveles en ambos sistemas de manejo; sin embargo, en floración se obtuvieron mayores contenidos que en la etapa barbecho, donde los más altos valores se registraron durante el primer año cuando *T. aestivum* fue precultivo (Figura 3.8.D).

La actividad fosfatásica siempre fue superior bajo CL que en la LC, excepto cuando el *T. aestivum* se encontraba en floración, donde la P-asa alcanzó su mayor valor, no encontrándose diferencias entre los sistemas de labranza (Figura 3.9). En general, al final del ciclo de los dos

años, en CL los niveles de enzima liberados fueron mayores que al comienzo del ensayo, pero no presentando diferencias con la LC.

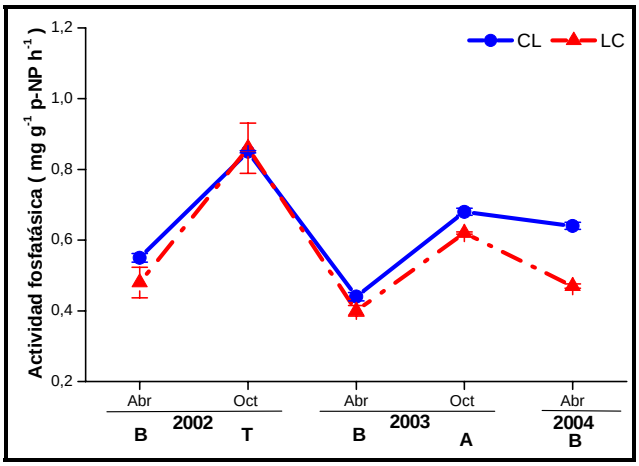


**Figura 3.9.** Actividad fosfatásica afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

### *3.3.1.3. Correlaciones entre propágulos de HMA y algunos parámetros del suelo*

Correlaciones positivas se encontraron entre el número de esporas de los HMA y algunas características del suelo para cada sistema de manejo. Así, con LC correlacionaron estrechamente las esporas con el porcentaje de humedad del suelo, pH, contenido de MO y P Olsen (Tabla 3.2). La excepción ocurrió bajo CL donde no hubo correlación entre el número de esporas con la MO. Cuando los períodos de barbecho y floración se consideraron individualmente, se encontró una fuerte correlación positiva entre el número de esporas con la humedad del suelo y con la actividad fosfatásica. Sin embargo, cuando la rotación, el sistema de manejo y la época se consideraron en conjunto, solamente se obtuvo una correlación entre el número de esporas y la humedad.

**Tabla 3.2.** Coeficiente de correlación lineal (r)* entre propágulos de HMA y parámetros de un suelo afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile (** Significativo P≤ 0.01; *Significativo P≤ 0.05).

| Correlación | Manejo | | Estación | | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| | CL | LC | Cultivo | Barbecho | |
| Esporas vs humedad (%) | 0.75** | 0.86** | -0.07 | 0.79** | 0.67** |
| Esporas vs pH | -0.74** | -0.61** | 0.53* | -0.20 | -0.16 |
| Esporas vs M.O (%) | 0.12 | 0.56** | 0.20 | 0.08 | 0.40* |
| Esporas vs P | -0.74** | -0.74** | -0.05 | -0.23 | -0.38 |
| Esporas vs P-asa | -0.74** | -0.73** | -0.06 | 0.89** | -0.07 |
| Hifas activas vs P-asa | -0.51* | 0.31 | 0.69** | 0.32 | -0.08 |
| Hifas activas vs hifas totales | 0.69** | 0.52* | 0.42 | 0.48 | 0.50** |
| Humedad (%) vs P | -0.95** | -0.76** | -0.77* | -0.44 | -0.53** |
| Humedad (%) vs pH | -0.84** | -0.46* | -0.46 | -0.52* | -0.54** |
| N | 15 | 15 | 12 | 18 | 30 |

## 3.3.2. Efecto del manejo y rotación de cultivos con hospedero discontinuo

### *3.3.2.1. Propágulos de HMA*

En las Figuras 3.10, 3.11 y 3.12 se muestran los resultados obtenidos desde el año 2002 hasta el 2004, para los propágulos de los HMA constituidos por longitud de micelio total y longitud de hifas metabólicamente activas, número de esporas y porcentaje de colonización de raíces tanto en *T. aestivum* como *L. albus*, bajo CL o LC.

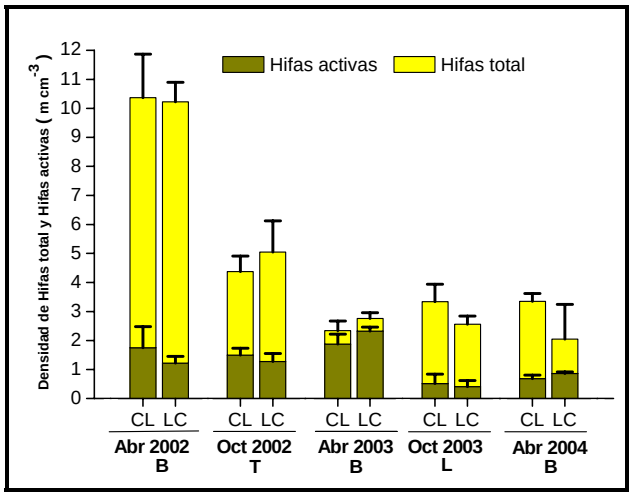


**Figura 3.10.** Densidad de micelio total y activo afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)- *L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

Al comparar los sistemas de labranza, entre CL y LC, no se encontraron diferencias en la densidad de hifas. En el micelio total, se observaron grandes diferencias al comparar los valores obtenidos en el año 2002, con los obtenidos en los años 2003 y 2004 (Figura 3.10); después de la siembra del 2001 con *L. albus*, durante el barbecho de 2002, se obtuvieron más de 10 m $cm^{-3}$ de micelio, en comparación con alrededor de 3 m $cm^{-3}$ obtenidos en barbecho 2003 y 2004. Al final del ensayo, se obtuvo la menor longitud de hifas con precultivo *L. albus* en LC.

Con respecto al micelio metabólicamente activo, fue mayor durante barbecho 2003 proveniente de precultivo *T. aestivum*. La menor cantidad de hifas activas se obtuvo con cultivo de *L. albus* (Figura 3.10); mientras que, a través del tiempo, no hubo un efecto notorio del sistema de labranza. Lo que sí se puede observar es la gran proporción de hifas viables o metabólicamente activas que permanecieron en el suelo en barbecho después de *T. aestivum*, es decir, con un hospedero micorrizable (Figura 3.11A).

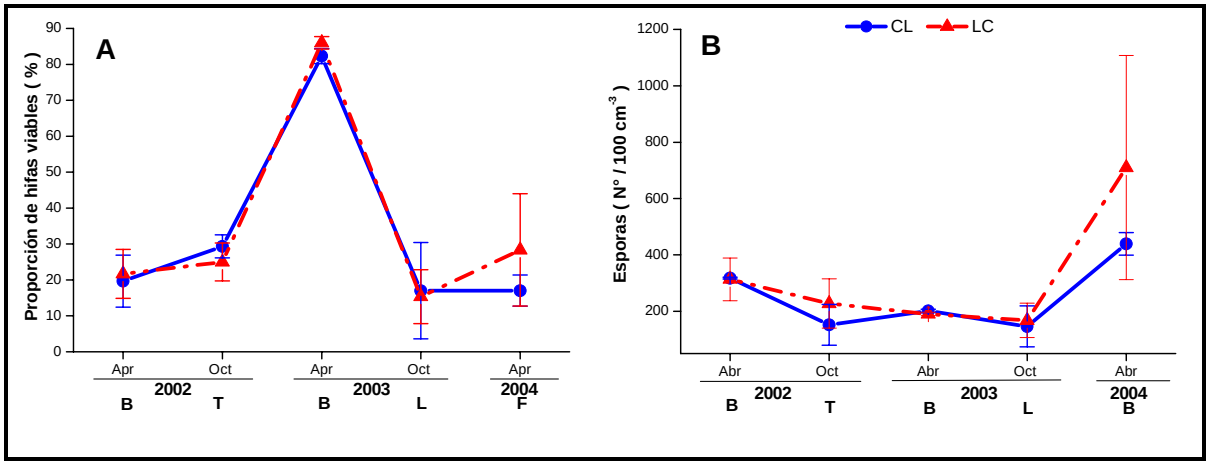


**Figura 3.11.** Proporción de hifas viables (A) y esporas de HMA (B) afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

El número de esporas no fue afectado por el cultivo o sistema de laboreo. Al comienzo del estudio, se encontraban en un número de alrededor de 300 esporas por 100 $cm^3$ en ambos sistemas de labranza. En octubre del 2002 durante la época de floración del *T. aestivum*, las

esporas disminuyeron en los dos tratamientos. El número de esporas permaneció casi constante hasta floración del 2003, luego tuvieron un gran incremento al final del ensayo (400 esporas por 100 $cm^3$ con CL y 700 esporas por 100 $cm^3$ bajo LC).

Durante el período de floración del *T. aestivum* en el año 2002, la colonización de las raíces por HMA fue significativamente mayor en CL que en la LC, con un incremento de un 58%. En este acápite además se incluyeron los resultados de colonización de *T. aestivum* correspondiente a octubre del 2004; se pudo observar que en LC los propágulos micorrízicos aumentaron levemente, pero en CL disminuyeron, no presentando diferencias significativas por el manejo.

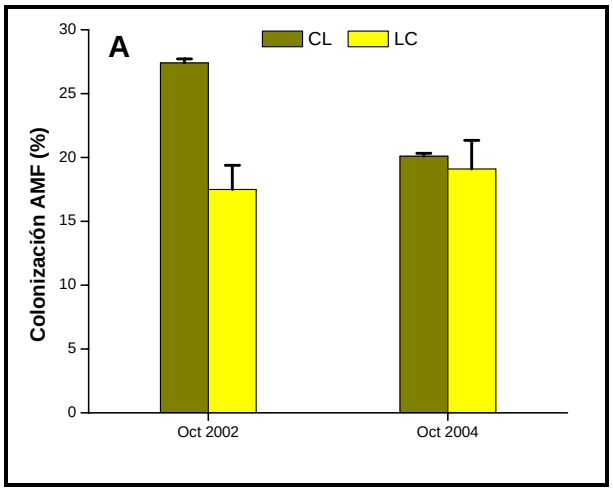


**Figura 3.12.** Porcentaje de colonización por HMA en raíces afectado por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)- *L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de octubre (Oct) corresponde al suelo con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

### *3.3.2.2. Parámetros del suelo*

Durante el primer año, la humedad del suelo disminuyó rápidamente bajo CL en comparación con la LC, recuperándose para ambos sistemas de manejo al final del segundo año de muestreo (Figura 3.13A). El pH del suelo al comienzo en barbecho fue igual, pero durante la floración del primer año registró una diferencia de una unidad más de pH en CL comparado con la LC, igualándose nuevamente en barbecho del segundo año a pH 5,6 (Figura 3.13B). El contenido de MO, en general, disminuyó durante los dos años desde abril 2002 a octubre 2003 en los dos

sistemas de manejo, excepto al final del ensayo, donde experimentó una importante elevación, no presentándose diferencias significativas entre sistemas de labranza en barbecho 2003 (Figura 3.13C). La disponibilidad de P, tuvo un comportamiento similar entre los tratamientos, encontrándose diferencias sólo en barbecho después de *T. aestivum*. En floración, se obtuvieron mayores contenidos de P disponible que en barbecho, registrándose los más altos valores durante el primer año, cuando *T. aestivum* fue precultivo (Figura 3.13D).

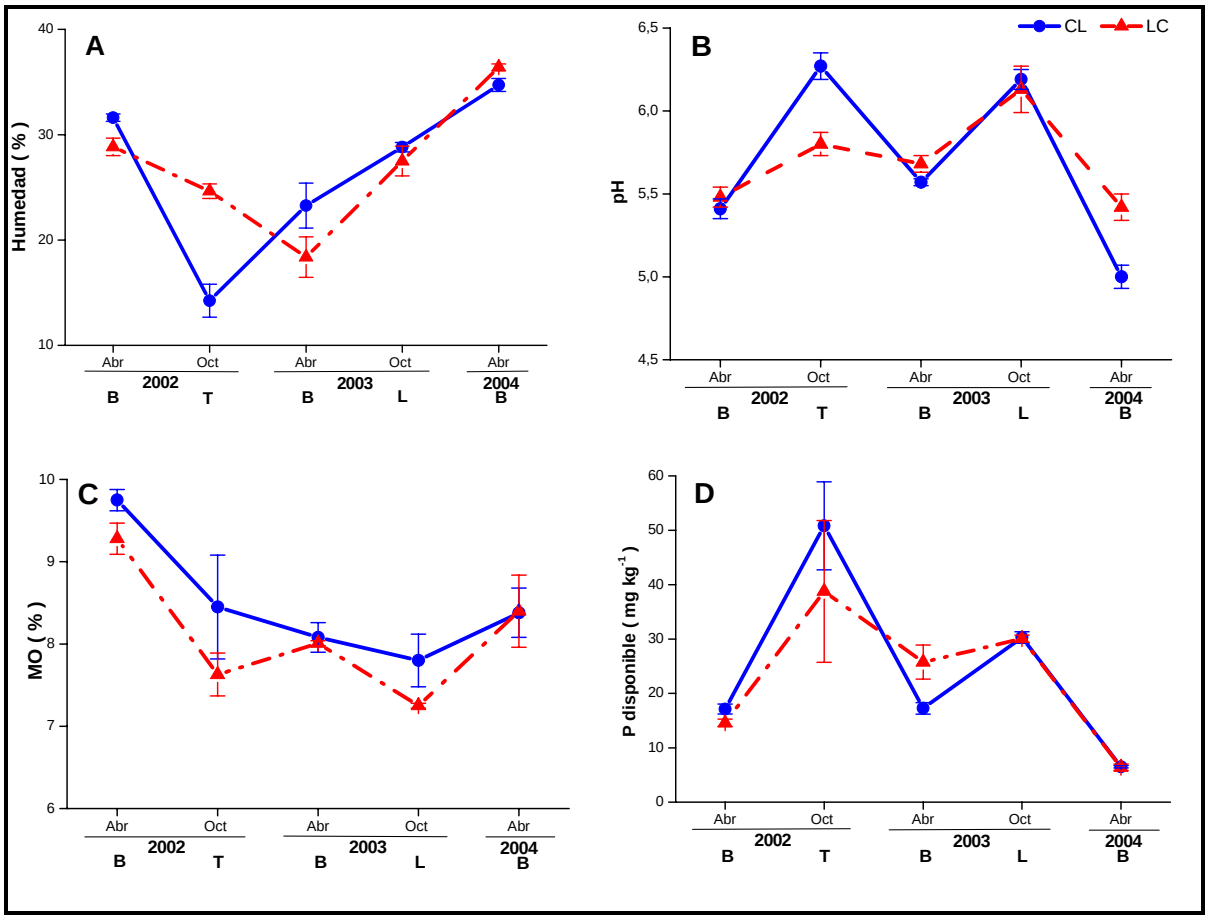


**Figura 3.13.** Parámetros del suelo: humedad (A), pH (B), materia orgánica (C) y P-Olsen (D), afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

Con respecto a la actividad fosfatásica no se encontraron diferencias entre CL o LC (Figura 3.14); en la rotación cuando estuvo presente *L. albus*, aumentó la cantidad de enzima especialmente en octubre 2003. En general, al final del ciclo de los dos años, los niveles de enzima liberados volvieron a igualarse con los del comienzo.

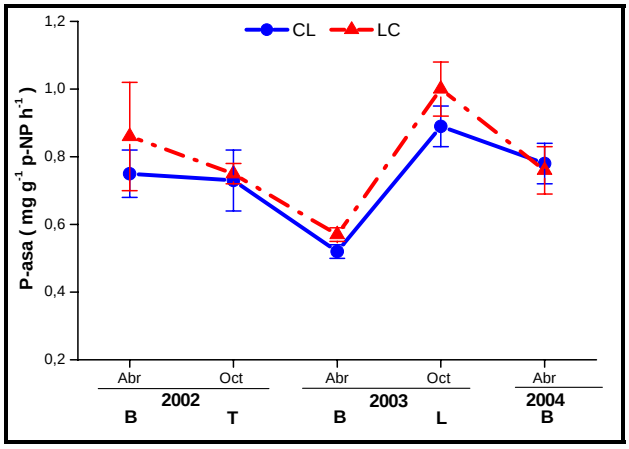


**Figura 3.14.** Actividad fosfatásica afectada por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. El mes de abril (Abr) corresponde al suelo en barbecho (B) y octubre (Oct) con cultivo. Los valores representan la media de cuatro repeticiones con barras del error estándar.

### *3.3.2.3 Correlaciones entre propágulos de HMA y algunos parámetros del suelo*

Correlaciones significativas se encontraron entre el número de esporas de los HMA y algunas características del suelo para cada sistema de manejo. Así, con LC correlacionaron estrechamente las esporas con el porcentaje de humedad del suelo, pH y P Olsen (Tabla 3.3). Cuando los períodos de barbecho y floración se consideraron individualmente, se encontró una fuerte correlación positiva entre el número de esporas con la humedad del suelo y con la actividad fosfatásica. Cuando se consideraron en conjunto la rotación, el sistema de manejo y la época de muestreo, se obtuvieron correlaciones entre el número de esporas con la humedad, el pH, P y las hifas activas con la P-asa.

