

Anatomical description of the arbuscular mycorrhizal fungi colonization in two tree legumes

Descripción anatómica de la colonización de hongos micorrízicos arbusculares en dos leguminosas arbóreas

Solenny M. Parra-Rivero*; Norberto M. Maciel-De Sousa; María E. Sanabria-Chopite; Juan Pineda†

Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Decanato de Agronomía, Posgrado de Agronomía, Calle 1 entre Av. General Patiño y Redoma de Agua Viva. Cabudare, Lara, Venezuela.

*Corresponding author: solennyparra@ucla.edu.ve, tel.: +58 251 259 2581

Abstract

Introduction: The arbuscular mycorrhizal association is the symbiosis between fungi and the roots of plants, which contributes to maintaining ecosystems in a sustainable manner.

Objectives: To describe the colonization of three arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculated in two tree legumes and to determine the morphological type of the symbiotic association.

Materials and methods: The seeds of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. and *Platymiscium diadelphum* S. F. Blake were inoculated with three pure strains of AMF: *Rhizophagus manihotis* (R. H. Howeler, Sieverd. & N. C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler, *Funneliformis mosseae* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler y *Scutellospora heterogama* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F. E. Sanders. At 105 days, the secondary roots were sampled, clarified and stained with acid fuchsin and trypan blue. The fungal structures were observed under an optical microscope and the colonization percentage was determined.

Results and discussion: The colonization of the AMF was greater than 60 %. Thin, transparent and cenocytic hyphae, as well as hylopodia and arbuscules, were observed. In *P. dulce*, *S. heterogama* tends to produce more arbuscules. In *P. diadelphum*, the percentages of colonization and fungal structures of the AMF were similar. The morphological association in the two arboreal species was mainly from the Paris type, with occasional presence of the type Arum.

Conclusion: The inocula of the AMF established high symbiotic association with the legumes studied. The applied techniques evidenced the structures of the AMF inside the root and allowed to identify the morphological association of the symbionts.

Keywords: *Pithecellobium dulce*; *Platymiscium diadelphum*; *Rhizophagus manihotis*; *Funneliformis mosseae*; *Scutellospora heterogama*; symbiosis.

Resumen

Introducción: La asociación micorrízica arbuscular es la simbiosis entre un hongo y las raíces de las plantas, la cual contribuye a mantener los ecosistemas de manera sostenible.

Objetivos: Describir la colonización de tres hongos micorrízicos arbusculares (HMA) inoculados en dos leguminosas arbóreas y determinar el tipo morfológico de la asociación simbiótica.

Materiales y métodos: Las semillas de *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. y *Platymiscium diadelphum* S. F. Blake se inocularon con tres cepas puras de HMA: *Rhizophagus manihotis* (R. H. Howeler, Sieverd. & N. C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler, *Funneliformis mosseae* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler y *Scutellospora heterogama* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F. E. Sanders. A los 105 días, las raíces secundarias se muestrearon, clarificaron y tiñeron con fucsina ácida y azul de tripán. Las estructuras fúngicas se observaron en microscopio óptico y se determinó el porcentaje de colonización.

Resultados y discusión: La colonización de los HMA fue mayor de 60 %. Se observaron hifas delgadas, transparentes y cenocíticas, así como hifopodios y arbusculos. En *P. dulce*, *S. heterogama* tiende a producir mayor cantidad de arbusculos. En *P. diadelphum*, los porcentajes de colonización y estructuras fúngicas de los HMA fueron similares. La asociación morfológica en las dos especies arbóreas fue principalmente de tipo Paris, con presencia ocasional del tipo Arum.

Conclusión: Los inóculos de los HMA establecieron alta asociación simbiótica con las leguminosas estudiadas. Las técnicas aplicadas evidenciaron las estructuras de los HMA en el interior de la raíz y permitieron identificar la asociación morfológica de los simbioses.

Palabras clave: *Pithecellobium dulce*; *Platymiscium diadelphum*; *Rhizophagus manihotis*; *Funneliformis mosseae*; *Scutellospora heterogama*; simbiosis.

Introduction

The arbuscular mycorrhizal association is a symbiosis between fungi and the root system of plants. It is a biotrophic, harmonious and non-pathogenic interaction that contributes to maintain ecosystems in a sustainable manner (Bonfante & Genre, 2012; Scheublin & van der Heijden, 2006). The described symbiosis is mutualistic, where both organisms benefit from a reciprocal exchange of minerals and organic resources (Cuenca, Cáceres, Oirdobro, Hasmy, & Urdaneta, 2007) to improve the nutritional status of the parties involved.

Mycorrhizal fungi facilitate the absorption of nutrients that are hardly available to plants (Ortas, 2009; van der Heijden & Scheublin, 2007); in addition, they favor osmotic adjustment during periods of stress due to a lack of moisture in the soil (Augé et al., 2004). On the other hand, fungi require the host plant to complete the life cycle. This is how the plant controls the colonization and formation of arbuscules according to their needs, regulates their defense mechanisms and initiates a communication process preparing the cells of the root cortex to receive the symbiote (Schmitz & Harrison, 2014). As colonization progresses through the root, the fungal structures develop into two types of association called *Arum* and *Paris*. In the first, the hypha grows intercellularly in the cortex, longitudinally to this tissue and penetrates with short branches in the cells forming arbuscules in its interior. In the *Paris* type, the intracellular coiled hyphal; it does not always originate arbuscules capable of interacting with the cytoskeleton. In this way, the hypha remains separated from the cytoplasm of the host cell by a matrix at the interface formed in the apoplastic compartment, similar to the type *Arum* (Kubota, McGonigle, & Hyakumachi, 2005).

