

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍFICO ARBUSCULARES EN
BOSQUES DE *Polylepis australis* Bitt. Y EFECTIVIDAD DEL
INÓCULO MICORRÍFICO PARA SU RESTAURACIÓN EN ÁREAS
DEGRADADAS DE LAS SIERRAS GRANDES DE CÓRDOBA.

por

Biól. María Florencia Soteras

Directora: Dra. Alejandra Gabriela Becerra

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET)

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**



Córdoba, Argentina

2013

COMISIÓN ASESORA

Dra. Mónica Lugo, IMIBIO (CONICET), Universidad Nacional de San Luis.

Dra. María Victoria Novas, PROPLAME-PRHIDEB (CONICET), FCEyN, Universidad de Buenos Aires.

Dra. Alejandra Gabriela Becerra, IMBIV (CONICET), FCEyN, Universidad Nacional de Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

*Dedico esta Tesis
a mi familia por estar siempre conmigo
a Gabriel por su apoyo incondicional*

*Nadie lo conoce todo ni nadie lo desconoce todo,
nadie educa a nadie ni nadie se educa solo,
los hombres se educan entre sí,
mediados por el mundo.*

Paulo Freire

AGRADECIMIENTOS

No hubiera sido posible realizar esta Tesis sin la ayuda y el sostén de muchas personas.

A mi directora Alejandra Becerra y a mi co-director Daniel Renison por acompañarme y ayudarme en esta tarea.

A todos los integrantes del laboratorio de Micología por su apoyo siempre, su ayuda académica y colaboración en los viajes de campo (Noelia, Nicolás, Laura, Silvana, Adriana, Celeste, Eduardo, Graciela, Gerardo, Luciana).

A todos los voluntarios en los muestreos y la reforestación (Iván Barberá, Andrés Berizzo, Elizabeth Street, Lucía Gonzalez Carrales, Gimena Farias, Sebastián Flores, Emiliano Galli, Silvana Funes, Julieta Aguggia, Julio Domínguez). Sin su ayuda no podría haber hecho este trabajo.

Al laboratorio de Micología del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (UNC-CONICET) por proveerme las instalaciones y el equipamiento.

A la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 438- 2006), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 0269), al Ministerio de Educación de la Nación: Programa de Voluntariado Universitario (Res. N° 474 SPU) y a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (Res. N° 214/10) por el financiamiento. A Idea Wild por proveerme el equipamiento de campo.

A mis incondicionales amigas (Pach, Guada, Lau C., Mery, Mari, Lau G., Carlita) por escucharme y apoyarme.

A mis papás, Elvis, hermanos, sobrinos, Luca, tía y mi prima por contenerme y acompañarme en todo momento.

A Gabriel por su gran ayuda en este trabajo, por entenderme y estar conmigo siempre.

ABREVIATURAS Y DEFINICIÓN DE TÉRMINOS EMPLEADOS EN LA TESIS

Ca: calcio.

Cu: cobre.

e.g.: por ejemplo (abreviatura de las palabras en latín *exempli gratia*).

Fe: hierro.

HMA: hongos micorrízico arbusculares.

i.e.: esto es (abreviatura de las palabras en latín *id est*).

juveniles: individuos de *Polylepis australis* mayores a 3 meses de edad, de hasta 50 cm de altura.

K: potasio.

Mg: magnesio.

Mn: manganeso.

MO: materia orgánica.

N: nitrógeno.

Na: sodio.

Nt: nitrógeno total.

P: fósforo.

Zn: zinc.

plántulas: individuos de *P. australis* de hasta 3 meses de edad.

sensu: en el sentido de (término en latín).

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1 Introducción general	6
1.1.1 La situación actual de los bosques de <i>Polylepis australis</i>	6
1.1.2 Generalidades de los hongos micorrízico arbusculares (HMA)	7
1.1.3 Influencia de los cambios del ambiente original y la estacionalidad sobre las comunidades de HMA y la colonización micorrízica arbuscular	11
1.1.4 Utilización del inóculo micorrízico para la promoción del crecimiento y la supervivencia del hospedante	12
1.2 Antecedentes, hipótesis generales y objetivos	14
1.2.1 Hipótesis generales	15
1.2.2 Objetivo general.....	16
1.2.3 Objetivos específicos	16
1.3 Estructura de la tesis	17
CAPÍTULO II: INFLUENCIA DEL TIPO DE BOSQUE SOBRE LA ABUNDANCIA Y DIVERSIDAD DE LOS HONGOS MICORRÍZICO ARBUSCULARES DE LA RIZOSFERA DE <i>Polylepis australis</i> BITT. Y SU COLONIZACIÓN MICORRÍZICA.....	18
2.1 Introducción	19
2.2 Materiales y Métodos.....	22
2.2.1 Área de estudio	22
2.2.2 Diseño experimental	25
2.2.3 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares	25
2.2.4 Colonización micorrízica arbuscular	26
2.2.5 Análisis estadísticos	27
2.3 Resultados	28
2.3.1 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares	28
2.3.2. Colonización micorrízica arbuscular	36
2.4 Discusión.....	38
2.4.1 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares	38
2.4.2 Colonización micorrízica arbuscular	40
2.5 Conclusiones	42

CAPÍTULO III: RESPUESTA DE <i>Polylepis australis</i> EN CONDICIONES DE INVERNADERO FRENTE A LA INOCULACIÓN CON SUELO PROVENIENTE DE TRES TIPOS DE VEGETACIÓN	44
3.1 Introducción	45
3.2 Materiales y Métodos	47
3.2.1 Inóculo utilizado	47
3.2.2 Inoculación de las plántulas de <i>Polylepis australis</i>	48
3.2.3 Respuesta de <i>Polylepis australis</i> frente a la inoculación	50
3.2.4 Análisis estadísticos	51
3.3 Resultados	51
3.3.1 Inóculo: características del suelo y comunidad de hongos micorrízico arbusculares	51
3.4 Discusión.....	57
3.5 Conclusiones	60
CAPÍTULO IV: RESPUESTA A CAMPO DE <i>Polylepis australis</i> FRENTE A LA INOCULACIÓN CON SUELO PROVENIENTE DE TRES TIPOS DE VEGETACIÓN.....	61
4.1 Introducción	62
4.2 Materiales y Métodos	64
4.2.1 Inóculo utilizado	64
4.2.2 Cultivos de planta trampa	64
4.2.3 Ensayo de infectividad.....	65
4.2.4 Inoculación de las plántulas de <i>Polylepis australis</i>	66
4.2.5 Trasplante a campo	66
4.2.6 Respuesta de <i>Polylepis australis</i> frente a la inoculación.....	68
4.2.7 Análisis estadísticos	70
4.3 Resultados	71
4.3.1 Plantas trampa.....	71
4.3.2 Infectividad del suelo.....	73
4.3.3 Respuesta a campo de <i>Polylepis australis</i> frente a la inoculación.....	74
4.3.4 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares de la rizosfera de los juveniles trasplantados	78
4.4 Discusión.....	80
4.4.1 Inóculo micorrízico: plantas trampa e infectividad del suelo	80
4.4.2 Respuesta a campo de <i>Polylepis australis</i> frente a la inoculación.....	82

4.4.3 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares de la rizosfera de los juveniles trasplantados a campo	83
4.5 Conclusiones	84
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL.....	86
5.1 Discusión general.....	87
5.1.1 Influencia de los cambios del ambiente original y la estacionalidad sobre las comunidades de HMA y la colonización micorrízica arbuscular	88
5.1.2 Utilización del inóculo micorrízico para la promoción del crecimiento y la supervivencia del hospedante	92
5.2 Conclusiones generales	94
ANEXO.....	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

En la provincia de Córdoba, la conservación de los bosques de altura, dominados por *Polylepis australis* Bitt., es importante para proteger la biodiversidad y los suelos de la cabecera de las cuencas donde nacen la mayoría de los ríos de la región. Para poder restaurar un ecosistema degradado es necesario considerar tanto el componente vegetal como los microorganismos edáficos, entre ellos los más importantes por su ubicuidad y su directa implicancia en los procesos esenciales planta-suelo, son los hongos micorrízico arbusculares (HMA). Con el fin de entender la ecología de los HMA de los bosques de *P. australis* y contribuir con el desarrollo de técnicas adecuadas para la reforestación con esta especie, en este trabajo se propuso por un lado, estudiar durante dos estaciones la abundancia y diversidad de HMA y la colonización radical en tres tipos de bosque de *P. australis* con distinta complejidad estructural (bosque degradado, bosque joven y bosque maduro). Por otro lado, se propuso evaluar la respuesta de juveniles de *P. australis* previamente inoculados con suelo de dos tipos de bosque (bosque degradado y bosque maduro) y de un pastizal de altura, bajo condiciones controladas de invernadero y a campo en un área degradada por un incendio reciente en las Sierras Grandes de Córdoba. La comunidad de HMA no estuvo influenciada por los cambios en la estructura del bosque. Sin embargo, un grupo de morfoespecies fue más abundante durante la estación húmeda que durante la estación seca. En cuanto a la colonización micorrízica, sólo durante la estación seca se observó un mayor número de arbusculos y vesículas en las raíces de *P. australis* del bosque degradado. En los distintos tipos de inóculo se observó una mayor riqueza de HMA en el del pastizal. Además, el inóculo del bosque degradado y el del pastizal fueron 25 veces más infectivos que el inóculo del bosque maduro. A pesar de que en el invernadero los juveniles inoculados con suelo del bosque maduro presentaron la mayor colonización

radical y valores mayores de la relación raíz / tallo, esto no se observó en los juveniles trasplantados al campo en un sitio degradado por un incendio reciente. En base a los resultados de la tesis, se puede concluir que los HMA de la rizosfera de *P. australis* cambian de nicho estacionalmente, incrementando su abundancia dentro de la raíz o en el suelo. Además habría una mayor dependencia de la asociación micorrícica bajo condiciones más desfavorables (estación seca y bosque degradado). Probablemente, las adaptaciones de los HMA a los cambios estacionales, le hayan conferido resistencia a los cambios en la estructura de los bosques. Por otro lado, la inoculación de *P. australis* antes del trasplante no sería esencial para su establecimiento y crecimiento, al menos en el área considerada en este estudio.

ABSTRACT

The conservation of high mountain forests, dominated by *Polylepis australis* Bitt., is of great importance for the protection of the biodiversity and the soils of the watersheds where the majority of rivers of the Córdoba province grow. In addition to aboveground organisms, it is essential to consider belowground organisms to carry on restoration practices. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are one of the most important soil organisms due to their ubiquity and influence on plant-soil processes. The aim of this work was to understand the ecology of the AMF of *P. australis* forests and to contribute with restoration techniques development. Therefore, we studied the abundance and diversity of AMF and root colonization of three types of *P. australis* forest, differing in its structural complexity (degraded forest, young forest and mature forest) during two seasons. On the other hand, we evaluated *P. australis* seedlings response to the inoculation with natural soil from two forest types (degraded forest and mature forest) and grassland, under controlled greenhouse conditions and in the field at a degraded area of the high mountains of the Córdoba province affected by a recent fire. AMF community of *P. australis* rhizosphere was not influenced by forest structure changes. However, during the wet season a morphospecies assemblage was more abundant than during the dry season. A highest percentage of arbuscules and vesicles were found in the degraded forest during the dry season. In related to the inocula richness, grassland showed the highest AMF richness and together with degraded forest inocula were 25 times more infective than mature forest inocula. Despite under greenhouse conditions the seedlings inoculated with mature forest soil showed the highest root colonization and root to shoot ratio, this pattern was not observed under field conditions at a site degraded by a recent wildfire. Based on the results of the thesis, we conclude that possibly the AMF of *P. australis* rhizosphere have niche seasonal

changes, being more frequent inside the roots or in the soil depending on the season. Besides there may be a higher dependency of the symbiosis under unfavorable conditions (dry season and degraded forest). Probably, AMF adaptations to seasonal changes, have gave to AMF their resilience to forest structural changes. On the other hand, soil inoculation before transplanting is not essential for *P. australis* establishment and increase in height at least at the site considered in this study.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Introducción general

1.1.1 La situación actual de los bosques de *Polylepis australis*

La apariencia de los bosques montanos de Sudamérica ha sido cambiada por el hombre mediante la tala, la quema, la introducción de ganado doméstico y la conversión a terrenos agrícolas o áreas urbanas (Ellenberg 1979). La reducción y fragmentación de estos bosques ha producido cambios en la composición de la flora y fauna, pérdida de la cubierta vegetal, compactación y reducción de la humedad del suelo e incremento de la erosión del mismo. En consecuencia, la función de los bosques montanos de retener y reciclar recursos limitantes (como agua y nutrientes) y de mantener la biodiversidad, se ven afectados seriamente (Fjeldså 1993; Fernández Terrazas & Stahl 2002; Hensen 2002; Kauffman et al. 2003).

Los bosques de *Polylepis* spp. (Rosaceae) se encuentran exclusivamente en las zonas más altas de las montañas de Sudamérica, desde Venezuela hasta Argentina (Sierras Grandes de Córdoba, Sierra de los Comechingones de Córdoba y San Luis) (Renison et al. 2013). El género incluye aproximadamente 30 especies (Schmidt-Lebuhn et al. 2013) y se caracteriza por presentar una corteza compuesta por múltiples capas, que podría servirle como aislante de las temperaturas extremas. De esta característica deriva el nombre *Polylepis* que está formado por dos palabras griegas *poly* (muchas) y *letis* (capas) (Simpson 1979). Los bosques dominados por *Polylepis*, son uno de los ecosistemas montanos tropicales y subtropicales más amenazados del mundo (UNEP-WCMC 2004), siendo su recuperación una prioridad (Fjeldså & Kessler 1996; Renison et al. 2002; Enrico et al. 2004).

La especie más austral del género, endémica de Argentina, es *P. australis* Bitt. (“tabaquillo” o “queñoa”) (Cabido & Acosta 1985; Renison et al. 2013). *P. australis* es una especie arbórea de crecimiento lento, de hasta 14 m de altura (Renison et al. 2011),

presenta frutos pequeños y alados, dispersados principalmente por el viento (Simpson 1979). Se distribuye entre los 900 y los 2900 m snm, siendo su óptimo altitudinal a los 1800 m snm (Marcora et al. 2008). Muchos individuos de esta especie viven en pequeños grupos o como ejemplares solitarios en el fondo de los valles o en barrancas empinadas, que son áreas inaccesibles al ganado, al hombre y al fuego (Renison et al. 2006; Cingolani et al. 2008). En cada sitio, donde nacen numerosos ríos, pueden encontrarse distintos tipos de bosque que difieren en su complejidad estructural (Renison et al. 2011).

La preservación y restauración de estos bosques en las Sierras Grandes de Córdoba son consideradas una prioridad (APN 2004). En este contexto y contribuyendo con estos objetivos, en 1997 se creó el Parque Nacional Quebrada del Condorito, luego de expropiar 26.000 ha. En el mismo año, las tierras que rodean al Parque fueron declaradas como Reserva Hídrica Nacional y Provincial (12.000 y 117.000 ha, respectivamente), sin ser expropiadas, por lo tanto siguen siendo de dominio privado. Además, con el fin de proteger las cuencas que proveen de agua a aproximadamente 2 millones de personas en Córdoba, en la actualidad existen al menos tres grupos de trabajo formado por investigadores, voluntarios y aficionados, que colaboran con la restauración y reforestación con especies nativas, entre ellas *P. australis* (Renison et al. 2013).

1.1.2 Generalidades de los hongos micorrízico arbusculares (HMA)

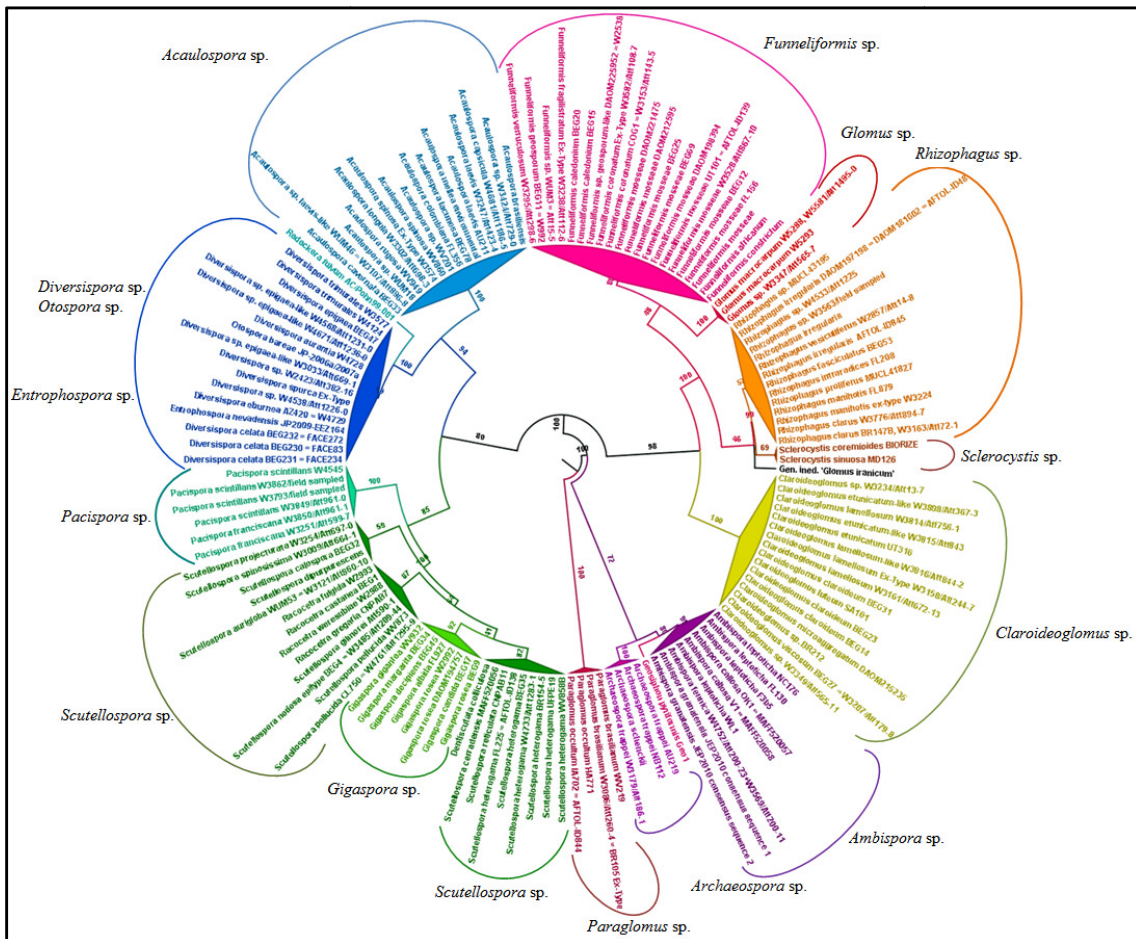
Los microorganismos del suelo representan gran parte de la diversidad de organismos y tienen un papel crucial en el funcionamiento de los ecosistemas (Fitter et al. 2005). Los hongos micorrízico arbusculares (HMA), pertenecientes al Phylum Glomeromycota (Schüßler et al. 2001), son uno de los microorganismos del suelo más

importantes por su ubicuidad y su directa implicancia en los procesos esenciales entre las plantas y el suelo (Fitter 2005). Los HMA son simbioses obligados y forman el tipo de micorriza más ampliamente distribuida, las micorrizas arbusculares, asociadas con casi el 80 % de las especies de plantas vasculares estudiadas (Wang & Qiu 2006, Brundrett 2009).

Riley & Corradi (2013) hipotetizaron que los HMA podrían potencialmente tener reproducción sexual, pero la mayor parte de la evidencia (Kuhn et al. 2001; Smith & Read 2008) sugiere que han evolucionado asexualmente, con la ocurrencia de algunos eventos de recombinación genética poco frecuentes. Por lo tanto, la delimitación de una especie en los Glomeromycota es controvertida (Rosendahl 2008) y, en consecuencia se utiliza el término “morfoespecie” (Robinson-Boyer et al. 2009), para diferenciar a los distintos taxa en función de las características morfológicas y la ontogenia de las esporas. Éstas son estructuras multinucleadas asexuales que se forman por diferenciación de las hifas vegetativas y funcionan como reserva de lípidos y como propágulos micorrícicos (Smith & Read 2008). Algunas características diagnósticas de las esporas son: tamaño, color, forma, formación de agrupamientos (“esporocarpos”), características de la pared (número y grosor de capas, reacción con iodo, ornamentaciones) y características de la hifa sustentadora o del sáculo esporífero según el género, entre otras. La taxonomía de los HMA se encuentra en continuo debate e intenta corresponder las características morfológicas con la filogenia molecular de las morfoespecies (e.g. Lanfranco et al. 2001; Morton & Redecker 2001). Actualmente una de las clasificaciones más aceptadas es la propuesta por Schüßler & Walker (2010) y discutida por Krüger et al. (2012) y Redecker et al. (2013), que fue la empleada en esta tesis (Fig. 1.1). El Phylum Glomeromycota está formado por 4 órdenes (Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaeosporales) y 11 familias: Glomeraceae (con

los géneros *Glomus*, *Funneliformis*, *Sclerocystis* y *Rhizophagus*), Claroideoglomeraceae (*Claroideoglossum* spp.), Gigasporaceae (*Gigaspora* spp., *Scutellospora* spp., *Racocetra* spp.), Acaulosporaceae (*Acaulospora* spp.), Entrophosporaceae (*Entrophospora* spp.), Pacisporaceae (*Pacispora* spp.), Diversisporaceae (*Diversispora* spp., *Otospora* spp., *Redeckera* spp.), Paraglomeraceae (*Paraglossum* spp.), Geosiphonaceae (*Geosiphon* spp.), Ambisporaceae (*Ambispora* spp.) y Archaeosporaceae (*Archaeospora* spp.).

Figura 1.1 Árbol filogenético de la clasificación considerada en esta tesis. Realizado por Schüßler & Walker (2010) a partir de análisis moleculares del gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (SSU) junto con características morfológicas de las esporas de hongos micorrízico arbusculares. Modificado de: <http://www.amf-phylogeny.com>.



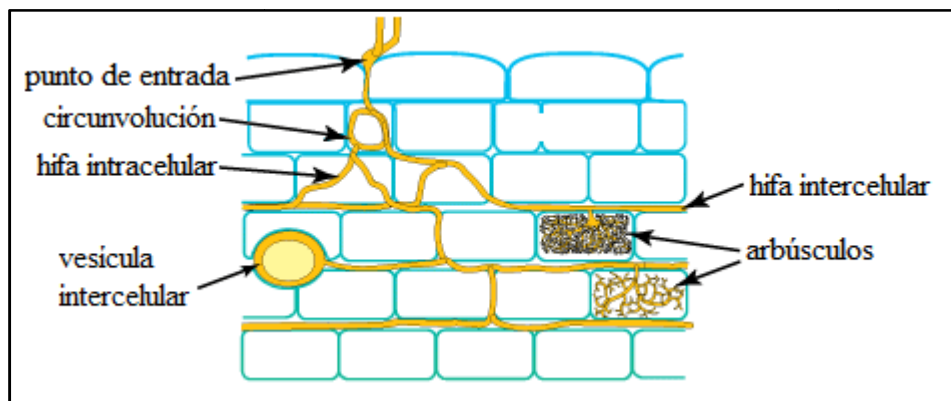
Además de las esporas, los HMA forman micelio intra-radical y extra-radical de hifas aseptadas y multinucleadas. El micelio extra-radical les permite a las plantas extender su capacidad de exploración del suelo, para acceder al agua y a los nutrientes (Smith & Read 2008); y favorece la agregación de las partículas del suelo, mecánicamente y a través de la producción de una glicoproteína denominada glomalina (Rillig et al. 2002).

La colonización micorrícica arbuscular es también utilizada como característica descriptiva de la simbiosis y puede producirse a partir de tres fuentes de inóculo de HMA, denominados propágulos micorrícicos: las esporas, el micelio externo y los segmentos radicales colonizados (Smith & Read 2008). Los propágulos micorrícicos determinan la infectividad del suelo, la cual se relaciona además con el tipo de suelo y con la habilidad de los propágulos para iniciar la colonización micorrícica de una planta (Plenchette et al. 1989).

Los HMA se caracterizan por formar distintas estructuras intra-radicales: vesículas, arbusculos y circunvoluciones (Fig. 1.2). Las vesículas se pueden formar intra- o inter-celularmente y se consideran estructuras de almacenamiento, ya que en su interior contienen lípidos, aunque también se ha indicado que tienen un rol como propágulos fúngicos (Biermann & Linderman 1983). Los arbusculos son estructuras con ramificaciones arborescentes de hifas muy delgadas que no contactan directamente con el contenido citoplasmático de las células radicales, sino que se rodean por la membrana plasmática de las mismas, dando lugar a la formación de la membrana periarbuscular. Los arbusculos son las estructuras diagnóstico de las micorrizas arbusculares. En la zona de interfase o apoplasto se produce el intercambio, los nutrientes inorgánicos fluyen hacia la planta y los fotosintetatos hacia el hongo, aunque los últimos también podrían transportarse a través de otras estructuras intra-radicales, como hifas o

circunvoluciones (circunvoluciones de la hifa) (Smith & Read 2008; Smith & Smith 2011).

Figura 1.2 Esquema de las estructuras intra-radicales formadas por los hongos micorrízico arbusculares. Modificado de Brundrett et al. (1996).



1.1.3 Influencia de los cambios del ambiente original y la estacionalidad sobre las comunidades de HMA y la colonización micorrízica arbuscular

Los HMA se ven influenciados por los cambios de temperatura, humedad, pH, la capacidad de intercambio catiónico del suelo y por factores antrópicos, tanto físicos (e.g. tala de árboles, pisoteo del ganado doméstico) como químicos (e.g. aplicación de fertilizantes) (Entry et al. 2002; Koltai & Kapulnik 2010). Por ello, generalmente los cambios en la estructura del ecosistema original (Zhang et al. 2004; Menoyo et al. 2009; Stürmer & Siqueira 2011; Zangaro et al. 2013), así como las variaciones estacionales (Lugo & Cabello 2002; Lugo et al. 2003; García & Mendoza 2008; Becerra et al. 2009) están acompañados por variaciones en la composición y ocurrencia de los HMA. Numerosos trabajos aportan evidencia de las relaciones entre el porcentaje de colonización, la respuesta fisiológica de la planta (e.g. Kiers et al. 2000, Tamai et al. 2008) y los factores ambientales (e.g. Lugo et al. 2003; Zangaro et al. 2013). Resultados

contradictorios demuestran que no siempre los HMA se ven afectados por estos factores (Johnson & Wedin 1997; Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999; Picone 2000; Davison et al. 2012). Estas evidencias revelan que la respuesta de los HMA depende de la especie de planta, de los HMA asociados a la misma y de las condiciones ambientales (Jones & Smith 2004; Hoeksema et al. 2010), por lo tanto es necesario estudiar las comunidades en los diferentes ecosistemas.

1.1.4 Utilización del inóculo micorrícico para la promoción del crecimiento y la supervivencia del hospedante

Para poder llevar a cabo la restauración de un ecosistema degradado, es importante considerar las comunidades edáficas nativas (Wardle et al. 2004; Heneghan et al. 2008; Pagano et al. 2009), incluyendo a los HMA, que pueden facilitar el proceso de restauración (Harris 2009). El efecto positivo de los HMA se puede observar en las plantas hospedantes, al incrementar su crecimiento, establecimiento y supervivencia (Allen et al. 2003; van der Heijden et al. 2006). Esto lo logran a través de la nutrición mineral (principalmente de fósforo) (Smith & Smith 2011), la protección contra los patógenos radicales (Newsham et al. 1995), el incremento de la absorción de agua (Augé 2001) y la retención de los metales tóxicos contaminantes (Meharg & Cairney 1999), entre otros.