**Tabla 3.3.** Coeficiente de correlación lineal (r)* entre propágulos de HMA y parámetros del suelo afectados por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum* (T)- *L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile (** Significativo P≤ 0.01 ; * Significativo P≤ 0.05).

| Correlación | Manejo | | Estación | | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| | CL | LC | Cultivo | Barbecho | |
| Esporas vs humedad (%) | 0,70** | 0,66** | 0,09 | 0,66** | 0,61** |
| Esporas vs pH | -0,86** | -0,47 | 0,23 | -0,29 | -0,51** |
| Esporas vs M.O (%) | 0,31 | 0,36 | 0,27 | 0,05 | 0,27 |
| Esporas vs P disponible | -0,74** | -0,56* | 0,09 | -0,63** | -0,56** |
| Esporas vs P-asa | 0,04 | -0,05 | -0,16 | 0,49* | 0,07 |
| Hifas activas vs P-asa | -0,58* | -0,74** | -0,67* | -0,54* | -0,66** |
| Hifas activas vs hifas totales | 0,25 | -0,07 | 0,64* | -0,01 | 0,16 |
| Humedad (%) vs P disponible | -0,84** | - 0,62* | -0,82** | -0,87** | -0,75** |
| Humedad (%) vs pH | -0,71** | -0,37 | -0,28 | -0,73** | -0,59** |
| N | 20 | 20 | 16 | 24 | 40 |

### 3.3.3. Efecto del manejo y rotación de cultivos sobre el número de esporas de HMA a través del perfil de suelo

#### *3.3.3.1. Propágulos de HMA: número de esporas*

Las esporas de HMA sufrieron una drástica disminución a la profundidad de 10-20 cm. Al considerar los dos horizontes superficiales, la *A. sativa* entre 0-5 cm fue significativamente mayor en la LC que CL, pero cuando se muestreó a la profundidad 0-10 cm, no se encontraron diferencias entre los manejos.

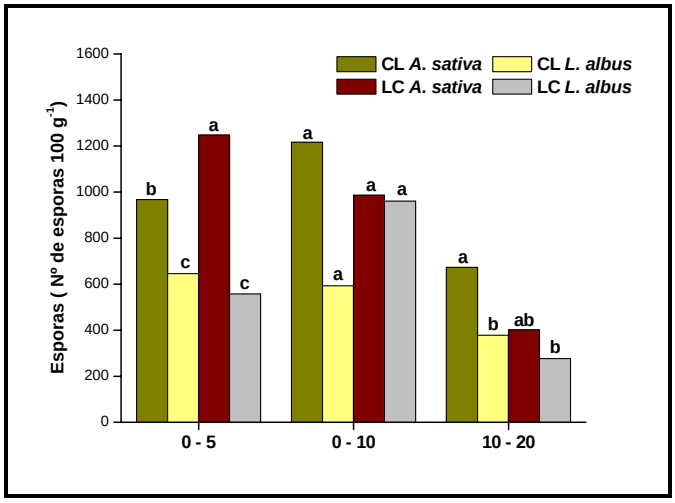


**Figura 3.15.** Número de esporas HMA a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum-A. sativa-T. aestivum* y *T. aestivum-L. albus-T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Cuando la rotación incluyó *L. albus*, una planta no hospedera, los propágulos fúngicos disminuyeron en relación con el hospedero continuo. Entre 0-10 cm, no se encontraron diferencias con el manejo o rotación; la presencia de *A. sativa* se relacionó con un número significativamente mayor de propágulos fúngicos (Figura 3.15).

#### *3.3.3.2. Parámetros del suelo*

En la Figura 3.16A se observa que en general, el pH del suelo es menor en profundidad, no encontrándose diferencias producto del manejo o la rotación de cultivo. En superficie, entre los 0-5 cm, la rotación que incluyó *A. sativa* no mostró diferencias con el manejo, mientras que con *L. albus* en CL se obtuvo la menor acidez (Figura 3.16).

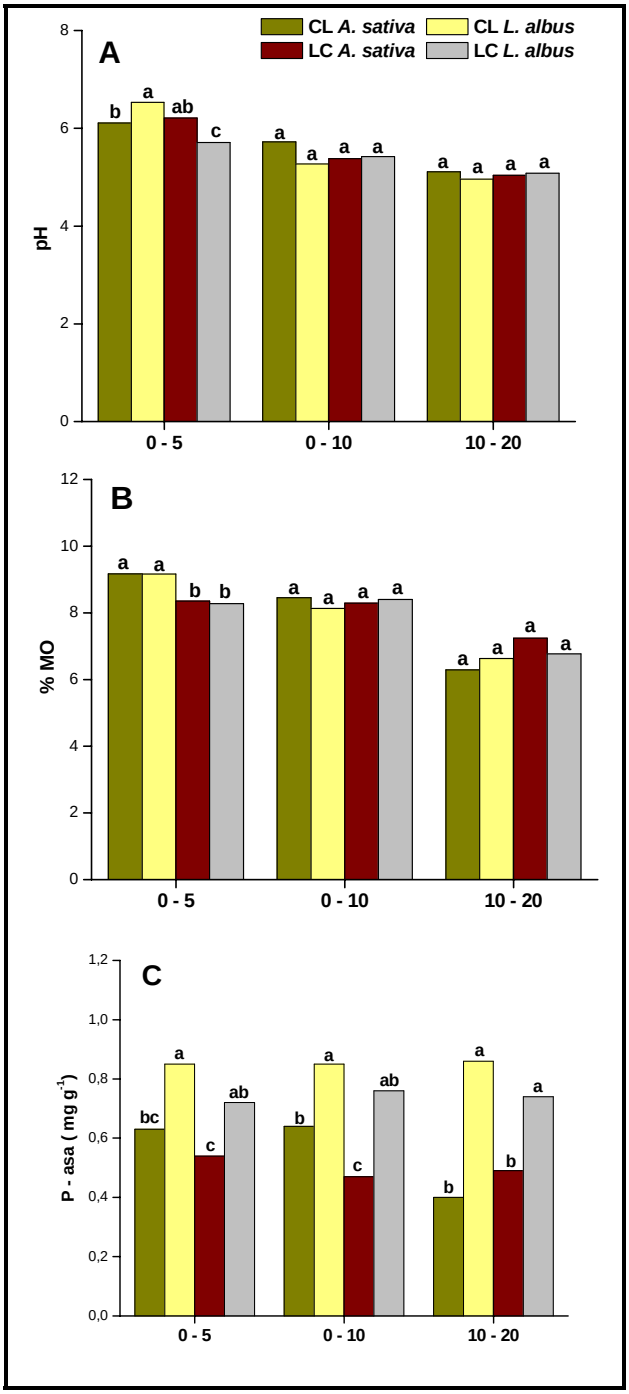


**Figura 3.16.** Parámetros del suelo: pH (A), materia orgánica (B) y actividad fosfatásica (C) a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum-A. sativa* (A)-*T. aestivum* y *T. aestivum-L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas (P≤ 0,05).

Los niveles de MO fueron notoriamente mayores en el horizonte superficial hasta los 10 cm. Entre 0-5 cm, sólo se produjeron diferencias significativas por el manejo presentando la CL los más altos contenidos (Figura 3.16B).

El P disponible se concentró mayoritariamente en los primeros 10 cm del suelo disminuyendo drásticamente entre 10-20 cm, siendo la rotación con cereal continuo y bajo CL, el tratamiento que presentó la más alta disponibilidad del nutriente. Los más bajos contenidos se encontraron con LC cuando la rotación incluyó *L. albus* como cultivo (Tabla 3.4).

La mayor fracción del Po correspondió a P húmico, siendo el P fúlvico muy inferior; ambas fracciones se encontraron mayoritariamente entre 0-5 cm, manteniéndose relativamente constantes sus concentraciones en profundidad. En la Tabla 3.4 se puede observar que los niveles de P húmico y P fúlvico no variaron con el manejo o la rotación, pero entre los 10 y 20 cm fueron significativamente más bajos para la rotación con *A. sativa* en LC. De manera similar, el P total no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ya sea, por efecto del manejo o rotación de cultivo (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Fraccionamiento de P a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza (CL) y labranza convencional (LC) con rotación corta *T. aestivum*-*A. sativa* (A)-*T. aestivum* y *T. aestivum*-*L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

| Profundidad (cm) | Tratamiento | P disponible (mg kg$^{-1}$) | P húmico (mg kg$^{-1}$) | P fúlvico (mg kg$^{-1}$) | P Total (mg kg$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 – 5 | CL *A. sativa* | 18,6 a | 1331 a | 182 a | 2468 a |
| | CL *L. albus* | 17,1 ab | 1294 a | 215 a | 2508 a |
| | LC *A. sativa* | 15,9 b | 1303 a | 164 a | 2204 a |
| | LC *L. albus* | 13,1 c | 1236 a | 154 a | 2767 a |
| 0 – 10 | CL *A. sativa* | 14,2 a | 744 a | 106 a | 2409 a |
| | CL *L. albus* | 6,5 c | 802 a | 86 a | 2407 a |
| | LC *A. sativa* | 12,1 b | 701 a | 95 a | 2331 a |
| | LC *L. albus* | 6,9 c | 700 a | 85 a | 2307 a |
| 10 – 20 | CL *A. sativa* | 5,1 a | 675 ab | 107 b | 2386 a |
| | CL *L. albus* | 4,4 ab | 712 a | 134 a | 2533 a |
| | LC *A. sativa* | 5,6 a | 563 b | 104 b | 2378 a |
| | LC *L. albus* | 3,6 b | 641 ab | 143 a | 2232 a |

En general, a través del perfil del suelo, la actividad fosfatásica se mantuvo constante para cada tratamiento, excepto con CL *A. sativa*, en que disminuyó entre 10-20 cm. Grandes diferencias se produjeron por efecto del cultivo que participó en la rotación; así, el *L. albus* aumentó significativamente la actividad enzimática, exacerbándose en superficie cuando el suelo fue sometido a un manejo conservacionista (Figura 3.15).

### *3.3.3.3 Correlaciones entre esporas y algunos parámetros del suelo*

Una correlación positiva se encontró entre las esporas y el pH, entre el pH con el P húmico y P disponible y entre el P disponible con la MO (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Coeficiente de correlación lineal (r)* entre esporas con parámetros del suelo a tres profundidades de suelo afectadas por la cero labranza y labranza convencional con rotación corta *T. aestivum-A. sativa* (A)-*T. aestivum* y *T. aestivum-L. albus* (L)-*T. aestivum* en un Ultisol, Temuco, Centro Sur de Chile (** Significativo P≤0.01; *Significativo P≤0.05)..

| | Esporas | P-disponible | MO | pH | P-húmico |
|---|---|---|---|---|---|
| P-asa | 0,3220 | - | - | - | - |
| P-disponible | 0,3363 | - | - | - | - |
| MO | 0,3618 | 0,7387** | - | - | - |
| pH | 0,4463* | 0,7723** | 0,6461** | - | - |
| P-húmico | - | 0,8094** | 0,6118** | 0,7981** | - |
| P-fúlvico | - | 0,5628** | - | 0,6347** | 0,7781** |

## 3.4. DISCUSIÓN

Los sistemas con mínima labranza en ensayos a largo plazo, muestran un efecto positivo sobre las comunidades de HMA, comparados con los de LC (Douds *et al*., 1995; Mäder *et al*., 2000; Jansa *et al*., 2003). En Chile, se ha encontrado que suelos sometidos a CL, presentan mayor colonización por HMA en las raíces, más alto número de esporas y mayor cantidad de micelio (Borie & Rubio, 1990; Borie *et al.,* 2000). Así, en un Ultisol del secano interior de la IX Región sometido a distinto manejo agronómico (CL y LC) se determinó el nivel de propágulos micorrícicos y P disponible, informándose los mayores niveles en CL (Rouanet *et al.,* 2003). Además, en una rotación de 5 años en un suelo transicional, la colonización por HMA fue mayor en los primeros 10 cm de profundidad con menor grado de inversión y cuando los rastrojos fueron dejados sobre la superficie se observó una movilización de P desde formas menos lábiles a más lábiles (Borie *et al*., 2005; Rouanet *et al*., 2005).

Esta investigación se centró en estudiar el efecto temprano que podrían tener los sistemas de labranza sobre los propágulos de HMA en un ensayo de rotación corta. Es indudable que las prácticas de manejo agrícola del suelo afectan el número y actividad de los propágulos fúngicos; en sistemas de rotación la importancia que tienen dichos propágulos (micelio, trozos

de raíces colonizadas y esporas) es que sirven como una fuente potencial de inóculo para el cultivo siguiente.

La longitud de hifas de HMA en sistemas con cultivos anuales generalmente fluctúa entre 2 a 8 m $g^{-1}$ (Boddington *et al*., 1999; Leake *et al*., 2004). Los valores encontrados fueron muy inferiores a los de la literatura, lo que podría indicar que 4 años con CL no fue un tiempo suficiente en este tipo de suelo para demostrar que la longitud de hifas totales y la longitud de micelio activo podrían servir como indicadores tempranos de cambios producidos por los sistemas de manejo sobre los propágulos de HMA. La proporción de hifas activas respecto a la cantidad de micelio total con ambos sistemas de manejo en *T. aestivum* o *A. sativa*, fue notoriamente más baja que la reportada en un experimento a largo plazo realizado en el este de Canadá durante 11 años con *Z. mays* (Kabir *et al*., 1997; 1998). La utilización de maquinaria pesada u otro tipo de perturbación del suelo rompen la red de micelio fúngico (Evans & Miller, 1990; Kabir *et al*., 1998; McGonigle & Miller, 2000); sin embargo, en este estudio no se encontró tal efecto para el período de evaluación de 2-4 años.

Por otra parte, en condiciones de campo la colonización de las raíces por HMA se ve afectada por la rotación y el tipo de cultivo (Sieverding, 1991; Borie *et al*., 2005). Debido a que la CL disminuye considerablemente la evaporación del agua del suelo en la superficie y por tanto, aumenta su contenido hídrico, existe una mayor distribución de las raíces de la planta, en especial, en los primeros 5 cm del suelo (Phillips, 1985). Los nutrientes se encuentran concentrados en este mismo volumen del suelo, situación ideal para su captación óptima, especialmente durante los primeros estadios de crecimiento de la planta. Cultivos con raíces profundizadoras, como *L. albus*, pueden utilizar nutrientes ubicados a mayor profundidad en el perfil del suelo. En el proceso, estas plantas pueden traer los nutrientes a la superficie haciéndolos disponibles para los cultivos de sistemas radiculares más superficiales (Bowman & Halvorson, 1997).

La velocidad de colonización fue considerablemente mayor con CL que LC. Actualmente, existen escasos antecedentes sobre el efecto genotípico de los cultivos estudiados sobre los propágulos HMA cuando crecen en Ultisoles; algunos cultivares de *A. sativa* locales han

mostrado ser más susceptibles a la colonización que cultivares de *T. aestivum* (Borie *et al*., 1994).

La CL afectó positivamente el número de esporas de HMA en el Ultisol, lo que podría estar relacionado con la humedad del suelo, coincidiendo con lo informado por Burrows & Pfleger (2002). Sin embargo, este parámetro fúngico en CL no estuvo relacionado con la MO, resultados contrarios a los obtenidos por Anderson *et al*. (1984), Klironomos *et al*. (1993) y Beena *et al*. (2000). Esta última relación entre la MO y el número de esporas en suelos volcánicos ha sido informada por Borie *et al.* (1997), quienes encontraron diferente número de esporas en dos ensayos de campo realizados en Andisoles (13% MO) con 10 cultivares de *T. aestivum*. En el primer Andisol fluctuaron entre 170 y 593 esporas por 100 g mientras que en el segundo, de mayor acidez, estuvieron en el rango de 53 a 243 esporas por 100 g, siendo la velocidad de esporulación también diferente para cada cultivar.

Las 22 especies de HMA encontradas en este estudio resultaron superiores a las informadas desde agroecosistemas del hemisferio norte por Douds & Millner (1999) y Oehl *et al*. (2003) desde agroecosistemas de Europa central, semejantes a los nuestros y con uso intensivo del suelo, pero levemente inferiores a las de Ellis *et al*. (1992) en Norteamérica, quienes aislaron 26 especies en un ensayo de rotación *Sorghum* sp.-soya (*Glycine max*). No es sorprendente que la mayoría de las esporas de HMA que han sido aisladas y descritas para suelos agrícolas pertenezcan al género *Glomus* (Jansa *et al*., 2003). Sin embargo, probablemente debido a las condiciones edáficas de nuestros suelos, se encontró mayor abundancia del tipo *Acaulospora* spp. que en otros estudios (Oehl *et al*., 2003; 2005) lo que podría deberse a la acidez del suelo. En cambio, en suelos ácidos tropicales, tanto esporas de *Acaulospora* spp. como de *Glomus* spp. se encuentran con frecuencia (Sieverding, 1991).