Smith and Smith (1997) determined the type of association between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants, showing that the *Paris* type prevailed in 41 botanical families, while in another 30 families the type *Arum* was present; in addition, they found intermediate types in 21 families, among them, the Fabaceae. It has been reported that individuals of this botanical family are able to establish symbiotic relationships with various organisms, both with the AMF and with the bacteria responsible for fixing nitrogen (Zhu, Riely, Burns, & Ané, 2006). The triple symbiotic relationship plant-fungi-bacteria guarantees greater efficiency to the legumes, increasing their biological importance (Scotti & Corrêa, 2004).

The tree species *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. and *Platymiscium diadelphum* S. F. Blake are native plants capable of withstanding the adverse conditions that characterize the semiarid zone of Lara, Venezuela.

Introducción

La asociación micorrízica arbuscular es una simbiosis entre un hongo y el sistema de raíces de las plantas. Es una interacción biotrófica, armoniosa y no patogénica, que contribuye a mantener los ecosistemas de manera sostenible (Bonfante & Genre, 2012; Scheublin & van der Heijden, 2006). La simbiosis descrita es mutualista, donde ambos organismos se benefician de un intercambio recíproco de minerales y recursos orgánicos (Cuenca, Cáceres, Oirdobro, Hasmy, & Urdaneta, 2007) para mejorar el estatus nutricional de las partes involucradas.

Los hongos micorrízicos facilitan la absorción de nutrientes que se encuentran difícilmente disponibles para las plantas (Ortas, 2009; van der Heijden & Scheublin, 2007); además, favorecen el ajuste osmótico durante periodos de estrés por escasez de humedad en el suelo (Augé et al., 2004). En contraparte, el hongo requiere a la planta hospedante para completar el ciclo de vida. Es así como la planta controla la colonización y formación de arbusculos de acuerdo con sus necesidades, regula sus mecanismos de defensa e inicia un proceso de comunicación preparando a las células de la corteza de la raíz para recibir al simbiote (Schmitz & Harrison, 2014). A medida que la colonización avanza a través de la raíz, las estructuras fúngicas se desarrollan en dos tipos de asociación denominadas *Arum* y *Paris*. En la primera, la hifa crece intercelularmente en la corteza, en sentido longitudinal a este tejido y penetra con cortas ramificaciones en las células formando arbusculos en su interior. En el tipo *Paris*, la hifa intracelular se enrolla formando espirales; no siempre origina arbusculos capaces de interactuar con el citoesqueleto. De esta manera, la hifa permanece separada del citoplasma de la célula del hospedante por una matriz en la interfase formada en el compartimiento apoplástico, similar al tipo *Arum* (Kubota, McGonigle, & Hyakumachi, 2005).

Smith y Smith (1997) determinaron el tipo de asociación entre los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las plantas, evidenciando que prevaleció el tipo *Paris* en 41 familias botánicas, mientras que en otras 30 estuvo presente el tipo *Arum*; además, encontraron tipos intermedios en 21 familias, entre éstas, las fabáceas. Se ha reportado que los individuos de esta familia botánica son capaces de establecer relaciones simbióticas con diversos organismos, tanto con los HMA como con las bacterias encargadas de fijar nitrógeno (Zhu, Riely, Burns, & Ané, 2006). La triple relación simbiótica planta-hongo-bacteria garantiza mayor eficiencia a las leguminosas, incrementando su importancia biológica (Scotti & Corrêa, 2004).

Las especies arbóreas *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. y *Platymiscium diadelphum* S. F. Blake son plantas

The fresh seeds of *P. dulce* and *P. diadelphum* reach emergency values of 91 and 78 %, respectively, which increases their potential to include them in urban landscape and with ecological and economic benefits, such as the production of excellent quality wood in the case of oak (Parra, Sanabria, & Maciel, 2011). A strategy that guarantees the survival of tree species, given the stress conditions of transplanting and establishment in urban wooded areas, is the inoculation with AMF at the initial stages in nursery.

The objectives of the present study were to describe the colonization of the AMF *Rhizophagus manihotis* (R. H. Howeler, Sieverd. & N. C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler, *Funnelformis mosseae* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler and *Scutellospora heterogama* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F. E. Sanders, inoculated in plants of yacure (*P. dulce*) and oak (*P. diadelphum*), trees adapted to semiarid conditions; and determine the morphological type of the symbiotic association.

Materials and methods

The experiments were carried out in the facilities of the Posgrado del Decanato de Agronomía of the Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (10° 01' 30" N, 69° 16' 30" W and 500 m) located in Cabudare, in the municipality of Palavecino in the state of Lara, Venezuela. The annual precipitation of the place is 662 mm with average annual temperature of 24.9 °C.

The mature fruits of *P. dulce* and *P. diadelphum* were collected from 12 and 25 years old adult trees, respectively, which are located in the facilities of the institution. The fruits were processed to select seeds based on size, degree of formation, coloration, absence of malformations and apparent symptoms of diseases. In containers designed to produce forest trees, substrate with mixture of coconut sawdust, rice husk and sandy loam (1: 1: 1) pasteurized was added. The substrate was placed until completing 70 % of the available volume of the cell; each one with 30 g of granulated inoculum of AMF, conforming the following treatments: *R. manihotis* (T1), *F. mosseae* (T2) and *S. heterogama* (T3). A seed was sown in each container. The pure strains of AMF were provided by the Unidad Micoven of the Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

The design of experiments was completely random; each treatment consisted of 40 experimental units. At 105 days after sowing (das), the secondary roots of 20 plants, selected at random, were subjected to the clarification process with the methodology of Phillips and Hayman (1970). The roots were divided into two groups and stained with acid fuchsin and trypan blue.

autóctonas capaces de soportar las condiciones adversas que caracterizan a la zona semiárida del estado Lara, Venezuela. Las semillas frescas de *P. dulce* y *P. diadelphum* alcanzan valores de emergencia de 91 y 78 %, respectivamente, lo que amplía su potencial para incluirlos en el paisajismo urbano y con beneficios ecológicos y económicos, tal como la producción de madera de excelente calidad en el caso del roble (Parra, Sanabria, & Maciel, 2011). Una estrategia que garantiza la sobrevivencia de las especies arbóreas, ante las condiciones de estrés del trasplante y establecimiento en el arbolado urbano, es la inoculación con HMA en fases iniciales en vivero.