En ecosistemas boscosos degradados la reforestación con especies nativas puede desempeñar un papel importante para la recuperación de su estructura, riqueza y diversidad florística (Dobson 1997; Aide et al. 2000), y en muchas situaciones la utilización de inóculos naturales, principalmente de HMA, puede ser implementada para promover el establecimiento y crecimiento de la planta trasplantada (Haselwandter & Bowen 1996; White et al. 2008). En Latinoamérica se han realizado experiencias de

recuperación de áreas degradadas mediante la reforestación con especies de plantas previamente inoculadas con HMA (Cuenca et al. 1998, 2003, 2006; Allen et al. 2003; Pagano et al. 2009, 2010), observándose una gran variabilidad de respuestas frente a la inoculación, donde una determinada combinación de taxones de HMA puede tener un efecto positivo, neutro o negativo sobre el hospedante (Johnson et al. 1997; van der Heijden et al. 1998; Jones & Smith 2004).

A pesar de que los HMA usualmente han sido considerados generalistas debido a la gran cantidad de potenciales hospedantes en comparación con la escasa cantidad de morfoespecies descritas (Smith & Read 2008), hay evidencias de que la asociación de una planta con un determinado grupo de morfoespecies no sería al azar y existiría un grado de preferencia de las plantas por las especies de simbiontes (Helgason et al. 2002; Vandenkoornhuysen et al. 2003; Davison et al. 2011). De esta manera, resulta relevante estudiar la influencia de distintos tipos de inóculos de HMA en cada especie en particular, para determinar si es conveniente inocular y además conocer cuál es la combinación de especies más adecuada.

Es importante evaluar la infectividad de cada inóculo, ya que distintos suelos pueden presentar una composición de especies de HMA similar, pero mostrar diferencias en su capacidad de iniciar la colonización radical de la planta hospedante, y por lo tanto variar en su influencia como simbiontes (Cuenca et al. 2004). Esto se debe a que las esporas pueden presentar períodos prolongados de dormancia, lo que puede retardar su germinación y posterior colonización de la raíz. De esta manera, en algunos ambientes, el micelio externo y los fragmentos radicales colonizados son los principales propágulos por los que una planta puede ser colonizada, incluso cuando el número de esporas en el suelo es elevado (Smith & Read 2008).

Finalmente, cuando los árboles son trasplantados al campo, el efecto benéfico de la inoculación temprana con HMA puede reducirse (Gange & Brown 1993, 2002) y los factores tanto bióticos como abióticos pueden influenciar la respuesta del hospedante, además del inóculo micorrícico (Fitter 1985; Allen 1991). De esta manera, la determinación de la efectividad de un inóculo bajo condiciones controladas en invernadero debe extrapolarse con precaución para la toma de decisiones a gran escala, como son las prácticas de reforestación.

1.2 Antecedentes, hipótesis generales y objetivos

Con el fin de contribuir con la conservación y restauración de los bosques de *P. australis* en las Sierras Grandes de Córdoba, se ha comenzado ya con su reforestación y, al mismo tiempo, se están analizando y desarrollando técnicas para optimizar este proceso (Renison & Cingolani 1998; Renison et al. 2002; Renison et al. 2005).

Antes de elaborar un programa de restauración de un ecosistema boscoso es importante conocer la identidad y ecología (e.g. interacciones con otros organismos y con el ambiente) de las comunidades, tanto vegetales como fúngicas, que se encuentran en el ambiente (Dobson 1997).

En general, los estudios en los bosques de *P. australis* han estado enfocados en describir las comunidades vegetales (Cingolani et al. 2004, 2008; Renison et al. 2011, 2013) e incluso las comunidades de macromicetes (Robledo & Renison 2010; Hernández Caffot et al. 2011), pero poco se conoce respecto a las comunidades de HMA presentes en su rizosfera (Menoyo et al. 2007; Martino et al. 2011), que son esenciales para cualquier práctica de manejo sustentable (Robinson-Boyer et al. 2009). Se ha observado que las condiciones del suelo influyen en la producción de semillas viables de *P. australis*, siendo mayor en árboles que crecen en ambientes menos

erosionados (Renison et al. 2004). Además, los juveniles que crecen en micrositiros rocosos o en suelos degradados tienen un menor crecimiento que los situados en micrositiros con mejores condiciones de suelo, probablemente debido a la falta de nutrientes o agua (Renison et al. 2005; Giorgis et al. 2010). Por lo tanto, la asociación con HMA podría favorecer su desarrollo bajo estas condiciones.

La mayoría de las decisiones para cualquier plan de acción a gran escala se toman luego de realizar experimentos bajo condiciones controladas en invernadero. Pero en base a los antecedentes de los HMA (Hoeksema et al. 2010), la respuesta frente a la inoculación puede modificarse en el sitio de reforestación. Por lo tanto, resulta necesario evaluar los diferentes escenarios posibles para conocer cómo influye el inóculo micorrícico y si se justifica el esfuerzo de la inoculación para la reforestación con *P. australis* a gran escala.

1.2.1 Hipótesis generales

En base a los antecedentes expuestos, en la presente tesis se plantearon las siguientes hipótesis:

1. Las comunidades de hongos micorrícico arbusculares (HMA) y la colonización micorrícica de *P. australis* varían con los tipos de bosque y las estaciones.
2. Diferentes tipos de inóculo presentan distinta comunidad de HMA y, por lo tanto promueven diferencialmente el crecimiento y nutrición de juveniles de *P. australis* bajo condiciones controladas de invernadero.
3. Diferentes tipos de inóculo presentan distinta infectividad y, por lo tanto promueven diferencialmente el crecimiento, supervivencia y nutrición de juveniles de *P. australis* trasplantados a campo.

1.2.2 Objetivo general

Estudiar el efecto del tipo de bosque de *P. australis* sobre la abundancia y diversidad de los HMA, y analizar la efectividad del inóculo de HMA en juveniles de *P. australis* bajo condiciones controladas de invernadero y en el campo, para mejorar las técnicas de reforestación en áreas degradadas de las Sierras Grandes de Córdoba.

1.2.3 Objetivos específicos

1. Estudiar la riqueza, diversidad y equitatividad fúngica específica de los HMA en tres tipos de bosque de *P. australis* (maduro, joven y degradado) durante dos estaciones del año (primavera y otoño).
2. Describir morfológicamente las esporas de los HMA presentes en la rizosfera de *P. australis* que no se determinaron a nivel de especie en los tres tipos de bosque y las dos estaciones.
3. Estudiar la variación de la colonización micorrízico-arbuscular bajo las diferentes condiciones planteadas.
4. Evaluar en invernadero la efectividad de diferentes tipos de inóculo de HMA (de un bosque maduro, un bosque degradado y un pastizal de altura) sobre el crecimiento, nutrición y colonización micorrízica de *P. australis*.
5. Determinar la habilidad de los HMA de cada tipo de inóculo para iniciar la colonización micorrízica (infectividad).
6. Evaluar a campo la efectividad de los diferentes tipos de inóculo de HMA sobre el crecimiento, nutrición y colonización micorrízica de *P. australis*. Estudiar la diversidad de HMA en la rizosfera de los juveniles trasplantados durante las dos estaciones posteriores al trasplante.

1.3 Estructura de la tesis

La presente tesis está organizada en capítulos donde se desarrollan los objetivos específicos planteados. El esquema general del manuscrito es el siguiente:

- **Capítulo I:** Introducción general.
- **Capítulo II (objetivos específicos 1, 2 y 3):** Influencia del tipo de bosque sobre la abundancia y diversidad de los HMA de la rizosfera de *P. australis* y su colonización micorrícica.
- **Capítulo III (objetivo específico 4):** Evaluación en invernadero de la respuesta de *P. australis* frente a la inoculación con suelo proveniente de tres tipos de vegetación.
- **Capítulo IV (objetivo específico 5 y 6):** Infectividad de los tres tipos de inóculo y respuesta en el campo de *P. australis* frente a la inoculación con suelo proveniente de tres tipos de vegetación. Descripción de las comunidades de HMA de la rizosfera de los juveniles trasplantados y su variación durante las dos estaciones subsiguientes al trasplante.
- **Capítulo V:** Discusión general.

CAPÍTULO II

INFLUENCIA DEL TIPO DE BOSQUE SOBRE LA ABUNDANCIA Y DIVERSIDAD DE LOS HONGOS MICORRÍFICOS ARBUSCULARES DE LA RIZOSFERA DE *Polylepis australis* BITT. Y SU COLONIZACIÓN MICORRÍFICA

2.1 Introducción

Los bosques de *Polylepis* spp. se encuentran exclusivamente en las zonas más altas de las montañas de Sudamérica (Simpson 1979). Estos ecosistemas montanos son uno de los más amenazados del mundo (UNEP-WCMC 2004), debido a la ocurrencia de incendios, al ramoneo del ganado doméstico y a su utilización como combustible y madera (Fjeldså 2002; Enrico et al. 2004). Por lo tanto, los servicios ecosistémicos que brindan (e.g. proteger cabeceras de cuencas hídricas que proveen agua a las poblaciones humanas) pueden verse seriamente afectados (Fernández Terrazas & Stahl 2002; Hensen 2002; Kauffman et al. 2003).

La especie más austral del género, *P. australis*, no escapa a la influencia de los impactos antrópicos (Cingolani et al. 2008). En un trabajo reciente, Renison et al. (2011) clasificaron a los bosques existentes según su complejidad estructural en cuatro tipos de bosque (bosque degradado, bosque en regeneración, bosque joven y bosque maduro). Éstos difirieron en su grado de conservación, distribución de las clases de tamaño y cobertura de árboles y de vegetación del sotobosque. Probablemente, los distintos tipos de bosque se generaron por la historia de modificaciones antrópicas producidas desde el siglo XVII en las Sierras Grandes de Córdoba (principalmente cría de ganado doméstico e incendios intencionales) (Cingolani et al. 2003), junto con las características topográficas (e.g. altitud) (Marcora et al. 2008) y otras particularidades de la especie (e.g. dispersión, regeneración, establecimiento y supervivencia) (Enrico et al. 2004; Renison et al. 2004; 2011; Seltsmann et al. 2006; Torres et al. 2008; Pollice et al. 2013).

Los estudios realizados en los bosques de *P. australis* han destacado la influencia de los impactos antrópicos sobre las condiciones físicas del suelo (Renison et

al. 2010). Sin embargo, los hongos micorrízico arbusculares (HMA) han sido poco estudiados (Menoyo et al. 2009; Martino et al. 2011).

Los cambios en la estructura de los bosques pueden producir efectos indirectos sobre las comunidades de HMA (densidad de esporas, diversidad y riqueza de morfoespecies) y la colonización micorrízica arbuscular, al producir variaciones en la vegetación, en las condiciones micro-climáticas, en las características físicas del suelo, entre otros. Por ejemplo, cuando la cobertura vegetal disminuye, la erosión y la exposición del suelo a intensas radiaciones se incrementan (Hensen 2002; Cingolani et al. 2003; Renison et al. 2004; FAO 2006), lo que podría promover cambios en la composición de las comunidades de HMA (Carpenter et al. 2001; Dumbrell et al. 2010) y la colonización micorrízica (Haugen & Smith 1992; Entry et al. 2002). Por otro lado, suelos compactados, producto del pisoteo del ganado doméstico, entre otros factores (Cingolani et al. 2003; Renison et al. 2010), generalmente sufren la disrupción del entramado de hifas extra-radicales de HMA presentes en el suelo (Jasper et al. 1989), afectando el establecimiento de las familias de HMA que generan mayor biomasa de micelio extra-radical (i.e. Gigasporaceae) (Hart et al. 2001) y disminuyendo la colonización radical (Evans & Miller 1990).

Los trabajos referidos a la influencia de los cambios de la estructura del bosque sobre las comunidades de HMA muestran resultados contradictorios. Algunos trabajos han descripto que las comunidades de HMA son resilientes frente a la conversión del ambiente (e.g. Johnson & Wedin 1997; Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999; Picone 2000; Aguilar-Fernández et al. 2009). Sin embargo, por otro lado, se ha evidenciado la influencia de las modificaciones del bosque original sobre la abundancia de esporas, la riqueza o la diversidad de HMA (Oehl et al. 2003; Irrazabal et al. 2004; Zhang et al. 2004; Grilli et al. 2011; Stürmer & Siqueira 2011). En particular, en dos bosques de *P.*

australis de las Sierras Grandes de Córdoba, Menoyo et al. (2009) estudiaron el impacto de la ganadería sobre las comunidades de HMA y la colonización radical. Estos autores no observaron variaciones de la diversidad de HMA ni de la colonización micorrícica en relación a la carga ganadera, pero encontraron una mayor densidad de esporas en el sitio con mayor carga ganadera.

Por otro lado, las comunidades de HMA y la colonización micorrícica varían estacionalmente (Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999; Lugo et al. 2003; Becerra et al. 2009; Soteras et al. 2012). Esto puede deberse a la influencia de los factores abióticos (como la temperatura y la humedad) sobre los HMA (Entry et al. 2002; Dumbrell et al. 2010); y al cambio estacional del nicho de los HMA (dentro de la raíz o en el suelo) que se ha observado en algunas morfoespecies (Merryweather & Fitter 1998; Pringle & Bever 2002). Por lo tanto para describir a la comunidad de HMA de un ambiente en particular es importante considerar distintas estaciones.

El objetivo de este capítulo fue describir en tres tipos de bosque (bosque degradado, bosque joven y bosque maduro, sensu Renison et al. (2011)) las comunidades de HMA de la rizosfera de *P. australis* y su colonización micorrícica, durante dos estaciones del año.

En base a los antecedentes, se plantea la siguiente hipótesis: las comunidades de HMA y la colonización micorrícica de *P. australis* varían con los tipos de bosque y las estaciones. Considerando que la exposición a intensas radiaciones en los bosques con menor cobertura vegetal incrementa la esporulación de los HMA y que el disturbio disminuye la colonización micorrícica, se predice un aumento de la colonización micorrícica y una disminución de la densidad de esporas desde el bosque degradado hacia el bosque maduro y diferentes valores de riqueza y diversidad entre los tres tipos de bosque. A su vez, se predice una mayor densidad de esporas, menor colonización

micorrícica y diferentes valores de riqueza y diversidad de HMA durante la estación seca en comparación con la estación húmeda.

2.2 Materiales y Métodos

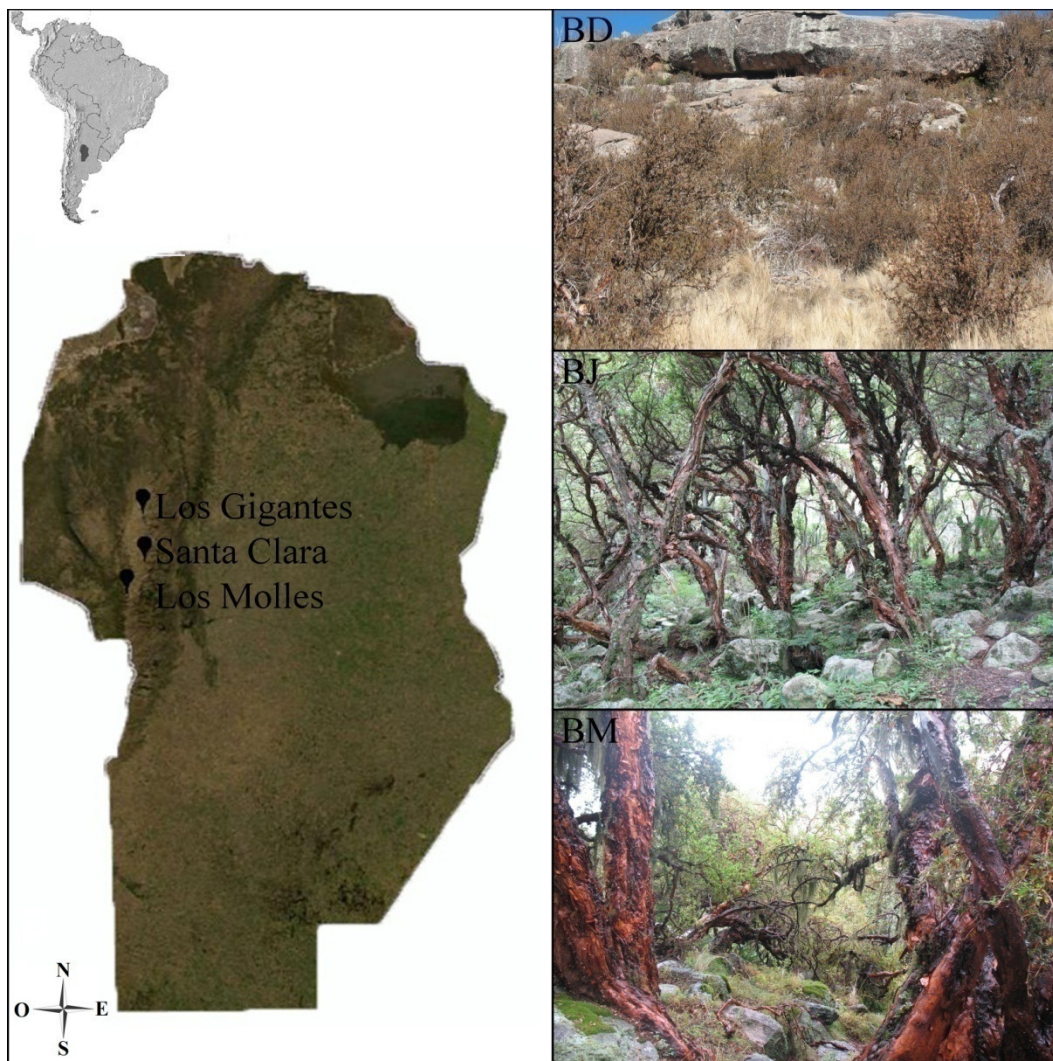
2.2.1 Área de estudio

Para la realización de este estudio se eligieron tres tipos de bosque de *Polylepis australis*, de aquí en adelante llamados “bosque degradado”, “bosque joven” y “bosque maduro”, definidos en Renison et al. (2011), en tres sitios de las Sierras Grandes de Córdoba: Los Gigantes (1800-1900 msnm; 31°23’S, 64°48’O), Santa Clara (2000-2200 msnm; 31°44’S, 64°47’O) y quebrada del río Los Molles (1800-2000 msnm; 31°58’S, 64°56’O), los que fueron considerados réplicas (Fig. 2.1). La temperatura media de los meses más fríos y más cálidos es de 5 °C y 11,4 °C; respectivamente, con la ocurrencia de heladas prácticamente durante todo el año (Cabido 1985). El clima es templado y húmedo, típico de ambientes de montaña, con un invierno seco y frío y un verano corto y fresco. La precipitación media anual es de 840 mm, concentrándose entre los meses de octubre y abril (Cabido et al. 1987).

El paisaje está compuesto por diferentes unidades según la pendiente, la intensidad del relieve y el porcentaje de afloramientos rocosos; e incluye fondos de valles y barrancas, mesetas, levantamientos rocosos altos y acantilados escarpados (Cabido et al. 1987). El suelo presenta un desarrollo incipiente sobre rocas graníticas y está provisto de abundante materia orgánica (Hapludoles Líticos) (Cabido & Acosta 1985). La vegetación está formada por pajonales y céspedes, principalmente representados por *Deyeuxia hieronymi* (Hack.) Türpe, *Festuca tucumanica* Alexeev, *Poa stuckertii* (Hack.) Parodi, *Alchemilla pinnata* Ruiz & Pav. y *Carex fuscula* Urv., interrumpidos por afloramientos graníticos y áreas erosionadas con roca expuesta.

También se encuentran arbustos y árboles mayores de *P. australis*, acompañados por árboles de *Maytenus boaria* Molina, arbustos de *Berberis hieronymi* Schneid. y comunidades de helechos (Cabido 1985; Cabido & Acosta 1985; Cingolani et al. 2004).

Figura 2.1 Imágenes representativas de la fisonomía de los tipos de bosque (bosque degradado - BD -, bosque joven - BJ - y bosque maduro - BM -) definidos por Renison et al. (2011) y elegidos para este estudio en tres sitios de las Sierras Grandes de Córdoba (Los Gigantes, Santa Clara y quebrada del río Los Molles).



Desde principios del siglo XVII, la principal actividad económica del área ha sido la cría de ganado doméstico, en su mayoría de ovejas y vacas, para la producción de lana y carne, que desde el siglo XX ha reemplazado completamente a los grandes

herbívoros nativos (principalmente *Lama guanicoe* Müller) (Cabido et al. 1987; Díaz et al. 1994). El impacto del pastoreo junto con los incendios de origen antrópico para promover el rebrote de los pastos utilizados como alimento para el ganado, han generado distintos tipos de bosques, que difieren en su complejidad estructural (Renison et al. 2011). Así, los bosques más conservados han quedado restringidos especialmente al fondo de los valles o barrancas empinadas, que son áreas inaccesibles al hombre, al ganado y al fuego (Renison et al. 2006; Cingolani et al. 2008).

En este estudio se utilizaron los mismos bosques georeferenciados y descritos por Renison et al. (2011). El bosque degradado se caracteriza por la presencia de árboles de *P. australis* esparcidos, con una cobertura promedio de 8%, poca regeneración, evidencias de eventos previos de fuego y de erosión del suelo. La edad promedio del árbol más grande es de 43 años; el volumen promedio de madera muerta caída es de 0,8 m³ / ha y en pie de 0,1 m³ / ha; el porcentaje promedio de cobertura por helechos es de 3,3 y la abundancia en promedio de árboles de *M. boaria* es de 2 individuos. El bosque joven presenta una cobertura promedio de 54%, una gran cantidad de árboles de 116 a 200 cm de altura. En este tipo de bosque la edad del árbol más grande es en promedio 37 años, el volumen promedio de madera muerta caída y en pie es de 1,1 m³ / ha para las dos categorías; el porcentaje promedio de cobertura por helechos es de 6,8; y presenta en promedio 19 árboles de *M. boaria*. El bosque maduro tiene una cobertura promedio de 72%, con algunos individuos de más de 800 cm de altura. La edad promedio del árbol más alto es de 67 años; el volumen de materia muerta caída y en pie es de 11,4 y 19,5 m³ / ha, respectivamente; la cobertura por helechos es en promedio 30%; y presenta 16 individuos de *M. boaria* en promedio. A diferencia de los otros tipos de bosque, en el bosque maduro se encuentran evidencias de un período sucesional más

avanzado (e.g. mayores volúmenes de madera muerta en pie y caída, alta cobertura por helechos en el sotobosque) (tomado de Renison et al. 2011).

2.2.2 Diseño experimental

Durante dos estaciones: primavera (7/2010, húmeda) y otoño (5/2011, seca), en cada tipo de bosque y en cada sitio se tomaron muestras de la rizosfera de 6 árboles de *P. australis* elegidos al azar, separados entre sí por al menos 20 m de distancia. De cada individuo se obtuvieron muestras de suelo y de raíces a una distancia de entre 15 y 50 cm desde el tronco principal. El sistema radical de cada individuo fue excavado cuidadosamente a fin de confirmar su conexión con el tronco principal, evitando extraer raíces de otras plantas. Se extrajo un pan de tierra de 15 cm de diámetro x 15 cm de profundidad. Las muestras fueron guardadas en bolsas de polietileno, etiquetadas y conservadas en heladera a 4 °C, para su posterior estudio en laboratorio y procesamiento dentro de los 15 días siguientes.

2.2.3 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares

De cada muestra se tomaron 100 g, que fueron tamizados empleando mallas de distinto tamaño de apertura (125 y 38 μm), siguiendo la metodología propuesta por Gerdemann & Nicolson (1963). El contenido retenido en los tamices fue centrifugado en sacarosa al 80% (Walker et al. 1982). Las esporas obtenidas se colocaron en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro con base cuadrada de 1 cm de lado. Las esporas y esporocarpos (aparentemente saludables y sin ningún tipo de ataque) fueron cuantificados e identificados a nivel de especie cuando fuera posible, bajo microscopio estereoscópico y microscopio óptico (Nikon, E200).

Para cada tipo morfológico, se realizaron preparados permanentes usando polivinil-alcohol (PVA) y PVA + Melzer (Omar et al. 1979) como medios de montaje. Las morfoespecies fueron identificadas siguiendo los manuales de identificación de INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>), Blaszkowski (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>), Schenk & Perez (1990) y Redecker et al. (2013). Las morfoespecies fueron fotografiadas con el microscopio Axiophot Zeiss.

Se calculó la diversidad de morfoespecies de HMA a través del índice de diversidad Shannon (H), que combina la riqueza de especies (S) y la equitatividad (E) (Magurran & McGill 2011). Los índices se obtuvieron con la función *diversityresult()* del paquete *BiodiversityR* (Kindt 2013).

2.2.4 Colonización micorrícica arbuscular

Una vez en el laboratorio, en bandejas con agua se separaron cuidadosamente las raíces de *P. australis* de las muestras de suelo, las cuales fueron fácilmente distinguibles del resto por su corteza característica, y se fijaron en alcohol 70% v/v hasta su posterior estudio. La colonización micorrícica arbuscular en las raíces se determinó mediante observación microscópica, previa clarificación y tñido siguiendo la técnica de Phillips & Hayman (1970) y Grace & Stribley (1991). De cada individuo se realizaron 5 preparados permanentes y se cuantificó el porcentaje de colonización micorrícica arbuscular y de estructuras intra-radicales (arbúsculos, circunvoluciones, vesículas e hifas), siguiendo la técnica propuesta por McGonigle et al. (1990) utilizando un microscopio óptico (Nikon, E200) a 400x de aumento. Los segmentos radicales colonizados fueron fotografiados con el microscopio Axiophot Zeiss.

2.2.5 Análisis estadísticos

Se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados (MMLG). Los individuos dentro de cada tipo de bosque y los preparados por individuo (en el caso de colonización micorrícica arbuscular) fueron anidados y utilizados como término aleatorio dentro de cada sitio (réplicas) para controlar la pseudo-replicación. Los factores fijos fueron el tratamiento con tres niveles (tipos de bosque: bosque degradado, bosque joven y bosque maduro); y la estación con dos niveles (húmeda y seca), se incluyó el término de la interacción en todos los casos. Se usó el criterio de Akaike (AIC) para la elección del mejor ajuste, comparando los distintos modelos usando el estadístico del Chi-cuadrado (χ^2), $P < 0,05$. La significancia de los factores fijos se determinó analizando los cambios en la Devianza a través de una prueba χ^2 . Los análisis se realizaron con el paquete lme4 (Bates et al. 2012) del programa estadístico R 2.13.2 (R Development Core Team 2011). Para las variables densidad de esporas, diversidad de Shannon y riqueza de morfoespecies se ajustó un modelo con distribución de los errores Gaussiana Inversa, con función de enlace logarítmica. Para el porcentaje de vesículas, circunvoluciones y arbusculos se ajustaron modelos con error Poisson y función de enlace logarítmica. La colonización micorrícica y el porcentaje de hifas se ajustaron con un error Gaussiana Inversa y función de enlace de identidad. Se evaluaron las diferencias significativas entre los niveles de cada factor con la prueba a posteriori de Tukey HSD con un $P < 0,05$.

Durante cada estación se realizaron curvas de acumulación de morfoespecies por rarefacción basadas en el número de muestras, con 999 permutaciones (Gotelli & Colwell 2001). Para ello se utilizó la función *accumresult()* del paquete *vegan* (Oksanen et al. 2012).

Para evaluar el efecto de los factores (tipo de bosque y estación) sobre la densidad específica de las morfoespecies se realizó un PERMANOVA con la función *adonis()*, del paquete *vegan*, utilizando la disimilaridad de Bray Curtis como la medida de distancia entre pares de morfoespecies y realizando 999 permutaciones.