Resulta interesante observar en términos de formación de esporas, el aumento relativo que se produjo en la proporción de esporas de *Acaulospora* bajo LC; esto está de acuerdo con lo informado por Jansa *et al*., (2003) quienes encontraron que el manejo tuvo una influencia significativa sobre la esporulación de esporas de géneros distintos a *Glomus,* resultados que podrían demostrar que las especies de *Acaulospora* reaccionan positivamente a la perturbación

del suelo; este incremento podría deberse a una disminución en el pH del suelo en LC, especialmente con *T. aestivum*. En bosques tropicales lluviosos y suelos cultivados se han encontrado altas cantidades en el número de especies dentro del género *Acaulospora* (Bohrer, 2001) tendiendo a dominar en suelos más ácidos (Porter *et al*., 1987; Stürmer, 1998) como ha sido recientemente encontrado en Andisoles de bosques ácidos del sur de Chile (Capítulo 2; Castillo *et al*., 2005).

Por otra parte, en general esporas de *Scutellospora* se encontraron en menor cantidad en LC que en CL (excepto en barbecho 2003), resultados que concuerdan con lo informado por Jansa *et al*. (2003) en un ensayo en campo con *Z. mays* a largo plazo en Suiza. Ellos concluyeron que con la alteración del suelo, el género *Scutellospora* se redujo fuertemente acompañado con un aumento de la colonización del *Z. mays* por Glomeraceae. Antecedentes de la literatura sugieren que *Scutellospora* spp. (Gigasporaceae) puede propagarse solamente vía esporas viables o micelio intacto; por el contrario, Glomeraceae colonizan las raíces vía fragmentos de micelio (Biermann & Linderman, 1983; Daniell *et al*., 2001). Algunas investigaciones han demostrado anastomosis entre hifas de la misma espora y entre esporas diferentes del mismo *Glomus*, pero no en *Gigaspora* (Giovannetti *et al*., 1999; 2001). De la Providencia *et al*. (2005) mostraron que trozos de hifas de Glomeraceae son capaces de unirse nuevamente por anastomosis, mientras que Gigasporaceae forman puentes hifales dentro de la misma hifa, pero no entre hifas diferentes. De aquí que, Glomeraceae pudiera ser capaz de reestablecer conexiones de las redes fúngicas, luego de una alteración mecánica (Daniell *et al*. 2001), no pudiendo realizarlo Gigasporaceae. Estas diferencias explicarían la dominancia de *Glomus* (Glomeraceae) sobre los miembros de *Scutellospora* bajo un sistema con LC.

Mayor riqueza de especies de HMA se encontró con CL que en LC siendo superior en barbecho después de *T. aestivum* que *A. sativa*. El índice de H' fue mayor que los informados para otros suelos agrícolas (Franke-Snyder *et al*. 2001; Johnson *et al*. 1991b; Cuenca & Meneses, 1996) pero, semejante a los reportados por Oehl *et al*. (2003) en suelos europeos. La riqueza de especies y la diversidad, a pesar que mostraron diferencias entre los dos sistemas de manejo, no fueron significativas aún después de los 4 años de evaluación. Por esta razón, estos

índices no serían útiles para pronosticar cambios tempranos ocurridos en la diversidad de HMA por las prácticas agrícolas.

Los altos niveles de P disponible encontrados en el suelo con *T. aestivum*, pudieron deberse por una parte, a un efecto hidrolítico de las fosfatasas sobre el Po, como también a la elevada fertilización fosfatada que demanda este cultivo en comparación a *A. sativa*. Por otra parte, elevados contenidos de P en los suelos inhiben las micorrizas (Dhillion & Zak, 1993) y las actividades enzimáticas (Nannipieri *et al.,* 2002), pero en este estudio sólo se afectó negativamente la colonización de las raíces por los HMA. Escasos antecedentes existen en Chile sobre el rol ejercido por el Po sobre la nutrición de los cultivos agrícolas y la influencia que ejercería LC sobre este pool de P. Los suelos volcánicos tienen elevados contenidos de P total y en algunos de ellos el Po representa más del 50% del total (Borie & Zunino, 1983; Rubio *et al*. 1990); estas fracciones son hidrolizadas en la rizósfera de la planta por la raíz o mediante la acción de las fosfatasas y fitasas microbianas (Tadano & Sakai, 1991; Richardson *et al*. 2001). En este tipo de suelos deficitarios en P disponible, estos mecanismos adquieren especial relevancia debido a que las fosfatasas ácidas liberadas podrían ser mecanismos adaptativos para el crecimiento de las plantas, lo que contribuye a reestablecer el P en la solución del suelo (Li *et al*. 1997). Tarafdar & Marschner (1994) informaron que la actividad fosfatásica en *T. aestivum* aumentó significativamente en presencia de micorrizas, estando fuertemente correlacionadas con la longitud hifal. Sin embargo, en nuestro estudio la actividad fosfatásica correlacionó negativamente con la densidad de hifas metabólicamente activas en CL.

Criquet *et al.* (2004) encontraron que las raíces eran una fuente importante de fosfatasas ácidas en el suelo y que correlacionaban bien con la humedad. En la época en que se realizó el muestreo durante el barbecho de otoño, los suelos presentaban una alta humedad. También, Harrison & Pearse (1979) encontraron un incremento estacional en la actividad P-asa ácida de los suelos durante el invierno.

La dinámica del P puede afectar la intensidad del cultivo; así, inicialmente la semilla cuenta con una concentración de P relativamente alta, pero con la demanda de nutrientes para el

crecimiento vegetal, el P se diluye en los tejidos en expansión. Si no existe un sistema de raíces adecuado para abastecer a la planta del P requerido, la falta del nutriente restringe el desarrollo de la planta. El *L. albus* no mostró deficiencias de P, probablemente por sus raíces proteoídeas que exudan cantidades significativas de enzimas fosfatasas al suelo, liberando P desde formas orgánicas, especialmente P-fúlvico en el horizonte superficial. Olander & Vitousek (2000) observaron la presencia de un *feedback* negativo entre el suministro de nutrientes y la actividad enzimática que ha sido observado en muchos estudios de P en el suelo; ellos explicaron la pérdida de relación entre estas variables sugiriendo que el P inorgánico puede no ser un factor limitante y que algunos otros sustratos (N, C, Po) o interferencias desde sustancias húmicas pueden limitar la producción o actividad fosfatasa.

Las plantas de *L. albus* son poco exigentes en cuanto a fertilidad del suelo y clima, pudiendo crecer en zonas de secano, como también en suelos ácidos o deficitarios en nutrientes. En una rotación con *Z. mays*-*T. aestivum* y *L. albus*- *T. aestivum* en un Alfisol de la VIII Región, los resultados mostraron que en el horizonte entre 5-10 cm, el balance de C fue superior en *T. aestivum*- *L. albus*, ya que al incluir la leguminosa en la rotación, por su sistema de raíces proteoídeas con alta densidad de pelos radicales que actúan como "arado biológico" (Borie *et al.,* 2000) se pudo aprovechar mejor el C disponible (Crovetto, 2002).

Por otra parte, el bajo número de esporas encontradas en los suelos con *L. albus*, pudo ser resultado de las prácticas de manejo que incluyeron una planta no hospedera en la rotación. Ryan (2001) en experimentos realizados en campo con trigo usando como precultivo *Brassica* (hospedero no micorrízico) encontró que la colonización por HMA se redujo significativamente de manera similar a largos períodos en barbecho.

De aquí que, el biociclado de nutrientes inmóviles a través de la captación desde horizontes más profundos por cultivos con raíces profundizadoras y la reposición cerca de la superficie del suelo a través de la descomposición de residuos de plantas, es importante en sistemas de cultivo con entradas mínimas de nutrientes desde fuentes externas, o con una mínima perturbación o ambas (Bowman & Halvorson, 1997).

El aumento de esporas en los suelos con *A. sativa* entre 0-10 cm, en CL en comparación con LC, y en *L. albus* con CL, entre 0-5 cm y 10-20 cm, podría deberse a una conservación de la temperatura y humedad del suelo por efecto de los residuos superficiales.

## 3.5 CONCLUSIONES

La densidad de esporas disminuyó drásticamente en profundidad cuando la rotación incluyó un hospedero continuo, *A. sativa;* mientras que la rotación con hospedero discontinuo, *L. albus* presentó menor cantidad de propágulos fúngicos, pero los cuales se mantuvieron relativamente constantes a través del perfil de suelo.

En general, de este ensayo se puede concluir que no se pueden visualizar cambios en las características físicas y químicas del suelo antes de 4 años de prácticas de manejo sostenible, semejantes a las de CL. Además, los resultados muestran que propágulos de HMA como: número de esporas o trozos de raíces colonizadas, podrían servir como indicadores tempranos para cambios producidos en el suelo, cuando están sometidos a prácticas agrícolas del tipo de la CL. Es decir, los propágulos micorrízicos responderían más rápidamente a las rotaciones de cultivo, que los parámetros químicos. La extensión del período de monitoreo de los propágulos micorrízicos, para los años siguientes de un nuevo ciclo de rotación, pareciera ser crucial para un mejor conocimiento de las funciones que cumplen los HMA en los suelos ácidos del centro-sur de Chile.

## 3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Acevedo, E. (2003). Sustentabilidad en cultivos anuales. Cero Labranza. Manejo de rastrojos. (Ed.) Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. 183 p.

Aguilera, S.M., Borie, G., Del Canto, P., Peirano, P. (1996). Contribución del sistema conservacionista cero labranza en los niveles de C, P y bioactividad de suelo Santa Bárbara. Agric. Téc. 56: 250-254.

Allen, M.F., Allen, E.B., Dahm, C.N., Edwards, F.S. (1993). Preservation of biological diversity in mycorrhizal fungi: importance and human impacts. In: Sundnes, G. (Ed.). International Symposium on Human Impacts on Self-Recruiting Populations. Trondheim: The Royal Norwegian Academy of Sciences. pp. 81-108.

Altieri, M.A. (1995). Agroecology: the Science of Sustainable Agriculture. 2nd edition. Westview Press, Boulder, CO. 281 p.

Altieri, M.A., Nicholls, C.I. (2004). Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems. The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. 236 p.

Anderson, R.C., Liberta, A.E., Dickman, L.A. (1984). Interaction of vascular plants and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture-nutrient gradient. Oecologia 64: 111-117.

Ayling, R.M., Ross, R., Towner, P., Von Laue, S., Finidori, J., Moutoussamy, S., Buchanan, C.R., Clayton, P.E., Norman, M.R. (1997). A dominant-negative mutation of the growth hormone receptor causes familial short stature. Nature Genetics 16: 13-14.

Azcón, R., Barea, J.M. (1997). Mycorrhizal dependency of a representative plant species in Mediterranean shrublands (*Lavandula spica* L.) as a key factor to its use for revegetation strategies in desertification-threatened areas. Appl. Soil Ecol. 7: 83-92.

Beena, K.R., Raviraja, N.S., Arun, A.B., Sridhar, K.R. (2000). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of the west coast of India. Current Sci. 79: 1459-1466.

Bellgard, S.E. (1993). The topsoil as the major store of propagules of vesicular-arbuscular fungi in southeast Australian sandstone soils. Mycorrhiza 3: 19-24.

Biermann, B., Linderman, R.G. (1983). Use of vesicular- arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. New Phytol. 95: 97-105.

Boddington, C.L., Basset, E.E., Jakobsen, I., Dodd, J.C. (1999). Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. Soil Biol. Biochem. 31: 479-482.

Bohrer, G. (2001). Evidence of host and environmental preferences in wild communities of VAM fungi in the Kalahari Desert. Th Master. Ben Gurion University. 67 p.

Bolan, N.S., Abbott, L.K. (1983). Seasonal variation in infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. Aust. J. Soil Res. 21: 207-210.

Borie, F. (1981). Caracterización de diversas fracciones del P en Andisoles chilenos y significado de los microorganismos, con especial referencia a las micorrizas, en el aporte de dicho macronutriente a las plantas. Tesis Ph. D. Universidad de Granada. España. 191 p.

Borie, F., Zunino, H. (1983). Organic matter-phosphorus associations as a sink in P-fixation processes in allophanic soils of Chile. Soil Biol. Biochem. 15: 599-603.

Borie, F., Rubio, R. (1990). Micorrizas vesículo-arbuscular y otros organismos en la disponibilidad del fósforo. En: 1º Jornadas Binacionales de Cero Labranza, Temuco, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Carillanca. pp. 96-109.

Borie, F., Rubio, R. (1999). Effects of arbuscular mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive barley cultivars. J. Plant Nutr. 22: 121-137.

Borie, F., Rivas, M., Rubio, R., Moraga, E. (1994). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and aluminum tolerance of cereal crop. Trans. 15th World Congress Soil Sci b. pp. 42-43.

Borie, F., Rubio, R., Rouanet, J.L., García, J.C. (1997). Effect of soil Management Practices on arbuscular–mycorrhizal fungi and phosphatase activity in volcanic soils. Ciencia e Investigación Agraria. 24: 25-34 (in Spanish).

Borie, F., Rubio, R., Morales, A., Castillo, C. (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. Rev. Chil. Hist. Nat. 73: 749-756.

Borie, F., Rubio, R., Rouanet, J.L., Morales, A., Borie, G., Rojas, C. (2005). Effects of tillage systems on soil characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean Ultisol. Soil Till. Res. (in press).

Bowman, R.A., Halvorson, A.D. (1997). Crop rotation and tillage effects on phosphorus distribution in the Central Great Plains. Soil Sci. Soc. Am. J. 61: 1418-1422.

Brundrett, M., Melville, L., Peterson, L. (1994). Practical methods in mycorrhiza research. Mycologue Publications, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. 161 p.

Burrows, R.L., Pfleger, F.L. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. Can. J. Bot. 80: 120-130.

Castellano, M.A., Molina, R. (1989). Mycorrhizae. In: Landis, T.H., Tinus, R.W., McDonald, S.D., Barnett, S.D. (Eds.). The biological component: nursery pests and mycorrhizae. Vol. 5. The container tree nursery manual. Agric. Handbk. 674. U.S.D.A. For. Serv. Washington D.C. pp. 101-167.

Castillo, C.G., Borie, F., Godoy, R., Rubio, R., Sieverding, E. (2005). Diversity of arbuscular mycorrhizal plant species and fungal species in ecosystems of the temperate rainforest region of Chile. Forest Ecol. Manage. (submitted)

Criquet, S., Ferre, E., Farnet, A.M., Le Petit, J. (2004). Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. Soil Biol. Biochem. 36: 1111-1118.

Crovetto, C. (2002). Cero Labranza. Los rastrojos, la nutrición del suelo y su relación con la fertilidad de las plantas. Talcahuano, Chile, Trama impresores. 225 p.

Cuenca, G., Meneses, E. (1996). Diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cacao in Venezuela. Plant Soil 183: 315-322.

De la Providencia, I.E., de Souza, F.A., Fernandez, F., Delmas, N.S., Declerck, S. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenic groups. New Phytol. 165: 261-271.

Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H., Young, J.P.W. (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. FEMS Microl. Ecol. 36: 203-209.

Deng, S.P., Tabatabai, M.A. (1997). Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. Biol. Fertil. Soils 24: 141-146.

Derpsch, R., Florentin, M., Moriya, K. (2000). Importancia de la siembra directa para alcanzar la sustentabilidad agrícola. Proyecto Conservación de Suelos, San Lorenzo, Paraguay.

Dhillion, S.S., Zak, J.C. (1993). Microbial dynamics in arid ecosystems-desertification and the potential role of mycorrhizas. Rev. Chil. Hist. Nat. 66: 253-270.

Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1977). An alkaline oxidation method for the determination of total phosphorus in soils. J. Soil Sci. Soc. Am. 41: 511-514.

Douds, D.D., Galvez, L., Janke, R.R., Wagoner, P. (1995). Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Agric. Ecosyst. Environ. 52: 111-118.

Douds, D.D., Millner, P.D. (1999). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. Agric. Ecosyst. Environ. 74: 77-93.

Ellis, J.R., Roder, W., Mason, S. (1992). Grain-sorghum-soybean rotation and fertilization influence on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Sci. Soc. Am. J. 56: 783-794.

Evans, D.G., Miller, M.H. (1988). Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil-disturbance-induced reduction of nutrient absorption in maize. I. Causal relations. New Phytol. 110: 67-74.

Evans, D.G., Miller, M.H. (1990). The role of the external mycelial network in the effect of soil disturbance upon vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of maize. New Phytol. 114: 65-72.

Faiguenbaum, H. (2003). Labranza, siembra y oproducción de los principales cultivos de Chile. Impresora y Editora Ograma S.A. Santiago, Chile. 760 p.

Fairchild, G.L., Miller, M.H. (1990) Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil-disturbance-induced reduction of nutrient absorption in maize. III. Influence of phosphorus amendments to soil. New Phytol. 114: 641-650.

Florkin, M., Stotz, E.H. (1964). Comprehensive Biochemistry, vol. 13. Elsevier, New York. 1962-1979. 32v.

Francl, L.J. (1993). Interactions of nematodes with mycorrhizae and mycorrhizal fungi. In: Khan, M.W. (Ed.). Nematode Interactions. Chapman and Hall. London, UK. pp. 203-216.