Los objetivos del presente trabajo fueron describir la colonización de los HMA *Rhizophagus manihotis* (R. H. Howeler, Sieverd. & N. C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler, *Funnelformis mosseae* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler y *Scutellospora heterogama* (T. H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & F. E. Sanders, inoculados en plantas de yacure (*P. dulce*) y roble (*P. diadelphum*), árboles adaptados a condiciones del semiárido; y determinar el tipo morfológico de la asociación simbiótica.

Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Posgrado del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (10° 01' 30" LN, 69° 16' 30" LO y 500 m) ubicado en Cabudare, en el municipio Palavecino del estado Lara, Venezuela. La precipitación anual del lugar es 662 mm con temperatura media anual de 24.9 °C.

Los frutos maduros de *P. dulce* y *P. diadelphum* se colectaron de árboles adultos de 12 y 25 años, respectivamente, los cuales están ubicados en las instalaciones de la institución. Los frutos se procesaron para seleccionar semillas con base en el tamaño, grado de formación, coloración, ausencia de malformaciones y síntomas aparentes de enfermedades. En tubetes diseñados para producir árboles forestales se agregó sustrato, producto de la mezcla de aserrín de coco, cáscara de arroz y suelo franco arenoso (1:1:1) pasteurizado. El sustrato se colocó hasta completar 70 % del volumen disponible de la celda; en cada una se adicionaron 30 g de inóculo granulado de HMA conformando los siguientes tratamientos: *R. manihotis* (T1), *F. mosseae* (T2) y *S. heterogama* (T3). Una semilla se sembró en cada tubete. Las cepas puras de HMA fueron proporcionadas por la Unidad Micoven del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

El diseño de experimentos fue completamente al azar; cada tratamiento estuvo conformado por 40 unidades experimentales. A los 105 días después de la siembra

The percentage of colonization in the roots was determined with the methodology proposed by McGonigle, Hiller, Evans, Fairchild, and Swan (1990); the thinnest ones (<1 mm) were chosen and separated into 1 cm long sections. The roots were placed on the slide in vertical position. Colonization was described through observations with an optical microscope (Olympus CX21, China) of 400x and 1000x magnification. The mycorrhizal structures (hyphae, arbuscules and vesicles) were quantified by the following formulas:

Colonization (%): [colonized segments (cm)/(uncolonized segment (cm) + colonized segment (cm)) * 100

Colonization by hyphae (%): (number of segments with hyphae/number of total segments) * 100

Colonization by arbuscules (%): (number of segments with arbuscules/number of total segments) * 100

Colonization by vesicles (%): (number of segments with vesicles/number of total segments) * 100

The stained roots were cross-sectioned by freehand. Fungal structures were described in each segment and section. The information was necessary to define the morphological type of the association.

Statistical analysis

The colonization percentage data was analyzed by analysis of variance after checking the statistical assumptions of the completely random design, using the program Statistix version 8.0. (Analytical Software, 2003). Subsequently a comparison of means was made with the Dunnet test ($P \leq 0.05$).

Results and discussion

Pithecellobium dulce

Colonization of arbuscular mycorrhizal fungi at 105 days after sowing

Table 1 shows the results of colonization and development of AMF structures in *P. dulce*. At 105 das, *R. manihotis* colonized 80.36 % of the roots and developed 79.40 % of hyphae and 47.60 % of arbuscules; *F. mosseae* colonized 61.38 % and generated 61.05 % of hyphae and 31.57 % of arbuscules; while *S. heterogama* had approximately the same percentage of colonization, hyphae and arbuscules (59 %). The analysis of variance detected significant differences ($P < 0.05$) between at least a pair of means of the treatments inoculated when estimating the variables mentioned above, being *R. manihotis* (T_1) the one with highest percentage of

(dds), las raíces secundarias de 20 plantas, seleccionadas al azar, se sometieron al proceso de clarificación con la metodología de Phillips y Hayman (1970). Las raíces se dividieron en dos grupos y se tiñeron con fucsina ácida y azul de tripán.

El porcentaje de colonización en las raíces se determinó con la metodología propuesta por McGonigle, Hiller, Evans, Fairchild, y Swan (1990); se eligieron las más delgadas (< 1 mm) y se separaron en secciones de 1 cm de largo. Las raíces se colocaron sobre la lámina portaobjeto en posición vertical. La colonización se describió a través de observaciones con un microscopio óptico (Olympus CX21, China) de 400x y 1000x de aumento. Las estructuras micorrízicas (hifas, arbuscúlos y vesículas) se cuantificaron mediante las siguientes fórmulas:

Colonización (%): [segmentos colonizado (cm) / (segmento no colonizado (cm) + segmento colonizado (cm)) * 100

Colonización por hifas (%): (número de segmentos con hifas/número de segmentos totales) * 100

Colonización por arbuscúlos (%): (número de segmentos con arbuscúlos/número de segmentos totales) * 100

Colonización por vesículas (%): (número de segmentos con vesículas/número de segmentos totales) * 100

Las raíces teñidas se seccionaron transversalmente a mano alzada. En cada segmento y sección se describieron las estructuras de los hongos. La información fue necesaria para definir el tipo morfológico de la asociación.

Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de colonización se analizaron mediante análisis de varianza después de comprobar los supuestos estadísticos del diseño completamente al azar, en el programa Statistix versión 8.0. (Analytical Software, 2003). Posteriormente se hizo una comparación de medias con la prueba de Dunnet ($P \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Pithecellobium dulce

Colonización de los hongos micorrízicos arbusculares a los 105 días después de la siembra

El Cuadro 1 muestra los resultados de colonización y desarrollo de estructuras de los HMA en *P. dulce*. A los 105 dds, *R. manihotis* colonizó 80.36 % de las raíces y desarrolló 79.40 % de hifas y 47.60 % de arbuscúlos;

colonization and hyphae. The production of arbuscules and vesicles was statistically similar ($P > 0.05$) in *R. manihotis* and *S. heterogama*. *Rhizophagus manihotis* and *F. mosseae* had 18.91 and 15.95 % intra-radicular vesicles, respectively. It should be noted that *S. heterogama* does not produce them (González & Cuenca, 2008). The vesicles are indicative of the end of the development of mycorrhizal fungi when colonizing the roots (Bonfante & Genre, 2012), so that it is inferred that *R. manihotis* and *F. mosseae* kept growing actively.

The highest percentage of colonization corresponded to the treatment where *R. manihotis* (80.36 %) was inoculated. In the case of *F. mosseae* and *S. heterogama*, although they were inferior to those of T1 (61.38 and 59.58 %, respectively), they exceeded the value indicated by Habte, Fox, Aziz, and El-Swaify (1988) for *L. leucocephala* 'K8', inoculated with *Glomus aggregatum* N. C. Schenck & G. S. Sm. (30 % colonization). This suggests that the spores used in the tests had adequate conditions for germination and, as indicated by these authors, the fungi behaved like good colonizers. The results demonstrated the affinity between AMF and *P. dulce*, a species belonging to the fabaceae, which coincided with the results obtained by Patreze and Cordeiro (2005), who indicated 24.72, 42.25 and 15.35 % of colonization of native mycorrhizal fungi in *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Inga laurina* (Sw.) Willd. and *Platypodium elegans* Vogel, respectively. The values superior to 50 % of colonization, in mycorrhizal relations, favor the ecological succession and level of survival, as indicate by Kumar, Raghuwanshi, and Upadhyay (2003) in *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth., *A. catechu* (Willd.) Wight & Arn., *A. procera* (Roxb.) Willd., *A. nilotica* (L.) Delile, *Albizia lebbeck* (L.) Benth., *Prosopis juliflora* (SW) DC., *Pongamia pinnata* (L.) Pierre, *Dalbergia sissoo* Roxb. ex DC. and *Tamarindus indica* species of the Fabaceae family.

F. mosseae colonizó 61.38 % y generó 61.05 % de hifas y 31.57 % de arbusculos; mientras que *S. heterogama* tuvo aproximadamente el mismo porcentaje de colonización, hifas y arbusculos (59 %). El análisis de varianza detectó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre al menos un par de medias de los tratamientos inoculados al estimar las variables mencionadas anteriormente, siendo *R. manihotis* (T₁) quien produjo mayor porcentaje de colonización e hifas. La producción de arbusculos y vesículas fue estadísticamente similar ($P > 0.05$) en *R. manihotis* y *S. heterogama*. *Rhizophagus manihotis* y *F. mosseae* tuvieron 18.91 y 15.95 % de vesículas intrarradicales, respectivamente. Cabe destacar que *S. heterogama* no las produce (González & Cuenca, 2008). Las vesículas son indicativos de la finalización del desarrollo del hongo micorrízico al colonizar las raíces (Bonfante & Genre, 2012), de manera que se infiere que *R. manihotis* y *F. mosseae* se mantuvieron creciendo activamente.

El mayor porcentaje de colonización correspondió al tratamiento donde se inoculó *R. manihotis* (80.36 %). En el caso de *F. mosseae* y *S. heterogama*, aunque fueron inferiores a los de T1 (61.38 y 59.58 %, respectivamente), superaron el valor señalado por Habte, Fox, Aziz, y El-Swaify (1988) para *L. leucocephala* 'K8', inoculada con *Glomus aggregatum* N. C. Schenck & G. S. Sm. (30 % de colonización). Lo planteado permite inferir que las esporas utilizadas en los ensayos tuvieron condiciones adecuadas para la germinación y, tal cual lo señalaron dichos autores, los hongos se comportaron como buenos colonizadores. Los resultados demostraron la afinidad entre los HMA y *P. dulce*, especie perteneciente a las fabáceas, lo cual coincidió con los resultados obtenidos por Patreze y Cordeiro (2005), quienes indicaron 24.72, 42.25 y 15.35 % de colonización de hongos micorrízicos nativos en *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Inga laurina* (Sw.) Willd. y *Platypodium elegans* Vogel,

Table 1. Colonization and structures of arbuscular mycorrhizal fungi inoculated in *Pithecellobium dulce*. The fungal structures were quantified in root segments at 105 days after sowing.

Cuadro 1. Colonización y estructuras de hongos micorrízicos arbusculares inoculados en *Pithecellobium dulce*. Las estructuras fúngicas se cuantificaron en segmentos de raíces a los 105 días después de la siembra.

Treatments / Tratamientos	Colonization (%) / Colonización (%)	Hyphas (%) / Hifas (%)	Arbuscules (%) / Arbusculos (%)	Vesicles (%) / Vesículas (%)
<i>Rhizophagus manihotis</i>	80.36 ± 2.62 a	79.40 ± 2.85 a	47.60 ± 3.67 a	18.91 ± 2.25 a
<i>Funneliformis mosseae</i>	61.38 ± 2.91 b	61.05 ± 3.01 b	31.57 ± 1.88 b	15.95 ± 2.67 a
<i>Scutellospora heterogama</i>	59.98 ± 3.81 b	59.38 ± 3.90 b	59.38 ± 2.33 a	0 a
Coefficient of variation (%) / Coeficiente de variación (%)	12.26	12.74	17.08	19.03

Means with different letter in each column differ significantly according to the Dunnet test ($P \leq 0.05$).