Se realizó un análisis de correspondencia destendenciado (ACD) para evaluar la distribución de las especies y los dos factores (tipos de bosque y estación) en los ejes de ordenamiento (Hill & Gauch 1980). Estos análisis fueron realizados con la función *decorana()* del paquete *vegan*. Posteriormente, para evaluar la significancia de los agrupamientos observados en el ordenamiento se realizó un PERMANOVA, como fue explicado anteriormente.

2.3 Resultados

2.3.1 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares

En total se registraron 32 morfoespecies de HMA, pertenecientes a 10 géneros, de las cuales 29 pudieron identificarse a nivel de especie (Tabla 2.1, ver Anexo págs. 111-115). Doce morfoespecies pertenecieron al género *Acaulospora*, dos al género *Ambispora*, dos a *Claroideoglossum*, dos a *Entrophospora*, tres a *Funneliformis*, dos a *Gigaspora*, tres a *Glomus*, tres a *Pacispora*, dos a *Rhizophagus* y una a *Scutellospora*. En los tres tipos de bosque, durante la estación húmeda la morfoespecie más frecuente fue *A. mellea* y durante la estación seca fue *Glomus bohultii* (Tabla 2.1). Las morfoespecies identificadas sólo a nivel de género (Fig . 2.2) se describen en la Tabla 2.2.

Las curvas de rarefacción de cada tipo de bosque generaron estimaciones asintóticas de la riqueza de morfoespecies por muestra durante cada estación (Fig. 2.3). A partir de las curvas también se pudo observar que durante la estación húmeda, cuando

se hicieron asíntotas, en el bosque degradado se observó un mayor número de especies que en el bosque maduro, y el bosque joven presentó valores intermedios de riqueza (Fig. 2.3). Por el contrario, durante la estación seca, el bosque joven presentó la mayor riqueza, seguido por el bosque maduro y el bosque degradado (Fig. 2.3). Sin embargo, durante las dos estaciones las curvas siguieron un recorrido similar en los tres tipos de bosque (Fig. 2.3).

Tabla 2.1 Frecuencia relativa de las morfoespecies de hongos micorrízico arbusculares encontradas en la rizosfera de tres tipos de bosque de *P. australis* (bosque degradado- BD -, bosque joven - BJ - y bosque maduro - BM -) durante dos estaciones (húmeda y seca). Las morfoespecies más frecuentes se resaltan en negrita.

	Estación húmeda			Estación seca		
	BD	BJ	BM	BD	BJ	BM
Acaulosporaceae						
<i>Acaulospora alpina</i> Oehl, Sýkorová & Sieverd.	0,052	0,058	0,042	0,011	0,010	0,010
<i>A. bireticulata</i> Rothwell & Trappe	0,006	0,006	0,020	0,002	0,002	0,002
<i>A. excavata</i> Ingleby & Walker	0,028	0,029	0,027	0,018	0,016	0,020
<i>A. foveata</i> Rothwell & Trappe	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001
<i>A. mellea</i> Spain & Schenck	0,213	0,225	0,218	0,144	0,147	0,144
<i>A. rehmii</i> Sieverd. & Toro	0,011	0,011	0,011	0,000	0,000	0,000
<i>A. rugosa</i> Morton	0,034	0,035	0,034	0,033	0,030	0,027
<i>A. scrobiculata</i> Trappe	0,174	0,133	0,139	0,251	0,257	0,249
<i>A. spinosa</i> Walker & Trappe	0,030	0,030	0,014	0,008	0,007	0,007
<i>A. undulata</i> Sieverd.	0,000	0,000	0,000	0,003	0,003	0,014
<i>A. lacunosa</i> Morton	0,041	0,057	0,043	0,028	0,025	0,027
<i>Acaulospora</i> sp.	0,000	0,000	0,000	5,02 E -5	2,40 E -4	2,17 E -4
Ambisporaceae						
<i>Ambispora leptoticha</i> (Schenck & Sm.) Walker, Vestberg & Schüßler	0,002	0,003	0,014	0,012	0,013	0,014
<i>A. appendicula</i> (Spain, Sieverd. & Schenck) Walker	0,014	0,012	0,013	0,002	0,002	0,003
Claroideoglomeraceae						
<i>Claroideoglomerus claroideum</i> (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler	0,002	0,002	0,002	0,011	0,010	0,009
<i>C. luteum</i> (Kenn., Stutz & Morton) Walker & Schüßler	0,010	0,010	0,010	0,012	0,010	0,017

Tabla 2.1 (continuación)

	Estación húmeda			Estación seca		
	BD	BJ	BM	BD	BJ	BM
Entrophosporaceae						
<i>Entrophospora infrequens</i> (Hall) Ames & Schneid.	0,001	0,001	0,001	0,006	0,006	0,006
<i>Entrophospora</i> sp.	0,004	0,004	0,004	0,001	0,001	0,001
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	0,029	0,028	0,027	0,016	0,015	0,022
<i>G. rosea</i> Nicolson & Schenck	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000
<i>Scutellospora biornata</i> Sieverd. & Toro	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,006
Glomeraceae						
<i>Funneliformis badium</i> (Oehl, Redecker & Sieverd.) Walker & Schüßler	0,011	0,010	0,010	0,005	0,004	0,004
<i>F. geosporum</i> (Nicolson & Gerd.) Walker & Schüßler	0,011	0,009	0,009	0,000	0,000	0,000
<i>F. mosseae</i> (Nicolson & Gerd.) Walker & Schüßler	0,005	0,005	0,006	0,012	0,011	0,011
<i>Glomus brohultii</i> Sieverd. & Herrera	0,186	0,168	0,171	0,283	0,285	0,260
<i>G. fuegianum</i> Trappe & Gerd.	0,015	0,011	0,011	0,040	0,042	0,038
<i>Glomus</i> sp.	0,004	0,004	0,004	0,000	0,001	0,002
<i>Rhizophagus clarus</i> (Nicolson & Schenck) Walker & Schüßler	0,003	0,005	0,005	0,023	0,022	0,033
<i>R. intraradices</i> (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler	0,089	0,117	0,135	0,043	0,046	0,048
Pacisporaceae						
<i>Pacispora patagonica</i> (Novas & Fracchia) Walker, Vestberg & Schüßler	0,011	0,017	0,016	0,013	0,012	0,011
<i>P. dominikii</i> (Blaszk.) Sieverd. & Oehl	0,006	0,006	0,006	0,007	0,006	0,007
<i>P. robigina</i> Sieverd. & Oehl	0,005	0,005	0,004	0,008	0,007	0,007

Figura 2.2 Morfoespecies de hongos micorrízico arbusculares identificadas a nivel de género encontradas en la rizosfera de *P. australis*: (a) *Acaulospora* sp., (b) detalle de la pared de *Acaulospora* sp., (c) *Glomus* sp., (d) detalle de la pared de *Glomus* sp., (e) *Entrophospora* sp., (f) detalle de la pared de *Entrophospora* sp.

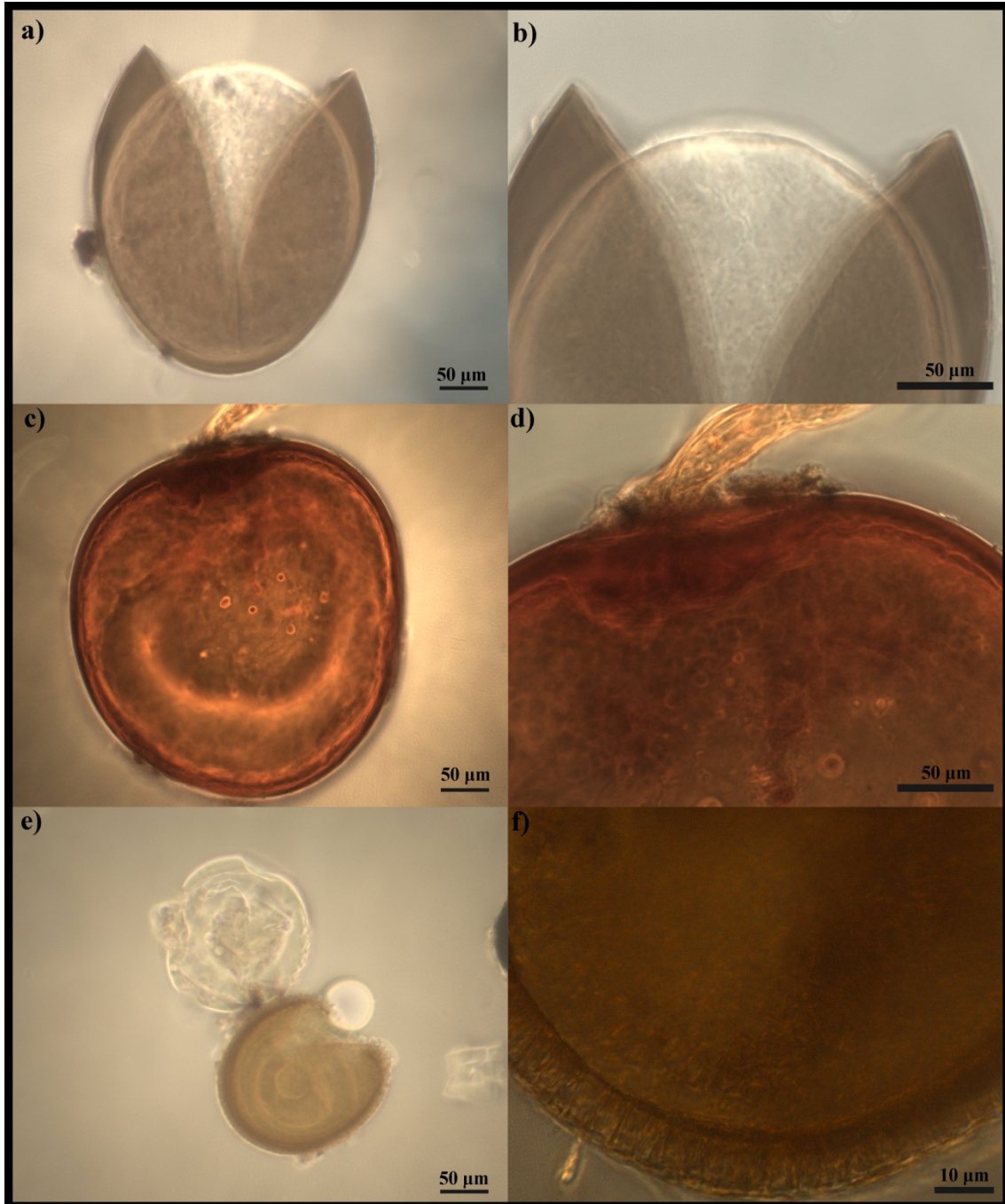
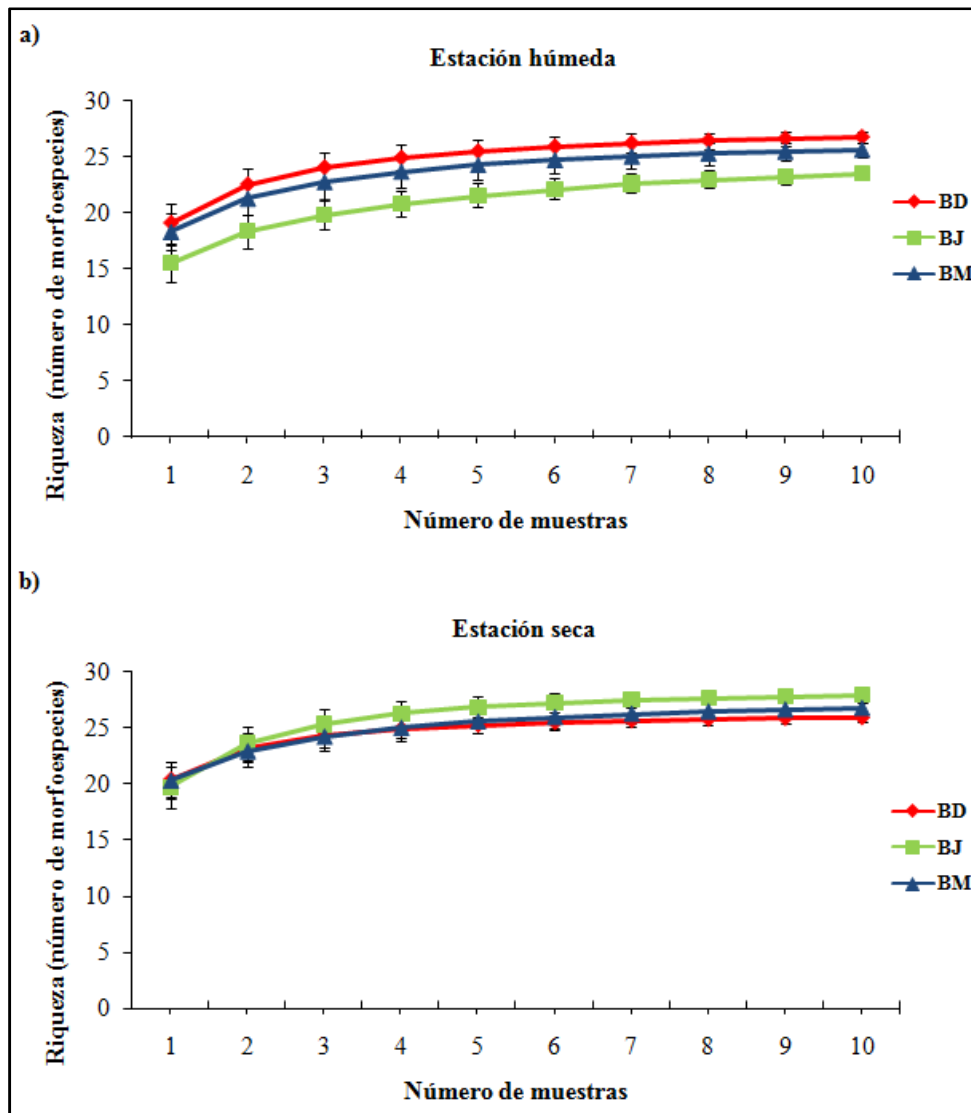


Tabla 2.2 Características morfológicas de las morfoespecies de hongos micorrícico arbusculares identificadas a nivel de género encontradas en la rizosfera de *P. australis*.

	<i>Acaulospora</i> sp. (Fig. 2.2 a y b)	<i>Glomus</i> sp. (Fig. 2.2 c y d)	<i>Entrophospora</i> sp. (Fig. 2.2 e y f)
Color y forma	Gris, globosa	Anaranjada a marrón; globosa a sub-globosa.	Amarilla amarronada; globosa a sub-globosa.
Distribución del tamaño (µm)	170 x 170	200-220 x 220-270	85-130 x 85-116
Hifa sustentora	_____	Derecha, ensanchada en la base de la espora; pared formada por dos capas, continuas con la pared de la espora y de coloración más clara que la pared de la espora.	_____
Oclusión del poro	_____	Septo debajo de la base de la espora.	_____
Cicatrices	Una cicatriz.	_____	Dos cicatrices.
Sáculo esporífero	No observado.	_____	Hialino a amarillo. Tamaño: 100 x 100 µm Pared (2 µm) formada por dos capas, una hialina externa y otra granulosa interna.
Otras características	Pared de la espora (hasta 3 µm) formada por dos capas; pared germinal hialina.	Pared de la espora (hasta 10 µm) formada por cuatro capas.	Proyecciones regulares, cónicas más altas que anchas (3-5) × (9) µm en la capa media de la pared de la espora.

Figura 2.3 Curvas de acumulación de morfoespecies de HMA por el método de rarefacción, por tipo de bosque de *Polylepis australis* (bosque degradado - BD -, bosque joven - BJ - y bosque maduro - BM -) durante dos estaciones: (a) húmeda y (b) seca.



La densidad (número total de esporas / 100 gr de peso seco de suelo), la diversidad de Shannon y la riqueza de morfoespecies de HMA no mostraron diferencias significativas entre los distintos tipos de bosque ni entre las estaciones estudiadas (Tabla 2.3). La densidad varió entre 5 y 6964 esporas / 100 gr de peso seco de suelo durante la estación húmeda (25 - 6964 en el bosque degradado, 7 - 469 en el bosque joven y 5 - 964 en el bosque maduro). Durante la estación seca varió entre 27 y 1631 esporas / 100

gr de peso seco de suelo (49 - 1108 en el bosque degradado, 27 - 1631 en el bosque joven y 29 - 1151 en el bosque maduro).

Tabla 2.3 a) Media de la densidad (número de esporas cada 100 g de peso seco de suelo), diversidad de Shannon y riqueza de morfoespecies de hongos micorrízico arbusculares (HMA) encontradas en tres tipos de bosque de *Polylepis australis* (bosque degradado - BD -, bosque joven - BJ - y bosque maduro - BM -) durante dos estaciones (húmeda y seca) y b) resultado del modelo lineal generalizado para cada término.

a)

	Estación húmeda			Estación seca		
	BD	BJ	BM	BD	BJ	BM
Densidad	526 ± 379	164 ± 32	191 ± 56	366 ± 77	368 ± 106	302 ± 73
Diversidad	1,87 ± 0,15	1,75 ± 0,10	1,92 ± 0,13	2,10 ± 0,15	2 ± 0,10	2,12 ± 0,12
Riqueza	7 ± 0,59	6 ± 0,59	7 ± 0,71	9 ± 0,70	8 ± 0,64	8 ± 0,56

b)

	Término								
	Tipo de bosque			Estación			Tipo de bosque x Estación		
	gl ¹	Devianza (χ^2)	P	gl ¹	Devianza (χ^2)	P	gl ¹	Devianza (χ^2)	P
Densidad	4	0,056	0,999	3	0,034	0,998	2	0,017	0,992
Diversidad	4	0,057	0,999	3	0,194	0,979	2	0,001	0,999
Riqueza	4	0,024	0,999	3	0,176	0,981	2	0,006	0,997

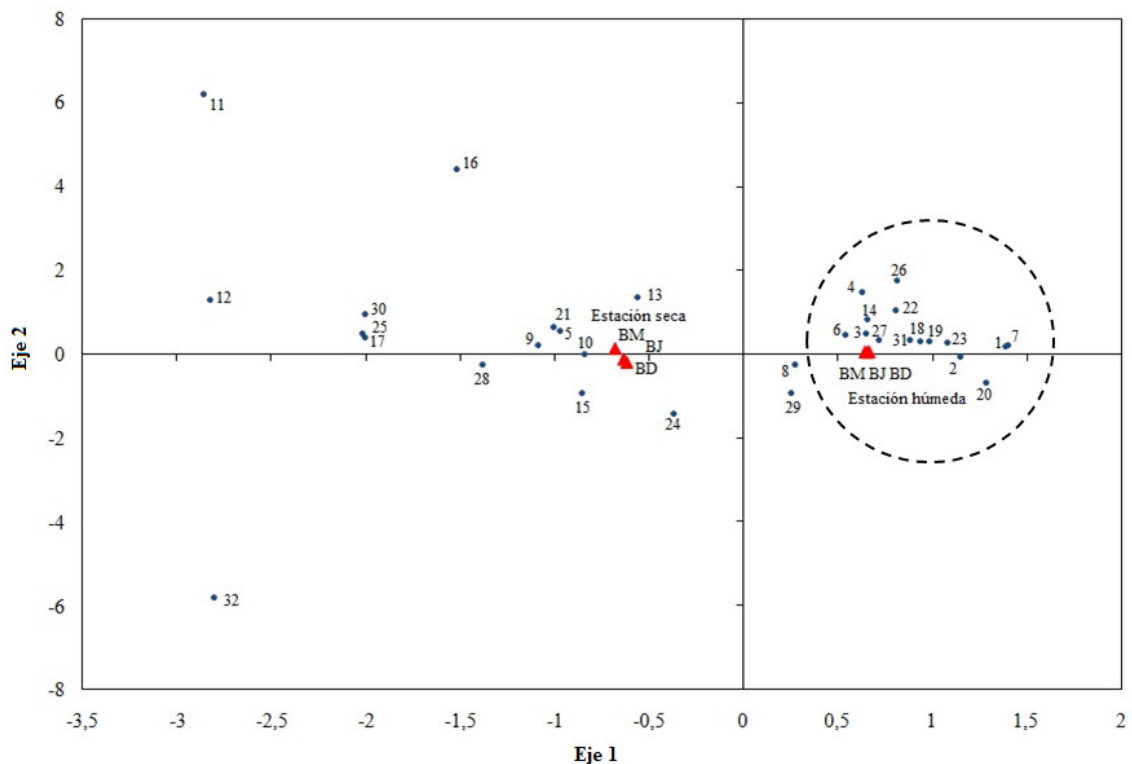
¹ Grados de libertad.

El análisis de correspondencia destendenciado (ACD) mostró el ordenamiento de la comunidad de HMA en los tres tipos de bosque durante las dos estaciones (Fig. 2.4). Los autovalores del eje 1 y del eje 2 fueron 0,35 y 0,02; respectivamente. Las estaciones, a diferencia de los tipos de bosque, mostraron una clara separación en relación al eje 1 (Fig. 2.4). El agrupamiento fue significativo sólo durante la estación húmeda (PERMANOVA: *pseudo-F* = 622,76; *P* < 0,05) (Fig. 2.4). Por lo tanto, la densidad específica (número de esporas por morfoespecie) fue mayor durante la

estación húmeda en las siguientes morfoespecies: *Acaulospora alpina*, *A. bireticulata*, *A. excavata*, *A. foveata*, *A. mellea*, *A. rehmi*, *Ambispora appendicula*, *Entrophospora* sp., *Funneliformis badium*, *F. geosporum*, *Gigaspora margarita*, *G. rossea*, *Glomus* sp., *Pacispora patagonica* y *Rhizophagus intraradices*.

Por otro lado, la densidad específica de las morfoespecies difirió significativamente entre las estaciones (PERMANOVA: *seudo-F* = 2,97; *P* < 0.001), pero no entre los tratamientos (PERMANOVA: *seudo-F* = 1.31; *P* = 0,129).

Figura 2.4 Análisis de correspondencia destendenciado (ACD) de las 32 morfoespecies de hongos micorrízicos arbusculares encontradas en tres tipos de bosque de *Polylepis australis* (bosque degradado - BD -, bosque joven - BJ - y bosque maduro - BM -) durante dos estaciones (húmeda y seca). Círculo de líneas punteadas: agrupamiento significativo según el PERMANOVA (*P* < 0,05).



1: *Acaulospora alpina*, 2: *A. bireticulata*, 3: *A. excavata*, 4: *A. foveata*, 5: *A. lacunosa*, 6: *A. mellea*, 7: *A. rehmi*, 8: *A. rugosa*, 9: *A. scrobiculata*, 10: *A. spinosa*, 11: *A. undulata*, 12: *Acaulospora* sp., 13: *Ambispora leptoticha*, 14: *A. appendicula*, 15: *Claroideogloium claroideum*, 16: *C. luteum*, 17: *Entrophospora infrequens*, 18: *Entrophospora* sp., 19: *Funneliformis badium*, 20: *F. geosporum*, 21: *F. mosseae*, 22: *Gigaspora margarita*, 23: *G. rossea*, 24: *Glomus brohultii*, 25: *G. fuegianum*, 26: *Glomus* sp., 27: *Pacispora patagonica*, 28: *P. dominikii*, 29: *P. robigina*, 30: *Rhizophagus clarus*, 31: *R. intraradices*, 32: *Scutellospora biomnata*.

2.3.2. Colonización micorrícica arbuscular

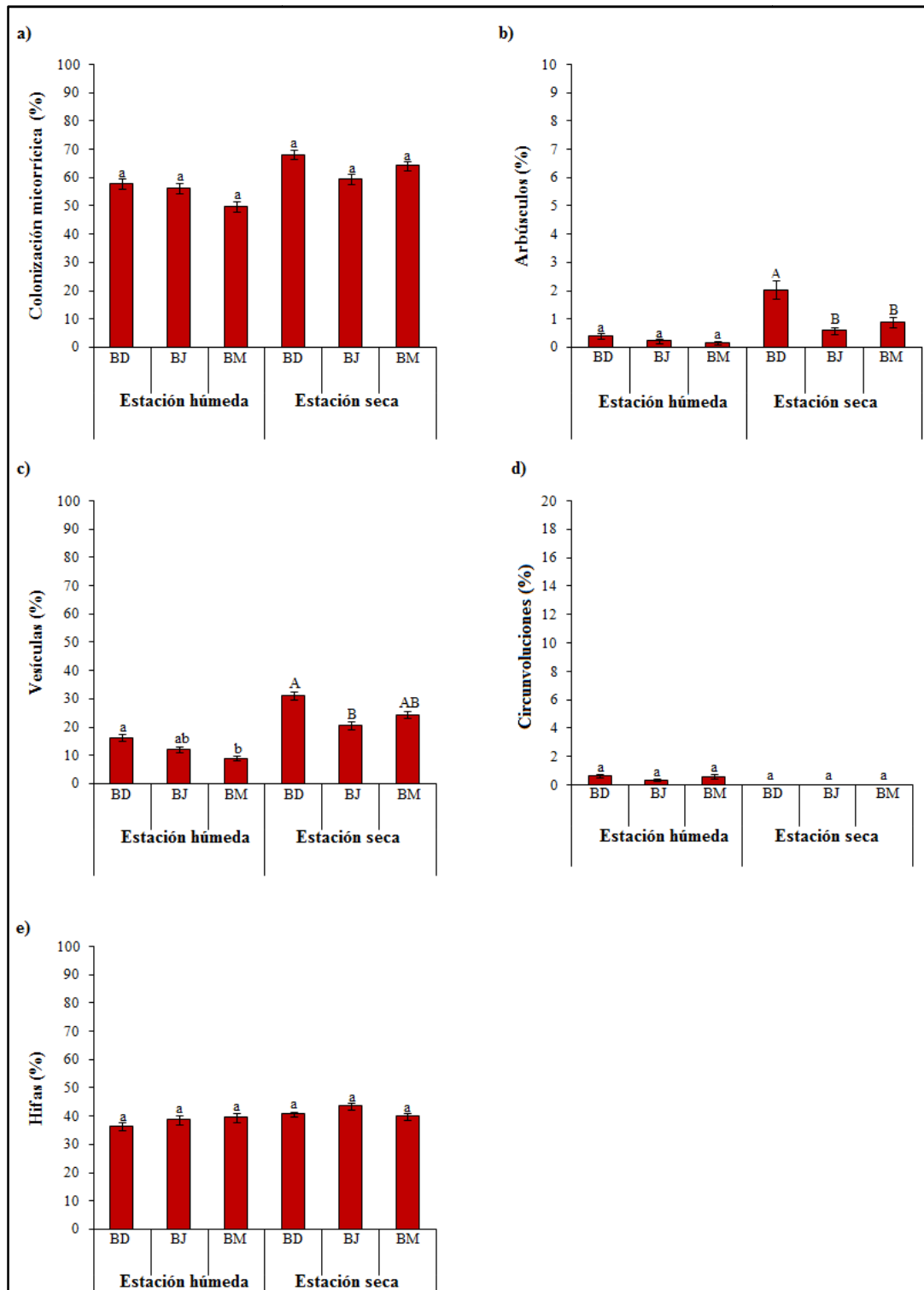
Las raíces de *P. australis* en todos los tratamientos y durante las dos estaciones presentaron colonización por HMA (ver Anexo, Fig. 6). La colonización micorrícica arbuscular varió entre 4 y 95 % durante la estación húmeda (16 - 95 % en el bosque degradado, 4 - 92 % en el bosque joven y 6 - 88 % en el bosque maduro). Durante la estación seca varió entre 11 y 100 % (32 - 100 % en el bosque degradado, 11 - 90 % en el bosque joven y 16 - 93 % en el bosque maduro).