Franke-Snyder, M., Douds, D.D., Galvez, L., Phillips, J.G., Wagoner, P., Drinkwater, L., Morton, J.B. (2001). Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. Appl. Soil Ecol. 16: 35-48.

Galvez, L., Doudds, D.D., Wagoner, P. (2001). Tillage and farming system affect AM fungus populations, mycorrhizal formation, and nutrient uptake by winter wheat in a high-P soil. Am. J. Altern. Agric. 16: 152-160.

George, E., Marschner, H., Jakobsen, I. (1995). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. Crit. Rev. Biotechnol. 15: 257-270.

Gil, F. (1995). Las micorrizas y la nutrición mineral. En: Elementos de fisiología vegetal. Relaciones hídricas. Nutrición mineral. Transporte. Metabolismo. Ediciones Mundi-Prensa. pp. 281-283.

Giovannetti, M., Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-500.

Giovannetti, M., Azzolini, D., Citernesi, A.S. (1999). Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5571-5575.

Giovannetti, M., Fortuna, P., Citernesi, A.S., Morini, S., Nuti, M.P. (2001). The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. New Phytol. 151: 717-724.

Grant, C.A., Flaten, D.N. (1998). Fertilizing for protein content of wheat. In: Fowler, D.B. (Ed.). Proc. Wheat Protein Symp. Univ. Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada. pp. 151-168.

Grant, C.A., Peterson, G.A., Campbell, C.A. (2002). Nutrients considerations for diversified cropping systems in the northern great plains. Agron. J. 94: 186-198.

Halvorson, A.D., Reule, C.A., Follett, R.F. (1999a). Nitrogen fertilization effects on soil carbon and nitrogen in a dryland cropping system. Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 912-917.

Halvorson, A.D., Black, A.L., Krupinsky, J.M., Merrill, S.D., Tanaka, D.L. (1999b). Sunflower response to tillage and nitrogen fertilization under intensive cropping in a wheat rotation. Agron. J. 91: 637-642.

Hart, M.M., Reader, R.J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 153: 335-344.

Hooker, J.E., Jaizme-Vega, M., Atkinson, D. (1994). Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi, S., Schüepp, H. (Eds.). Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 191-200.

Jansa, J., Mozafar, A., Khun, G., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R., Frossard, E. (2003). Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. Ecol. Appl. 13: 1164-1176.

Jasper, D.A., Abbott, L.K., Robson, A.D. (1993). The survival of infective hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in dry soil: an interaction with sporulation. New Phytol. 124: 473-479.

Johnson, N.C., Pfleger, F.L., Crookston, R.K., Simmons, S.R., Copeland, P.J. (1991a). Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. New Phytol. 117:657-663.

Johnson, N.C., Zak, D.R., Tilman, D., Pfleger, F. (1991b). Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. Oecologia 86: 349-358.

Juma, N.G., Tabatabai, M.A., (1977). Effects of trace elements on phosphatase activity in soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 41: 343-346.

Kabir, Z., O`Halloran, I.P., Fyles, J.W., Hamel, C. (1997). Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. Plant Soil 192: 285-293.

Kabir, Z., O'Halloran, I.P., Fyles, J.W., Hamel, C. (1998). Dynamics of the mycorrhizal symbiosis of corn: effects of host physiology, tillage practice and fertilization on spatial distribution of extra-radical mycorrhizal hyphae in the field. Agric. Ecosyst. Environ. 68: 151-163.

Klironomos, J.N., Moutoglis, P., Kendrick, B., Widden, P. (1993). A comparison of spatial heterogeneity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in two maple-forest soils. Can. J. Bot. 71: 1472-1480.

Koske, R.E., Gemma, J.N. (1990). VA mycorrhizae in strand vegetation of Hawaii: evidence for long-distance codispersal of plants and fungi. Amer. J. Bot. 77: 466-474.

Koske, R.E., Tessier, B. (1983). A convenient, permanent slide mounting medium. Mycol. Soc. Am. Newsl. 34: 59.

Kucey, R.M.N., Paul, E.A. (1983). Vesicular-arbuscular mycorrhizal spore populations in various Saskatchewan soils and the effect of inoculation with *Glomus mosseae* on faba bean growth in green house and field trials. Can. J. Soil Sci. 63:87-95.

Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L., Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. Can. J. Bot. 82: 1016-1045.

Li, G.C., Mahler, R.L., Everson, D.O. (1990). Effects of plant residues and environmental factors on phosphorus availability in soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 21:471-491.

Li, M.G., Osaki, M., Rao, I.M., Tadano, T. (1997). Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus deficient conditions. Plant Soil 195: 161-169.

Liu, A., Hamel, C., Hamilton, R.I., Ma, B.L., Smith, D.L. (2000). Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. Mycorrhiza 9: 331-336.

Lupwayi, N.Z., Rice, W.A., Clayton, G.W. (1999). Soil microbial biomass and carbon dioxide flux under wheat as influenced by tillage and crop rotation. Can. J. Soil Sci. 79:273–280.

Mäder, P., Edenhofer, S., Boller, T., Wienken, A., Niggli, U. (2000). Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. Biol. Fertil. Soils 31: 150-156.

Maturana, M.L., Acevedo., E. (2003). Cambios en la fertilidad del suelo asociados a cero labranza. Fac. Agron. Universidad de Chile, Santiago. 111 p.

McGonigle, T.P., Evans, D.G., Miller, M.H. (1990). Effect of degree of soil disturbance on mycorrhizal colonization and phosphorus absorption by maize in growth chamber and field experiments. New Phytol. 116: 629-636.

McGonigle, T.P., Miller, M.H. (1996). Mycorrhizae, phosphorus absorption, and yield of maize in response to tillage. Soil Sci. Soc. Am. J. 60: 1856-1861.

McGonigle, T.P., Miller, M.H. (2000). The inconsistent effect of soil disturbance on colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi: a test of the inoculum density hypothesis. Appl. Soil Ecol. 14: 147-155.

Medeiros, C.A.B., Clark, R.B., Ellis, J.R. (1994a). Effects of excess aluminum on mineral uptake in mycorrhizal sorghum. J. Plant Nutr. 17: 1399-1416.

Medeiros, C.A.B., Clark, R.B., Ellis, J.R. (1994b). Effects of excess manganese on mineral uptake in mycorrhizal sorghum. J. Plant Nutr. 17: 2203-2219.

Mendoza, J., Borie, F. (1998). The effects of *Glomus etunicatum* inoculation on aluminum, phosphorus, calcium and magnesium uptake in two barley genotypes with different aluminum tolerance. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 9: 681-695.

Miller, R.M., Jastrow, J.D. (1992). The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. In: Bethlenfalvay, G.J., Lindermann, R.G. (Eds.). Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. Agron. Soc. Am. Special Publication Nº 54. Madison, WI. pp. 24-44.

Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P. (2002). Enzyme activities and microbial and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.) Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. Marcel Dekker, New York. pp 1-33.

Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T., Wiemken, A. (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2816-2824.

Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A. (2004). Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. Oecologia 138:574–583.

Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Ris, E.A., Boller, T., Wiemken, A. (2005). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. New Phytol. 265:273-283.

Olander, L.P., Vitousek, P.M. (2000). Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. Biogeochemistry 49: 175-190.

Olsen, S.R., Sommers, M.E. (1982). Phosphorus. In: Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological properties. Agronomy Monograph N° 9. Am. Soc. Agron. Soil Sci. Madison. pp. 403-430.

Phillips, R.E. (1985). Humedad del suelo. En: Agricultura sin Laboreo. Ed. Bellatera. pp. 69-89.

Phillips, J.M., Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158-161.

Porter, W.M., Robson, A.D., Abbott, L.K. (1987). Field survey of the distribution of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil-pH. J. Appl. Ecol. 24: 659-662.

Rao, M.A., Gianfreda, L., Palmiero, F., Violante, A. (1996). Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. Soil Sci. 161: 751-760.

Reeves, F.B. (1985). Survival of VA mycorrhizal fungi-interactions of secondary succession, mycorrhizal dependency in plants, and resource competition. In: Molina, R. (Ed.). Proc. North Am. Conf. on Mycorrhizae, 6$^{th}$, Bend, OR. 25-29 June 1984. Forest Res. Lab., Oregon State Univ., Corvallis. pp. 110-113.

Reid, T.W., Wilson, I.B. (1971). *E. coli* alkaline phosphatase. In: Boyer, P.D. (Ed.). The Enzymes, vol. IV. Academic Press, London. pp 373-415.

Reyes, J.I. (2002). Efecto de cuatro temporadas de cero labranza y manejo de rastrojo en las condiciones físicas y químicas de un suelo aluvial de la zona central de Chile. (Tesis Ing. Agrónomo) Santiago, Chile, Universidad Mayor. 85 p.

Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E. (2001). Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus. Plant J. 25: 1-10.

Rillig, M.C., Wright, S., Shaw, R., Field, B. (2002). Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. OIKOS 97: 52-58.

Riquelme, J. (1992). Manejo conservacionista del recurso suelo. IPA Quilamapu 51: 29-34.

Rodríguez, J. (1993). La fertilización de los cultivos. Facultad de Agronomía P.U.C. Santiago, Chile. 291 p.

Rouanet, J.L., Pino, I., Uribe, H., Nario, A., Schuller, P., Borie, F., Barrientos, L., Parada, A.M., Alvear, M., Mera, M. (2003). Manejo integrado suelo-planta y desarrollo sustentable de la agricultura del sur de Chile. Seminario Sustentabilidad en Cultivos Anuales. 53 Congreso Agronómico. Santiago, Chile.

Rouanet, J.L., Acevedo, E., Silva, P., Ferrada, S., Mera, M. (2005). Rotaciones en el Sur de Chile. Fundación Chile (Ed.) (submitted).

Rubio, R., Moraga, E., Borie, F. (1990). Acid phosphatase activity and vesicular-arbuscular infection associated with roots of four wheat cultivars. J. Plant Nutr. 13: 585-598.

Rubio, R., Borie, F., Schalchli, C., Castillo, C., Azcón, R. (2003). Occurrence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilization and fungal inoculation. Appl. Soil Ecol. 23: 245-255.

Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. (1995). Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. Physiol. Plant 95: 472-478.

Ryan, M.H. (2001). The effect of Brassica crops on the level of mycorrhizal inoculum in soil. Proceedings 10th Australian Agronomy Conference.

Sadzawka, A. (1994). Cero labranza y características químicas del suelo. En: 3º Jornadas Nacionales de CeroLabranza, Temuco, Chile. pp. 1–12.

Sierra, C. (1990). Fertilidad de los suelos en cero labranza. En: 1º Jornadas Binacionales de Cero Labranza. Concepción, Chile. pp. 196–209.

Schenck, N.C., Pérez, Y. (1990). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi, 3rd ed. Synergistic, Gainesville, Fla, USA. 241 p.

Sieverding, E. (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deustche Gesellschaft Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn. 371 p.

Solar, B. (2002). Aspectos económicos de la cero labranza. Seminario Sustentabilidad en Cultivos Anuales. 53 Congreso Agronómico. 3 de Diciembre de 2003. Santiago. Chile.

Southwood, T.R.E., Way, M.J. (1970). Ecological background to pest management. In: Rabb, R.L., Guthrie, F.E. (Eds.). Concepts of Pest Management. North Carolina State University, Raleigh. pp. 6-29.

Smith, S.E., Read, D.J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London. 605 p.

Steubing, L., Godoy, R., Alberdi, M. (2002). Métodos de ecología forestall. Universidad Austral de Chile. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 345 p.

Stürmer, S.L. (1998). Characterization of diversity of fungi forming arbuscular endomycorrhizae in selected plant communities. Ph D. Thesis. Morgantown, West Virginia. 92 p.

Swift, M.S., Vandermeer, J., Ramakrishnan, P.S., Anderson, J.M., Ong, C.K., Hawkins, B.A. (1996). Biodiversity and agroecosystem function. In: Mooney H. A. (Ed.). Functional roles of biodiversiy: a global perspective. J. Wiley and Sons, N. Y. pp. 261-298.

Sylvia, D.M. (1992). Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K. (Eds.). Methods in Mycrobiology 24: Techniques for the Study of Mycorrhiza. Academic Press, London. pp. 53-65.

Sylvia, D.M., Williams, S.E. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA Special Publication no 54, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. pp. 101-124.

Tabatabai, M.A. (1994). Soil enzymes. In: Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties. Soil Sci. Soc. Am. Madison. pp. 775-833.

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. (1969). Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1: 301-307.

Tadano, T., Sakai, H. (1991). Secretion of acid-phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. Soil Sci. Plant Nutr. 37: 129-140.

Tarafdar, J.C., Marschner, H. (1994). Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. Soil Biol. Biochem. 26: 387-395.

Tennant, D. (1975). A test of modified line intersection method of measuring root length. J. Ecol. 63: 995-1001.

Turner, B.L., Mc Kelvie, I.D., Haygarth, P.M. (2002a). Characterization of water-extractable soil organic phosphorus by phosphate hydrolysis. Soil Biol. Biochem. 34: 27-35.

Turner, B.L., Baxter, R., Whitton, B.A. (2002b). Seasonal phosphatase activity in three characteristic soils of the English uplands polluted by long-term atmospheric nitrogen deposition. Environ. Pol. 120: 313-317.

Vandermeer, J., Perfecto, I. (1995). Breakfast of biodiversity: the truth about rainforest destruction. Food First Books, Oakland.

Venegas, C. (1990). Labranza conservacionista. IPA Carillanca 9: 3-10.

Vidal, I. (2002). Dinámica del nitrógeno bajo diferentes rotaciones, sistema de labranza y manejo de residuos. Agric.Téc. 62: 122-131.

Walkley, A., Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.

Wilson, J.M., Tommerup, I.C. 1992. Interactions between fungal symbionts: VA mycorrhizae. In: Allen, M.F. (Ed.). Mycorrhizal Functioning. New York, Chapman and Hall. pp. 199-248.

Wright, S.F., Upadhyaya, A. (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Sci. Soc. 161: 575-586.

Wright, S.F., Upadhyaya, A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 198: 97-107.

# CAPÍTULO 4

# COMPATIBILIDAD Y EFECTIVIDAD COMPARATIVA DE LA INOCULACIÓN CON *Glomus claroideum*, *Glomus etunicatum* Y *Paraglomus occultum* SOBRE *Triticum aestivum* L. Y *Avena sativa* L. EN CONDICIONES DE INVERNADERO

**RESUMEN**

Debido al creciente interés económico y ecológico que tienen en la actualidad los HMA se realizan esfuerzos para poner en práctica su uso como biofertilizantes. De aquí que, el objetivo del trabajo fue estudiar la compatibilidad y efectividad comparativa de la inoculación con tres especies de HMA: *Glomus claroideum* (I-1), *Glomus etunicatum* (I-2) y *Paraglomus occultum* (I-3) aisladas desde un Ultisol de la IX Región sobre dos hospederos agronómicos importantes trigo (*Triticum aestivum* L.) y avena (*Avena sativa* L.), medida en tres estadios fenológicos: embuche, espigadura y madurez. Para seleccionar el inóculo más eficiente se evaluaron parámetros agronómicos, fúngicos y bioquímicos. El rendimiento de *T. aestivum* en espigadura y madurez, frente a la inoculación, respondió en el orden I-1>I-3>I-2; en cambio, *A. sativa* siguió la tendencia I-1>I-2>I-3. En ambos hospederos el mayor peso seco se obtuvo con la inoculación de I-1. El contenido foliar de Cu en *T. aestivum* no presentó diferencias significativas, mientras que el mayor contenido de Zn foliar se obtuvo con I-3. En *A. sativa*, la captación de nutrientes siguió la misma tendencia que el peso seco. En *A. sativa* la mayor colonización se produjo con I-1 e I-2, mientras que con *T. aestivum* no se observaron diferencias en los tres estadios, coincidiendo con el mayor número de esporas. La producción de materia seca correlacionó estrechamente con los dos parámetros fúngicos (esporas y colonización de raíces). Las plantas presentaron distintas respuestas a la inoculación, destacando como más efectivo *G. claroideum*. En ambos cultivos la colonización por HMA estuvo relacionada con la captación de nutrientes; de manera que, se puede considerar como una alternativa a explorar para la selección de genotipos eficientes, que contribuyan a solucionar problemas de baja fertilidad de los suelos. De este estudio se concluye que, bajo las condiciones edáficas estudiadas, se encontró cierta compatibilidad funcional entre *A. sativa* y *G. claroideum*.