Medias con diferente letra en cada columna difieren significativamente según la prueba de Dunnet ($P \leq 0.05$).

With respect to the percentage of arbuscules, the fluctuation between the treatments with *R. manihotis*, *F. mosseae* and *S. heterogama* in *P. dulce* is justified, since these structures are short-lived, with seasonal occurrence and formation sensitive to variation of environmental factors and physiological metabolism of the host plant (Alexander, Meier, Toth, & Weber, 1988).

On the other hand, the low percentage of vesicles determined in this study (18.95 and 15.95 % for *R. manihotis* and *F. mosseae*, respectively) is explained by the fact that the formation of these storage structures depends on the type of mycorrhizal fungi, of its development within the root and environmental factors (Hawley & Dames, 2004; Kumar et al., 2003).

Anatomy of arbuscular mycorrhizal fungi colonization

Figure 1 illustrates the colonization of the arbuscular mycorrhizal fungi *R. manihotis* (A and E), *S. heterogama* (B and G) and *F. mosseae* (C, D and F). The colonization in *P. dulce* was evidenced in the terminal roots, maintaining the integrity of the cortical cells. The hyphae formed thickened hifopodia, which were the means of penetration through or between the rhizodermal cells (Figure 1B). These observations coincided with those described by Garriock, Petersonm, and Ackerley (1989), who considered that these structures are similar to those of pathogenic fungi. The inter and intracellular hyphae developed from the penetration points (Figures 1B and 1D) in circumferential and longitudinal directions, crossing the cortical parenchyma, without reaching the vascular cylinder (Figures 1F and 1G).

According to the development of the intraradical mycelium, the morphological behavior observed in *P. dulce* was intermediate between *Arum* (Figures 1A, 1B and 1F) and *Paris* (Figures 1C and 1D). During the first phase of colonization, the second morphological type was predominant in the circumferential direction, since the fungal symbiont propagated in the cortical parenchyma by means of intracellular hyphae of considerable thickness (Figure 1F); subsequently, arbuscules were formed as terminal structures within the cells, in addition to intercellular spirals (Figure 1C). The arbuscular interfaces in *Arum* and *Paris* were similar. In the arbuscules, the trunk or base could be distinguished, while the ends were divided dichotomically (Figure 1E). These results coincided with those reported by Shi, Chen, Feng, Liu, and Christie (2006) in species of *Meliaceae*, and with those of Armstrong and Peterson (2002) in *Panax quinquefolius* L. Although the function of hyphae rolled into the type *Paris* is still uncertain, Cavagnaro, Smith, Ayling, and Smith (2003) stated that they provide an interfacial area as wide as arbuscules, which could be related to

respectivamente. Los valores superiores a 50 % de colonización, en relaciones micorrízicas, favorecen la sucesión ecológica y nivel de sobrevivencia, tal cual lo señalan Kumar, Raghuwanshi, y Upadhyay (2003) en *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth., *A. catechu* (Willd.) Wight & Arn., *A. procera* (Roxb.) Willd., *A. nilotica* (L.) Delile, *Albizia lebbeck* (L.) Benth., *Prosopis juliflora* (SW) DC., *Pongamia pinnata* (L.) Pierre, *Dalbergia sissoo* Roxb. ex DC. y *Tamarindus indica* (L.), especies de la familia *Fabaceae*.

Con respecto al porcentaje de arbúsculos, la fluctuación entre los tratamientos con *R. manihotis*, *F. mosseae* y *S. heterogama* en *P. dulce* se justifica, ya que estas estructuras son de vida corta, con ocurrencia estacional y de formación sensible a la variación de los factores ambientales y metabolismo fisiológico de la planta hospedante (Alexander, Meier, Toth, & Weber, 1988).

Por otra parte, el bajo porcentaje de vesículas determinado en este estudio (18.95 y 15.95 % para *R. manihotis* y *F. mosseae*, respectivamente) se explica por el hecho de que la formación de estas estructuras de almacenamiento depende del tipo de hongo micorrízico, de su desarrollo dentro de la raíz y de los factores ambientales (Hawley & Dames, 2004; Kumar et al., 2003).

Anatomía de la colonización de los hongos micorrízicos arbusculares

La Figura 1 ilustra la colonización de los hongos micorrízicos arbusculares *R. manihotis* (A y E), *S. heterogama* (B y G) y *F. mosseae* (C, D y F). La colonización en *P. dulce* se evidenció en las raíces terminales, manteniéndose la integridad de las células corticales. Las hifas formaron hifopodios engrosados, los cuales fueron el medio de penetración a través o entre las células rizodérmicas (Figura 1B). Estas observaciones coincidieron con las descritas por Garriock, Petersonm, y Ackerley (1989), quienes consideraron que dichas estructuras son similares a las de los hongos patogénicos. Las hifas inter e intracelulares se desarrollaron desde los puntos de penetración (Figuras 1B y 1D) en sentidos de dirección circumferencial y longitudinal, recorriendo el parénquima cortical, sin llegar al cilindro vascular (Figuras 1F y 1G).