El porcentaje de colonización micorrícica no presentó diferencias significativas entre las estaciones ($F = 0,008$; $P = 0,994$) ni entre los tipos de bosque ($F = 0,067$; $P = 0,946$) (Fig. 2.5a).

El porcentaje de arbuscúlos y de vesículas fue mayor durante la estación seca ($F = 8,735$, $P < 0,001$; $F = 66,04$, $P < 0,001$, respectivamente) y difirieron significativamente entre los tratamientos ($F = 0,238$, $P < 0,01$; $F = 20,35$, $P < 0,001$; para arbuscúlos y vesículas, respectivamente). Las raíces de *P. australis* del bosque degradado mostraron el mayor porcentaje de arbuscúlos durante la estación seca (Fig. 2.5b) y el mayor porcentaje de vesículas durante las dos estaciones (Fig. 2.5c).

El porcentaje de circunvoluciones y de hifas no presentó diferencias significativas entre las estaciones ($F = 0,011$, $P = 0,991$; $F = 0,126$, $P = 1$, respectivamente) ni entre los tratamientos ($F = 0,012$, $P = 0,990$; $F = 0,010$, $P = 1$, para circunvoluciones e hifas respectivamente) (Fig. 2.5d y 2.5e).

Figura 2.5 Media \pm error estándar de (a) la colonización micorrícica, (b) el porcentaje de arbuscúlos, (c) vesículas, (d) circunvoluciones y (e) hifas en raíces de *Polylepis australis* en tres tipos de bosque (bosque degradado - BD -, bosque joven - BJ - y bosque maduro - BM -), durante dos estaciones (húmeda y seca). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas y minúsculas denotan diferencias significativas entre estaciones. Prueba a posteriori de Tukey HSD, $P < 0,05$.



2.4 Discusión

2.4.1 Comunidad de hongos micorrícico arbusculares

La riqueza de HMA en los tres tipos de bosque (32 morfoespecies) estuvo comprendida entre los valores obtenidos para otros ecosistemas boscosos. El número total de morfoespecies de HMA en bosques tropicales de México varió desde 16 a 18 (Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999; Aguilar-Fernández et al. 2009), en bosques de *P. australis* de Córdoba (Argentina) fue de 20 morfoespecies (Menoyo et al. 2009), en bosques secos de la región pampeana de Argentina 26 (Irrazabal et al. 2004), en bosques de Costa Rica y Nicaragua 28 (Johnson & Wedin 1997; Picone 2000), en bosques subtropicales de China 44 (Zhang et al. 2004) y en la región oeste del Amazona brasilero se identificaron 61 morfoespecies (Stürmer & Siqueira 2011). En el presente trabajo, la extracción de 6 muestras de suelo para cada tipo de bosque en tres sitios de las Sierras Grandes de Córdoba fue suficiente como para generar estimaciones asintóticas de la riqueza de morfoespecies durante cada estación, es decir que la recolección de más cantidad de muestras no hubiera evidenciado un patrón de riqueza de especies distinto al observado.

Los tres tipos de bosque no presentaron diferencias en el índice de diversidad de Shannon, ni en la riqueza de morfoespecies. Estos resultados coinciden con lo observado por Menoyo et al. (2009) en bosques de *P. australis* con distinta carga ganadera, y por otros autores en bosques tropicales de México (Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999) y de Nicaragua y Costa Rica (Picone 2000) bajo distintos regímenes de manejo. Sin embargo, las comunidades de HMA de algunos ecosistemas boscosos son sensibles a los cambios del ecosistema original (Irrazabal et al. 2004; Zhang et al. 2004; Stürmer & Siqueira 2011; Grilli et al. 2012). En este estudio las comunidades de HMA parecen ser resistentes a las variaciones de la estructura de los bosques de *P. australis*,

posiblemente producto de una larga historia evolutiva de pastoreo (Cingolani et al. 2003; Renison et al. 2004, 2010). Como propusieron Díaz et al. (1994) para las comunidades de pastizales de las Sierras Grandes de Córdoba, la presencia del ganado doméstico ha ocurrido por tantos años que podría no ser considerada un disturbio, ya que al haber estado modificando el ambiente por un tiempo tan prolongado se ha vuelto un factor intrínseco del ecosistema y las comunidades vegetales han logrado adaptarse. Lo mismo podría estar ocurriendo con las comunidades de HMA, ya que se ha evidenciado que se adaptan a diferentes condiciones ambientales (Brundrett 1991). Por otro lado, se ha observado en bosques de *P. australis* y en los pastizales de altura circundantes que el impacto del pastoreo puede modificar irreversiblemente el paisaje de las Sierras Grandes, ya que la pérdida de suelo deja grandes superficies de roca expuesta (Renison et al. 2010). Este proceso puede ocasionarse debido a una carga ganadera mayor de la que estos sistemas históricamente han soportado o a los efectos diferenciales del ganado doméstico en comparación con los camélidos nativos y/o a la utilización de los incendios para promover el rebrote de los pastos (Cingolani et al. 2003, 2005, 2008). Es decir que, cambios mayores en la estructura de los bosques también podrían generar modificaciones en las comunidades de HMA (Abbott & Gazey 1994). Por lo tanto, no se debe subestimar el efecto de las modificaciones del ecosistema, más aún cuando en otros estudios se ha visto que los bosques de *P. australis* con mayor complejidad estructural (i.e. mayor cobertura arbórea y por helechos, abundante madera muerta en pie y caída, presencia de individuos de la especie tolerante a la sombra -*M. boaria*-) presentan un mayor número de endemismos (Robledo et al. 2006) y los árboles producen una mayor cantidad de semillas viables (Renison et al. 2004).

En relación a la influencia de los cambios estacionales sobre las comunidades de HMA, no se observaron diferencias significativas en el índice de Shannon, la riqueza o la densidad de morfoespecies, pero sí se encontró un grupo de morfoespecies con mayor abundancia durante la estación húmeda. Resultados similares han sido reportados por otros autores en diferentes ecosistemas (Lugo & Cabello 2002; Becerra et al. 2009; Oehl et al. 2009; Soteras et al. 2012).

En los bosques de *P. australis*, al igual que en otros ecosistemas boscosos (Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999; Picone 2000), la estacionalidad, más que los cambios en la estructura del bosque, influyó sobre la densidad específica de las morfoespecies presentes en la rizosfera de esta especie arbórea. Sin embargo, no se observaron variaciones significativas en los parámetros de la comunidad de HMA (densidad, diversidad y riqueza). Probablemente, la adaptación de las comunidades de HMA a la estacionalidad, resulta en una mayor resistencia frente a los cambios de la estructura del bosque. Esto ha sido predicho para otro tipo de ecosistemas, en ambientes semiáridos con una larga historia evolutiva de pastoreo, donde la mayoría de las especies adaptadas a la sequía podrían adaptarse a la influencia del pastoreo, observándose menores variaciones de la diversidad florística frente a cambios en la intensidad del pastoreo (Cingolani et al. 2005 y referencias allí citadas).

2.4.2 Colonización micorrícica arbuscular

La colonización micorrícica arbuscular en *P. australis* presentó valores elevados, al igual que lo observado por Menoyo et al. (2009), aunque estos autores registraron valores mínimos de un 70 %, mientras que en el presente trabajo fueron de hasta un 4 %. Posiblemente, las réplicas en el espacio permitieron evidenciar la

variabilidad de la colonización radical que naturalmente existe entre los individuos en cada tipo de bosque.

El porcentaje de colonización micorrícica no difirió entre los tipos de bosque, coincidiendo con lo encontrado por Aguilar-Fernández et al. (2009) y Menoyo et al. (2009) en bosques con distinto grado de impacto. Por otro lado, a diferencia de lo observado en otros trabajos (e.g. Lugo et al. 2003; Zangaro et al. 2013) no se encontraron variaciones estacionales de esta variable, por lo tanto la colonización por los HMA no se ve influenciada por los cambios estacionales. Sin embargo, algunas estructuras intra-radicales (arbúsculos y vesículas) presentaron diferencias significativas entre los tipos de bosque y las estaciones, coincidiendo con lo reportado por otros autores (Klironomos et al. 2004; Menoyo et al. 2009), es decir que la actividad de los HMA varía con las estaciones, apoyando los antecedentes sobre la biología de estos hongos (Smith & Read 2008).

A diferencia de Menoyo et al. (2009) que observaron un mayor porcentaje de arbúsculos en el sitio con menor carga ganadera, en este trabajo fue mayor en el bosque degradado, sólo durante la estación seca. Generalmente, los valores más altos de colonización por arbúsculos han sido reportados en la estación de máxima adquisición de nutrientes (estación húmeda) (Allen & Allen 1998; Lugo et al. 2003). Probablemente, cuando las condiciones climáticas y ambientales son desfavorables, *P. australis* requiera aún más de la asociación micorrícica, incrementando el número de estructuras para el intercambio de nutrientes. En sitios degradados, un incremento en la compactación del suelo aumenta el contenido de fósforo por unidad de longitud de raíz en plantas micorrizadas y, por lo tanto el número de estructuras empleadas para el intercambio de este nutriente (Nadian et al. 1997), lo que apoyaría la explicación planteada.

Durante las dos estaciones, las raíces de los árboles del bosque degradado mostraron el mayor porcentaje de vesículas, y en todos los tipos de bosque los valores fueron más altos durante la estación seca. Generalmente, las altas temperaturas, tanto por la estación seca como por la exposición del suelo a altas radiaciones debido a la disminución de cobertura en el bosque degradado, promueven la formación de estas estructuras de almacenamiento, que se ha sugerido que pueden tener una función como propágulos o para iniciar el crecimiento de hifas intercelulares (Smith & Read 2008). De esta manera, como ya ha sido destacado por otros autores (e.g. Aguilar-Fernández et al. 2009), las plantas continúan manteniendo la simbiosis activa incluso en períodos de menor actividad fotosintética como durante la estación seca.

2.5 Conclusiones

Los resultados muestran que en los bosques de *P. australis* de las Sierras Grandes de Córdoba la estacionalidad genera cambios sobre la densidad específica de algunas morfoespecies de HMA. Estos hongos cambian de nicho, entre el suelo y la raíz, en respuesta a la estacionalidad, pero sin modificarse la riqueza, diversidad ni densidad de esporas de la comunidad. De esta manera, así como están adaptados a los cambios estacionales, a la sequía y al frío del invierno y al congelamiento del suelo a lo largo de prácticamente todo el año, estarían adaptadas a las variaciones micro-climáticas del suelo que se producen por el cambio en la estructura del bosque, al menos en los tipos de bosque comparados en este estudio.

Por otro lado, las estructuras intra-radicales de los HMA estuvieron influenciadas por los cambios en la estructura del bosque y por la estacionalidad. Los árboles del sitio más degradado presentaron el mayor porcentaje de estructuras para el intercambio (arbúsculos) y para almacenamiento (vesículas) durante la estación seca.

Probablemente, bajo condiciones ambientales más desfavorables, *P. australis* requiera aún más de la asociación con los HMA para el intercambio de nutrientes.

CAPÍTULO III

RESPUESTA DE *Polylepis australis* EN CONDICIONES DE INVERNADERO FRENTE A LA INOCULACIÓN CON SUELO PROVENIENTE DE TRES TIPOS DE VEGETACIÓN

*La mayor parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en: Soteras F, Renison D & Becerra A. (2013). Growth response, phosphorus content and root colonization of *Polylepis australis* Bitt. seedlings inoculated with different soil types. *New Forests* 44:577–589 (ver Anexo). La publicación final está disponible en <http://link.springer.com>

3.1 Introducción

Los bosques de *P. australis*, proveen de importantes servicios ecosistémicos en las Sierras Grandes de Córdoba, entre ellos agua, formación de suelo, mantenimiento de la biodiversidad y hábitat para especies endémicas (Renison et al. 2010, 2011). Desde el siglo XVII el pastoreo del ganado doméstico y los incendios intencionales para promover el rebrote de los pastizales utilizados como alimento para el ganado han reducido el área boscosa de la región (Cingolani et al. 2008). Actualmente se realizan planes para restaurar estos bosques y, a través de numerosos estudios, se han determinado algunos de los métodos más eficientes para facilitar la reforestación con *P. australis* (Renison et al. 2005, 2011; Seltmann et al. 2006). Sin embargo, los hongos micorrízico arbusculares (HMA), que pueden conferir beneficios al crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes (Smith & Read 2008), aun no se han considerado para las prácticas de reforestación con esta especie.

Los HMA presentan diferencias en sus estrategias de colonización al nivel taxonómico de familia (Hart & Reader 2002). Una combinación de taxones de HMA formada por especies filogenéticamente más distantes, de familias diferentes, promueven un mayor incremento en la biomasa que un grupo de HMA formado por especies más cercanas (Maherali & Klironomos 2007). Sin embargo, la relación entre la abundancia y la riqueza de HMA con la respuesta de crecimiento de la planta no está completamente clara. Se ha visto que los suelos con el mayor potencial de inóculo, mayor capacidad de colonizar las raíces de la planta hospedante (Asbjornsen & Montagnini 1994), o suelos con la mayor riqueza de HMA (Cuenca et al. 2004) no siempre provocan la mejor respuesta de la planta hospedante. Esto podría deberse a los patrones de esporulación específicos de cada morfoespecie de HMA o a efectos diferenciales de la colonización micorrízica arbuscular en el balance costo-beneficio de

una planta (Jones & Smith 2004). Además, hay evidencias contrastantes respecto a la relación entre el período sucesional al que pertenece la planta hospedante y la efectividad de un determinado suelo como inóculo. En general se ha observado una respuesta positiva de plantas de etapas sucesionales tardías frente a la inoculación con HMA de un período sucesional temprano (Asbjornsen & Montagnini 1994; Kiers et al. 2000; Allen et al. 2003). De esta manera, es importante estudiar la influencia de distintos inóculos de HMA sobre cada especie de planta, ya que la efectividad micorrícica depende de la interacción específica entre el hongo y el hospedante (Jones & Smith 2004; Smith & Smith 2011).

Los antecedentes acerca del efecto de la inoculación con HMA sobre *P. australis* son escasos. Sólo Martino et al. (2011) observaron bajo condiciones de invernadero una mayor biomasa y una menor colonización en los juveniles inoculados con suelo de un área sin ganadería.

En este trabajo se propuso evaluar bajo condiciones de invernadero el crecimiento, la colonización radical y el contenido nutricional de juveniles de *P. australis*. Para ello, se utilizó como inóculo natural el suelo de tres tipos de vegetación: un pastizal, y dos tipos de bosque (bosque degradado y bosque maduro sensu Renison et al. (2011)) que diferían en su complejidad estructural. El suelo de un pastizal, considerado como perteneciente a un periodo sucesional temprano, fue elegido debido a que se ha observado que incrementa significativamente el crecimiento de especies de árboles leñosas (Onguene & Kuyper 2005).

En base a los antecedentes se hipotetiza que la comunidad de HMA varía entre los diferentes tipos de inóculo y, por lo tanto promueven diferencialmente el crecimiento y nutrición de juveniles de *P. australis*. Considerando que *P. australis* es una especie sucesional tardía y que, en base a los antecedentes, el inóculo proveniente

de un periodo sucesional temprano sería el más efectivo para la promoción de su crecimiento, se predice que desde el suelo del pastizal hacia el del bosque maduro disminuirá la colonización radical, relación raíz / tallo y nutrición de los juveniles de *P. australis*.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Inóculo utilizado

El suelo utilizado para inocular las plántulas de *P. australis* fue extraído de la quebrada del río Los Molles (1800-2000 msnm; 31°58'S, 64°56'O). Se eligió este sitio por ser una de las áreas mejor preservadas de las Sierras Grandes de Córdoba. El paisaje consiste en un mosaico de afloramientos rocosos, pastizales y bosques de *P. australis* en distintos estados de conservación. Se pueden encontrar sitios donde fuegos sucesivos han impactado en la estructura del bosque, provocando una erosión de los suelos extensiva y dificultando la regeneración del bosque (Cingolani et al. 2004; Renison et al. 2011). Por otro lado, existe un fragmento de bosque maduro único en las Sierras Grandes con grandes volúmenes de madera muerta en pie, una cobertura típica de helechos en el sotobosque y la presencia de *Maytenus boaria*, una especie arbórea relativamente menos abundante en estos ecosistemas (Renison et al. 2011). Relevamientos sucesivos en el campo, con la ayuda de imágenes satelitales, no han logrado revelar otro bosque maduro de numerosas hectáreas como el de este sitio (Cingolani et al. 2008; Renison et al. 2011).

Se extrajeron muestras de suelo de tres tipos de vegetación: (1) un típico pastizal de altura sin árboles de *P. australis*, dominado por *Deyeuxia hieronymi* (Hack.) Türpe y entremezclado con *Alchemilla pinnata* Ruiz & Pav. y *Carex fuscata* Urv. (Cingolani et al. 2003), de aquí en adelante llamado "pastizal"; (2) un área con árboles de *P. australis* esparcidos, con poca regeneración y evidencias de la ocurrencia previa

de incendios y de erosión del suelo, de aquí en adelante llamado “bosque degradado”; y (3) un bosque maduro de *P. australis* con la presencia de grandes volúmenes de madera muerta en pie y caída, cobertura por helechos y gran abundancia de individuos de *M. boaria*, de aquí en adelante llamado “bosque maduro” (Renison et al. 2011). El bosque degradado se encontraba a aproximadamente 100 m del bosque maduro y ambos tipos de bosque a 600 m del pastizal.

Durante la estación seca (mayo del 2009) y en 10 puntos elegidos al azar y separados por al menos 10 m dentro de cada comunidad vegetal, se extrajeron muestras de los primeros 20 cm del suelo, se colocaron en bolsas de polietileno y se conservaron a 4 °C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. De cada muestra de suelo se realizaron los siguientes análisis edáficos: textura, N total (%), nitrato (ppm), materia orgánica (%), pH (25 % en solución con agua), fósforo extraíble (ppm) por medio del método de Bray and Kurtz I (Jackson 1964), potasio, calcio, magnesio y sodio (meq / 100 g).

Cada tipo de inóculo consistió en un homogeneizado de las 10 muestras de suelo, previa tamización con una malla de apertura de 1 cm, a fin de remover hojarasca, piedras y palos pequeños.

Con el fin de producir un solo control para todos los tipos de inóculo, este tratamiento se realizó con una mezcla de los tres tipos de suelo en proporciones iguales previamente esterilizado (1h en autoclave a 100 °C y 1,5 atm de presión).

3.2.2 Inoculación de las plántulas de *Polylepis australis*

Las semillas de *P. australis* fueron recolectadas durante los meses de diciembre 2008 y enero 2009 de numerosos fragmentos de bosques de las Sierras Grandes de Córdoba. Una vez en el laboratorio, fueron lavadas por 10 minutos con una solución de

hipoclorito de sodio al 10% y luego con agua esterilizada. Posteriormente, se colocaron para su germinación en bandejas de plástico con arena estéril (1h en autoclave a 100 °C y 1,5 atm de presión) y tierra tindalizada (1 h en autoclave a 120 °C, por 3 días consecutivos con intervalos de 24 h de reposo), en proporción 3:1, durante el mes de marzo de 2009 (Fig. 3.1a). Luego de la germinación, las plántulas fueron repicadas a recipientes más grandes (Fig. 3.1b). Finalmente, en junio de 2009, las plántulas se trasplantaron a las macetas (19 cm de alto x 9 cm de diámetro) para su inoculación (Fig. 3.1c). Cada maceta contenía 500 g de suelo, de la misma mezcla utilizada como inóculo, previamente tindalizado. Se realizaron 6 réplicas de 4 tratamientos de inoculación (control, pastizal, bosque degradado y bosque maduro), agregando 30 g de cada tipo de inóculo 3 cm por debajo del suelo tindalizado. Con excepción del control, el inóculo contenía esporas, fragmentos radicales colonizados, micelio externo y otros microorganismos del suelo.

Para la extracción e identificación de las esporas de HMA de cada tipo de inóculo, se realizó el procedimiento de la misma manera que fue explicado en la sección 2.2, sub-sección 2.2.3 del Capítulo II. Se calculó la diversidad de morfoespecies de HMA a través del índice de diversidad Shannon (H), que combina la riqueza de especies (S) y la equitatividad (E) (Magurran & McGill 2011). Los índices se obtuvieron con la función *diversityresult()* del paquete *BiodiversityR* (Kindt 2013).

Figura 3.1 (a) Germinación de semillas de *Polylepis australis* en bandejas con arena estéril, (b) repique a recipientes mayores y (c) trasplante a macetas donde se realizó la inoculación.



3.2.3 Respuesta de *Polylepis australis* frente a la inoculación

Luego de 12 meses de crecimiento en el invernadero, se cosecharon todos los individuos. Se determinaron como indicadores del crecimiento a la altura y la relación raíz / tallo (peso seco de raíz / peso seco de parte aérea). También se cuantificó la colonización micorrícica arbuscular (metodología descrita en el Capítulo II, sección 2.2, sub-sección 2.2.4). Además se realizaron análisis nutricionales de la parte aérea

(porcentaje): contenido P, N por el método de digestión ácida (Jones et al. 1991), Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Zn y Mn.

3.2.4 Análisis estadísticos

Las medidas de las comunidades de HMA (diversidad de Shannon, riqueza, densidad y equitatividad) y las variables consideradas para determinar la respuesta a la inoculación (crecimiento: altura y relación raíz / tallo; colonización micorrícica arbuscular y contenido nutricional de la parte aérea) se compararon a través de un ANAVA de un nivel, con tratamiento como factor fijo (cuatro niveles: control, pastizal, bosque degradado y bosque maduro). Se realizó la prueba a posteriori de Tukey HSD para detectar diferencias entre tratamientos, con un nivel de significancia de 0,05.

En todos los casos se comprobó que los residuos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza (con las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente). Antes de realizar el análisis, las variables densidad de HMA (número de esporas / 100 gr de peso seco de suelo) y equitatividad fueron transformadas a rango, y las variables porcentaje de arbusculos y porcentaje de vesículas fueron transformadas a log10. Los nutrientes del suelo fueron comparados con el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, ya que ninguna transformación fue posible.

3.3 Resultados

3.3.1 Inóculo: características del suelo y comunidad de hongos micorrícico arbusculares

El suelo de los tres inóculos presentó una textura arcillosa. El suelo del pastizal presentó un pH levemente ácido y el del bosque maduro moderadamente ácido con un mayor porcentaje de fósforo. El suelo del bosque degradado fue moderadamente ácido, con un mayor contenido de nitrógeno y de materia orgánica. El porcentaje de nitrato no

fue diferente entre los tres tipos de inóculo. En cuanto a los cationes de intercambio el bosque degradado presentó mayor cantidad de K y de Na (Tabla 3.1).

La diversidad de Shannon, la equitatividad y la densidad de esporas fue similar entre los tres tipos de inóculos. Sólo la riqueza fue significativamente mayor en el inóculo del pastizal (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Media (error estándar) de características del suelo, índice de Shannon, equitatividad, densidad y riqueza de la comunidad de hongos micorrízico arbusculares de los tres tipos de inóculo: pastizal, bosque degradado y bosque maduro.

	pastizal	bosque degradado	bosque maduro	estadístico y valor de <i>P</i>
Nt (%)	0,51 (0,03) b	0,81 (0,07) a	0,56 (0,08) b	$H = 8,80; P = 0,01$
Nitrato (ppm)	220 (17,22) a	210 (66,36) a	258 (6,63) a	$H = 4,77; P = 0,09$
P (ppm)	10,24 (0,37) b	4,41 (1,87) b	16,87 (1,25) a	$H = 19,95; P < 0,0001$
K (meq/100 g)	0,59 (0,06) b	1,63 (0,29) a	0,47 (0,1) b	$H = 14,96; P < 0,001$
Ca (meq/100 g)	16,53 (1,6) a	18,66 (2,69) a	21,97 (3,11) a	$H = 1,63; P = 0,44$
Mg (meq/100 g)	1,48 (0,16) a	2,16 (0,37) a	2,08 (0,35) a	$H = 2,72; P = 0,25$
Na (meq/100 g)	0,16 (0,02) b	0,36 (0,05) a	0,18 (0,02) b	$H = 12,03; P < 0,001$
MO (%)	9,53 (0,61) b	16,68 (1,39) a	12,62 (1,71) ab	$H = 10,95; P < 0,01$
pH 1:2,5	6,23 (0,04) a	5,85 (0,09) b	5,9 (0,07) b	$H = 11,73; P < 0,01$
Diversidad	2,28 (0,14) a	2 (0,20) a	2,14 (0,12) a	$F = 0,83; P = 0,45$
Equitatividad	0,65 (0,04) a	0,66 (0,07) a	0,64 (0,04) a	$F = 0,34; P = 0,72$
Riqueza	12 (0,73) a	9 (1) b	10 (0,55) ab	$F = 3,93; P = 0,03$
Densidad	234 (67) a	281 (114) a	229 (33) a	$F = 0,27; P = 0,77$

Nt: nitrógeno total, P: fósforo, K: potasio, Ca: calcio, Mg: magnesio, Na: sodio, MO: materia orgánica

Considerando todos los inóculos, se identificaron 26 morfoespecies de HMA pertenecientes a diez géneros: *Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Pacispora*, *Rhizophagus*, *Scutellospora*; 24 morfoespecies pudieron identificarse a nivel de especie (Tabla 3.2). Las morfoespecies más frecuentes fueron *R. intraradices* en el bosque degradado y en el bosque maduro, y

G. fuegianum en el pastizal. En el inóculo del bosque maduro se encontraron principalmente morfoespecies de las familias Glomeraceae y Acaulosporaceae. Los otros tipos de inóculo mostraron representantes de todas las familias observadas, a excepción de *Ambispora appendicula* que sólo fue observada en el inóculo del pastizal (Tabla 3.2).

Luego de 12 meses en el invernadero los juveniles alcanzaron una altura promedio de $22,56 \pm 2,94$ cm ($31,33 \pm 4,95$ cm los controles; $16,05 \pm 1,85$ los juveniles inoculados con suelo del pastizal; $19,75 \pm 1,93$ cm con suelo del bosque degradado y $23,10 \pm 3,02$ cm con suelo del bosque maduro). Los controles fueron significativamente más altos que los juveniles inoculados con suelo del pastizal, el resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí ($F = 4,18$; $P = 0,019$). La relación raíz / tallo fue significativamente mayor en los juveniles inoculados con suelo del bosque maduro, el resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí (Fig. 3.2a).

Los controles no presentaron colonización micorrícica arbuscular, evidenciando la ausencia de contaminación en el transcurso del experimento. La colonización micorrícica arbuscular de los juveniles en los tres tratamientos de inoculación varió entre 7 y 75 % (19 - 50 % en el pastizal, 19 - 55 % en el bosque degradado y 7 - 75 % en el bosque maduro). Los juveniles inoculados con suelo del bosque maduro mostraron una colonización mayor que el resto de los tratamientos, aunque esta diferencia no fue significativa ($F = 2,57$; $P = 0,109$) (Fig. 3.2b).