**ABSTRACT**

Due to the growing economic and ecological interest in the importance of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), work is worldwide carring out in order to use AMF as biofertilizers. The objective of the present study was to compare the effectiveness and compatibility under glasshouse conditions of three AMF species: *Glomus claroideum* (I-1), *Glomus etunicatum* (I-2), and *Paraglomus occultum* (I-3), isolated from an Ultisol Pumalal IX$^{th}$ Region, on two host plants. These were wheat (*Triticum aestivum* L.*)* and oat *(Avena sativa* L.). The effect of the inoculation was measured at three phenological stages: booting, heading and maturity. In order to select the more efficient inoculum agronomic, fungal, and biochemical parameters were evaluated. The yield of *T. aestivum* with respect to AM inoculation resulted in the order I-1>I-3>I-2; in contrast, *A. sativa* had the order I-1>I-2>I-3. In both crop species the highest dry weight was obtained with the inoculation I-1 species. In *T. aestivum,* the Cu content did not show significant differences. Highest Zn was obtained with I-3. In *A. sativa*, nutrients uptake followed the same trends that those of dry weight. In both host plants at maturity, the highest colonization by AMF was achieved with I-1, coinciding with the highest number of spores. Dry matter production showed a good relationship with the two fungal parameters (spores and root colonization). In both crops nutrient uptake was also related to AMF colonization,. In conclusion, it is possible to identify efficient fungal genotypes which can improve crop production in environments with low fertility. We can also conclude from this study that there is a better functional compatibility between *A. sativa* and the *G. claroideum* than between *T. aestivum* and any of the fungal isolates studied.

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Hasta hace algunos años se consideraba que la simbiosis MA carecía de especificidad entre el HMA y un hospedero (Gianinazzi-Pearson *et al*., 1985; Smith & Read, 1997). Así, una especie de HMA podría colonizar un amplio rango de plantas hospederas o también, una planta sería colonizada por varias especies de HMA. Bajo condiciones de invernadero, se asumía una falta de especificidad absoluta, ya que muchos vegetales podían ser inoculados exitosamente con mezclas de HMA. Lo anterior no demuestra en forma concluyente una ausencia de especificidad ecológica bajo condiciones de campo, ya que algunos hongos pueden colonizar solamente a ciertas plantas (Sanders, 2002) sugiriendo una cierta preferencia endófito-hospedero (McGonigle & Fitter, 1990). En mezclas de poblaciones de HMA nativas, Schenck & Kinloch (1980) encontraron que distintos cultivos tuvieron un efecto selectivo sobre los hongos. Además, en suelos cultivados, Hayman (1982) informó que la distribución de HMA se ve afectada en gran medida por las especies de plantas presentes.

Por otra parte, en una investigación realizada en campo con distintas herbáceas McGonigle & Fitter (1990) observaron la presencia de varias especies de HMA en sus raíces mientras que, *Holcus lanatus* L. fue colonizado preferentemente por *Glomus tenue.* Posteriormente, Sanders (1993) utilizando como inóculo trozos de raíces colonizadas, no encontró evidencias de especificidad micorrízica y Sanders & Fitter (1992) determinaron que el número de esporas de HMA en el suelo difiere según la especie de hospedero asociada. Otros estudios sobre especificidad hongo-hospedero se han realizado con arroz (*Oryza sativa*) (Dhillion, 1992) y leguminosas forrajeras (Giovannetti & Hepper, 1985). Por el contrario, estudios realizados en campo con praderas permanentes de ballica (*Lolium perenne* L.)-trébol blanco (*Trifolium repens* L.) presentaron alta colonización por HMA, teniendo *L. perenne* distintas respuestas frente a la inoculación ya sea, si el inóculo provenía de una herbácea o de *T. repens* como planta hospedera (Rogers *et al*., 1994).También, Ravnskov & Jakobsen (1995) observaron compatibilidad simbiótica entre *G. invermaium* asociado con pepino (*Cucumis sativus* L.), lino (*Linum usitatissimum* L.) o *T. aestivum*, pero el hongo aumentó sólo la captación de P cuando estuvo asociado con *L. usitatissimum*.

En general, de estos estudios en campo se concluye que existiría una cierta especificidad ecológica entre los HMA con sus plantas hospederas asociadas, lo que tendría importantes consecuencias para el funcionamiento de las comunidades vegetales y para la dinámica nutricional.

Este criterio de carencia de especificidad simbiótica se mantuvo hasta el año 2002, cuando Vandenkoornhuyse *et al*. (2002) y Bidartondo *et al*. (2002) mediante el uso de técnicas moleculares probaron en dos ecosistemas diferentes, una pradera templada y un bosque sub-ártico, presencia de distintos niveles de especificidad. Sus estudios evidenciaron la existencia de presiones de selección sobre el hongo y la planta, que harían específica la elección de pareja, aunque no necesariamente significaría una especificidad completa pero sí, un tipo de preferencia de un hospedero por cierto hongo (Sanders, 2002). Es decir, existiría una compatibilidad genética determinada por la habilidad del simbionte fúngico para colonizar al hospedero, donde el vegetal no siempre se beneficiaría asociado con el hongo.

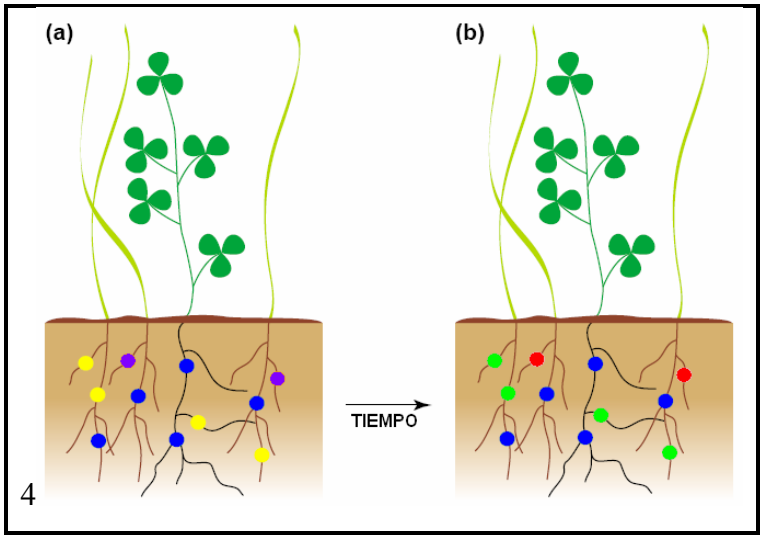


**Figura 4.1.** Cambios ocurridos en las comunidades de HMA a través del tiempo con dos hospederos *Agrostis capillaris* y *Trifolium repens*. Círculos de colores representan distintos morfotipos de HMA (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002).

Los estudios de Vandenkoornhuyse *et al.* (2002) los realizaron en raíces de dos herbáceas coexistentes *Agrostis capillaris* y *T. repens*; donde los resultados mostraron que la mayoría de los hongos se distribuyeron entre las dos plantas, mientras unas pocas especies mostraron preferencia por un hospedero (Figura 4.1). La evaluación de las comunidades fúngicas las

realizaron 4 veces durante el año con sorpresivas variaciones. Al comienzo (a) se encontraron varios tipos diferentes de HMA, la mayoría de ellos comunes para ambas plantas (azul y amarillo) mostrando un escaso número de ellos preferencia por un hospedero (naranjo). Con el tiempo (b), la comunidad fúngica compuesta por muchas especies de hongos no específicos cambió en ambas plantas, siendo algunos HMA diferentes a los del comienzo (azul y verde) y mostrando otros preferencia por un sólo hospedero (rosado). Este estudio muestra que además de la existencia de una cierta especificidad endófito-hospedero, la simbiosis es un sistema dinámico. Actualmente, se desconoce si los hongos que presentan preferencia por un determinado hospedero son los que entregan mayores beneficios al vegetal (Sanders, 2003).

Lo anterior conlleva a un interés por estudiar especies de HMA asociadas con determinadas especies de plantas hospederas y la influencia que tendrían los factores ambientales sobre la densidad de esporas y distribución, con la finalidad de seleccionar especies eficientes en programas de inoculación a gran escala. Así, este estudio soporta la hipótesis de que las especies de plantas, junto con las condiciones del suelo afectarían el funcionamiento de la simbiosis de acuerdo con la especie de HMA al cual se asocian.

De aquí que, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar, a través de la colonización producida por la inoculación de *G. claroideum*, *G. etunicatum* y *P. occultum* en plantas de *T. aestivum* y *A. sativa*, en tres estadios fenológicos (embuche, espigadura y madurez) la compatibilidad y eficiencia de las epítetas, entre ellas, junto con la cuantificación de parámetros de rendimiento de las plantas e indicadores del suelo.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Preparación de inóculos puros de HMA

Producto de los estudios de diversidad de HMA realizados en ensayos de campo en un Ultisol (Capítulo 3), se seleccionaron 3 especies de HMA que se encontraron con mayor abundancia: *G. claroideum* (I-1), *G. etunicatum* (I-2) y *P. occultum* (I-3). Durante aproximadamente una semana, se aislaron esporas de las 3 especies hasta obtener un número suficiente (alrededor de 500 esporas en triplicado), manteniéndolas en agua destilada y refrigeradas a 4ºC. Paralelamente, se hizo crecer sorgo (*Sorghum bicolor* L.) en macetas plásticas de 7,5 cm de

diámetro por 25 cm de profundidad, equivalentes a 900 mL, en arena fina estéril (previamente lavadas con ácido). Las plántulas se mantuvieron en invernadero bajo condiciones controladas de luz y temperatura (ciclos de luz de 16 h a 21ºC, acompañados de 8 h oscuridad a 15ºC y con densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 500-650 mmol $m^{-2}$ $s^{-1}$), con una humedad relativa ambiental de 50% y con la del suelo, a capacidad de campo. Cuando se estimó que la raíz había alcanzado un tamaño adecuado (aproximadamente 12 semanas), la planta completa se retiró cuidadosamente de la maceta, lavándose las raíces para eliminar cualquier resto de sustrato y con una jeringa se inyectaron superficialmente en el centro de la raíz las esporas del inóculo respectivo, previamente desinfectadas (Morton, comunicación personal). Las plantas inoculadas se colocaron en macetas de 5L de capacidad con una mezcla estéril suelo:arena:vermiculita en relación 7:2,5:0,5 y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero desde julio a octubre de 2004, controlando las condiciones de luz, temperatura y humedad.

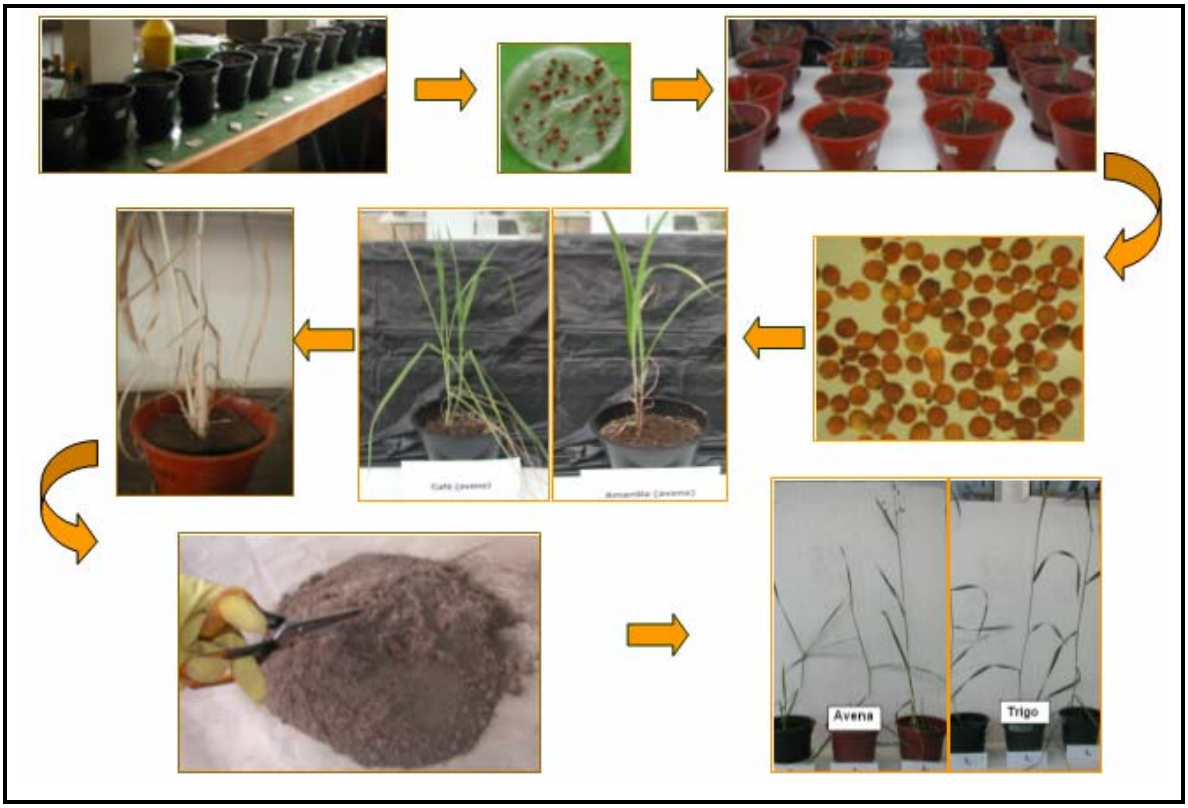


**Figura 4.2.** Proceso de producción de inóculo de HMA.

El suelo que se utilizó para la preparación del soporte correspondió a la serie Maquehue con pH de 5,3; 2,46 µg $g^{-1}$ de P Olsen; 22,14 % de MO y 2574 µg $g^{-1}$ de P total. Previo a la cosecha, se suspendió el riego durante 3 semanas para inducir la esporulación del HMA frente al estrés hídrico producido a la planta. Finalmente, se eliminó la parte aérea del *S. bicolor* y el contenido de cada una de las macetas, incluyendo el suelo y las raíces previamente cortadas en trozos de 1 cm, se homogeneizaron y almacenaron a 4º C, para ser utilizado posteriormente, como fuente de inóculo para el bioensayo (Figura 4.2).

### 4.2.2. Establecimiento del bioensayo

En noviembre de 2004 se estableció el ensayo de efectividad micorrízica en invernadero con condiciones controladas de luz y temperatura. Macetas de 1 L de capacidad se llenaron con mezcla estéril suelo:arena:vermiculita (7:2,5:0,5) y superficialmente se colocó una banda de 50 g de inóculo de HMA (equivalente a una capa de 1 cm de profundidad de sustrato conteniendo esporas, micelio extrarradical y trozos de raíces colonizadas por HMA en plantas de *S. bicolor* cultivadas bajo condiciones similares) la que se cubrió con el mismo sustrato estéril. En cada maceta se sembraron dos semillas pre-germinadas de cada planta hospedera, previamente desinfectadas con cloramina T. A la semana siguiente, todas las macetas se reinocularon con la microflora de vida libre y por una sola vez se fertilizaron con $KNO_3$ en el equivalente a 8 mg N por maceta. Cada 15 días, se adicionó solución nutritiva, exenta de P y durante todo el ensayo, las plantas fueron regadas una a dos veces a la semana para mantener el suelo a capacidad de campo.

### 4.2.3. Análisis estadístico

Este estudio factorial de 3x3x4 consistió de una combinación de tres especies HMA (*G. claroideum*, *G. etunicatum* y *P. occultum*), 3 estadios fenológicos del hospedero (embuche, espigadura y madurez), con 4 repeticiones por tratamiento y en 2 plantas (*A. sativa*, *T. aestivum*) con un total de 72 macetas.

### 4.2.4. Parámetros evaluados

En el transcurso del ensayo los 2 hospederos se evaluaron en tres estadios fenológicos según escala de Zadocks (Zadocks *et al*., 1974): 45 (embuche), 59 (espigadura) y 75 (madurez), midiéndose parámetros de ambos simbiontes:

a) Hospedero: peso seco aéreo, peso seco raíz, relación tallo:raíz (T/R) y peso seco espiga.
b) HMA: porcentaje de colonización en raíces (determinada en una fracción de masa fresca del sistema radicular), longitud total de raíz y longitud de raíz colonizada (Figura 4.3).

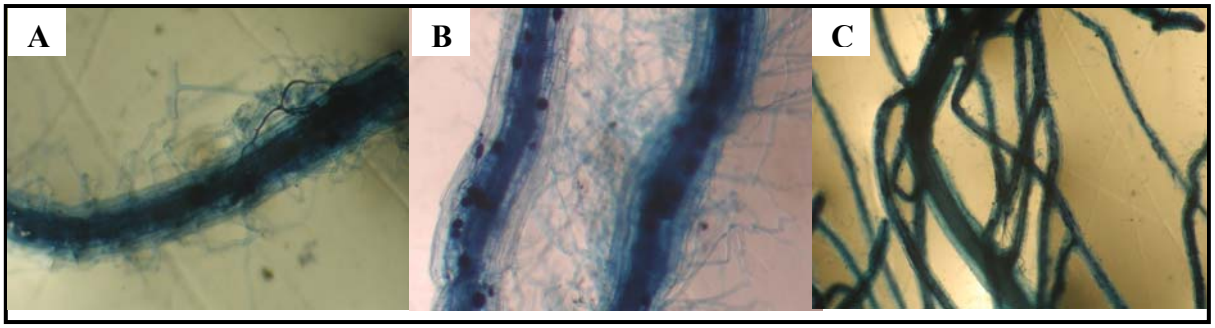


**Figura 4.3.** Colonización por HMA en raíces de *A. sativa* (A y B) y *T. aestivum* (C).

En la etapa final del ensayo (madurez) al cosechar el hospedero, las plantas se dividieron en tallo y raíz y se determinaron los pesos secos después de llevarlas a estufa de secado a 70ºC hasta peso constante (Staibung *et al*., 2002). En el material vegetal se realizaron determinaciones de concentración de algunos nutrientes como P (espectrofotometría visible), Cu y Zn foliar (espectrofotometría de absorción atómica).