De acuerdo con el desarrollo del micelio intraradical, el comportamiento morfológico observado en *P. dulce* fue intermedio entre el tipo *Arum* (Figuras 1A, 1B y 1F) y *Paris* (Figuras 1C y 1D). Durante la primera fase de colonización, el segundo tipo morfológico fue predominante en sentido circumferencial, ya que el simbionte fúngico se propagó en el parénquima cortical por medio de hifas intracelulares de grosor considerable (Figura 1F); posteriormente, se formaron arbúsculos

the transfer of nutrients in plant species tolerant to environmental stress and slow growth. On the other hand, Hawley and Dames (2004) considered that the host could determine the dominant morphological type, indicating that the different structures are no more than adaptations for fungi survival.

como estructuras terminales dentro de las células, además de espirales o rulos intercelulares (Figura 1C). Las interfases arbusculares en los tipos *Arum* y *Paris* fueron similares. En los arbusculos se pudo distinguir el tronco o base, mientras que las terminaciones de los extremos se dividieron dicotómicamente (Figura 1E).

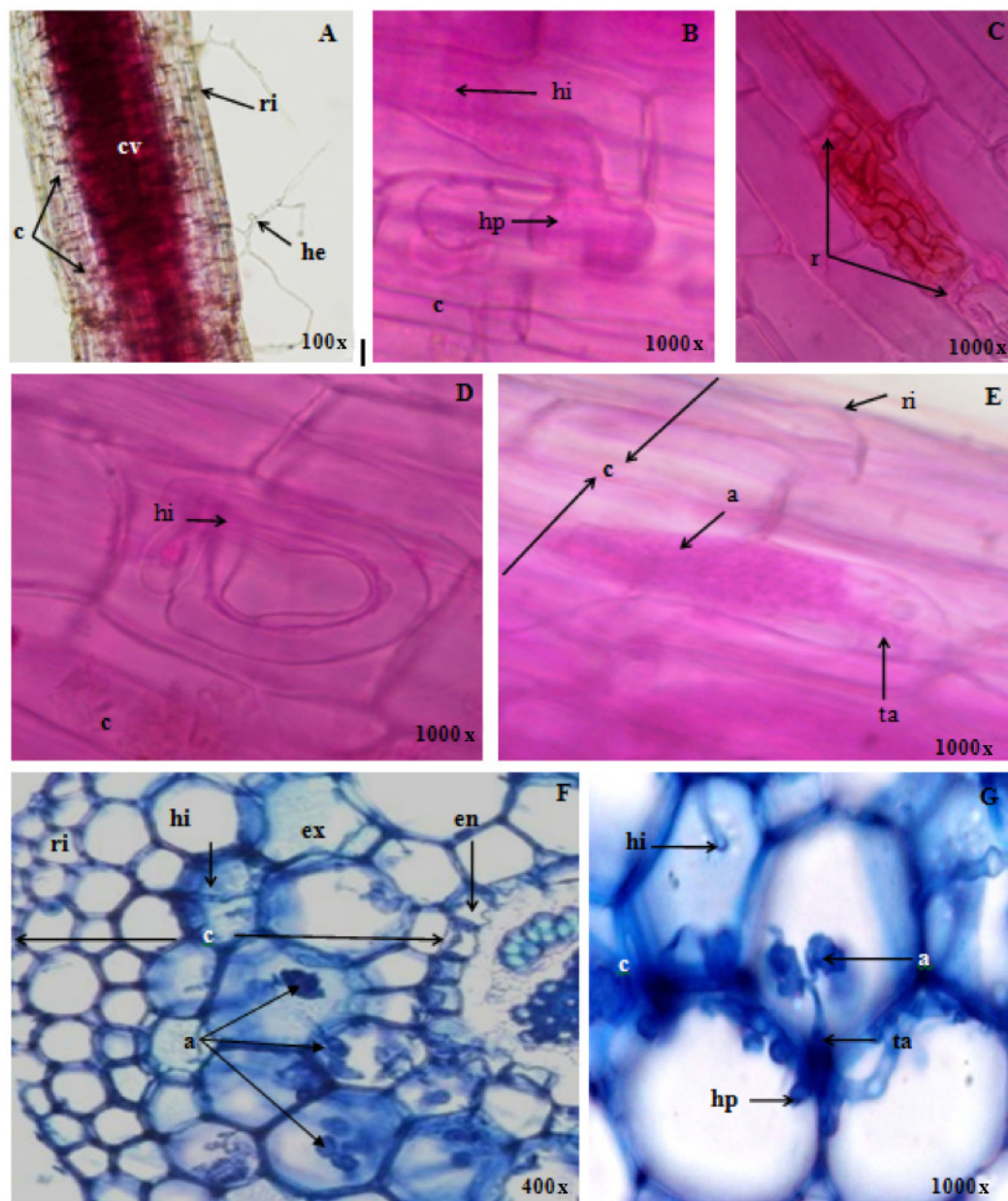


Figure 1. Colonization of the arbuscular mycorrhizal fungi *Rhizopagus manihotis* (A and E), *Scutellospora heterogama* (B and G) and *Funneliformis mosseae* (C, D and F) in pruning (A, B, C, D and E) and cross sections (F and G) of *Pithecellobium dulce* roots; where rhizodermis (ri), cortex (c), vascular cylinder (cv), extraradical hyphae (he), hifopodium (ap), intraradical hypha (hi), intracelular (r), exodermis (ex), endodermis (en), arbusculo (a) and trunk or base of the arbuscle (ta) can be observed.

Figura 1. Colonización de los hongos micorrízicos arbusculares *Rhizopagus manihotis* (A y E), *Scutellospora heterogama* (B y G) y *Funneliformis mosseae* (C, D y F) en aclarados (A, B, C, D y E) y secciones transversales (F y G) de raíces de *Pithecellobium dulce*; donde se pueden observar rizodermis (ri), corteza (c), cilindro vascular (cv), hifa extrarradical (he), hifa intrarradical (hi), rulo intracelular (r), exodermis (ex), endodermis (en), arbusculo (a) y tronco o base del arbusculo (ta).