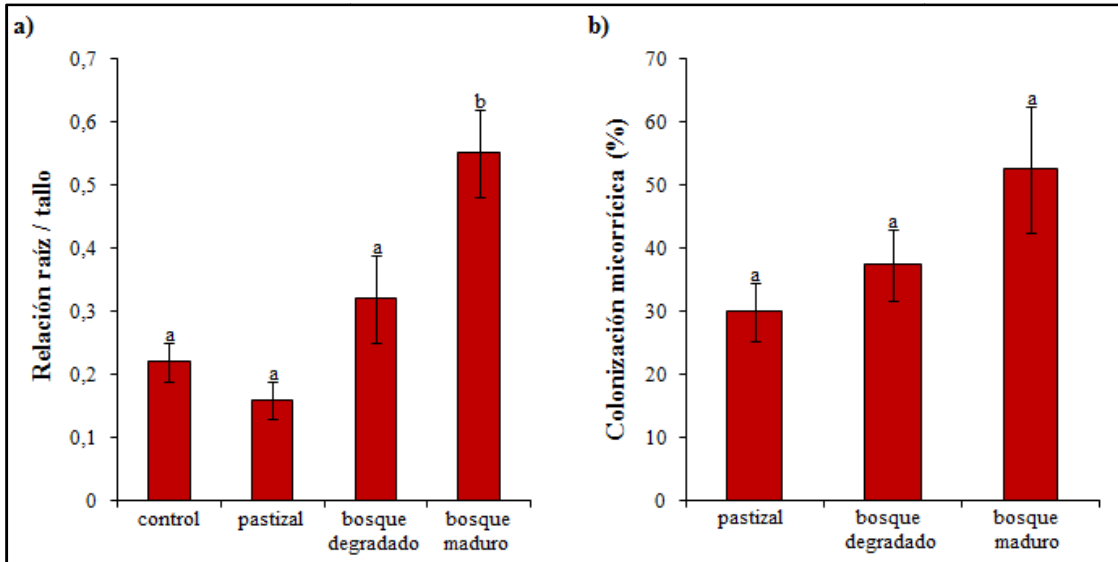
El valor promedio de colonización por arbusculos fue $3,20 \pm 1,64$ % en los juveniles inoculados con suelo del pastizal; $5,29 \pm 2,23$ % en los juveniles con suelo del bosque degradado; y $3,05 \pm 2,22$ % en los juveniles con suelo del bosque maduro. La colonización promedio por vesículas fue de $6,56 \pm 2,15$ % en los juveniles inoculados

con suelo del pastizal; $12,77 \pm 2,58$ % en los juveniles inoculados con suelo del bosque degradado; y $23,84 \pm 9,27$ % en los juveniles con suelo del bosque maduro. Estas variables no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 0,71$; $P = 0,507$ para el porcentaje de arbusculos; $F = 0,58$; $P = 0,572$ para el porcentaje de vesículas).

Tabla 3.2 Frecuencia relativa de las morfoespecies de hongos micorrízico arbusculares encontradas en los tres tipos de inóculo: pastizal (P), bosque degradado (BD) y bosque maduro (BM). Los valores más altos están resaltados en negrita.

	P	BD	BM
Familia Acaulosporaceae			
<i>Acaulospora bireticulata</i> Rothwell & Trappe	0,0441	0	0,0005
<i>A. foveata</i> Rothwell & Trappe	0	0,0018	0,0154
<i>A. lacunosa</i> Morton	0,0040	0	0
<i>A. mellea</i> Spain & Schenck	0,0698	0,0142	0,0486
<i>A. rehmi</i> Sieverd. & Toro	0,0003	0,0350	0,0060
<i>A. rugosa</i> Morton	0,0278	0,0149	0,0176
<i>A. scrobiculata</i> Trappe	0,0144	0,1951	0,0666
<i>A. spinosa</i> Walker & Trappe	0,0149	0,0071	0,0103
<i>Acaulospora</i> sp.	0	0,0124	0,0007
Familia Ambisporaceae			
<i>Ambispora appendicula</i> (Spain, Sieverd. & Schenck) Walker	0,0003	0	0
Familia Archaeosporaceae			
<i>Archaeospora trappei</i> (Ames & Linderman) Morton & Redecker,	0,0057	0,0205	0,0768
Familia Claroideoglomeraceae			
<i>Claroideoglosum claroideum</i> (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler	0,0202	0	0
<i>C. luteum</i> (Kenn., Stutz & Morton) Walker & Schüßler	0,0010	0,0188	0
Familia Entrophosporaceae			
<i>Entrophospora infrequens</i> (Hall) Ames & Schneid.	0,0051	0,0122	0,0034
Familia Glomeraceae			
<i>Funneliformis badium</i> (Oehl, Redecker & Sieverd.) Walker & Schüßler	0,0351	0,0141	0,0058
<i>F. geosporum</i> (Nicolson & Gerd.) Walker & Schüßler	0,0692	0,0003	0
<i>F. mosseae</i> (Nicolson & Gerd.) Walker & Schüßler	0,0163	0,0175	0,0282
<i>Glomus brohultii</i> Sieverd. & Herrera	0,0490	0,1609	0,0440
<i>G. fuegianum</i> (Speg.) Trappe & Gerd.	0,4134	0,0630	0,2540
<i>Glomus</i> sp.	0,0116	0,0003	0
<i>Rhizophagus clarus</i> (Nicolson & Schenck) Walker & Schüßler	0,0137	0,0334	0,0236
<i>R. intraradices</i> (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler	0,1291	0,3601	0,3984
Familia Gigasporaceae			
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	0,0065	0,0024	0
<i>G. rosea</i> Nicolson & Schenck	0,0100	0	0
<i>Scutellospora biornata</i> Sieverd & Toro	0,0142	0,0019	0
Familia Pacisporaceae			
<i>Pacispora domiikii</i> (Blaszk.) Sieverd. & Oehl	0,0242	0,0118	0

Figura 3.2 Media \pm error estándar de (a) relación raíz / tallo y (b) colonización micorrícica arbuscular (%) de juveniles de *Polylepis australis* luego de 12 meses en invernadero y previamente inoculados con suelo estéril (control), de pastizal, bosque degradado y bosque maduro. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba a posteriori de Tukey HSD con un $P < 0,05$ ($n = 6$).



El contenido de P de la parte aérea fue significativamente menor en los controles, aunque no difirió entre los tratamientos de inoculación. El contenido de Na fue significativamente mayor en los juveniles inoculados con suelo del bosque degradado. El resto de los nutrientes no difirió significativamente entre los tratamientos (Tabla 3.3).

Tabla 3.2 Media (error estándar) del contenido nutricional (%) de la parte aérea de los juveniles de *Polylepis australis* cosechados luego de 12 meses en invernadero y previamente inoculados con suelo estéril (control), de pastizal, bosque degradado y bosque maduro. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba a posteriori de Tukey HSD con un $P < 0,05$ ($n = 6$).

	control	pastizal	bosque degradado	bosque maduro	estadístico y valor de P
P	0,09 (0,01) b	0,13 (0,005) a	0,12 (0,01) a	0,1 (0,01) ab	$F = 6,83; P < 0,05$
N	0,59 (0,05) a	0,56 (0,03) a	0,64 (0,03) a	0,56 (0,02) a	$F = 1,39; P = 0,28$
Ca	1,39 (0,08) a	1,15 (0,05) a	1,3 (0,1) a	1,22 (0,1) a	$F = 1,56; P = 0,23$
Mg	0,13 (0,01) a	0,13 (0,01) a	0,14 (0,01) a	0,13 (0,01) a	$F = 0,46; P = 0,71$
Na	0,14 (0,01) b	0,17 (0,01) b	0,26 (0,02) a	0,17 (0,01) b	$F = 9,75; P < 0,001$
K	0,45 (0,03) a	0,5 (0,01) a	0,53 (0,06) a	0,45 (0,03) a	$F = 1,22; P = 0,33$
Cu	0,001 (0,0002) a	2 (0,0001) a	0,002 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	$F = 1,98; P = 0,15$
Fe	0,002 (0,0001) a	0,002 (0,002) a	0,002 (0,0001) a	0,002 (0,0002) a	$F = 1,93; P = 0,16$
Zn	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,00005) a	$F = 0,76; P = 0,53$
Mn	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,002 (0,001) a	0,002 (0,001) a	$F = 0,66; P = 0,58$

P: fósforo, N: nitrógeno, Ca: calcio, Mg: magnesio, Na: sodio, K: potasio, Cu: cobre, Fe: hierro, Zn: zinc, Mn: manganeso.

3.4 Discusión

La comunidad de HMA de los tres tipos de vegetación presentó una diversidad de Shannon similar. Esto también ha sido observado en otros estudios comparativos de diferentes tipos de ecosistemas (Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999; Picone 2000; Menoyo et al. 2009). En este trabajo, se encontró una mayor riqueza de morfoespecies en el suelo del pastizal, basado en la identificación morfológica de las esporas. La comunidad de plantas de los pastizales de altura presenta una alta riqueza de especies vegetales (Cingolani et al. 2003) altamente micotróficas (Lugo et al. 2003; Menoyo et al. 2007), lo que podría relacionarse con un mayor número de morfoespecies de HMA en este ecosistema (van der Heijden et al. 1998).

Por otro lado, se observaron cambios de las morfoespecies entre los distintos tipos de inóculo a nivel de familia. Maherali & Klironomos (2007) evidenciaron que

una combinación de HMA formado por especies filogenéticamente más distantes (de diferentes familias), previene la redundancia funcional a nivel de los requerimientos espaciales de nicho (dentro de la raíz o en el suelo). Más aún, estos grupos de especies menos relacionadas parecen ser la mejor combinación funcional de taxones para promover la productividad de las plantas.

El efecto de diferentes inóculos de suelo sobre el crecimiento de una planta hospedante ha sido ampliamente estudiado (Allen et al. 2003; Uibopuu et al. 2009; Urgiles et al. 2009; Martino et al. 2011). Contrario a lo esperado, el inóculo del bosque maduro fue el más beneficioso para incrementar la relación raíz / tallo de los juveniles de *P. australis*. Esto concuerda con los modelos de sucesión de los HMA, que infieren que cuando una especie hospedante de un período sucesional tardío (como *P. australis*) coloniza un sitio, ya ha incrementado la densidad de los simbioses de la misma etapa (Hart et al. 2001). De esta manera, los árboles de fases sucesionales tardías encontrarían especies de HMA más compatibles en comunidades del suelo del mismo período. Sin embargo, es importante destacar que junto con los HMA del inóculo posiblemente se encuentren otros microorganismos del suelo, que también pueden afectar el crecimiento de *P. australis* (van der Heijden et al. 2008).

La teoría de asignación de biomasa sugiere que la colonización micorrícica disminuye la relación raíz / tallo, ya que las plantas asignan menos fotosintetatos al crecimiento radical al adquirir los nutrientes principalmente a través del micelio extraradical de los HMA asociados con sus raíces (Johnson 2010; Veresoglou et al. 2011). Sin embargo, a pesar de que la teoría puede ayudar a predecir la dirección general de la respuesta de una planta micorrizada, hay variaciones entre las diferentes especies de plantas, las comunidades y los ecosistemas (Johnson et al. 2013). En algunos casos, la simbiosis micorrícica es una de las estrategias a través de las cuales las plantas

extienden el sistema radical para incrementar la exploración del suelo y acceder a los nutrientes (Porras-Soriano et al. 2009; Meddad-Hamza et al. 2010; Neumann & Eckhard 2010). Generalmente, en los experimentos realizados con plantas leñosas por un período mayor a 25 semanas, se ha visto un incremento de la relación raíz / tallo (Veresoglou et al. 2011 y referencias allí citadas), tal como se observó en los juveniles de *P. australis* inoculados con suelo del bosque maduro, los cuales también presentaron un mayor porcentaje de colonización micorrícica. En el inóculo del bosque maduro predominaron las familias Acaulosporaceae y Glomeraceae que tienden a formar hifas delicadas y difusas que serían menos “costosas” para la planta (Hart & Reader 2002), pudiendo utilizar parte del carbono asignado también para el crecimiento radical. Por el contrario, la presencia de morfoespecies de la familia Gigasporaceae, que sólo se observaron en los inóculos del pastizal y del bosque degradado, pueden actuar como sumideros de carbono (Hart & Reader 2002), requiriendo más carbohidratos del hospedante para mantener la colonización y reduciendo la asignación de carbono a la biomasa radical.

Por otro lado, los controles mostraron valores similares de la relación raíz / tallo a los juveniles inoculados con suelo del pastizal y del bosque degradado. A pesar de que la inoculación con estos dos tipos de inóculo no sería más efectiva que la inoculación con suelo estéril, teniendo en cuenta que la simbiosis le demanda carbohidratos a los juveniles micorrizados, posiblemente éstos incrementaron su capacidad fotosintética hasta lograr un crecimiento similar al de los controles (Miller et al. 2002). Por otro lado, es importante destacar que otros hongos parasíticos o patogénicos presentes naturalmente en el suelo del inóculo, que no fueron descartados con nuestro experimento, podrían estar influyendo de manera negativa sobre la biomasa de los juveniles (Maron et al. 2011; Schnitzer et al. 2011).

A pesar de no observarse diferencias del contenido de P en la parte aérea entre los distintos tratamientos de inoculación, los controles mostraron un porcentaje de P significativamente menor que las plantas inoculadas, lo que evidenciaría la contribución de los HMA para la captación de P (Smith et al. 2004). La mayor cantidad de Na en las plantas inoculadas con suelo del bosque degradado podría ser explicado por la mayor abundancia de estos cationes en el suelo de este inóculo (Giri et al. 2007). Por otro lado, a diferencia de otros trabajos que evidenciaron la influencia de la simbiosis micorrícica en la captura de otros micronutrientes de baja movilidad como el Zn, Cu y Fe, además del P y N (Marschner & Dell 1994; Al-Karaki 2000; Giri et al. 2007; Miransari et al. 2009), en este estudio no se observaron diferencias en el contenido de los otros nutrientes entre los juveniles micorrizados y los controles.

3.5 Conclusiones

En este capítulo se evaluó en invernadero la respuesta de *P. australis* frente a la inoculación con suelo proveniente de tres tipos de vegetación. Los resultados mostraron que distintos tipos de inóculo pueden influir diferencialmente sobre el crecimiento y nutrición de esta especie. En particular, los individuos inoculados con suelo del bosque maduro presentaron los valores más altos de la relación raíz / tallo y de colonización micorrícica arbuscular. Los árboles trasplantados con mayor relación raíz / tallo presentan un menor riesgo de shock al trasplante y tienen más habilidad para enfrentar el estrés hídrico seguido al trasplante (Bernier et al. 1995). Probablemente la comunidad de HMA del inóculo del bosque maduro, perteneciente a un período sucesional tardío, es la mejor combinación funcional de taxones para promover el crecimiento radical de *P. australis* bajo condiciones controladas de invernadero, aunque todos los inóculos estarían promoviendo la captación de P del suelo.

CAPÍTULO IV

RESPUESTA A CAMPO DE *Polylepis australis* FRENTE A LA INOCULACIÓN CON SUELO PROVENIENTE DE TRES TIPOS DE VEGETACIÓN

*La mayor parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en: Soteras F, Renison D & Becerra A. *En prensa*. Restoration of high altitude forests in an area affected by a wildfire: *Polylepis australis* Bitt. seedlings performance after soil inoculation. *Trees*. DOI: 10.1007/s00468-013-0940-7 (ver Anexo). *La publicación final está disponible en <http://link.springer.com>*

4.1 Introducción

Los bosques de *Polylepis australis* Bitt. presentan distinta complejidad estructural (Renison et al. 2011) por el efecto de la ganadería (ramoneo y pisoteo), la utilización del fuego para promover el rebrote de los pastos y la tala de árboles. Estos cambios en el ambiente original han afectado las condiciones del suelo (Renison et al. 2010) y, por lo tanto probablemente influyan en las comunidades de hongos micorrízico arbusculares (HMA) (Picone 2000) que colonizan las raíces de *P. australis* (Menoyo et al. 2007).

Los estudios que han evaluado la reforestación con *P. australis*, han destacado la importancia de las condiciones del suelo para el crecimiento de las plántulas (Renison et al. 2005; Torres et al. 2008), de los adultos (Marcora et al. 2008; Suarez et al. 2008; Renison et al. 2010) y para la producción de semillas viables (Renison et al. 2004). También se ha evaluado la influencia de la inoculación de los juveniles con distintos tipos de suelo bajo condiciones de invernadero (Martino et al. 2011; Soteras et al. 2013). Sin embargo, la inoculación previa al trasplante a campo aún no ha sido considerada para las prácticas de reforestación con esta especie.

Los juveniles de *P. australis* se ven principalmente afectados por el ramoneo del ganado doméstico que retarda su crecimiento y su recuperación luego de un disturbio (Teich et al. 2005; Renison et al. 2006; Giorgis et al. 2010). Además, resulta difícil consensuar con los pobladores la exclusión de sus animales con el fin de promover la recuperación del bosque. En este contexto, es deseable lograr un óptimo crecimiento de los individuos trasplantados en un corto período de tiempo para reducir el tiempo de influencia del ganado.

Generalmente, la inoculación con HMA incrementa el crecimiento y la supervivencia de los árboles trasplantados al campo (Allen et al. 2003; Cuenca et al.

2004; Amaranthus & Steinfeld 2005). Sin embargo, la influencia del inóculo de HMA depende de muchos factores como de la fisiología de la planta (van der Heijden & Kuyper 2001; Smith et al. 2011), de la combinación de taxones de HMA presente en el inóculo (Maherali & Klironomos 2007), la infectividad micorrícica del suelo (Cuenca et al. 2004), el estadio sucesional de la planta hospedante (Asbjornsen & Montagnini 1994; Fischer et al. 1994; Kiers et al. 2000; Allen et al. 2003) y de otros factores bióticos y abióticos (Hoeksema et al. 2010; Jones & Smith 2004).

La habilidad de los HMA para iniciar la colonización micorrícica arbuscular de una planta determina la infectividad del suelo (Plenchette et al. 1989). Ésta puede diferir entre distintos tipos de suelo, aunque presenten la misma composición de HMA (Cuenca et al. 2004), ya que además de las esporas, depende del micelio externo y de los segmentos radicales colonizados (Smith & Read 2008). Se ha observado que el suelo de los pastizales tiene mayor infectividad que el de los bosques (Jasper et al. 1991), y que a su vez, la de los bosques disturbados es mayor que la de los bosques conservados (Closa & Goicoechea 2011). Sin embargo, Irrazabal et al. (2004) no observaron variaciones en la infectividad entre bosques conservados y áreas desmontadas.

Las comunidades de HMA, así como la colonización micorrícica arbuscular, pueden variar con los cambios estacionales (Lugo & Cabello 2002; Oehl et al. 2009; Sene et al. 2012), lo que podría modificar la influencia del inóculo.

En este capítulo se determinó la infectividad micorrícica del suelo proveniente de tres tipos de vegetación (un pastizal, un bosque degradado y un bosque maduro sensu Renison et al. (2011)), y se evaluó su influencia sobre el crecimiento, supervivencia y nutrición de juveniles de *P. australis* trasplantados a un pastizal de altura, recientemente afectado por un incendio, dentro del Parque Nacional Quebrada del Condorito. Además

se estudiaron las comunidades de HMA de la rizosfera de los juveniles durante las dos estaciones posteriores al trasplante.

En base a los antecedentes, se hipotetiza que los distintos tipos de inóculo presentan diferente infectividad y por lo tanto promueven diferencialmente el crecimiento, supervivencia y nutrición de los juveniles de *P. australis*. Además las comunidades de HMA de la rizosfera de los juveniles varían con las estaciones. Se predice que la infectividad del suelo disminuirá desde el pastizal hacia el bosque maduro, así como su influencia positiva sobre el crecimiento, supervivencia y nutrición de los juveniles de *P. australis*. Por otro lado, la diversidad y riqueza de la comunidad de la rizosfera de los juveniles trasplantados cambiará entre las estaciones y durante la estación seca la densidad de esporas será mayor y la colonización micorrícica menor, lo que modificará la respuesta de los juveniles.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Inóculo utilizado

Se utilizaron los mismos inóculos (pastizal, bosque degradado y bosque maduro) empleados en el Capítulo III (sección 3.2, sub-sección 3.2.1). Como se explicó anteriormente, cada inóculo consistió en un homogeneizado de 10 muestras de suelo extraídas de cada tipo de vegetación, previa tamización con una malla de apertura de 1 cm de diámetro, a fin de remover hojarasca, piedras y palos pequeños.

4.2.2 Cultivos de planta trampa

Para confirmar las morfoespecies de HMA del suelo utilizado como inóculo que fue extraído del campo, se realizaron cultivos de planta trampa con el homogeneizado utilizado para inocular. Para ello se seleccionaron dos plantas

hospedantes: *Medicago sativa* L. (alfalfa) y *Sorghum vulgare* Pers. (sorgo), debido a su alta respuesta micorrícica (Cabello 1997). Las semillas de alfalfa y sorgo fueron lavadas por 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10 % y germinadas en bandejas con arena esterilizada (1h en autoclave a 100 °C y 1,5 atm de presión).

Se establecieron 4 macetas de 500 gr por tipo de inóculo (2 macetas de sorgo y 2 de alfalfa, cada una con 10 plántulas). Cada maceta contenía el suelo del inóculo y arena estéril en proporción 1:1 (v:v). El experimento se mantuvo en invernadero (22/19 °C día/noche, fotoperiodo 16/8 h día/noche), no se utilizó ningún fertilizante y las plantas fueron regadas por aspersion durante 1 min dos veces al día. Luego de cinco meses de crecimiento, se suprimió el riego por 10 días y, posteriormente se cortó la parte aérea. El suelo de las macetas se conservó a 4°C por dos meses con el objetivo de romper la latencia de las esporas. Por último, las esporas de HMA se extrajeron e identificaron tal como se explicó en el Capítulo II, sección 2.2, sub-sección 2.2.3.

4.2.3 Ensayo de infectividad

El homogeneizado empleado para inocular las plántulas y para realizar los cultivos de planta trampa se utilizó también para el ensayo de infectividad. Se realizaron 3 diluciones de suelo (1:0, 1:4 y 1:40), mezclando el suelo original sin esterilizar con perlita y vermiculita esterilizadas (1h en autoclave a 100 °C y 1,5 atm de presión) en una proporción 1:1 (v:v) (Díaz & Honrubia 1993). Esta mezcla se colocó en macetas de plástico de 500 gr, donde se sembraron dos plántulas de alfalfa, cuyas semillas fueron lavadas por 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10 % y germinadas en bandejas con arena esterilizada. Se realizaron 12 réplicas por dilución por inóculo. El experimento se mantuvo en invernadero, no se utilizó ningún fertilizante y las plantas fueron regadas por aspersion durante 1 min dos veces al día. A los 15, 30 y 60 días posteriores al inicio

del ensayo, se cosecharon 4 macetas por dilución y tipo de inóculo. De cada planta se extrajo el sistema radical, se lo lavó cuidadosamente y se cuantificó la colonización micorrícica arbuscular, tal como se explicó en el Capítulo II, sección 2.2, sub-sección 2.2.4.

4.2.4 Inoculación de las plántulas de *Polylepis australis*

Para la inoculación de las plántulas de *P. australis* se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo III, sección 3.2, sub-sección 3.2.2. En este caso, se realizaron 66 réplicas por tratamiento (control, pastizal, bosque degradado, bosque maduro), quedando un total de 264 macetas.

4.2.5 Trasplante a campo

Seis meses después de realizada la inoculación, durante el mes de diciembre del 2009, los juveniles se plantaron dentro del Parque Nacional Quebrada del Condorito (1900 m snm, 31° 40'S, 64° 42'O). En el sitio donde se realizó la reforestación había ocurrido un incendio en julio del mismo año (Fig. 4.1 a y b). Antes del incendio, la vegetación consistía en un mosaico de pastizales de altura, áreas erosionadas con un alto porcentaje de roca expuesta, afloramientos graníticos naturales y fragmentos de bosques abiertos de *P. australis*, representando una cobertura menor del 1% (Cingolani et al. 2004).

Antes del trasplante y, para obtener una visión general del impacto del incendio sobre los HMA, se evaluó la densidad de esporas comparando el sitio quemado con un sitio contiguo no afectado por el incendio. Para ello, en 3 puntos elegidos al azar y separados por al menos 10 m se tomaron muestras de los primeros 20 cm de suelo dentro de cada situación, se colocaron en bolsas de polietileno y se conservaron a 4 °C

hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. La densidad de HMA fue 43% menor en el sitio incendiado y el número de esporas fue de 68,75 cada 100 g de peso seco de suelo.

Los juveniles se plantaron espaciados por 3 m de distancia, delante de estacas numeradas que tenían asignados los tratamientos al azar (Fig. 4.1 c) y se regaron con abundante agua al momento del trasplante. Hasta cuatro semanas después del trasplante, aquellos juveniles que habían sido removidos por zorrinos (obs. pers. y Renison D. com. pers.) fueron reemplazados por individuos del mismo tratamiento.

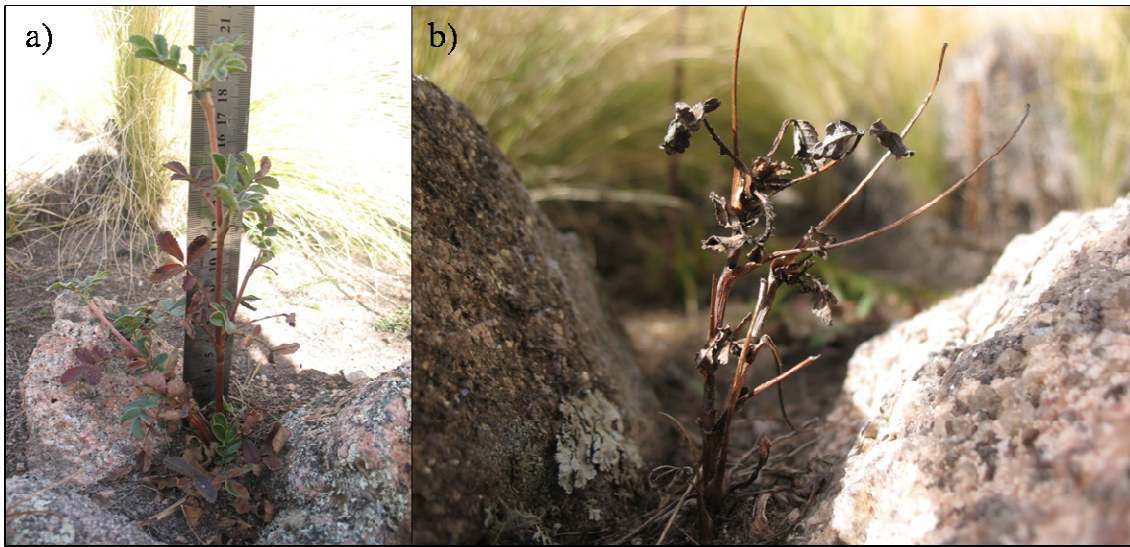
Figura 4.1 (a) y (b) Sitio de reforestación en el Parque Nacional Quebrada del Condorito. Se observan evidencias de un incendio reciente. (c) Plantación de *Polylepis australis* delante de estacas numeradas.



4.2.6 Respuesta de *Polylepis australis* frente a la inoculación

La altura (cm), el crecimiento (diferencia de altura entre fechas) y la supervivencia (probabilidad de supervivencia acumulada a lo largo del tiempo) de los juveniles se midió en el momento del trasplante - tiempo 0 - (diciembre 2009) y antes y después de la etapa de crecimiento: mayo 2010, diciembre 2010 y mayo 2011 (Fig. 4.2 a y b).

Figura 4.2 Mediciones de (a) altura y (b) supervivencia de los juveniles trasplantados.



Para evaluar la respuesta frente a la inoculación con HMA, luego de 12 meses, se cosecharon 6 individuos de cada tratamiento al azar, quedando 60 individuos por tratamiento en el campo. De los juveniles cosechados se determinó la relación raíz / tallo (peso seco de raíz / peso seco de parte aérea), la colonización micorrícica arbuscular (ver Capítulo II, sección 2.2, sub-sección 2.2.4) y se realizaron análisis nutricionales de la parte aérea (porcentaje): contenido de P, N por el método de digestión ácida (Jones et al. 1991), Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Zn y Mn.