En el suelo de cada una de las macetas se determinaron los siguientes parámetros:

a) Químicos: pH (relación suelo:agua 1:2,5), %MO (Walkley & Black, 1934) y P disponible (Olsen & Sommers, 1982).
b) Bioquímicos: actividad fosfatásica ácida (Tabatabai & Bremner, 1969).
c) Fúngicos: número de esporas mediante el método de tamizado húmedo con gradiente de sacarosa (Sieverding, 1991).

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Rendimiento y contenido nutricional de las plantas

En la Figura 4.4 se muestra el peso aéreo y de la raíz tanto de *T. aestivum* como *A. sativa* en los tres estadios fenológicos estudiados: embuche, espigadura y madurez.

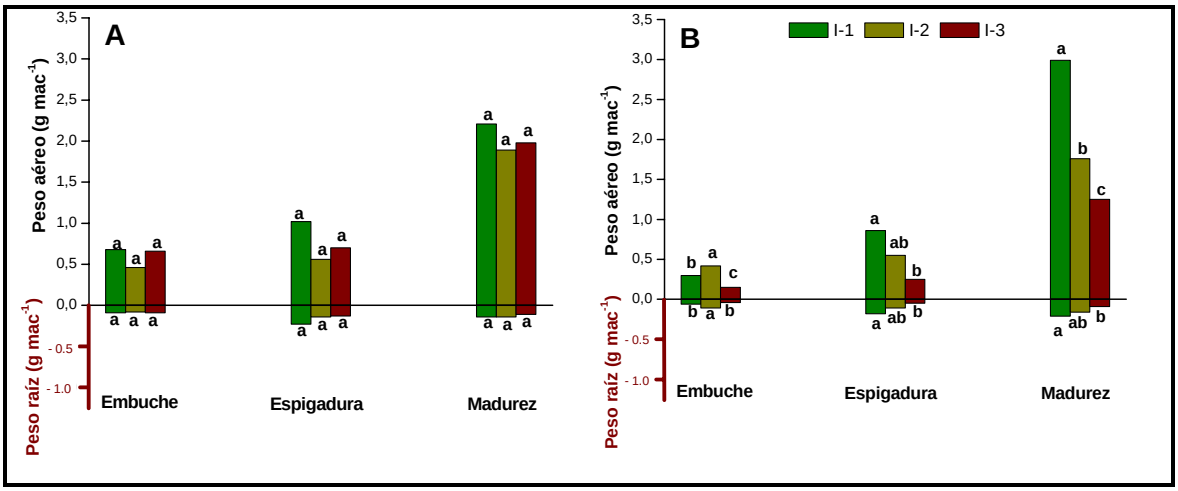


**Figura 4.4.** Peso seco de la parte aérea y raíz en *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectados por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. Valores representan la media de tres repeticiones, barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En *T. aestivum* (Figura 4.4A), se puede observar que no se produjeron diferencias significativas en el rendimiento por la inoculación con las especies de HMA en cada una de las tres etapas fenológicas y lo mismo sucedió con el peso de la raíz. En cambio, en *A. sativa* (Figura 4.4B) el peso de la parte aérea se incrementó a medida que se aproximaba al período de madurez, mostrando diferencias significativas entre inóculos, al igual que el peso de la raíz. A la cosecha, I-1 produjo un aumento en peso aéreo de 140% con respecto a I-3 y un 44%, en comparación con I-2. En espigadura y madurez, *A. sativa* mostró una respuesta en rendimiento frente a la inoculación de HMA en el siguiente orden: I-1>I-2>I-3; así, la mayor masa aérea se obtuvo por la inoculación con *G. claroideum.*

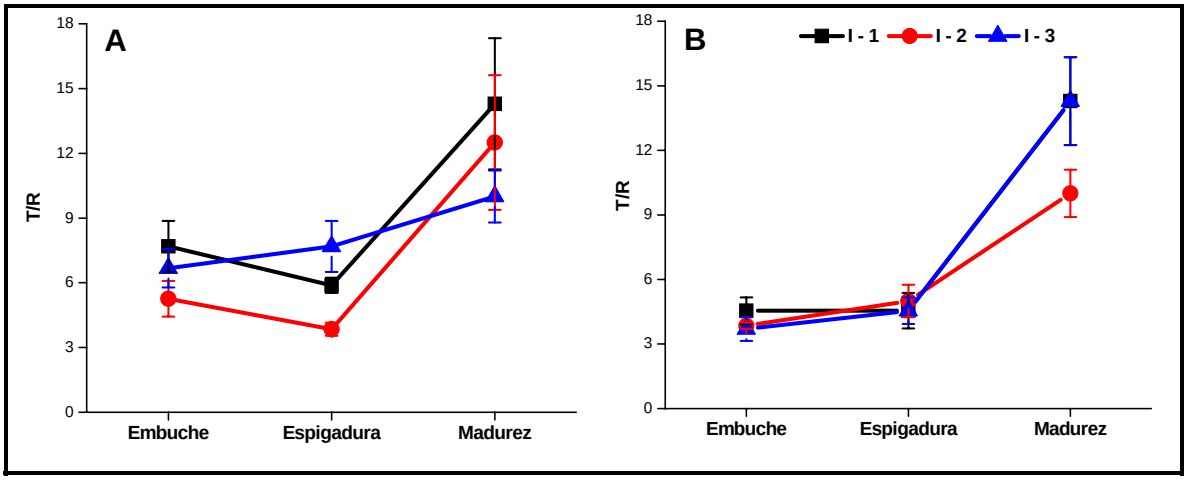


**Figura 4.5.** Relación tallo/raíz (T/R) en *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectado por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. Barras representan el error estándar de tres repeticiones.

En *T. aestivum* (Figura 4.5A) con I-3 la relación T/R fue aumentando en el tiempo, es decir, la parte aérea incrementó su masa en comparación al sistema radicular mientras que, con los otros dos inóculos la relación disminuyó en la etapa de espigadura, aumentando en madurez. En cambio, T/R en *A. sativa* con los tres inóculos aumentó en el tiempo, señalando un desarrollo armonioso del hospedero (Figura 4.5B).

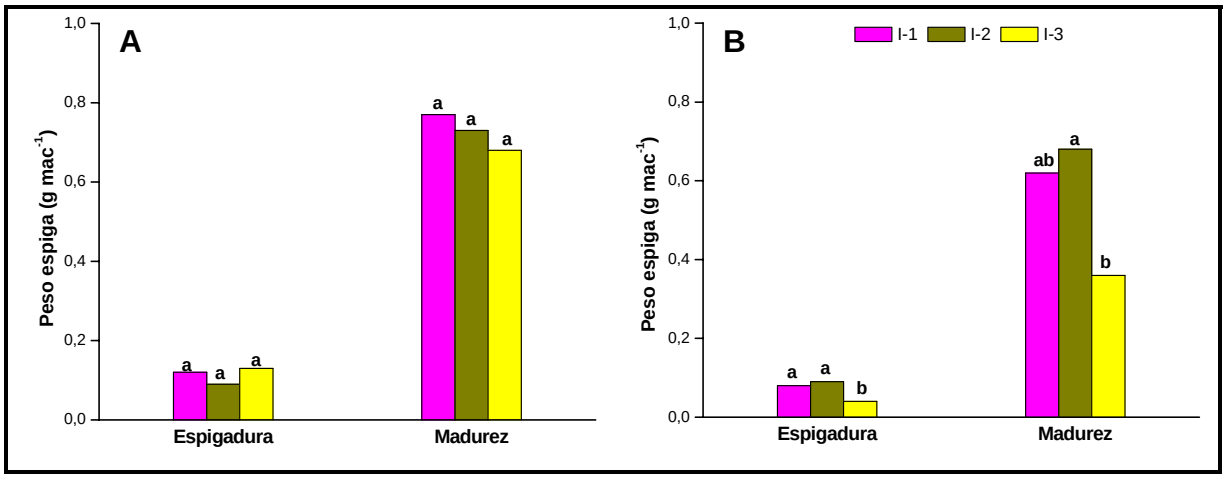


**Figura 4.6.** Peso espiga en *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectado por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de espigadura y madurez. Valores representan la media de tres repeticiones, barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Con respecto al peso de las espigas en *T. aestivum* no se encontraron diferencias significativas en los dos estadios fenológicos evaluados (Figura 4.6A). En *A. sativa* (Figura 4.6B), la mayor masa se obtuvo con I-2 e I-1, obteniéndose significativamente menor peso de espigas por la

inoculación con I-3. En espigadura el tratamiento con I-2 produjo un incremento de 125% respecto a I-3; descendiendo en madurez, a un 89%.

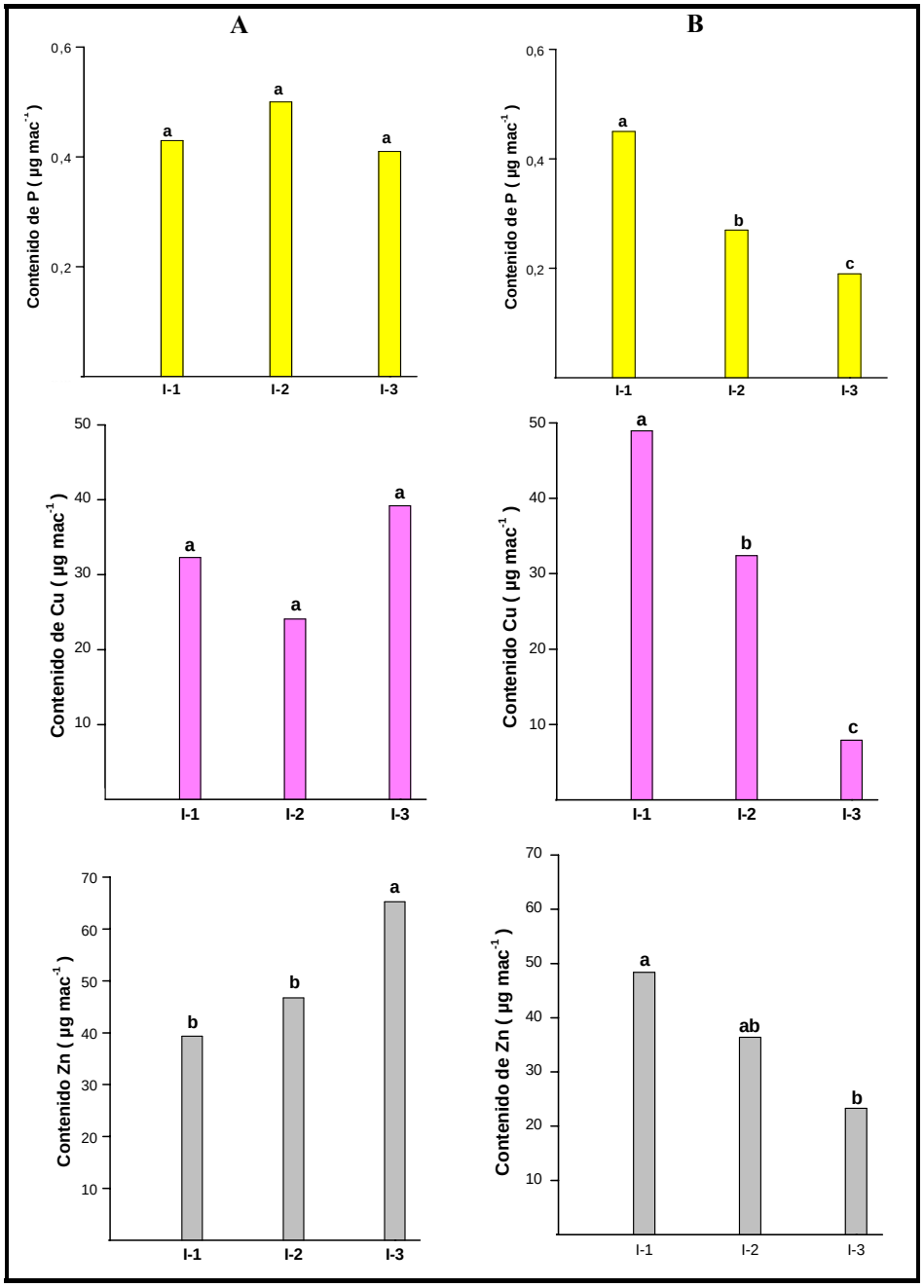


**Figura 4.7.** Contenido de nutrientes: P, Cu y Zn en *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectados por la inoculación de I-1, I-2 e I-3. Valores representan la media de tres repeticiones, barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En la Figura 4.7A se puede observar que en *T. aestivum* los contenidos de P y Cu foliar no presentaron diferencias significativas; en cambio, la movilización de Zn con la inoculación

con I-3 fue significativamente mayor que I-2 e I-1, con incrementos de 40% y 66%, respectivamente.

En *A. sativa* los contenidos de P y Cu foliar fueron significativamente mayores con I-1 seguido por I-2; en el contenido de Zn no se encontraron diferencias significativas entre I-1 e I-2, teniendo I-3 la menor movilización. Así, en *A. sativa* la inoculación con *G. claroideum* (I-1) produjo incrementos en el contenido de P de 67% respecto a *G. etunicatum* (I-2) y de 137% con respecto a *P. occultum* (I-3). En el caso de Cu, este incremento fue de 51% y 520%, respectivamente, mientras que el aumento en el contenido de Zn en *A. sativa* por la inoculación con *G. claroideum* fue de 108%, sobre *P. occultum* (Figura 4.7B).

La cantidad de nutrientes movilizados a la planta en el caso de *T. aestivum* no indican claramente un efecto por la inoculación. En cambio, en *A. sativa* se mantiene una clara tendencia I-1>I-2>I-3, de la misma manera que para el rendimiento de las planta (Figura 4.4).

### 4.3.2 Parámetros HMA

Con respecto a la velocidad de colonización por HMA, mostrada en la Figura 4.8, las plantas de *T. aestivum* (Figura 4.8A) presentaron desde la etapa de embuche un elevado porcentaje de colonización, el que prácticamente se mantuvo constante en el tiempo y aunque no se encontraron diferencias significativas por la inoculación, I-3 incrementó notoriamente la colonización de las raíces entre espigadura y madurez.

En *A. sativa* (Figura 4.8B), en el estado de embuche, la colonización fue baja y aumentó a través del tiempo con I-1 e I-2. La inoculación con I-3 mantuvo un valor relativamente constante alcanzando en la madurez un notable incremento de aproximadamente 283%, presentando *P. occultum* una velocidad de colonización semejante con ambos hospederos; sin embargo, durante este estadio fenológico la colonización con I-1 e I-2 fue significativamente mayor, respecto a I-3.

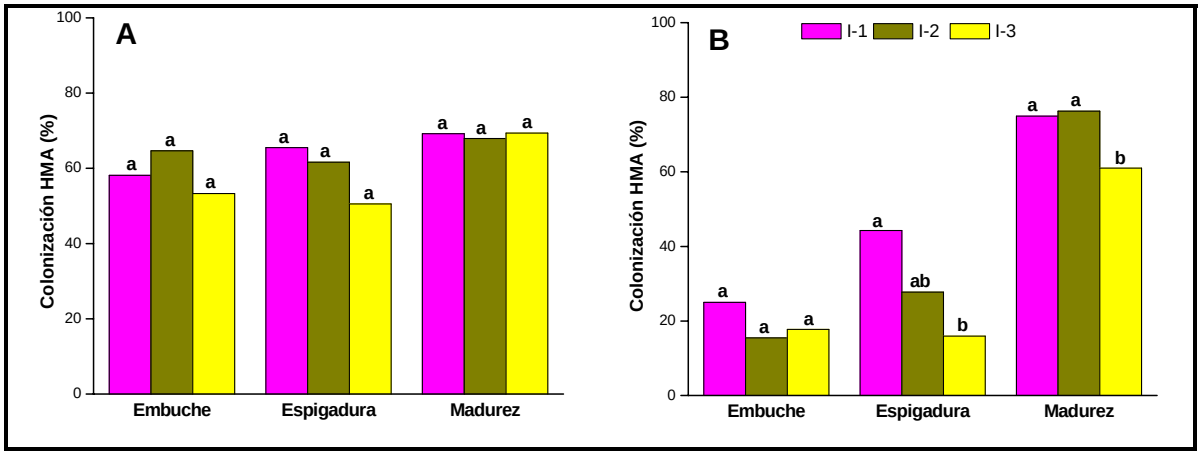


**Figura 4.8.** Porcentaje de colonización por HMA en raíces de: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectado por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. Valores representan la media de tres repeticiones, barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En *T. aestivum* (Figura 4.9) la longitud de raíz total no presentó diferencias frente a la inoculación con los tres ecotipos, pero se puede observar que con I-2 la longitud se mantuvo prácticamente constante a través del tiempo. En *A. sativa*, en estado de embuche la inoculación con I-2 presentó mayor longitud radical siendo mayor que I-1; en cambio, en espigadura y madurez, I-1 fue significativamente mayor que I-3. En la raíz inoculada con I-1 se observa una tendencia en aumento; mientras por el contrario, la longitud con I-2 tuvo una disminución en espigadura, con un incremento importante en madurez.