Platymiscium diadelphum

Colonization of arbuscular mycorrhizal fungi at 105 days after sowing

Table 2 presents the results of the colonization of *R. manihotis*, *F. mosseae* and *S. heterogama* in *P. diadelphum* at 105 das. The colonization of the three AMF was greater than 90 %, being statistically similar ($P > 0.05$). The percentage of hyphae, arbuscules and vesicles was also similar in the three treatments.

The interaction and bidirectional exchange between the plant and the mycorrhizal fungi were evidenced with a satisfactory percentage of arbuscules in each treatment. The lowest value was 69.7 % in *F. mosseae*, while the highest corresponded to *R. manihotis* (85.7 %); all three treatments were statistically similar ($P > 0.05$). The importance of the presence of arbuscules lies in the fact that these structures participate directly in the transport of compounds necessary for the development of the plant and fungi (Ortas, 2009).

The percentages of intraradical vesicles were 85.7 and 12.2 for *R. manihotis* and *F. mosseae*, respectively. These values allowed to infer that the interaction between *P. diadelphum* and the inocula used if it was carried out, since the colonization was greater than 90 %. Despite the difference margins of the values, the analysis of variance ($P < 0.05$) did not detect significant differences between the variables evaluated. The low values are due to the fact that the vesicles are formed with the purpose of storing reserve substances, so they are less perceived until fungi are fully established.

Estos resultados coincidieron con los reportados por Shi, Chen, Feng, Liu, y Christie (2006) en especies de Meliaceae, y con los de Armstrong y Peterson (2002) en *Panax quinquefolius* L. Aunque la función de las hifas enrolladas en el tipo morfológico *Paris* aún es incierta, Cavagnaro, Smith, Ayling, y Smith (2003) afirmaron que estas proveen un área interfacial tan amplia como los arbusculos, lo cual podría estar relacionado con la transferencia de nutrientes en especies vegetales tolerantes a estrés ambiental y de crecimiento lento. Por su parte, Hawley y Dames (2004) consideraron que el hospedante podría determinar el tipo morfológico dominante, indicando que las diferentes estructuras no son más que adaptaciones para la sobrevivencia del hongo.

Platymiscium diadelphum

Colonización de los hongos micorrízicos arbusculares a los 105 días después de la siembra

El Cuadro 2 presenta los resultados de la colonización de *R. manihotis*, *F. mosseae* y *S. heterogama* en *P. diadelphum* a los 105 dds. La colonización de los tres HMA fue mayor de 90 %, siendo estadísticamente similar ($P > 0.05$). El porcentaje de hifas, arbusculos y vesículas también fue similar en los tres tratamientos.

La interacción e intercambio bidireccional entre la planta y el hongo micorrízico se evidenciaron con un porcentaje de arbusculos satisfactorio en cada tratamiento. El valor más bajo fue de 69.7 % en *F. mosseae*, mientras que el máximo correspondió a *R. manihotis* (85.7 %); los tres tratamientos fueron estadísticamente similares ($P > 0.05$). La importancia de la presencia de

Table 2. Colonization and structures of arbuscular mycorrhizal fungi inoculated in *Platymiscium diadelphum*. The fungal structures were quantified in root segments at 105 days after sowing.

Cuadro 2. Colonización y estructuras de hongos micorrízicos arbusculares inoculados en *Platymiscium diadelphum*. Las estructuras fúngicas se cuantificaron en segmentos de raíces a los 105 días después de la siembra.

Treatments / Tratamientos	Colonization (%) / Colonización (%)	Hyphae (%) / Hifas (%)	Arbuscules (%) / Arbusculos (%)	Vesicles (%) / Vesículas (%)
<i>Rhizopagus manihotis</i>	98.50 ± 2.75	93.50 ± 2.99	85.70 ± 3.24	85.70 ± 2.47
<i>Funneliformis mosseae</i>	92.40 ± 2.95	91.10 ± 3.07	69.70 ± 3.88	12.20 ± 3.35
<i>Scutellospora heterogama</i>	91.30 ± 2.37	88.10 ± 3.65	72.20 ± 3.83	0.0
Coefficient of variation (%) / Coeficiente de variación (%)	17.22	6.97	12.42	18.03

According to the Dunnet test, there was no significant difference ($P > 0.05$) in the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (treatments).

De acuerdo con la prueba de Dunnet, no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) en el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (tratamientos).

The results showed that the level of association of *P. diadelphum* with *R. manihotis*, *F. mosseae* and *S. heterogama* is high, regarding the classification categories proposed by Kumar et al. (2003).

The mycorrhizal relationship of *P. diadelphum* agrees with that expressed by Saslis-Lagoudakis, Chase, Robinson, Russell, and Klitgaard (2008), who determined that the success in the establishment of *Platymiscium* is due to the development of strategies to optimize development and adaptation in dry biomes, in turn Smith and Smith (1997) indicated the existence of a mycorrhizal symbiosis in the legumes of the subfamily Papilionoideae.

For individuals of the Fabaceae family, high percentages of colonization by mycorrhizal fungi have been reported. In this same sense, in a study carried out in six families of angiosperms, Fabaceae ranked third in colonization with values higher than 50 % (Ali, Mubassara, Rahman, Alam, & Khan, 2008). Similarly, Rey, Chamorro, and Ramírez (2005) determined superior colonization of 60 % when they used double inoculation with strains of rhizobia in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, while Ingleby, Wilson, and Munro (2007) reported that the arboreal fabaceae *Senna siamea* (Lam.) H. S. Irwin & Barneby, *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. and *Calliandra calothyrsus* Meisn. are highly dependent on mycorrhizae and, therefore, respond satisfactorily to inoculation. On the other hand, Sylvia, Alagely, Kent, and Mecklenburg (1998) determined that plants that grow in containers have a greater percentage of colonization than those that grow in open spaces, as observed in *Acacia farnesiana* (L.) Willd.