Para determinar los cambios en las comunidades de HMA entre tratamientos y entre estaciones, se tomaron muestras de la rizosfera (con un sacabocado de 3 cm de diámetro) de 6 juveniles elegidos al azar, durante la estación seca (mayo 2010) y la estación húmeda (diciembre 2010) posteriores al trasplante. De cada muestra de suelo, se extrajeron e identificaron las esporas de HMA (Capítulo II, sección 2.2, sub-sección 2.2.3).

4.2.7 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de la varianza (ANAVA) de medidas repetidas para determinar las diferencias de altura y de las comunidades de HMA (densidad, riqueza y diversidad de Shannon) entre las fechas y los tratamientos; con fecha como factor intra-sujeto y tratamiento como factor inter-sujeto con cuatro niveles (control, pastizal, bosque degradado y bosque maduro). Se realizó una prueba a posteriori de Tukey HSD para detectar diferencias entre tratamientos, con un nivel de significancia de 0,05. Para el caso de la variable respuesta “crecimiento” las réplicas fueron 51 en lugar de 60, ya que se optó por balancear el N al azar (con una tabla de número aleatorios) para tener el mismo número de réplicas en cada tratamiento por fecha, debido al desbalance producido como consecuencia de la muerte de algunos juveniles.

La probabilidad de supervivencia de los juveniles se analizó con las curvas de estimación de supervivencia de Kaplan-Meier del paquete SPSS 15.0. Para detectar diferencias entre tratamientos se realizó la prueba a posteriori no paramétrica de Log-rango, con un nivel de significancia de 0,05.

La relación raíz / tallo, la colonización micorrícica arbuscular y el contenido nutricional de la parte aérea de los juveniles cosechados, se analizaron a través de un ANAVA, con el tratamiento como factor fijo con cuatro niveles: control, pastizal, bosque degradado y bosque maduro. Se realizó la prueba a posteriori de Tukey HSD para detectar diferencias entre tratamientos, con un nivel de significancia de 0,05.

En todos los casos se comprobó que los residuos cumplieran los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza (con las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente).

4.3 Resultados

4.3.1 Plantas trampa

Los cultivos de planta trampa permitieron el aislamiento de morfoespecies de HMA que no habían sido registradas previamente en las muestras de suelo de los inóculos tomadas en el campo (Capítulo III, sección 3.3, sub-sección 3.3.1). En el suelo del bosque degradado se encontraron dos nuevas morfoespecies (*Claroideoglobus claroideum* y *Funneliformis geosporum*), y en el del bosque maduro tres morfoespecies (*C. claroideum*, *C. luteum* y *F. geosporum*) (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Morfoespecies de hongos micorrízico arbusculares de las plantas trampa (*Medicago sativa* - alfalfa - y *Sorghum vulgare* - sorgo -), presentes en los suelos utilizados como inóculo: pastizal, bosque degradado y bosque maduro. La presencia (X) de morfoespecies que no aparecieron en las muestras del campo está resaltada en negrita.

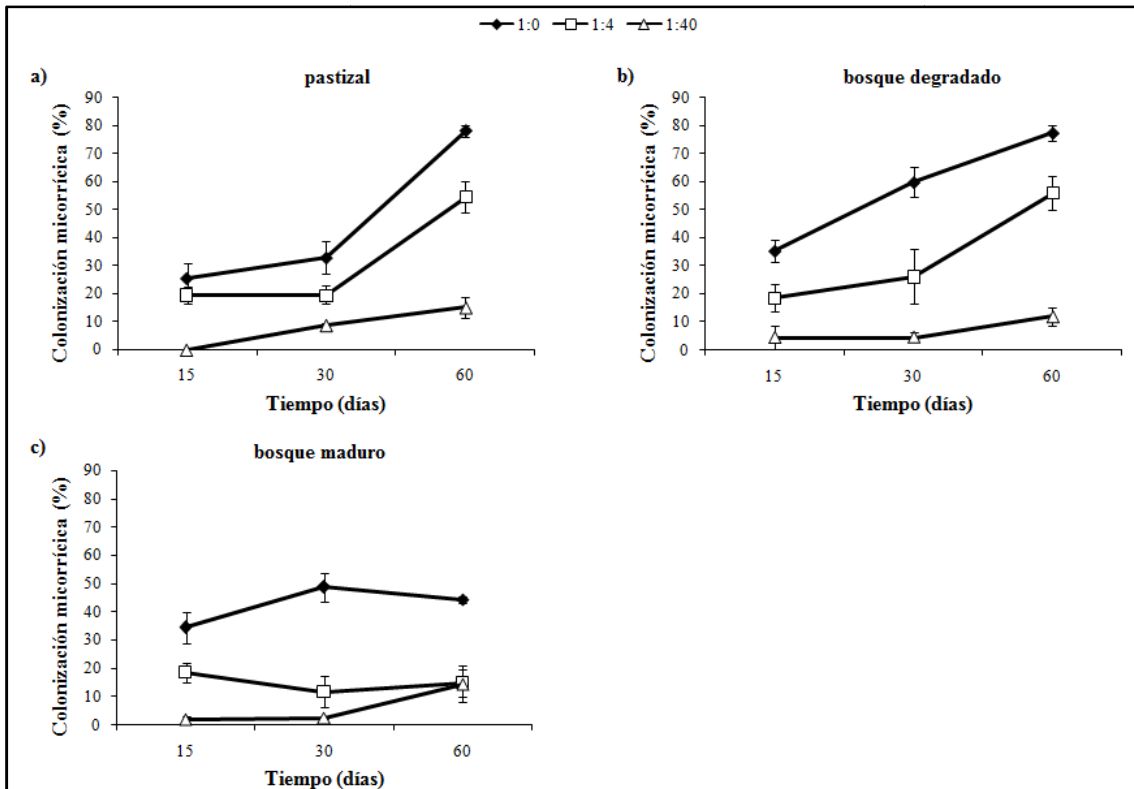
	pastizal		bosque degradado		bosque maduro	
	alfalfa	sorgo	alfalfa	sorgo	alfalfa	sorgo
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	X	X	X	X	X	X
<i>Acaulospora mellea</i> Spain & Schenck		X	X	X		X
<i>A. rugosa</i> Morton		X				
<i>A. spinosa</i> Walker & Trappe		X		X		
<i>Acaulospora</i> sp.			X			
<i>Archaeospora trappei</i> (Ames & Linderman) Morton & Redecker	X	X				
<i>Claroideogloium claroideum</i> (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler				X		X
<i>C. luteum</i> (Kenn., Stutz & Morton) Walker & Schüßler				X		X
<i>Funneliformis badium</i> (Oehl, Redecker & Sieverd.) Walker & Schüßler	X				X	
<i>F. geosporum</i> (Nicolson & Gerd.) Walker & Schüßler	X			X	X	X
<i>F. mosseae</i> (Nicolson & Gerd.) Walker & Schüßler						X
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	X					
<i>Glomus brohultii</i> Sieverd. & Herrera		X		X		
<i>Rhizophagus clarus</i> (Nicolson & Schenck) Walker & Schüßler						X
<i>R. intraradices</i> (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler	X	X	X	X		X
<i>Scutellospora biornata</i> Sieverd. & Toro	X		X			

4.3.2 Infectividad del suelo

El ensayo de infectividad realizado con el suelo de los inóculos del pastizal y del bosque degradado mostró un incremento de la colonización micorrícica arbuscular de las plantas de alfalfa (*M. sativa*) con el tiempo. En cambio, el suelo del bosque maduro presentó valores de colonización similares para todas las fechas de cosecha (Fig. 4.3). En los tres inóculos estudiados, el valor más alto de colonización radical se observó en las plantas en el suelo sin diluir (1:0) (78 % en el pastizal, 77 % en el bosque degradado y 49 % en el bosque maduro). En la dilución 1:4, los valores de colonización fueron intermedios y en la dilución 1:40 se observaron los valores más bajos (0 % en el pastizal, 4 % en el bosque degradado y 2 % en el bosque maduro). Teniendo en cuenta las tres diluciones el mayor valor de colonización en las plantas en el suelo del pastizal y del bosque degradado se alcanzó luego de 60 días de iniciado el experimento. Las plantas en el suelo del bosque maduro mostraron el nivel máximo de colonización luego de 30 días (Fig. 4.3).

En la Figura 4.3 se puede observar que al comparar los tres inóculos, una colonización radical del 40 % se alcanzó en la dilución 1:4 del suelo de los inóculos del bosque degradado y del pastizal y en el suelo sin diluir (1:0) del inóculo del bosque maduro (Fig. 4.3). Por lo tanto, los suelos del pastizal y del bosque degradado fueron 25 veces más infectivos que el suelo del bosque maduro.

Figura 4.3 Infectividad micorrícica: colonización micorrícica arbuscular de *Medicago sativa* para las tres diluciones (1:0, 1:4 y 1:40) en los tres tipos de suelo utilizados como inóculo: (a) pastizal, (b) bosque degradado y (c) bosque maduro, durante tres fechas de cosecha (15, 30 y 60 días a partir del inicio del ensayo). Los valores son la media \pm error estándar de $n = 4$ réplicas.



4.3.3 Respuesta a campo de *Polylepis australis* frente a la inoculación

El crecimiento de los juveniles no estuvo influenciado significativamente por el tipo de inóculo ($F = 0,54$; $P = 0,65$). Entre la segunda y la tercera fecha posterior al trasplante (entre mayo y diciembre de 2010) todos los tratamientos sufrieron una disminución del crecimiento, debido a que la parte apical se secó durante el invierno frío y seco posterior al trasplante (Fig. 4.4).

La supervivencia fue similar entre los tratamientos de inoculación, incluido el control (prueba de Log Rango; $L = 1,20$; $P = 0,75$) (Fig. 4.5).

Figura 4.4 Crecimiento de juveniles de *Polylepis australis* entre la fecha de trasplante - diciembre 2009 - y mayo 2010 (DIC-MAY), entre mayo 2010 y diciembre 2010 (MAY-DIC) y entre diciembre 2010 y mayo 2011 (DIC-MAY), previamente inoculados con suelo estéril e inicialmente no micorrizados (control), con suelo de pastizal, bosque degradado y bosque maduro. Las barras verticales representan el error estándar de n = 51 réplicas.

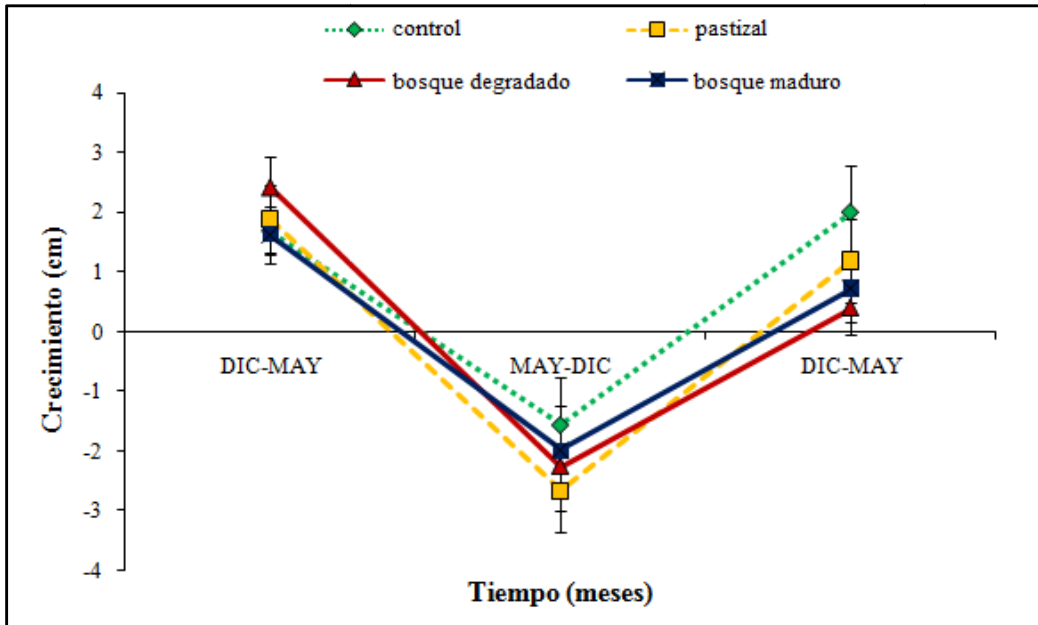
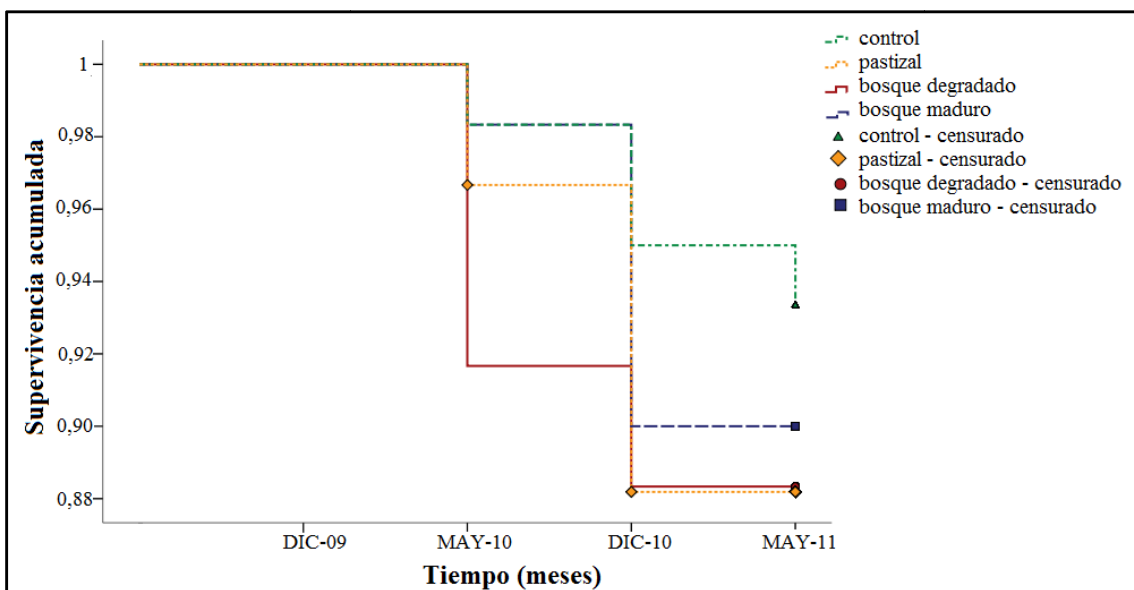


Figura 4.5 Supervivencia de juveniles de *Polylepis australis* a partir de la fecha de trasplante - diciembre 2009 - (DIC-09), en mayo 2010 (MAY-10), diciembre 2010 (DIC-10) y mayo 2011 (MAY-11), previamente inoculados con suelo estéril e inicialmente no micorrizados (control), con suelo de pastizal, bosque degradado y bosque maduro; censurado: pérdida de individuos; n = 60.



Luego de 12 meses desde la reforestación, en los individuos cosechados, la relación raíz/tallo y la colonización micorrícica arbuscular no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 4.6). Entre los nutrientes determinados, el % Ca fue significativamente mayor en los juveniles inoculados con suelo del pastizal que en los controles, pero no mostró diferencias entre los otros tratamientos. El contenido de Na fue significativamente mayor en los juveniles inoculados con suelo del pastizal, en comparación con los juveniles inoculados con suelo del bosque degradado, sin mostrar diferencias entre los otros tratamientos. El contenido del resto de los nutrientes de la parte aérea no difirió significativamente entre los tratamientos (Tabla 4.2).

Todos los juveniles presentaron colonización micorrícica arbuscular que varió entre 13 y 80 % (20 - 80 % en el control, 39 - 77 % en el pastizal, 15 - 79 % en el bosque degradado y 13 - 68 % en el bosque maduro). El porcentaje de colonización por arbusculos no difirió entre los tratamientos ($F = 0,83$; $P = 0,491$). El valor promedio de colonización por arbusculos para los controles fue de $0,33 \pm 0,21$ %, de 0 ± 0 % para los juveniles inoculados con suelo del pastizal; de $0,67 \pm 0,42$ % para los juveniles con suelo del bosque degradado; y de $1 \pm 0,82$ % para los juveniles inoculados con suelo del bosque maduro. La colonización por vesículas no difirió significativamente entre los tratamientos ($F = 1,41$; $P = 0,268$). La colonización promedio por vesículas fue de $13,50 \pm 4,40$ % para los controles, de $22,50 \pm 3,74$ % en los juveniles inoculados con suelo del pastizal; de $14,62 \pm 5,75$ % para los juveniles inoculados con suelo del bosque degradado; y de $24,83 \pm 4,89$ % para los juveniles inoculados con suelo del bosque maduro.

Figura 4.6 Media \pm error estándar de (a) relación raíz / tallo y (b) colonización micorrícica arbuscular (%) de juveniles de *Polylepis australis* cosechados luego de 12 meses en el sitio de plantación, previamente inoculados con suelo estéril e inicialmente no micorrizados (control), con suelo de pastizal, bosque degradado y bosque maduro. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD con un $P < 0,05$ ($n = 6$).

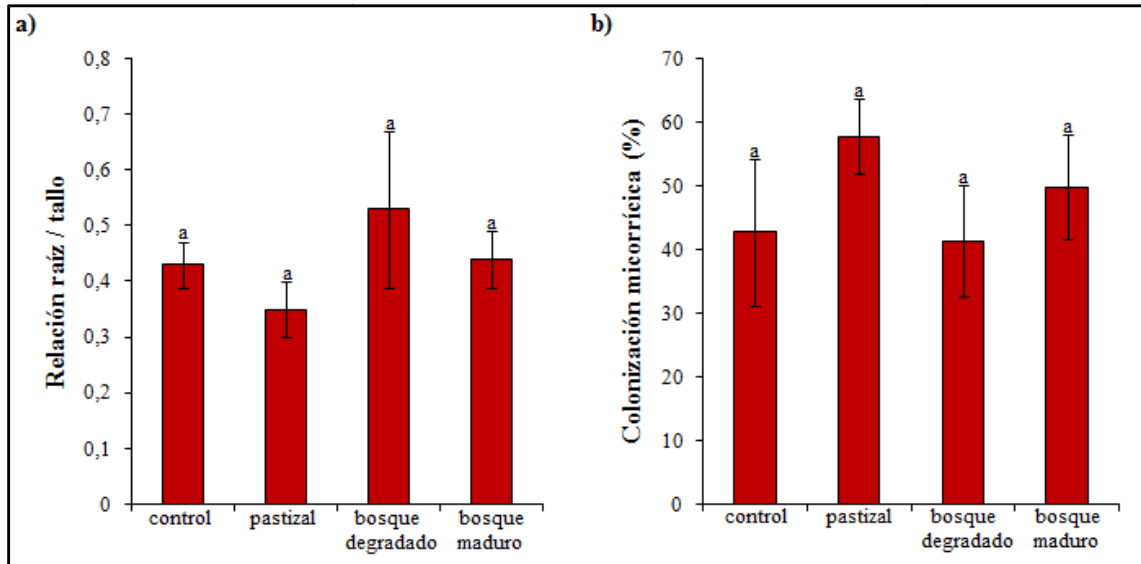


Tabla 4.2 Contenido nutricional (%) de la parte aérea de los juveniles de *Polylepis australis* cosechados luego de 12 meses en el sitio de plantación, previamente inoculados con suelo estéril e inicialmente no micorrizados (control), con suelo de pastizal, bosque degradado y bosque maduro. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD con un $P < 0,05$ ($n = 6$).

	control	pastizal	bosque degradado	bosque maduro	estadístico y valor de P
P	0,14 (0,01) a	0,14 (0,01) a	0,17 (0,02) a	0,14 (0,01) a	$F = 0,94$; $P = 0,44$
N	0,65 (0,05) a	0,61 (0,02) a	0,73 (0,05) a	0,70 (0,06) a	$F = 1,17$; $P = 0,35$
Ca	0,42 (0,03) b	0,58 (0,04) a	0,48 (0,03) ab	0,48 (0,04) ab	$F = 3,44$; $P < 0,05$
Mg	0,1 (0,01) a	0,09 (0,05) a	0,09 (0,01) a	0,09 (0,02) a	$F = 0,57$; $P = 0,64$
Na	0,08 (0,006) ab	0,09 (0,002) a	0,07 (0,004) b	0,08 (0,007) ab	$F = 3,14$; $P = 0,05$
K	0,80 (0,02) a	0,72 (0,03) a	0,73 (0,03) a	0,77 (0,04) a	$F = 1,62$; $P = 0,22$
Cu	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	$F = 0,60$; $P = 0,62$
Fe	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	$F = 1,83$; $P = 0,17$
Zn	0,0009 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,0007 (0,0001) a	0,004 (0,002) a	$F = 1,04$; $P = 0,40$
Mn	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	0,001 (0,0001) a	$F = 0,03$; $P = 0,99$

P: fósforo, N: nitrógeno, Ca: calcio, Mg: magnesio, Na: sodio, K: potasio, Cu: cobre, Fe: hierro, Zn: zinc, Mn: manganeso.

4.3.4 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares de la rizosfera de los juveniles trasplantados

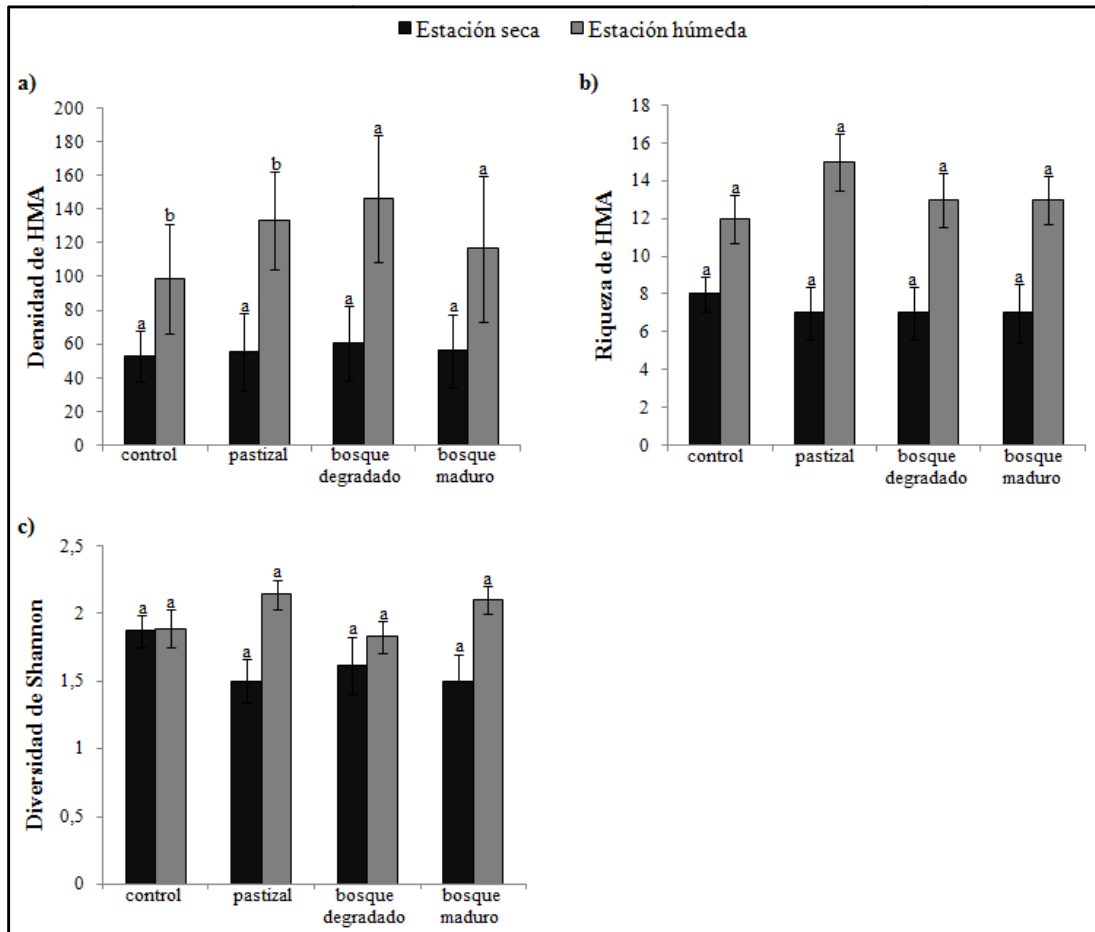
La comunidad de HMA de la rizosfera de los juveniles trasplantados no presentó diferencias significativas entre los tratamientos para las variables: densidad, riqueza y diversidad de Shannon ($F = 0,07$, $P = 0,97$; $F = 0,31$, $P = 0,82$; $F = 0,82$, $P = 0,49$, respectivamente).

Considerando todos los tratamientos, la densidad varió de 7 a 153 esporas / 100 g de peso seco de suelo durante la estación seca (16 - 123 en el control, 7 - 134 en el pastizal, 12 - 153 en el bosque degradado y 79 - 126 en el bosque maduro). Durante la estación húmeda la densidad varió entre 43 y 326 esporas / 100 g de peso seco de suelo (44 - 238 en el control, 61 - 243 en el pastizal, 46 - 298 en el bosque degradado y 48 - 326 en el bosque maduro). La densidad de esporas fue significativamente mayor durante la estación húmeda en la rizosfera de los controles ($F = 33,88$; $P < 0,001$) y de los juveniles inoculados con suelo del pastizal $F = 6,26$; $P < 0,05$) (Fig. 4.7 a).

La riqueza y la diversidad de Shannon no estuvieron influenciadas significativamente por la estación ($F = 0,83$, $P = 0,48$; $F = 0,82$, $P = 0,49$; respectivamente). Sin embargo en todos los tratamientos y para las variables de las comunidades de HMA consideradas, se observaron valores mayores durante la estación húmeda (Fig. 4.7 b y c).

En todas las muestras de suelo se identificaron 30 morfoespecies de HMA pertenecientes a ocho géneros (*Acaulospora*, *Funneliformis*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Pacispora*, *Rhizophagus*, y *Scutellospora*) y 27 pudieron ser determinadas a nivel de especie.

Figura 4.7 Media \pm error estándar de la (a) densidad (número de esporas / 100g de peso seco de suelo), (b) riqueza de morfoespecies y (c) diversidad de Shannon de la comunidad de hongos micorrícico arbusculares (HMA) de la rizosfera de los juveniles de *Polylepis australis* durante la estación seca y húmeda posteriores al trasplante, previamente inoculados con suelo estéril e inicialmente no micorrizados (control), con suelo de pastizal, bosque degradado y bosque maduro. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las estaciones según la prueba de Tukey HSD con un $P < 0,05$ ($n = 6$).



La densidad específica de esporas (número de cada morfoespecie cada 100 g de peso seco de suelo) de la rizosfera de todos los juveniles varió significativamente entre las estaciones, excepto en los juveniles inoculados con suelo del bosque maduro ($F = 0,07$, $P = 0,79$). *Rhizophagus intraradices* de la rizosfera de los controles, y *Acaulospora undulata*, *Glomus* sp. y *R. intraradices*, de la rizosfera de los juveniles inoculados con suelo del bosque degradado, fueron significativamente más abundante durante la estación húmeda ($F = 5,61$, $P < 0,05$; $F = 10,28$, $P < 0,05$; $F = 18,57$, $P <$

0,001; $F = 6,69$, $P < 0,05$, respectivamente). En la rizosfera de los juveniles inoculados con suelo del pastizal, *Acaulospora* sp. presentó la mayor densidad de esporas durante la estación seca ($F = 5,88$, $P < 0,05$). El resto de las morfoespecies de HMA no se vio influenciado por la estacionalidad.