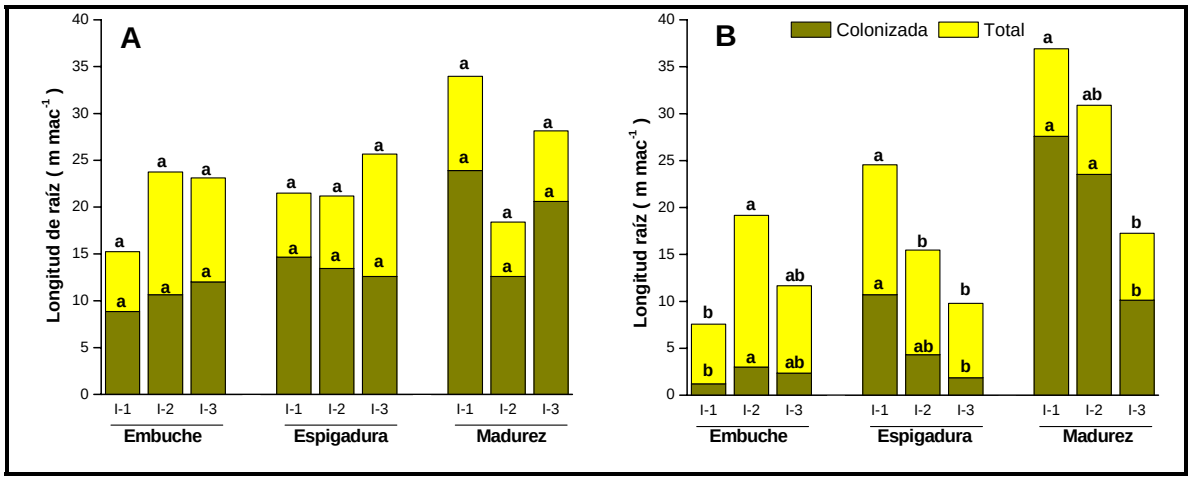


**Figura 4.9.** Longitud total de raíz y longitud de raíz colonizada de: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), afectadas por la inoculación de I-1, I-2 e I-3 en los estadios fenológicos de embuche, espigadura y madurez. Valores representan la media de tres repeticiones, barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En *T. aestivum* la longitud de raíz colonizada se mantuvo constante a través del tiempo, aumentando en madurez con I-1 e I-3. En *A. sativa* en embuche, la menor longitud colonizada se obtuvo con I-1, siendo significativamente mayor que I-3 en espigadura y madurez (Figura 4.9).

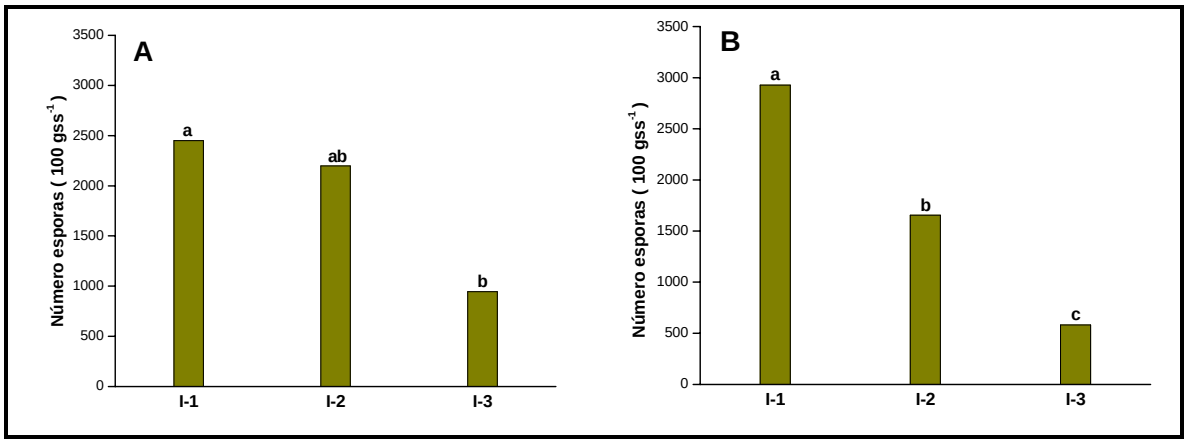


**Figura 4.10.** Número de esporas de I-1, I-2 e I-3 en *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B), al término del ensayo. Valores representan la media de tres repeticiones, barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

En *T. aestivum* el número de esporas de HMA encontrado en el suelo inoculado con I-1, fue significativamente mayor que en I-3. Similarmente en *A. sativa*, se produjeron grandes diferencias en la densidad de esporas dejadas en el suelo por los tres inóculos; siguiendo el siguiente orden: I-1>I-2>I-3 (Figura 4.10.).

### 4.3.3 Parámetros químicos y biológicos del suelo

Los suelos con ambos hospederos no presentaron diferencias significativas en acidez (Figura 4.11A) frente a la inoculación con las tres especies de HMA; sin embargo, con *T. aestivum* el pH del suelo se mantuvo sin mayor variación con respecto al del suelo utilizado como sustrato (pH 5,3) mientras que, con *A. sativa*, se observa una disminución de la acidez.

Con respecto a los contenidos de MO en el suelo, no se encontraron diferencias por la inoculación tanto para *T. aestivum* como *A. sativa*, aunque al utilizar *T. aestivum* como hospedero se alcanzaron niveles más altos que con *A. sativa* (Figura 4.11B). Los resultados de P disponible mostraron variaciones de acuerdo al inóculo utilizado; en *T. aestivum*, no se observaron diferencias significativas entre los suelos inoculados con I-2 e I-3, mientras que

con I-1 se tuvo un incremento de 35% respecto a los otros (Figura 4.11C). Por el contrario, en *A. sativa* la disponibilidad fue significativamente más alta producto de la inoculación con I-2 seguida por I-3.

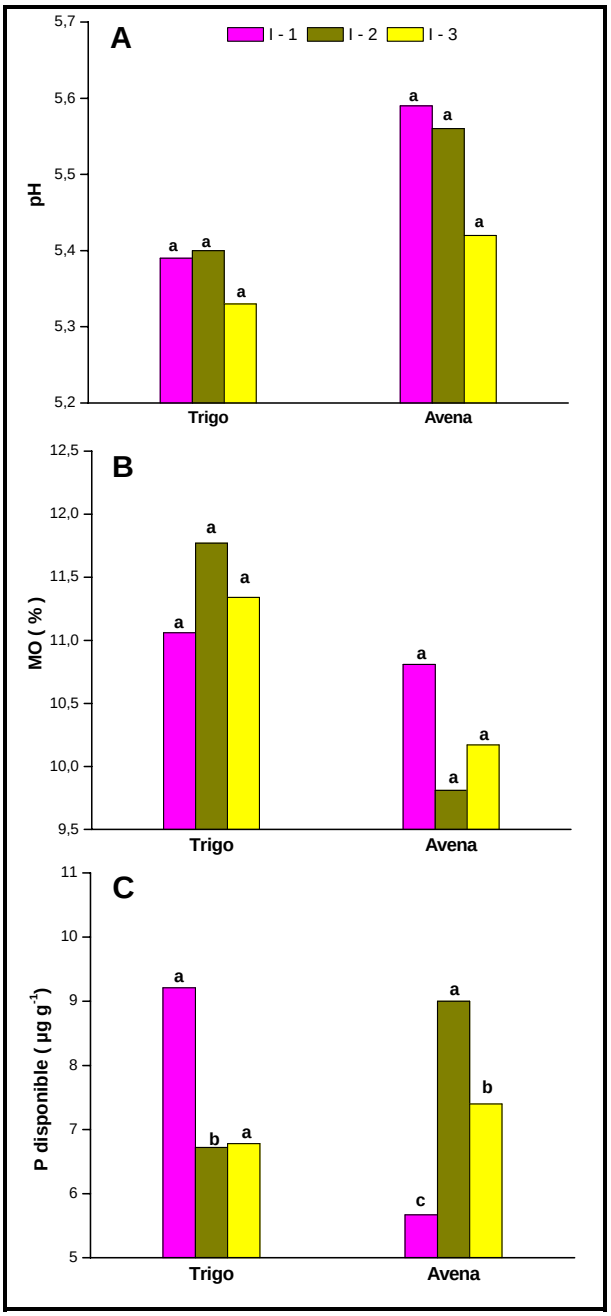


**Figura 4.11.** Parámetros químicos del suelo: pH (A), %MO (B) y P disponible (C) al finalizar ensayo, afectados por la inoculación con I-1, I-2 e I-3. Valores representan la media de tres repeticiones, barras con igual letra no presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

La actividad fosfatásica ácida en el suelo con *T. aestivum* (Figura 4.12A) no presentó diferencias significativas con la inoculación. Cuando en el suelo creció *A. sativa* (Figura 4.12B) como hospedero, la mayor cantidad de enzima se alcanzó con I-3, relacionado a una menor colonización, mientras que I-2 presentó la menor cantidad de enzima (Figura 4.12) y una alta colonización por HMA en madurez (Figura 4.8).

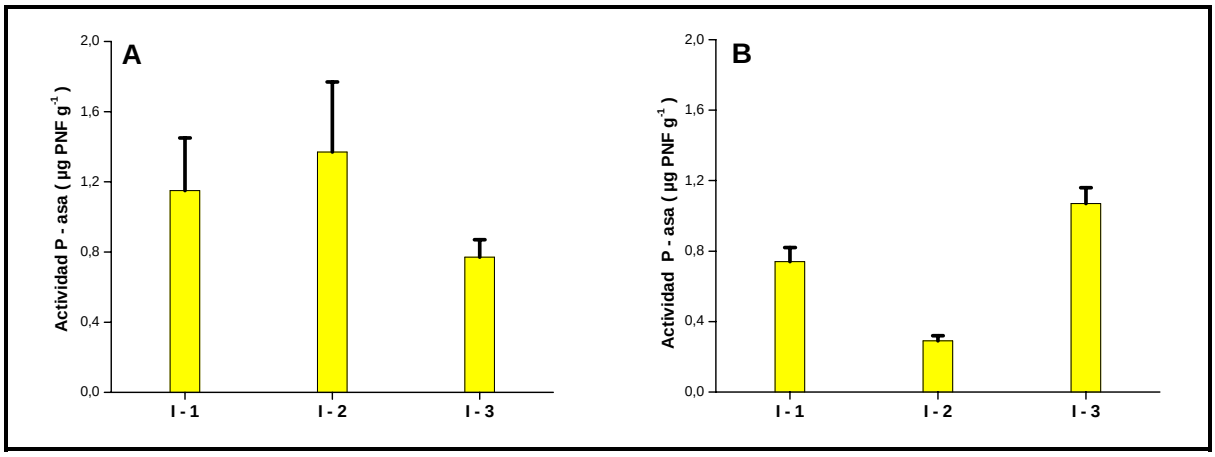


**Figura 4.12.** Actividad fosfatásica ácida en el suelo con: *T. aestivum* (A) y *A. sativa* (B) al finalizar ensayo, afectada por la inoculación con I-1, I-2 e I-3. Barras representan el error estándar de tres repeticiones.

### 4.3.4. Correlaciones entre parámetros fúngicos con algunos parámetros del suelo

Al utilizar *T. aestivum* como hospedero se encontró una estrecha correlación en el contenido de P del suelo con el número de esporas de HMA (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Coeficientes correlación de parámetros del suelo y concentración de nutrientes foliares en *T. aestivum* con algunas características de las poblaciones de HMA (n=12) (** Significativo P≤0,01; * significativo P≤0,05)..

| Variable | Planta | HMA | | |
|---|---|---|---|---|
| | Materia seca | Longitud raíz | Colonización HMA | Esporas HMA |
| **Esporas** | 0,52 | 0,31 | 0,35 | - |
| **Colonización** | 0,69* | 0,69* | - | 0,35 |
| **Materia seca** | - | 0,73* | 0,69* | 0,52 |
| **Longitud raíz** | 0,73* | - | 0,69* | 0,31 |
| **Cu foliar** | 0,86** | 0,61 | 0,69* | 0,35 |
| **Zn foliar** | 0,94** | 0,62 | 0,68* | 0,28 |
| **P foliar** | 0,93** | 0,63 | 0,48 | 0,71* |
| **P Olsen** | -0,02 | 0,11 | -0,02 | 0,51 |

Por el contrario, en *A. sativa* se aprecia una relación negativa entre los dos parámetros (Tabla 4.2). Así, ambos hospederos mostraron un comportamiento totalmente diferente.

La materia seca en ambos cereales del presente estudio correlacionó positivamente con el número de esporas siendo la relación mayor con *A. sativa*. Similarmente, el comportamiento del otro parámetro fúngico evaluado, el porcentaje de colonización, mostró una estrecha relación con la materia seca tanto en *A. sativa* como *T. aestivum*.

**Tabla 4.2.** Coeficientes correlación de parámetros del suelo y concentración de nutrientes foliares en *A. sativa* con algunas características de las poblaciones de HMA (n=12) (** Significativo P≤0,01; * significativo P≤0,05).

| Variable | Planta | HMA | | |
|---|---|---|---|---|
| | Materia seca | Longitud raíz | Colonización HMA | Esporas HMA |
| **Esporas** | 0,87** | 0,78* | 0,51 | - |
| **Colonización** | 0,57 | 0,73* | - | 0,51 |
| **Materia seca** | - | 0,86** | 0,57 | 0,87** |
| **Longitud raíz** | 0,86** | - | 0,73* | 0,78* |
| **Cu foliar** | 0,93** | 0,93** | 0,70* | 0,85** |
| **Zn foliar** | 0,82** | 0,82** | 0,52 | 0,87** |
| **P foliar** | 0,95** | 0,79* | 0,59 | 0,76* |
| **P Olsen** | -0,58 | -0,33 | -0,06 | -0,68* |

En *A. sativa*, la colonización de HMA correlacionó con el contenido de Cu foliar; mientras que *T. aestivum* estuvo relacionado con el contenido de Cu y Zn foliar. Además, en *T. aestivum*, el otro nutriente evaluado, P foliar, mostró una estrecha correlación con la densidad de esporas.

## 4.4 DISCUSIÓN

A través del tiempo, las plantas inoculadas tuvieron distintas respuestas en producción de biomasa. En *T. aestivum* no se encontraron diferencias, probablemente debido a una mayor sensibilidad del hospedero a las condiciones edáficas del suelo. La inoculación de HMA en *A. sativa* produjo diferencias significativas en las plantas; con *G. claroideum,* se obtuvo el mayor rendimiento; mientras que, la inoculación con *P. occultum* produjo el menor peso aéreo; posiblemente, entre *A. sativa* y *G. claroideum* se estableció una compatibilidad funcional. Varios autores han mostrado la existencia de "compatibilidad funcional", (Ravnskov & Jakobsen, 1995) entre determinadas especies de plantas y hongos (van der Heijden *et al*., 1998), sin que ello implique la existencia de una especificidad taxonómica entre ambos simbiontes, ya que en todos los casos se forman micorrizas. Lo que la "compatibilidad funcional" implica es que la misma especie vegetal al ser inoculada con HMA de poder

infectivo similar, produce diferencias marcadas en la respuesta fisiológica de la planta ante la inoculación.

Los resultados de biomasa de planta están relacionados con la longitud de raíz colonizada que varió considerablemente con las distintas combinaciones hospedero-endófito, donde nuevamente la mayor longitud de raíz, total o colonizada, la presentó *A. sativa* inoculada con *G. claroideum,* encontrándose menor longitud de raíz en la planta inoculada con *P. occultum*. Estos resultados son corroborados por antecedentes de la literatura, que demuestran variaciones significativas en la respuesta de las especies de plantas o cultivares dentro de una especie frente a la inoculación con HMA, bajo determinadas condiciones ambientales y edáficas (Bä *et al.*, 2000; Zhu *et al.,* 2000; Linderman & Davis, 2004). En *T. aestivum* la longitud de la raíz no cambió significativamente desde el estado de embuche, contrario a lo ocurrido con *A. sativa*, sugiriendo que este cereal pareciera ser un hospedero más dependiente de las MA.

Con *A. sativa*, se produjeron variaciones en el porcentaje de colonización por HMA a través de los 3 estadios fenológicos, corroborando lo informado por Wilson & Hartnett (1998), quienes encontraron que durante el ciclo de vida de una planta se producen variaciones en la formación y función micorrízica. En la etapa madurez, en *A. sativa*, la menor colonización se alcanzó con I-3 coincidiendo con un menor contenido de P foliar. En *T. aestivum* la colonización de las raíces por HMA en los 2 primeros estadios fenológicos fue mayor que en *A. sativa* igualándose en madurez, excepto con I-3, mientras que, la inoculación con I-1 produjo un aumento paulatino de la colonización, resultados similares a los informados por Montaño *et al*. (2001) en dos genotipos de *T. aestivum* crecidos en un Andisol mexicano y evaluados en tres estadios fenológicos de la planta. La colonización por HMA como mecanismo biológico para la captación de nutrientes por la planta, sólo es un proceso simbiótico complementario de la eficiencia nutricional fisiológica de cada genotipo (Marschner, 1995).