4.4 Discusión

4.4.1 Inóculo micorrícico: plantas trampa e infectividad del suelo

Al igual que los resultados de otros autores (Bever et al. 2001; Oehl et al. 2003), los cultivos con plantas trampa permitieron el aislamiento de morfoespecies de HMA que no habían sido observadas en las muestras de suelo extraídas del campo y utilizadas para inocular. Esto puede explicarse por las diferentes condiciones de crecimiento en el invernadero, como por ejemplo la extensión del tiempo de cultivo (Oehl et al. 2003; Sýkorová et al. 2007), o la preferencia de los distintos taxa de HMA por un determinado hospedador (Bever et al. 1996; Jansa et al. 2002; Ahulu et al. 2006). Particularmente, esto último pudo ser observado ya que se encontraron distintas morfoespecies según la especie de planta trampa utilizada. Para poder completar la caracterización de la comunidad de HMA de los tres inóculos, deberían realizarse análisis moleculares de las raíces de *P. australis* (Helgason et al. 1999; Redecker 2000).

El ensayo de infectividad mostró un incremento de la colonización micorrícica arbuscular con el tiempo, excepto en el suelo del bosque maduro, coincidiendo con lo observado en otros estudios (Plenchette et al. 1989; Díaz & Honrubia 1993; Irrazabal et al. 2004). Los suelos del pastizal y del bosque degradado presentaron la mayor habilidad para colonizar las raíces de alfalfa, en comparación con el suelo del bosque maduro. Los suelos de los pastizales han sido descriptos previamente como altamente infectivos, por la alta riqueza de plantas hospedantes anuales micotróficas, que en

general incrementan la cantidad de propágulos de HMA (Jasper et al. 1991; Sene et al. 2012). Debido a que la estructura de la vegetación, tanto de los pastizales como de los bosques degradados, ha sido determinada por la cría del ganado doméstico y la ocurrencia de incendios (Cingolani et al. 2008; Renison et al. 2011), las esporas de HMA probablemente se encuentren disponibles para colonizar las raíces de las plantas, presentando cortos períodos de dormancia, como una respuesta adaptativa a las condiciones más desfavorables, lo que podría explicar en parte la alta infectividad de estos dos inóculos (Bever et al. 2001). No obstante, la infectividad de un suelo no está exclusivamente relacionada con las esporas de HMA, ya que otros propágulos, como el micelio extra-radical y los segmentos radicales colonizados, junto con las características del suelo también influyen en su habilidad para iniciar la colonización (Jasper et al. 1991; Irrazabal et al. 2004; Smith & Read 2008), aunque a partir del ensayo realizado no es posible determinar la influencia de todos los factores.

Por otro lado, en ecosistemas más estables, como podría considerarse el bosque maduro, los propágulos micorrícicos más infectivos generalmente están representados por los segmentos radicales y el micelio externo, ya que usualmente las esporas tienen períodos de dormancia más prolongados (Zangaro et al. 2000; Irrazabal et al. 2004). En este experimento, las muestras de suelo original fueron homogeneizadas, por lo que la mayor parte del micelio externo pudo haberse dañado (Jasper et al. 1989; Evans & Miller 1990). Por lo tanto, la baja infectividad observada en el suelo del bosque maduro podría explicarse por los segmentos radicales colonizados (Irrazabal et al. 2004; Smith & Read 2008) que estarían presentes en menor cantidad que en los otros tipos de vegetación estudiados (pastizal y bosque degradado), ya que en los suelos de los bosques maduros generalmente la biomasa radical es poco abundante (Zangaro et al. 2008).

4.4.2 Respuesta a campo de *Polylepis australis* frente a la inoculación

La similitud de la respuesta en el crecimiento y la supervivencia entre los tratamientos de inoculación sugiere que cualquiera de los suelos estudiados podrían utilizarse para pre-inocular los juveniles de *P. australis* antes del trasplante. Esto no podría ser atribuido a la falta de réplicas, ya que otros estudios con la misma especie (Renison & Cingolani 2002; Renison et al. 2002; Renison et al. 2005) mostraron que 60 juveniles son suficientes para determinar diferencias significativas entre tratamientos (i.e. estación óptima de trasplante, tipo de micrositio, procedencias).

Generalmente, las plantas que presentan una respuesta positiva frente a la inoculación con HMA muestran patrones similares tanto a campo como en invernadero (Pringle & Bever 2008). Especies de períodos sucesionales tardíos, tal como *P. australis*, responden positivamente a la colonización por HMA (Janos 1980). Sin embargo, bajo condiciones controladas de invernadero (Capítulo III) se observó una mayor relación raíz / tallo en los juveniles inoculados con suelo del bosque maduro y un mayor contenido de P en todos los juveniles inoculados, lo que no concuerda con los resultados de este capítulo. Por lo tanto, no se podrían extrapolar las observaciones del invernadero al campo, al igual que han destacado otros autores (Rillig 2004; Amaranthus & Steinfeld 2005; Lekberg & Koide 2005), al menos en el sitio considerado en este estudio, con predominancia de pastizales y degradado por un incendio reciente.

En el sitio de reforestación, después de los 12 meses de realizado el trasplante, los controles, inicialmente no micorrizados, presentaron colonización radical por HMA. Esto coincide con otros experimentos de inoculación con HMA realizados en el campo (Allen et al. 2003; Cuenca et al. 2003; Amaranthus & Steinfeld 2005). Al igual que lo

observado por Cuenca et al. (2003) todos los tratamientos mostraron una colonización similar luego de 12 meses.

En cuanto al contenido nutricional de la parte aérea, los juveniles inoculados con suelo del pastizal presentaron un mayor porcentaje de Na y de Ca. El resto de los nutrientes no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque esto no necesariamente está indicando la ausencia de transporte de nutrientes entre el hongo y la planta (Smith et al. 2003; Smith & Smith 2011).

4.4.3 Comunidad de hongos micorrízico arbusculares de la rizosfera de los juveniles trasplantados a campo

En el Capítulo III se observó que la densidad de esporas y la diversidad de Shannon de los tres tipos de inóculo, así como la colonización micorrízica de los juveniles inoculados, fueron similares. En concordancia con estos resultados, en este Capítulo la comunidad de HMA y la colonización radical de la rizosfera de los juveniles trasplantados no mostraron diferencias entre los tratamientos, incluso fueron similares a los controles, que inicialmente no estaban micorrizados. Además, a diferencia del Capítulo III, la riqueza de HMA fue similar en la rizosfera de todos los trasplantes. Probablemente la recuperación de la comunidad original de HMA luego del incendio (Heneghan et al. 2008) pudo haber homogeneizado las comunidades de HMA de la rizosfera de los juveniles.

En la rizosfera de todos los tratamientos en general, la densidad de esporas, la riqueza y la diversidad de Shannon fueron mayores durante la estación húmeda, el período más cálido del año, coincidiendo con lo observado por Lugo & Cabello (2002) en las Sierras Grandes de Córdoba. Es esperable que los HMA respondan a las variaciones estacionales ya que se ven influenciados por factores abióticos como el contenido de fósforo del suelo (Smith & Read 2008), el pH (Dumbrell et al. 2010) y la

temperatura (Tommerup 1983). Durante la estación fría y seca, en el área donde crece *P. australis* el suelo se congela, lo que podría estar limitando la esporulación de algunas morfoespecies, disminuyendo así la densidad, riqueza y diversidad de morfoespecies de HMA durante esta estación (Klironomos et al. 2001). Al contrario de lo observado en este trabajo, Dumbrell et al. (2011) hipotetizaron que debido a que el mayor suministro de carbono a los simbiontes ocurriría durante la estación más cálida, se promovería la sobre-dominancia de las especies competitivamente más fuertes, disminuyendo así la diversidad de HMA en esta época del año.

Los HMA cambian de nicho dependiendo de su actividad fisiológica, pudiendo ser más abundantes dentro de la raíz o en el suelo según la estación (Merryweather & Fitter 1998; Pringle & Bever 2008; Dumbrell et al. 2010). En este trabajo, *Acaulospora* sp. fue la especie con mayor densidad durante la estación seca; mientras que *Rhizophagus intraradices*, *A. undulata* y *Glomus* sp. mostraron mayor abundancia durante la estación húmeda. Estos cambios en la densidad específica de morfoespecies de HMA con las estaciones coincide con lo observado por otros autores (Lugo & Cabello 2002; Becerra et al. 2009; Oehl et al. 2009; Soteras et al. 2012).

4.5 Conclusiones

Este trabajo es el primer estudio que evalúa la respuesta de *P. australis* frente a la inoculación con suelo procedente de distintos tipos de vegetación en un experimento a campo. La inoculación previa al trasplante no es esencial para el crecimiento, supervivencia y nutrición de *P. australis* ya que no se observaron diferencias entre los juveniles previamente inoculados y los controles inicialmente no micorrizados. Incluso las comunidades de HMA y la colonización micorrícica fueron similares en todos los tratamientos. En base a estos resultados no es posible recomendar un tipo de inóculo

para promover el éxito de la reforestación con *P. australis*, al menos en un sitio como el considerado en este trabajo.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

5.1 Discusión general

Los bosques de *Polylepis australis* Bitt. (“tabaquillo” o “queñoa”), formados por la especie más austral del género, son endémicos de Argentina (Cabido & Acosta 1985; Renison et al. 2013), y se encuentran en las Sierras Grandes de Córdoba formando pequeños grupos o como ejemplares solitarios en el fondo de los valles o en barrancas empinadas, inaccesibles al ganado, al hombre y al fuego (Renison et al. 2006; Cingolani et al. 2008). En cada sitio, donde nacen numerosos ríos, pueden encontrarse distintos tipos de bosque que difieren en su complejidad estructural (Renison et al. 2011).

Para poder llevar a cabo la restauración de un ecosistema degradado, es importante considerar las comunidades edáficas nativas (Wardle et al. 2004; Heneghan et al. 2008; Pagano et al. 2009) y los HMA, uno de los microorganismos más importantes del suelo (Fitter 2005), que pueden facilitar el proceso de restauración (Harris 2009). Para ello, en primer lugar es necesario conocer la identidad y ecología de las comunidades, tanto vegetales como fúngicas, que se encuentran en el ambiente natural (Dobson 1997).

En general, los estudios en los bosques de *P. australis* han estado enfocados en describir las comunidades vegetales (Cingolani et al. 2004, 2008; Renison et al. 2011, 2013) e incluso las comunidades de macromicetes (Robledo & Renison 2010; Hernández Caffot et al. 2011), pero poco se conoce referido a las comunidades de HMA presentes en su rizosfera (Menoyo et al. 2009; Martino et al. 2011). Por ello en la primer parte de esta tesis se estudiaron las comunidades de HMA de tres tipos de bosque que diferían en su complejidad estructural, durante dos estaciones. De esta manera, se profundizaron los conocimientos existentes acerca de la ecología de los HMA en los bosques de *P. australis* de las Sierras Grandes de Córdoba. Además se aportan

evidencias de las variaciones estacionales de la densidad específica de algunas morfoespecies de HMA, así como de la resistencia de estos hongos frente a los cambios de la estructura del bosque (Cap. II).

Al establecer simbiosis con las plantas hospedantes, los HMA pueden incrementar su crecimiento, establecimiento y supervivencia (Allen et al. 2003; van der Heijden et al. 2006). Por lo tanto, pueden ser considerados para la restauración de los ecosistemas naturales (Heneghan et al. 2008) e implementarse como inóculo natural para las prácticas de reforestación (Haselwandter & Bowen 1996; White et al. 2008). Por ello, en la segunda parte de esta tesis, se realizaron dos experimentos de inoculación con suelo de tres tipos de vegetación (un pastizal de altura, un bosque degradado y un bosque maduro), en invernadero (Cap. III) y en un sitio de reforestación, donde previamente había ocurrido un incendio, disminuyendo la densidad de propágulos micorrícicos del suelo (Cap. IV). En estas secciones se demuestran las complejas y variables relaciones entre las distintas comunidades de HMA y la planta hospedante (Jones & Smith 2004; Hoeksema et al. 2010).

5.1.1 Influencia de los cambios del ambiente original y la estacionalidad sobre las comunidades de HMA y la colonización micorrícica arbuscular

Los HMA se ven influenciados por los cambios de temperatura, humedad, pH, la capacidad de intercambio catiónico del suelo y por factores antrópicos, tanto físicos (e.g. tala de árboles, pisoteo del ganado doméstico) como químicos (e.g. aplicación de fertilizantes) (Entry et al. 2002; Koltai & Kapulnik 2010). Por ello, generalmente los cambios en la estructura del ecosistema original (Zhang et al. 2004; Menoyo et al. 2009; Stürmer & Siqueira 2011; Zangaro et al. 2013), así como las variaciones estacionales (Lugo & Cabello 2002; Lugo et al. 2003; García & Mendoza 2008; Becerra et al. 2009)

están acompañados por variaciones en la composición y ocurrencia de los HMA. Sin embargo, no siempre los HMA se ven afectados por estos factores (Johnson & Wedin 1997; Guadarrama & Álvarez-Sánchez 1999; Picone 2000; Davison et al. 2012). Estos antecedentes revelan que la respuesta de los HMA depende del tipo de especie de planta, de los HMA asociados y de las condiciones ambientales (Jones & Smith 2004; Hoeksema et al. 2010) y, por lo tanto es importante estudiar estas comunidades en los diferentes ecosistemas.

En este trabajo no se observaron variaciones de la densidad, riqueza y diversidad de Shannon de los HMA entre los tres tipos de bosque comparados (bosque degradado, bosque joven y bosque maduro) (Cap. II), por lo que se rechaza la hipótesis planteada en cuanto a la influencia de la estructura de los bosques sobre estas comunidades de hongos. Estos resultados estarían indicando que las comunidades de HMA son resistentes frente a los cambios del ambiente original (Pimm 1984). La adaptación de las comunidades de HMA a los cambios estacionales, con períodos de sequía y congelamiento del suelo, tal como ocurre en el sitio estudiado (Sierras Grandes de Córdoba) (Cabido & Acosta 1985), frente a los cuales estos hongos fluctúan naturalmente (Smith & Read 2008), les permitiría adaptarse a los cambios en la estructura del bosque. Sin embargo, no se debe subestimar el efecto de las actividades antrópicas, ya que modificaciones del ecosistema mayores que las consideradas en este trabajo podrían producir variaciones en las comunidades de HMA (Abbott & Gazey 1994).

Por otro lado, los resultados de esta tesis no mostraron variaciones estacionales de las variables de las comunidades de HMA (Cap. II). Por lo tanto, la hipótesis planteada se rechaza parcialmente ya que se observaron cambios en la densidad específica de algunas morfoespecies, encontrando un grupo de HMA con mayor

abundancia durante la estación húmeda. Esto aportaría evidencias referidas al cambio de nicho estacional (dentro de la raíz o en el suelo) observado en algunos HMA (Merryweather & Fitter 1998; Pringle & Bever 2002). Por ejemplo, se ha observado que *Acaulospora colossica* presenta una mayor esporulación durante la estación cálida y *Gigaspora gigantea* durante la estación fría (Pringle & Bever 2002). En otro estudio se observó que las raíces de *Hyacinthoides non-scripta* durante el otoño y el invierno se colonizan principalmente por *Scutellospora*, y al disminuir la densidad de este género, durante la primavera, se incrementa la abundancia de *Acaulospora* y *Glomus* tipo 1 (Merryweather & Fitter 1998). La caracterización de la comunidad de HMA a través de la extracción de esporas, tal como se ha realizado en este trabajo, no refleja necesariamente los simbiontes que colonizan las raíces de *P. australis*, por lo que resulta imprescindible complementar estos estudios con técnicas moleculares (Redecker 2000; Opik et al. 2006; Davison et al. 2012) a fin de identificar los HMA asociados con el tabaquillo y así profundizar sobre la ecología de las comunidades de HMA de este ecosistema boscoso.

La variación estacional de la densidad específica de algunas morfoespecies también se observó en el Capítulo IV al comparar las comunidades de HMA de la rizosfera de los juveniles trasplantados. Asimismo, tanto en los ecosistemas boscosos naturales (Cap. II) como en la rizosfera de algunos juveniles trasplantados previamente inoculados con suelo natural (Cap. IV) *Rhizophagus intraradices* y *Glomus* sp. fueron más abundantes durante la estación húmeda y *Acaulospora* sp. durante la estación seca. A partir de la consistencia de los resultados entre los dos Capítulos se puede deducir que estas especies estarían adaptadas a las condiciones ambientales de una estación (Tommerup 1983; Pringle & Bever 2002), siendo más abundantes en el suelo durante un determinado período del año.

En general los estudios referidos a los HMA han demostrado una variación estacional de la colonización micorrícica (e.g. Lugo et al. 2003; Zangaro et al. 2013). Por el contrario, en este trabajo no se observaron diferencias en la colonización micorrícica arbuscular entre las estaciones. En cuanto a la variación de esta variable entre bosques con distinta complejidad estructural, tampoco se observaron cambios significativos entre los distintos bosques considerados, coincidiendo con lo encontrado por otros autores (Aguilar-Fernández et al. 2009; Menoyo et al. 2009). Por otro lado, se observó una influencia significativa, tanto de la estación como del tipo de bosque, sobre la colonización por arbusculos y vesículas en las raíces de *P. australis* (Cap. II). Esta variación de las estructuras intra-radicales también ha sido reportada por otros autores (Klironomos et al. 2004; Menoyo et al. 2009). Un mayor porcentaje de arbusculos durante la estación seca y de vesículas durante las dos estaciones en los bosques degradados, aportan evidencia relativa a la actividad estacional de estos hongos (Smith & Read 2008). Nadian et al. (1997) observaron que un incremento en la compactación del suelo en sitios degradados aumenta el contenido de fósforo por unidad de longitud de raíz en plantas micorrizadas y, por lo tanto el número de estructuras empleadas para el intercambio de este nutriente. En consistencia con ello, en esta tesis se encontró un mayor porcentaje de arbusculos bajo condiciones menos favorables (bosque degradado y estación seca) tanto en los tipos de bosque comparados (Cap. II), como bajo condiciones de invernadero (juveniles inoculados con suelo del bosque degradado) (Cap. III). Por lo tanto, en base a estos resultados podría deducirse que *P. australis* muestra una mayor dependencia micorrícica bajo condiciones menos favorables.

Al evaluar las comunidades de HMA de la rizosfera de los juveniles plantados en el campo, se observaron mayores valores de las variables: riqueza, densidad y diversidad de Shannon durante la estación cálida y húmeda (Cap. IV), aunque sólo

fueron significativos para la variable densidad en dos tratamientos (controles y juveniles inoculados con suelo del pastizal). Por lo tanto, la hipótesis planteada se rechazó parcialmente. Estos resultados podrían explicarse por el usual congelamiento del suelo durante la estación fría y seca, que podría estar limitando la esporulación de algunas morfoespecies, disminuyendo así la densidad, riqueza y diversidad de morfoespecies de HMA durante esta estación (Klironomos et al. 2001).

A partir de los cultivos con planta trampa realizados con el suelo de los tres tipos de inóculos (Cap. IV), se aislaron nuevas morfoespecies en dos de los tratamientos (*Claroideoglossum claroideum* y *Funneliformis geosporum* para el bosque degradado y *C. claroideum*, *C. luteum* y *F. geosporum* para el bosque maduro), aunque estas morfoespecies habían sido observadas en las muestras del campo de otros tratamientos. Por lo tanto, la extracción de esporas a partir de las muestras del campo es un método adecuado para aislar las morfoespecies de HMA presentes en el ecosistema natural, lo cual también fue evidenciado con las curvas de acumulación de especies de los tres tipos de bosque evaluados (Cap. II).

5.1.2 Utilización del inóculo micorrízico para la promoción del crecimiento y la supervivencia del hospedante

El efecto positivo de los HMA sobre las plantas hospedantes lo logran a través de la nutrición mineral (principalmente de fósforo) (Smith & Smith 2011), la protección contra los patógenos radicales (Newsham et al. 1995), el incremento de la absorción de agua (Augé 2001) y la retención de los metales tóxicos contaminantes (Meharg & Cairney 1999), entre otros. Sin embargo, se ha evidenciado que la respuesta frente a la inoculación puede ser positiva, neutra o negativa, según la fisiología e identidad de la planta (van der Heijden & Kuyper 2001; Smith et al. 2011), la combinación de taxones

de HMA presente en el inóculo (Maherali & Klironomos 2007), la infectividad micorrícica del suelo (Cuenca et al. 2004), el estadio sucesional de la planta hospedante (Asbjornsen & Montagnini 1994; Fischer et al. 1994; Kiers et al. 2000; Allen et al. 2003) y de otros factores bióticos y abióticos (Jones & Smith 2004; Hoeksema et al. 2010). De esta manera, resulta relevante estudiar la influencia de distintos tipos de inóculos de HMA en cada especie de planta.

Smith et al. (2004) destacaron a través de experimentos con P marcado, que el intercambio de este nutriente con el simbionte siempre está ocurriendo, aunque no se observe un incremento en el crecimiento de la planta micorrizada. En el capítulo III se observó una respuesta positiva frente a la inoculación con HMA, un mayor contenido de P en los juveniles inoculados y una mayor relación raíz / tallo en los juveniles con suelo del bosque maduro. Probablemente, el grupo de taxones de HMA del inóculo proveniente de un estadio sucesional más avanzado, bosque maduro, sea el más efectivo para el crecimiento de *P. australis* (Hart et al. 2001; Hart & Reader 2002). Sin embargo y, a pesar de que se observaron variaciones en las comunidades de HMA entre los inóculos (mayor riqueza en el inóculo del pastizal) (Cap. III) y en la infectividad del suelo (los inóculos del pastizal y del bosque degradado fueron 25 veces más infectivos) (Cap. IV), no se evidenciaron influencias diferenciales sobre el crecimiento, supervivencia y nutrición a campo (Cap. IV). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis planteada en relación a estas variables en el experimento a campo. A partir de la inconsistencia entre los resultados del invernadero y del sitio de reforestación, se puede deducir que los experimentos bajo condiciones controladas no siempre son útiles para predecir la respuesta bajo condiciones naturales (Rillig 2004; Hoeksema et al. 2010), aspecto a tener en cuenta en la elaboración de planes de reforestación a campo.

En el sitio de reforestación de este trabajo, un pastizal quemado en el Parque Nacional Quebrada del Condorito, donde el inóculo micorrícico inicial era un 43 % menor al de un pastizal adyacente no quemado (Cap. IV), no fue esencial que los juveniles de *P. australis* estuvieran previamente inoculados con suelo natural. Incluso, después de 12 meses los controles presentaron colonización micorrícica arbuscular y una comunidad de HMA en su rizosfera similar a los otros tratamientos, indicando que rápidamente encontraron en el ambiente simbiontes micorrícicos (Vandenkoornhuyse et al. 2003; Davison et al. 2011). Esto puede haber ocurrido por la recuperación de la comunidad de HMA original luego del incendio (Friese & Koske 1991; Heneghan et al. 2008).

5.2 Conclusiones generales

El impacto de las actividades antrópicas sobre los ecosistemas naturales ha generado la modificación de la estructura y biodiversidad de los bosques, y *P. australis* no ha escapado a la influencia de estos efectos. Sin embargo, en esta tesis no se observaron variaciones de la comunidad de HMA de la rizosfera de bosques de tabaquillo con distinta complejidad estructural, aunque se mostraron variaciones estacionales de algunas morfoespecies de HMA (Cap. II). Estos resultados aportan evidencias relativas a la resistencia de estos hongos frente a los cambios en la estructura del ambiente, al menos a los bosques estudiados, y acerca de la adaptación de algunos taxa a una determinada estación (*Rhizophagus intraradices* y *Glomus* sp. durante la estación húmeda, y *Acaulospora* sp. durante la estación seca; Cap. II y Cap. IV). Sin embargo, no puede descartarse que cambios mayores en el ambiente provoquen modificaciones en las comunidades de HMA de la rizosfera de estos árboles. Además

estas comunidades no necesariamente representan a los hongos que están colonizando las raíces, que podrían ser diferentes en los distintos tipos de bosque.

En cuanto al rol de los HMA como simbioses benéficos para el crecimiento y supervivencia de las plantas hospedantes, en esta tesis se observó una variabilidad bajo diferentes situaciones (invernadero y a campo), evidenciando la respuesta diferencial de un hospedante frente a determinado grupo de taxones de HMA bajo distintas condiciones. La simbiosis fue positiva para *P. australis*, ya que los juveniles inoculados mostraron mayor contenido de fósforo y el tratamiento con suelo del bosque maduro presentó mayores valores de la relación raíz / tallo y un porcentaje de colonización micorrícica arbuscular mayor (Cap. III). Sin embargo, cuando los juveniles fueron trasplantados al campo este efecto no fue observado, probablemente por la influencia de otros factores, como otros microorganismos del suelo, las fluctuaciones de la temperatura, humedad, la presencia de herbívoros, etc. (Cap. IV). Aunque no se puede generalizar esta respuesta para cualquier sitio de reforestación.

En conclusión este trabajo aporta evidencias sobre la ecología de las comunidades de HMA en bosques con distinta complejidad estructural y en diferentes estaciones (Cap. II). Así como acerca de la respuesta diferencial de una planta hospedante frente a la inoculación con HMA (Cap. III y Cap. IV), resaltando la importancia de tener precaución al extrapolar las observaciones a partir de experimentos realizados bajo condiciones de invernadero para la toma de decisiones en las prácticas de reforestación.

Además esta tesis sienta las bases para futuras investigaciones, entre las cuales se pueden mencionar:

- Identificar a través de técnicas moleculares los HMA que están colonizando las raíces de *P. australis* y en su rizosfera, para complementar

este estudio y determinar si existen variaciones entre bosques con distinta complejidad estructural y entre las estaciones.

- Incluir bosques con mayor grado de impacto (sitios con evidencias mayores de pérdida de suelo, porcentajes elevados de roca expuesta, etc.) en la comparación de las comunidades de HMA, a fin de poner a prueba la hipótesis de resistencia.
- Determinar si la pre-inoculación con HMA promueve el crecimiento y supervivencia de *P. australis* en sitios de reforestación con diferentes tipos de disturbio antrópico (e.g. en suelos erosionados, canteras abandonadas), donde el inóculo original esté completamente ausente.
- Evaluar el efecto de la inoculación con suelo extraído durante diferentes estaciones, para determinar si las fluctuaciones en la esporulación de algunas morfoespecies influyen en la respuesta de los juveniles frente a la inoculación.
- Evaluar el efecto de la inoculación con HMA junto con la fertilización con fósforo y/o nitrógeno.

Referencias citadas

Abbott LK, Gazey C. (1994). An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. *Plant and Soil* 159:69–78.

Aguilar-Fernández M, Jaramillo Víctor J, Varela-Fregoso L, Gavito ME. (2009). Short-term consequences of slash-and-burn practices on the arbuscular mycorrhizal fungi of a tropical dry forest. *Mycorrhiza* 19:179–186.

Ahulu EM, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V, Nonaka M. (2006). Co-occurring plants forming distinct arbuscular mycorrhizal morphologies harbor similar AM fungal species. *Mycorrhiza* 17:37–49.

Aide TM, Zimmerman JK, Pascarella JB, Rivera L, Marcano-Vega H. (2000). Forest regeneration in a chronosequence of tropical abandoned pastures: implications for restoration ecology. *Restoration Ecology* 8:328–338.

Al-Karaki GN. (2000). Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10:51–54.

Allen EB, Rincón E, Allen MF, Pérez-Jimenez A, Huante P. (1998). Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 30:261–274.

Allen EB, Allen MF, Egerton-Warburton LM, Corkidi L, Gómez-Pompa A. (2003). Impacts of early- and late-seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest. *Ecological Applications* 13:1701–1717.

Amaranthus M, Steinfeld D. (2005). Arbuscular mycorrhizal inoculation following biocide treatment improves *Calocedrus decurrens* survival and growth in nursery and outplanting sites. En: *National proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations 2004*, Dumroese R, Riley LE & Landis T (eds.), Fort Collins, CO: U.S., pp. 103–108.

APN. (2004). Plan de manejo del Parque Nacional Quebrada del Condorito y Reserva Hídrica Provincial de Achala. Delegación Región Centro.

Asbjornsen H, Montagnini F. (1994). Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum potential affects the growth of *Stryphnodendron microstachyum* seedlings in a Costa Rican human tropical lowland. *Mycorrhiza* 5:45–51.

Augé RM. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42.

Bates DB, Maechler M, Bolker B. (2012). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. Version 0.999999-0. URL: <http://lme4.r-forge.r-project.org/>.

Becerra AG, Cabello M, Zak MR, Bartoloni N. (2009). Arbuscular mycorrhizae of dominant plant species in Yungas forests, Argentina. *Mycologia* 101:612–621.

- Bernier PY, Lamhanedi MS, Simpson DG. (1995). Shoot:root ratio is of limited use in evaluating the quality of container conifer stock. *Tree Planter's Notes* 46:102–106.
- Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA. (1996). Host dependent sporulation and species diversity of AMF in a mown grassland. *Journal of Ecology* 84:71–82.
- Bever JD, Schultz PA, Pringle A, Morton JB. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *BioScience* 51:923–932.
- Biermann B, Linderman RG. (1983). Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95:97–105.
- Brundrett M. (1991). Mycorrhizas in Natural Ecosystems. En: *Advances in Ecological Research*, volumen 21, Begon M, Fitter AH & Macfadyen A (eds.), pp. 171–313.
- Brundrett M. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320:37–77.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry Agriculture. ACIAR Monograph 32.
- Cabello MN. (1997). Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology* 22:233–236.
- Cabido M. (1985). Las comunidades vegetales de Pampa de Achala, Sierras de Córdoba, Argentina. *Documents Phytosociologiques* 9:431–443.
- Cabido M, Acosta A. (1985). Estudio fitosociológico en bosques de *Polylepis australis* BITT. (“Tabaquillo”) en las Sierras de Córdoba. Argentina. *Documents Phytosociologiques* 9:385–400.
- Cabido M, Breimer R, Vega G. (1987). Plant communities and associated soil types in a high plateau of the Cordoba Mountains, Central Argentina. *Mountain Research and Development* 7:25–42.
- Carpenter FL, Palacios S, Gonzalez E, Schroeder M. (2001). Land-use and erosion of a Costa Rican Ultisol affect soil chemistry, mycorrhizal fungi and early regeneration. *Forest Ecology and Management* 144:1-17.
- Cingolani AM, Cabido M, Renison D, Solís Neffa V. (2003). Combined effects of environment and grazing on vegetation structure in Argentine granite grasslands. *Journal of Vegetation Science* 14:223–232.
- Cingolani AM, Renison D, Zak MR, Cabido M. (2004). Mapping vegetation in a heterogeneous mountain rangeland using landsat data: an alternative method to define and classify land-cover units. *Remote Sensing of Environment* 92:84–97.

- Cingolani AM, Noy-Meir I, Díaz S. (2005). Grazing effects on rangeland diversity: a synthesis of contemporary models. *Ecological Applications* 15:757–773.
- Cingolani AM, Renison D, Tecco PA, Gurvich DE, Cabido M. (2008). Predicting cover types in a mountain range with long evolutionary grazing history: a GIS approach. *Journal of Biogeography* 35:538–551.
- Closa I, Goicoechea N. (2011). Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in naturally regenerating, unmanaged and clear-cut beech forests. *Pedosphere* 21:65–74.
- Cuenca G, De Andrade Z, Escalante G. (1998). Arbuscular mycorrhizae in the rehabilitation of fragile degraded tropical lands. *Biology and Fertility of Soils* 26:107–111.
- Cuenca G, De Andrade Z, Lovera M. (2003). Mycorrhizal response of *Clusia pusilla* growing in two different soils in the field. *Trees* 17:200–206.
- Cuenca G, De Andrade Z, Lovera M, Fajardo L, Meneses E. (2004). The effect of two arbuscular mycorrhizal inocula of contrasting richness and the same mycorrhizal potential on the growth and survival of wild plant species from La Gran Sabana, Venezuela. *Canadian Journal of Botany* 82:582–589.
- Cuenca G, Lovera M, Fajardo L, Meneses E. (2006). Efecto de las micorrizas arbusculares sobre el crecimiento y supervivencia de dos especies nativas de la Gran Savana al transplantarlas a un área degradada. *Acta Científica Venezolana* 57:42–48.
- Davison J, Öpik M, Daniell TJ, Moora M, Zobel M. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS Microbiology Ecology* 78:103–15.
- Davison J, Öpik M, Zobel M, Vasar M, Metsis M, Moora M. (2012). Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PloS One* 7:e41938.
- Díaz G, Honrubia M. (1993). Infectivity of mine soils from Southeast Spain. II. Mycorrhizal population levels in spoilt sites. *Mycorrhiza* 4:85–88.
- Díaz S, Acosta A, Cabido M. (1994). Community structure in montane grasslands of central Argentina in relation to land use. *Journal of Vegetation Science* 5:483–488.
- Dobson AP. (1997). Hopes for the future: restoration, ecology and conservation. *Biology Science* 277:515–522.
- Dumbrell AJ, Nelson M, Helgason T, Dytham C, Fitter AH. (2010). Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal* 4:337–45.
- Dumbrell AJ, Ashton PD, Aziz N, Feng G, Nelson M, Dytham C, Fitter AH, Helgason T. (2011). Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. *New Phytologist* 190:794–804.

- Ellenberg H. (1979). Man's influence on tropical mountain ecosystems in South America. *Journal of Ecology* 67:401–416.
- Enrico L, Funes G, Cabido M. (2004). Regeneration of *Polylepis australis* Bitt. in the mountains of central Argentina. *Forest Ecology and Management* 190:301–309.
- Entry JA, Rygielwicz PT, Watrud LS, Donnelly PK. (2002). Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research* 7:123–138.
- Evans DG, Miller MH. (1990). The role of the external mycelial network in the effect of soil disturbance upon vesicular - arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytologist* 114:65–71.
- FAO. (2006). Global Forest Resources. Assessment 2005. Progress towards sustainable forest management. Roma, Italia, 350 pp.
- Fernández Terrazas E, Stahl B. (2002). Diversity and phytogeography of the vascular flora of the *Polylepis* forests of the Cordillera de Cochabamba, Bolivia. *Ecotropica* 8:163–182.
- Fischer CR, Janos DP, Perry DA, Linderman RG., Sollins P. (1994). Mycorrhiza inoculum potentials in tropical secondary succession. *Biotropica* 26:369.
- Fitter AH. (2005). Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93:231–243.
- Fitter AH, Gilligan CA, Hollingworth K, Kleczkowski A, Twyman RM, Pitchford JW. (2005). Biodiversity and ecosystem function in soil. *Functional Ecology* 19:369–377.
- Fjeldså J. (1993). The avifauna of the *Polylepis* woodlands of the Andean highlands: the efficiency of basing conservation priorities on patterns of endemism. *Bird Conservation International* 3:37–55.
- Fjeldså J. (2002). *Polylepis* forests - vestiges of a vanishing ecosystem in the Andes. *Ecotropica* 8:111–123.
- Fjeldså J, Kessler M. (1996). Conserving the biological diversity of *Polylepis* woodlands of the highland of Peru and Bolivia. A contribution to sustainable natural resource management in the Andes. Nordeco: Copenhagen, Denmark, 250 pp.
- Friese CF, Koske RE. (1991). The spatial dispersion of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a sand dune: microscale patterns associated with the root architecture of American beachgrass. *Mycological Research* 95:952–957.
- García I V, Mendoza RE. (2008). Relationships among soil properties, plant nutrition and arbuscular mycorrhizal fungi-plant symbioses in a temperate grassland along hydrologic, saline and sodic gradients. *FEMS Microbiology Ecology* 63:359–71.

- Gerdemann JW, Nicolson TH. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 84:679–684.
- Giorgis MA, Cingolani AM, Teich I, Renison D, Hensen I. (2010). Do *Polylepis australis* trees tolerate herbivory? Seasonal patterns of shoot growth and its consumption by livestock. *Plant Ecology* 207:307–319.
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG. (2007). Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology* 54:753–60.
- Gotelli NJ, Colwell RK. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4:379–391.
- Grace C, Stribley DP. (1991). A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 95:1160–1162.
- Graham JH, Duncan LW, Eissenstat DM. (1997). Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency. *New Phytologist* 135:335–343.
- Grilli G, Urcelay C, Galetto L. (2012). Forest fragment size and nutrient availability: complex responses of mycorrhizal fungi in native–exotic hosts. *Plant Ecology* 213:155–165.
- Guadarrama P, Álvarez-Sánchez FJ. (1999). Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza* 8:267–270.
- Harris J. (2009). Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? *Science* 325(573).
- Hart MM, Reader RJ. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153:335–344.
- Hart MM, Reader RJ, Klironomos JN. (2001). Life-history strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to their successional dynamics. *Mycologia* 93:1186–1194.
- Haselwandter K, Bowen GD. (1996). Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. *Forest Ecology and Management* 81:1–17.
- Haugen LM, Smith SE. (1992). The effect of high temperature and fallow period on infection of mung bean and cashew roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Plant and Soil* 145:71–80.
- van der Heijden EW, Kuyper TW. (2001). Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis? *Plant and Soil* 230:161–174.

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

van der Heijden MGA, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. (2006). The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist* 172:739–52.

van der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11:296–310.

Helgason T, Fitter AH, Young JPW. (1999). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology* 8:659–666.

Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH. (2002). Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90:371–384.

Heneghan L, Miller SP, Baer S, Callahan MA, Montgomery J, Pavao-Zuckerman M, Rhoades CC, Richardson S. (2008). Integrating soil ecological knowledge into restoration management. *Restoration Ecology* 16:608–617.

Hensen I. (2002). Impacts of anthropogenic activity on the vegetation of *Polylepis* woodlands in the region of Cochabamba, Bolivia. *Ecotropica* 8:183–203.

Hernández Caffot ML, Dominguez LS, Hosaka K, Crespo EM. (2011). *Tulostoma domingueziae* sp. nov. from *Polylepis australis* woodlands in Córdoba Mountains, central Argentina. *Mycologia* 103:1047–1054.

Hill MO, Gauch HGJ. (1980). Detrended correspondence analysis: an improved ordination technique. *Plant Ecology* 42:47–58.

Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Collins Johnson N, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, Wilson GWT, Klironomos JN, Umbanhowar J. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13:394–407.

Irrazabal G, Velázquez S, Cabello MN. (2004). Infectividad y diversidad de hongos micorrízicos arbusculares de la rizosfera de los talares de Magdalena, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Boletín Micológico* 19:49–57.

Jackson ML. (1964). Análisis químico de suelos. 2nd ed. Omega: Barcelona, 622 pp.

Janos DP. (1980). Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica* 12:56–64.

- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E. (2002). Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12:225–234.
- Jasper DA, Abbott LK, Robson AD. (1989a). Hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soil is disturbed. *New Phytologist* 112:101–107.
- Jasper DA, Abbott LK, Robson AD. (1989b). The loss of VA mycorrhizal infectivity during bauxite mining may limit growth of *Acacia pulchella* R. Br. *Australian Journal of Botany* 37:33–42.
- Jasper DA, Abbot LK, Robson AD. (1991). The effect of soil disturbance on vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. *New Phytologist* 118:471–476.
- Johnson NC. (2010). Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* 185:631–647.
- Johnson NC, Wedin DA. (1997). Soil carbon, nutrients, and mycorrhizae during conversion of dry tropical forest to grassland. *Ecological Applications* 7:171–182.
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575–585.
- Jones JB, Wolf B, Mills HA. (1991). Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Inc.: Athens, Georgia, USA, 213 pp.
- Jones MD, Smith SE. (2004). Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? *Canadian Journal of Botany* 82:1089–1109.
- Kauffman JB, Steele MD, Cummings DL, Jaramillo VJ. (2003). Biomass dynamics associated with deforestation, fire, and conversion to cattle pasture in a Mexican tropical dry forest. *Forest Ecology and Management* 176:1–12.
- Kiers ET, Lovelock CE, Krueger EL, Herre EA. (2000). Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecology Letters* 3:106–113.
- Kindt R. (2013). BiodiversityR: GUI for biodiversity, suitability and community ecology analysis. Version 2.1. URL: <http://www.r-project.org>,
- Klironomos JN, Hart MM, Gurney JE, Moutoglis P. (2001). Interspecific differences in the tolerance of arbuscular mycorrhizal fungi to freezing and drying. *Canadian Journal of Botany* 79:1161–1166.
- Klironomos JN, Mccune J, Moutoglis P. (2004). Species of arbuscular mycorrhizal fungi affect mycorrhizal responses to simulated herbivory. *Applied Soil Ecology* 26:133–141.

Koltai H, Kapulnik Y. (2010). *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function*. Second Edition, Springer, 323 pp.

Koske RE, Gemma JN. (1990). VA mycorrhizae in strand vegetation of Hawaii: evidence for long-distance codispersal of plants and fungi. *American Journal of Botany* 77:466–474.

Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193:970–984.

Kuhn G, Hijri M, Sanders IR. (2001). Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414:745–748.

Lanfranco L, Bianciotto V, Lumini E, Souza M, Morton JB, Bonfante P. (2001). A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). *New Phytologist* 152:169–179.

Lekberg Y, Koide RT. (2005). Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist* 168:189–204.

Lugo M, Cabello MN. (2002). Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Cordoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* 94:579–586.

Lugo M, González Maza ME, Cabello MN. (2003). Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland II: Seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycologia* 95:407–415.

Magurran AE, McGill BJ. (2011). *Ecological diversity: frontiers in measurement and assessment*. Oxford University Press, 345 pp.

Maherali H, Klironomos JN. (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316:1746–1748.

Marcora P, Hensen I, Renison D, Seltmann P, Wesche K. (2008). The performance of *Polylepis australis* trees along their entire altitudinal range: implications of climate change for their conservation. *Diversity and Distributions* 14:630–636.

Maron JL, Marler M, Klironomos JN, Cleveland CC. (2011). Soil fungal pathogens and the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology letters* 14:36–41.

Marschner H, Dell B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159:89–102.

Martino J, Urcelay C, Renison D. (2011). Crecimiento y colonización micorrícica de *Polylepis australis* Bitter (Rosaceae) en suelos con distinta historia de pastoreo. *Kurtziana* 36:69–77.

- McGonigle TP, Miller M, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. (1990). A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115:495–501.
- Meddad-Hamza A, Beddiar A, Gollotte A, Lemoine MC, Kuszala C, Gianinazzi S. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. *African Journal of Biotechnology* 9:1159–1167.
- Meharg AA, Cairney JWG. (1999). Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Advances in Environmental Research* 30:69–112.
- Menoyo E, Becerra AG, Renison D. (2007). Mycorrhizal associations in *Polylepis* woodlands of Central Argentina. *Canadian Journal of Botany* 85:526–531.
- Menoyo E, Renison D, Becerra AG. (2009). Arbuscular mycorrhizas and performance of *Polylepis australis* trees in relation to livestock density. *Forest Ecology and Management* 258:2676–2682.
- Merryweather J, Fitter AH. (1998). The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta* II . Seasonal and spatial patterns of fungal populations. *New Phytologist* 138:131–142.
- Miller RM, Miller SP, Jastrow JD, Rivetta CB. (2002). Mycorrhizal mediated feedbacks influence net carbon gain and nutrient uptake in *Andropogon gerardii*. *New Phytologist* 155:149–162.
- Miransari M, Bahrami HA, Rejali F, Malakouti MJ. (2009). Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil and Tillage Research* 103:282–290.
- Morton JB, Redecker D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181–195.
- Nadian H, Smith SE, Alston AM, Murray RS. (1997). Effects of soil compaction on plant growth, phosphorus uptake and morphological characteristics of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of *Trifolium subterraneum*. *New Phytologist* 135:303–311.
- Neumann E, Eckhard G. (2010). Nutrient uptake: the arbuscular mycorrhiza fungal symbiosis as a plant nutrient acquisition strategy. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, Koltai H & Kapulnik Y (eds.), Springer Netherlands, pp. 137–167.
- Newsham KK, Fitter AH, Watkinson AR. (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution* 10:407–11.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2816–2824.

Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Boller T. (2009). Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 134:257–268.

Oksanen J, Blanchet FGK, Roeland Legendre P, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. (2012). *vegan*: Community Ecology Package. Version 2.0-5. URL: <http://cran.r-project.org>, <http://vegan.r-forge.r-project.org/>.

Omar MB, Bolland L, Heather WA. (1979). P.V.A. (polivinil alcohol). A permanent mounting medium for fungi. *Bulletin of the British Mycological Society* 13:31–32.

Onguene NA, Kuyper TW. (2005). Growth response of three native timber species to soils with different arbuscular mycorrhizal inoculum potentials in South Cameroon. Indigenous inoculum and effect of addition of grass inoculum. *Forest Ecology and Management* 210:283–290.

Opik M, Moora M, Liira J, Zobel M. (2006). Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94:778–790.

Pagano MC, Scotti MR, Cabello MN. (2009). Effect of the inoculation and distribution of mycorrhizae in *Plathymenia reticulata* Benth under monoculture and mixed plantation in Brazil. *New Forests* 38:197–214.

Pagano MC, Cabello MN, Scotti MR. (2010). Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of *Eremanthus incanus* Less. in a highland field. *Plant, Soil and Environment* 9:412–418.

Phillips JM, Hayman DS. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158–161.

Picone C. (2000). Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture. *Biotropica* 32:734–750.

Pimm SL. (1984). The complexity and stability of ecosystems. *Nature* 307:321–326.

Plenchette C, Perrin R, Duvert P. (1989). The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to Endomycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* 67:112–115.

Pollice J, Marcora P, Renison D. (2013). Seed production in *Polylepis australis* (Rosaceae) as influenced by tree size, livestock and interannual climate variations in the mountains of central Argentina. *New Forests* 44:233–247.

Porras-Soriano A, Soriano-Martín ML, Porras-Piedra A, Azcón R. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *Journal of Plant Physiology* 166:1350–1359.

Pringle A, Bever JD. (2002). Divergent phenologies may facilitate the coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi in a North Carolina grassland. *American Journal of Botany* 89:1439–1446.

Pringle A, Bever JD. (2008). Analogous effects of arbuscular mycorrhizal fungi in the laboratory and a North Carolina field. *New Phytologist* 180:162–175.

R Development Core Team. (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.

Redecker D. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10:73–80.

Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB, Walker C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* doi:10.1007/s00572-013-0486-y

Renison D, Cingolani AM. (1998). Experiencias en germinación y reproducción vegetativa aplicados a la reforestación con *Polylepis australis* (Rosaceae) en las Sierras. *Agriscientia* 15:47–53.

Renison D, Cingolani AM. (2002). Evaluación de la supervivencia y crecimiento de plantines de *Polylepis australis* (Rosaceae) para la elección de plantas semilleras. *Agriscientia* 9:63–66.

Renison D, Cingolani AM, Schinner D. (2002). Optimizing restoration of *Polylepis australis* woodlands: when, where and how to transplant seedlings to the mountains? *Ecotropica* 8:219–224.

Renison D, Cingolani AM, Suarez R. (2002). Efectos del fuego sobre un bosquecillo de *Polylepis australis* (Rosaceae) en las montañas de Córdoba, Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 75:719–727.

Renison D, Hensen I, Cingolani AM. (2004). Anthropogenic soil degradation affects seed viability in *Polylepis australis* mountain forests of central Argentina. *Forest Ecology and Management* 196:327–333.

Renison D, Cingolani AM, Suarez R, Menoyo E, Coutiers C, Sobral A, Hensen I. (2005). The restoration of degraded mountain woodlands: effects of seed provenance and microsite characteristics on *Polylepis australis* seedling survival and growth in Central Argentina. *Restoration Ecology* 13:129–137.

Renison D, Hensen I, Suarez R, Cingolani AM. (2006). Cover and growth habit of *Polylepis* woodlands and shrublands in the mountains of central Argentina: human or environmental influence? *Journal of Biogeography* 33:876–887.

Renison D, Hensen I, Suarez R, Cingolani AM, Marcora P, Giorgis MA. (2010). Soil conservation in *Polylepis* mountain forests of Central Argentina: Is livestock reducing our natural capital? *Austral Ecology* 35:435–443.

Renison D, Hensen I, Suarez R. (2011). Landscape structural complexity of high-mountain *Polylepis australis* forests: a new aspect of restoration goals. *Restoration Ecology* 19:390–398.

Renison D, Cuyckens GAE, Pacheco S, Guzmán GF, Grau HR, Marcora P, Robledo G, Cingolani AM, Dominguez J, Landi M, Bellis L, Hensen I. (2013). Distribución y estado de conservación de las poblaciones de árboles y arbustos del género *Polylepis* (Rosaceae) en las montañas de Argentina. *Ecologia Austral* 23:27–36.

Riley R, Corradi N. (2013). Searching for clues of sexual reproduction in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 6:44–49.

Rillig MC. (2004). Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters* 7:740–754.

Rillig MC, Wright SF, Eviner VT. (2002). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* 238:325–333.

Robinson-Boyer L, Grzyb I, Jeffries P. (2009). Shifting the balance from qualitative to quantitative analysis of arbuscular mycorrhizal communities in field soils. *Fungal Ecology* 2:1–9.

Robledo G, Urcelay C, Dominguez L, Rajchenberg M. (2006). Taxonomy, ecology, and biogeography of polypores (Basidiomycetes) from Argentinian *Polylepis* woodlands. *Canadian Journal of Botany* 84:1561–1572.

Robledo GL, Renison D. (2010). Wood-decaying polypores in the mountains of central Argentina in relation to *Polylepis* forest structure and altitude. *Fungal Ecology* 3:178–184.

Rosendahl S. (2008). Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178:253–66.

Salgado Salomón ME, Barroetaveña C, Rajchenberg M. (2010). Do pine plantations provide mycorrhizal inocula for seedlings establishment in grasslands from Patagonia, Argentina? *New Forests* 41:191–205.

Schenk NC, Perez Y. (1990). Manual of identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Gainesville, USA, 286 pp.

Schmidt-Lebuhn AN, Kessler M, Kumar M. (2013). Promiscuity in the Andes: species relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) based on AFLP and morphology. *Systematic Botany* 31:547–559.

Schnitzer SA, Klironomos JN, HilleRisLambers J, Kinkel LL, Reich PB, Xiao K, Rillig MC, Sikes BA, Callaway RM. (2011). Soil microbes drive the classic plant diversity-productivity pattern. *Ecology* 92:296–303.

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

Schüßler A, Walker C. (2010). The Glomeromycota: A species list with new families and new genera. Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University, 58 pp. URL <http://www.amf-phylogeny.com>.

Seltmann P, Leyer I, Renison D, Hensen I. (2006). Variation of seed mass and its effects on germination in *Polylepis australis*: implications for seed collection. *New Forests* 33:171–181.

Sene G, Thiao M, Manga A, Kane A, Samba-Mbaye R, Samba-Mbaye M, Khasa D, Sylla SN. (2012). Arbuscular mycorrhizal soil infectivity and spores distribution across plantations of tropical, subtropical and exotic tree species: a case study from the forest reserve of Bandia, Senegal. *African Journal of Ecology* 50:218–232.

Simpson BB. (1979). A revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). Número 43. Smithsonian Institution Press: Washington, 66 pp.

Smith S. E., Read D. (2008). Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press: Great Britain, 815 pp.

Smith S E, Smith FA. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* 62:227–50.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* 133:16–20.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. (2004). Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162:511–524.

Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology* 156:1050–7.

Soteras F, Becerra A, Cofré N, Bartoloni J, Cabello M. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungal species in saline environments of Central Argentina: seasonal variation and distribution of spores at different soil depths. *Sydowia* 64:301–311.

Soteras F, Renison D, Becerra AG. (2013). Growth response, phosphorus content and root colonization of *Polylepis australis* Bitt. seedlings inoculated with different soil types. *New Forests* 44:577–589.

Stürmer SL, Siqueira JO. (2011). Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in western Brazilian Amazon. *Mycorrhiza* 21:255–267.

Stürmer SL, Filho OK, De Queiroz H, De Mendonça MM. (2006). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of early stages of a secondary succession of atlantic forest in South Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 20:513–521.

Suarez ML, Renison D, Marcora P, Hensen I. (2008). Age–size–habitat relationships for *Polylepis australis*: dealing with endangered forest ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 17:2617–2625.

Sýkorová Z, Ineichen K, Wiemken A, Redecker D. (2007). The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18:1–14.

Teich I, Cingolani AM, Renison D, Hensen I, Giorgis MA. (2005). Do domestic herbivores retard *Polylepis australis* Bitt. woodland recovery in the mountains of Cordoba, Argentina? *Forest Ecology and Management* 219:229–241.

Tommerup IC. (1983). Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 81:381–387.

Torres R, Renison D, Hensen I, Suarez R, Enrico L. (2008). *Polylepis australis*' regeneration niche in relation to seed dispersal, site characteristics and livestock density. *Forest Ecology and Management* 254:255–260.

Turjaman M, Tamai Y, Sitepu IR, Santoso E, Osaki M, Tawaraya K. (2008). Improvement of early growth of two tropical peat-swamp forest tree species *Ploiarium alternifolium* and *Calophyllum hosei* by two arbuscular mycorrhizal fungi under greenhouse conditions. *New Forests* 36:1–12.

Uibopuu A, Moora M, Saks Ü, Daniell T, Zobel M, Öpik M. (2009). Differential effect of arbuscular mycorrhizal fungal communities from ecosystems along management gradient on the growth of forest understorey plant species. *Soil Biology and Biochemistry* 41:2141–2146.

UNEP-WCMC. (2004). United Nations Environment Programme, World Conservation Monitoring Center, URL <http://www.unep-wcmc.org/>.

Urgiles N, Loján P, Aguirre N, Blaschke H, Günter S, Stimm B, Kottke I. (2009). Application of mycorrhizal roots improves growth of tropical tree seedlings in the nursery: a step towards reforestation with native species in the Andes of Ecuador. *New Forests* 38:229–239.

Vandenkoornhuysen P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPW. (2003). Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12:3085–3095.

- Velázquez S, Cabello M. (2011). Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from El Palmar National Park soils. *European Journal of Soil Biology* 47:230–235.
- Veresoglou SD, Menexes G, Rillig MC. (2012). Do arbuscular mycorrhizal fungi affect the allometric partition of host plant biomass to shoots and roots? A meta analysis of studies from 1990 to 2010. *Mycorrhiza* 22:227–235.
- Walker C, Mize W, McNabb HS. (1982). Populations of endogonaceous fungi at two populations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* 60:2518–2529.
- Wang B, Qiu Y-L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299–363.
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, Van der Putten WH, Wall DH. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304:1629–1633.
- White JA, Tallaksen J, Charvat I. (2008). The effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation at a roadside prairie restoration site. *Mycologia* 100:6–11.
- Zangaro W, Bononi VLR, Trufen SB. (2000). Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 16:603–622.
- Zangaro W, De Assis RL, Rostirola LV, De Souza PB, Gonçalves MC, Andrade G, Nogueira MA. (2008). Changes in arbuscular mycorrhizal associations and fine root traits in sites under different plant successional phases in southern Brazil. *Mycorrhiza* 19:37–45.
- Zangaro W, Rostirola LV, De Souza PB, De Almeida Alves R, Azevedo Marques Lescano LE, Lírio Rondina AB, Nogueira MA, Carrenho R. (2013). Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza* 23:221–233.
- Zhang Y, Guo L-D, Liu R-J. (2004). Survey of arbuscular mycorrhizal fungi in deforested and natural forest land in the subtropical region of Dujiangyan, southwest China. *Plant and Soil* 261:257–263.