El otro parámetro fúngico evaluado, el número de esporas, fue influenciado por el hospedero correlacionando estrechamente con la materia seca. Este parámetro fúngico se utiliza como indicador rudimentario de la capacidad de reproducción de las especies de HMA; sin embargo,

la información que entrega puede ser sesgada por diferencias en tamaño y germinación de las esporas (Daniels *et al.,* 1981; Koske, 1987).

En este bioensayo, la diferencia entre el pH del suelo utilizado como soporte (pH 5,3) y el Ultisol del agroecosistema (pH 5,6) desde el cual se aislaron las 3 especies (capítulo 3) fue de 0,3 unidades, no encontrándose al término del ensayo diferencias por la inoculación. Se ha informado que la respuesta de las plantas inoculadas con HMA a la acidez del suelo, depende de la diferencia entre el pH del suelo del cual provienen los hongos y el pH del suelo en estudio (Entry *et al*., 2002). El *T. aestivum* es un cultivo sensible a la acidez (tolerancia sobre pH 5,6) lo que posiblemente afectó tanto al hospedero como al endófito. En cambio, *A. sativa* una especie más tolerante a la acidez al ser inoculada con *G. claroideum* y *G. etunicatum*, incrementó el pH del suelo. Lo anterior demuestra que algunas especies de HMA producen una alteración del pH rizósferico (Borie & Rubio, 1999). En general, con este tipo de estudios se han obtenido respuestas diferentes; mientras algunas especies HMA aumentaron el crecimiento de la planta en suelos ácidos encalados (Clark *et al*., 1999), otros morfotipos influyeron positivamente en suelos ácidos sin encalar (Guzmán-Plazola, 1989). Por otra parte, estudios realizados por Entry *et al*. (2002) con 13 especies de HMA, observaron que todos los hongos toleraron condiciones de acidez del suelo y concluyeron que la respuesta principalmente dependería de la especie de hongo asociado. Por otra parte, Sylvia & Williams (1992) señalaron que bajo condiciones de extrema acidez en los suelos, aún se desconoce si es realmente el hongo el que protege al hospedero de la acidez.

Desde un punto de vista nutricional la importancia de las MA radica en el hecho que incrementan la habilidad de la planta para absorber nutrientes especialmente aquellos de baja movilidad en el suelo como P (Ning & Cumming, 2001), Cu (Li *et al*., 1991) y Zn (Parada Dias & Cardoso, 2004). Este efecto es más pronunciado bajo condiciones de baja disponibilidad de P del suelo, donde la colonización aumenta significativamente la captación de nutrientes por unidad de longitud de raíz, debido a un incremento de superficie de raíz total por el crecimiento hifal (Siqueira *et al*., 1998).

El pH del suelo es un parámetro edáfico crítico, ya que afecta la movilidad de los iones metálicos; una mayor disponibilidad de metal asociado con un pH bajo podría resultar detrimental para el hongo (Angle & Heckman, 1986). En términos de mayor compatibilidad producida por la inoculación con las tres especies HMA en los dos cereales, los resultados mostraron que la captación de nutrientes en *T. aestivum*, no presentó diferencias significativas respecto al contenido de P y Cu foliar, en cambio, el Zn foliar incrementó un 39% cuando la planta estuvo inoculada con *P. occultum* en comparación con *G. claroideum*. En *A. sativa* la mayor compatibilidad se obtuvo con *G. claroideum*. En estudios realizados por van der Heijden (1998) informaron que las especies de plantas difieren en su dependencia a los HMA y a su vez, especies de hongos específicos tienen efectos diferentes sobre el crecimiento de la planta, sugiriendo que el hongo cumple distintos roles dentro del ecosistema.

En la etapa de madurez, tanto en *T. aestivum* y *A. sativa*, los tratamientos con mayor acumulación de P foliar fueron los que presentaron el menor porcentaje de colonización por HMA, resultados que son semejantes a los obtenidos en *T. aestivum* por Montaño *et al*. (2001).

Las respuestas obtenidas en este bioensayo sugieren que los HMA efectivamente mejoraron la adquisición de elementos por la planta hospedera; el notable incremento alcanzado en la concentración de nutrientes en *A. sativa*, producto de la inoculación con *G. claroideum*, corrobora resultados obtenidos por Cumming & Ning (2003) con *Andropogon virginicus* L.

En las condiciones de crecimiento de los hospederos con una baja disponibilidad de P del sustrato, la biomasa de la parte aérea de la *A. sativa*, como el peso de espiga junto con la colonización por MA de las raíces mostraron diferencias significativas siendo *G. claroideum* la especie fúngica más exitosa de las tres; en cambio, utilizando *T. aestivum* como hospedero no se encontraron diferencias; así, los cultivares individuales exhibieron diferentes respuestas de crecimiento frente a la inoculación con HMA.

## 4.5 CONCLUSIONES

En este estudio, uno de los primeros realizados en Chile sobre efectividad micorrízica, se seleccionaron como hospederos, dos cereales que son utilizados frecuentemente en rotaciones de cultivo por agricultores de la zona centro-sur del país, los que fueron inoculados con tres especies de HMA, aisladas desde los mismos suelos de la IX Región. En general, con *T. aestivum* no se encontraron diferencias en los parámetros evaluados frente a la inoculación de las especies de HMA; mientras que, con *A. sativa* se obtuvieron variadas respuestas a la inoculación, encontrándose una compatibilidad funcional con *G. claroideum*. La colonización por HMA se relacionó en ambos hospederos con la captación de nutrientes; de manera que se puede considerar como una alternativa a explorar la selección de genotipos eficientes, para que el efecto nutricional y mecanismo biológico de la simbiosis del HMA, y sean alternativas que puedan contribuir a solucionar problemas de baja fertilidad de los suelos agrícolas de origen volcánico del Centro Sur de Chile.

De acuerdo a los resultados, la *A. sativa* fue un cereal muy dependiente de la inoculación con *G. claroideum* y *G. etunicatum*, el crecimiento de su raíz fue paulatino y los propágulos producidos en el suelo, en términos de metros de raíz colonizada y número de esporas, fueron mayores, es decir, presentó un mayor potencial de inóculo que el *T. aestivum*.

Bajo las condiciones de invernadero que se realizó el ensayo se obtuvieron variaciones en los días en que las plantas alcanzaron los distintos estadios de crecimiento. Las principales diferencias se registraron con algunas relaciones específicas hospedero-endófito que aceleraron las respuestas fenológicas; así, *A. sativa* inoculada con *G. etunicatum* resultó ser la inoculación más precoz llegando a los 17 días a embuche (Z=45), 23 días hasta espigadura (Z=59), y 45 días para madurez (Z= 75). El efecto de la inoculación con *G.claroideum* fue el más tardío, ya que a los 35 días se alcanzó etapa de embuche, a los 63 días (espigadura) y 79 días (madurez). Por el contrario, la inoculación con las tres especies de HMA en *T. aestivum* produjo respuestas similares con valores promedio de 45 días (Z=45), 63 días (Z=59) y 96 días (Z=75).

## 4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Angle, J.S., Heckman, J.R. (1986). Effect of soil pH and sewage sludge on VA mycorrhizal infection of soybeans. Plant Soil 93: 437-441.

Bä, A.M., Plenchette, C., Danthu, P., Duponnois, R., Guissou, T. (2000). Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. Agroforestry Systems 50: 95-105.

Borie, F., Rubio, R. (1999). Effects of arbuscular mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of aluminum- tolerant and aluminum- sensitive barley cultivars. J. Plant Nutr. 22: 121-137.

Bidartondo, M.I., Redecker, D., Hijrl, I., Wiemken, A., Bruns, T.D., Dominguez, L., Sercic, A., Leake, J.R., Read, D.J. (2002). Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. Nature 419: 389-392.

Clark, C.A., Zeto, S.K., Zobel, R.W. (1999). Arbuscular mycorrhizal fungal isolate effectiveness on growth and root colonization of *Panicum virgatum* in acidic soil. Soil Biol. Biochem. 31: 1757-1763.

Cumming, J.R., Ning, J. (2003). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance aluminium resistance of broomsedge (*Andropogon virginicus* L.). J. Exp. Bot. 386: 1447-1459.

Daniels, B.A., McCool, P.M., Menge, J.A. (1981). Comparative inoculum potential of spores of six vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 89: 385-391.

Dhillion, S.S. (1992). Evidence for host mycorrhizal preference in native grassland species. Mycol. Res. 96: 359-362.

Douds, D.D., Nagahashi, G., Abney, G.D. (1996). The differential effects of cell wall associated phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol.133: 289-294.

Entry, J.A., Rygiewicz, P.T., Watrud, L.D., Donnelly, P.K. (2002). Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. Adv. Environ. Res. 7: 123-138.

Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Trouvelot, A. (1985). Evaluation of the infectivity and effectiveness of indigenous vesicular arbuscular fungal populations in some agricultural soils in Burgundy. Can. J. Bot. 63: 1521-1524.

Giovannetti, M., Hepper, C.M. (1985). Vesicular-mycorrhizal infection in *Hedysarum coronatum* and *Onobrychis viciaefolia:* host-endophyte specificity. Soil Biol. Biochem. 17: 899-900.

Guzmán-Plazola, R.A. (1989). Evaluación de sustratos y niveles de fósforo, potasio y solución nutritiva para la producción de inóculo micorrízico (V-A) en *Phaseolus vulgaris*. En: Quintero, R., Ferrera-Cerrato, R. (Eds.). Aportaciones del Área de Microbiología a la Formación de Investigación en México.

Hayman, D.S. (1982). Practical aspects of vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: Subba Rao, N.S. (Ed.). Advances in Agricultural Microbiology. pp. 325-373.

Koske, R.E. (1987). Distribution of VA mycorrhizal fungi along a latitudinal temperature gradient. Mycologia 79: 55-68.

Li, X-L, George, E., Marschner, H. (1991). Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. Plant Soil 136: 41-48.

Lindermann, R.G., Davis, E. A. (2004). Varied response of marigold (*Tagetes* spp.) genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. Scientia Horticulturae 99: 67-78.

Liu A., Hamel, C., Hamilton, R.I., Ma, B.L. (2000). Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. Mycorrhiza 9: 331-336.

Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press. London, England.

McGonigle, T.P., Fitter, A.H. (1990). Ecological specificity of vesicular arbuscular mycorrhizal associations. Mycol. Res. 94: 120-122.

Montaño, N.M., Quiroz, V., Cruz-Flores, G. (2001). Colonización micorrízica arbuscular y fertilización mineral de genotipos de maíz y trigo cultivados en un andisol. Terra 19: 337- 344.

Olsen, S.R., Sommers, M.E. (1982). Phosphorus. In: Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Agron. Monogr. 9. ASA, Madison. pp. 403-430.

Parada Dias da Silveira, A., Nogueira Cardoso, E.J.B. (2004). Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. Scientia Agricola 61:105-109.

Ravnskov, S., Jakobsen, I. (1995). Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant. New Phytol. 129: 611-618.

Rogers, J.B., Christie, P., Laidlaw, A.S. (1994). Some evidence of host specificity in arbuscular mycorrhizas. Pedosphere 4: 377-381.

Rubio, R., Moraga, E., Borie, F. (1990). Acid phosphatase activity and vesicular-arbuscular infection associated with roots of four wheat cultivars. J. Plant Nutr. 13: 585-598.

Sanders, I.R. (1993). Temporal infectivity and specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species. Oecologia 93: 349-355.

Sanders, I.R. (2002). Specificity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. In: Van der Heijden, M.G.A., Sanders, I.R. (Eds.). Mycorrhizal Ecology. Springer. pp. 415-437.

Sanders, I.R. (2003). Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Trends Plant Sci. 8: 143-145.

Sanders, I.R., Fitter, A.H. (1992). Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from a grassland. Mycol. Res. 96:415-419.

Schenck, N.C., Kinloch, R.A. (1980). Incidence of mycorrhizal fungi on six field crops in monoculture on a newly cleared woodland site. Mycologia 72:445-456.

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

Siqueira, J.O., Saggin-Júnior, O.J., Flores-Aylas, W.W., Guimarães, P.T.G. (1998). Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. Mycorrhiza 7: 293-300.

Smith, S.E., Read, D.J. (1997). Mycorrhizal Symbiosis. 2nd edn. Academic Press, London. 605 p.

Steubing, L., Godoy, R., Alberdi, M. (2002). Métodos de ecología forestall. Universidad Austral de Chile. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 345 p.

Sylvia, D.M., Williams, S.E. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G. (Eds.). Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. ASA Special Publication Nº 54, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. pp. 101-124.

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. (1969). Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1: 301-307.

Vandenkoornhuyse, P., Husband R., Daniell, T.J. Watson I.J., Duck, J.M., Fitter, A.H., Young, J.P.W. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Mol. Ecol. 11: 1555-1564.

van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396: 69-72.

Walkley, A., Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.

Wilson, G.W.T., Hartnett, D.C. (1998). Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization tallgrass prairie. Am. J. Bot. 85: 1732-1738.

Zadocks, J.C., Chang, T.T., Konzak, S. (1974). A decimal code for the growth estages of cereals. Crop Sci. 14: 415-421.

Zhu, Y.-G., Laidlaw, A.S., Christie, P., Hammond, M.E.R. (2000). The specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in perennial ryegrass-white clover pasture. Agric. Ecosys. Environ. 77: 211-218.

# CAPÍTULO 5

# CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

## 5.1 CONCLUSIONES GENERALES

En el ecosistema forestal San Pablo de Tregua la diversidad de especies HMA, estuvo muy influenciada por el número de especies de plantas MA pero no, por las propiedades químicas del suelo. Además, las prácticas de manejo silvícola como el raleo, afectaron negativamente la diversidad de especies vegetales MA y especies de HMA. De esta manera, el bosque secundario deciduo resultó ser un ecosistema ecológicamente degradado de baja biodiversidad, a diferencia del área de pradera que presentó una amplia comunidad de especies de plantas conservando una alta biodiversidad de HMA. Por otro lado, en el bosque siempreverde se encontraron especies de HMA que mostraron habilidad para esporular a bajo pH, tales como *Acaulospora spinosa, Glomus invermaium* y *Pacispora* sp. A.

En el agroecosistema Pumalal no se pudo visualizar un efecto sobre la diversidad de las comunidades fúngicas de HMA y sobre el micelio extrarradical así como también, cambios en algunas características físicas y químicas del suelo después de dos ciclos de rotación corta con prácticas de manejo sostenible, como la CL. En la rotación con hospedero continuo, *A. sativa* presentó mayor colonización por HMA que *T. aestivum*; pero cuando la rotación incluyó un cultivo no hospedero disminuyó la cantidad de micelio activo, aumentando la proporción de hifas viables. CL con hospedero continuo presentó un número de esporas significativamente más alto que LC a través del tiempo, mientras que en profundidad, su densidad disminuyó drásticamente en la rotación que incluyó *A. sativa*; con *L. albus,* se encontró menor cantidad de propágulos, los cuales permanecieron relativamente constantes a través del perfil de suelo.

En condiciones de invernadero, la inoculación con distintas epítetas de HMA produjo variaciones en la duración del ciclo de vida de *T. aestivum* y *A. sativa.* Las principales diferencias se registraron con algunas relaciones específicas hospedero-endófito que aceleraron los estadios fenológicos. Así, *A. sativa* inoculada con *G. etunicatum* resultó ser más precoz, mientras que con *G. claroideum* fue más tardía, con ambos inóculos tuvo un paulatino crecimiento radical y los propágulos dejados en el suelo, en términos de metros de raíz colonizada y número de esporas, fueron mayores; señalando mejor compatibilidad funcional *A. sativa* con *G. claroideum*.

## 5.2 PROYECCIONES

La conservación de los ecosistemas de bosque lluvioso valdiviano depende de la mantención de una alta diversidad de especies de plantas asociadas con comunidades de plantas MA. Así, las praderas que presentan una amplia comunidad de hospederos parecen ser una buena alternativa para este tipo de bosques, las que mantienen una alta biodiversidad de HMA. Mientras que, el bosque secundario deciduo con una casi monoespecífica cubierta de *N. alpina* a primera vista parece ser económicamente atractivo, pero resulta en un ecosistema ecológicamente degradado de baja biodiversidad. Como algunas especies de HMA pueden sobrevivir en estos Andisoles ácidos donde la toxicidad por Al es un problema frecuente, la inoculación con estos morfotipos podría servir para aminorar tales efectos.

En los ecosistemas agrícolas los propágulos de HMA como: número de esporas o trozos de raíces colonizadas, podrían servir como indicadores tempranos de cambios producidos en el suelo, cuando están sometidos a prácticas agrícolas del tipo CL. Es decir, los propágulos micorrízicos responderían más rápidamente a las rotaciones de cultivo, que los parámetros químicos. La extensión del período de monitoreo de los propágulos HMA, para los años siguientes de un nuevo ciclo de rotación, pareciera ser crucial para un mejor conocimiento de la función que cumplen los HMA en los suelos ácidos del centro-sur de Chile.

La inoculación con HMA en cultivos agrícolas de importancia económica se puede considerar como una alternativa a explorar para la selección de genotipos eficientes que puedan contribuir a solucionar problemas de baja fertilidad en suelos agrícolas de origen volcánico del Centro Sur de Chile.