The percentages of arbuscules in *P. diadelphum* were high, corresponding to the moderate to very high categories according to Kumar et al. (2003), although these structures are considered short-lived (Alexander et al., 1988). Opposite situation occurred with the vesicles; the absence of these was attributed to the fact that fungi are in an active phase of development (Hawley & Dames, 2004).

The inoculation with AMF caused satisfactory results; however, there was no constant prevalence of one mycorrhizal fungus over another, although the colonization rates were high. This result allows us to infer that a host plant can interrelate with different AMF, a response that can be measured through the effects on the survival and diversity of plant species in an ecosystem (Scotti & Corrêa, 2004). It is necessary to consider the extrinsic factors of the plant (Jansa, Smith, & Smith, 2008), since the quantification of fungal structures within the root is variable.

Each fungal species has potential characteristics to establish the symbiosis, such is the case of the species

arbúsculos radica en que estas estructuras participan directamente en el transporte de compuestos necesarios para el desarrollo de la planta y el hongo (Ortas, 2009).

Los porcentajes de vesículas intrarradicales fueron 85.7 y 12.2 para *R. manihotis* y *F. mosseae*, respectivamente. Estos valores permitieron inferir que la interacción entre *P. diadelphum* y los inóculos utilizados si se llevó a cabo, ya que la colonización fue mayor de 90 %. A pesar de los márgenes de diferencia de los valores, el análisis de varianza ($P < 0.05$) no detectó diferencias significativas entre las variables evaluadas. Los valores bajos se deben a que las vesículas se forman con la finalidad de almacenar sustancias de reservas, por lo que son menos percibidas hasta que el hongo se encuentra totalmente establecido.

Los resultados demostraron que el nivel de asociación de *P. diadelphum* con *R. manihotis*, *F. mosseae* y *S. heterogama* es alto, considerando las categorías de clasificación propuestas por Kumar et al. (2003).

La relación micorrízica de *P. diadelphum* concuerda con lo expresado por Saslis-Lagoudakis, Chase, Robinson, Russell, y Klitgaard (2008), quienes determinaron que el éxito en el establecimiento de *Platymiscium* se debe al desarrollo de estrategias para optimizar su desarrollo y adaptación en biomas secos, a su vez Smith y Smith (1997) indicaron la existencia de una simbiosis micorrízica en las leguminosas de la subfamilia Papilionoideae.

Para los individuos de la familia Fabaceae se han reportado porcentajes altos de colonización por hongos micorrízicos. En este mismo sentido, en un estudio realizado en seis familias de angiospermas, Fabaceae ocupó el tercer lugar en colonización con valores superiores de 50 % (Ali, Mubassara, Rahman, Alam, & Khan, 2008). Del mismo modo, Rey, Chamorro, y Ramírez (2005) determinaron colonización superior de 60 % cuando emplearon la doble inoculación con cepas de rizobios en *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, mientras que Ingleby, Wilson, y Munro (2007) señalaron que las fabáceas de porte arbóreo *Senna siamea* (Lam.) H. S. Irwin & Barneby, *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. y *Calliandra calothyrsus* Meisn. son altamente dependientes de las micorrizas y, por consiguiente, responden satisfactoriamente a la inoculación. Por su parte, Sylvia, Alagely, Kent, y Mecklenburg (1998) determinaron que las plantas que crecen en contenedores presentan mayor porcentaje de colonización que aquellas que crecen en espacios abiertos, tal como lo observaron en *Acacia farnesiana* (L.) Willd.

Los porcentajes de arbusculos en *P. diadelphum* fueron elevados, correspondiendo con las categorías de moderada a muy altas de acuerdo con Kumar et al. (2003), a pesar de que estas estructuras son consideradas de corta vida (Alexander et al., 1988). Caso

of Gigasporaceae that are slow to colonize, but their hyphae reach greater extension in the soil during the germination of the spore and after this period (Matekwor, Andoh, & Nonaka, 2007). The dynamics of growth and development of the host plant and the mycorrhizal fungus simultaneously regulates bidirectional exchange; therefore, synchronization depends on various factors that define the complexity of the relationship (van del Heijden & Scheublin, 2007).

Anatomy of colonization

Figure 2 shows the colonization of the arbuscular mycorrhizal fungi *S. heterogama* (A and C), *R. manihotis* (B and H) and *F. mosseae* (D, E, F and G). In the longitudinal and transverse sections of roots of *P. diadelphum* a large volume of thin, transparent and cenocytic hyphae was observed, surrounding the terminal roots (Figure 2A).

In the roots the presence of spores and hifopodia in the rhizodermis was evidenced, which initiated the intraradical colonization (Figures 2C, 2E and 2F); subsequently, the hyphae branched extending from the exodermis to the region of the central cylinder (Figure 2H). Sbrana and Giovannetti (2005) and Zhu et al. (2006) stated that germination of the spore and the formation of hifopodia represent the main specific morphogenetic event, whose differentiation is mediated by unknown signals, which probably includes the chemical and mechanical sensitive, specific to the type of hyphae.

During intraradical colonization in *P. diadelphum*, the hyphae of AMF showed development patterns corresponding to intermediate types between Paris (Figures 2D and 2G) and Arum (Figure 2H). Colonization spread from one cell to another and spirals formed to produce intercellular rollers (Figures 2 D and 2G); these characteristics corresponded to the type Paris. The development of the hyphae extended longitudinally intercellularly and at the level of the bark. The hyphae formed, at certain intervals, lateral branches that penetrated the cell wall; they branched dichotomically causing arbuscules (Figure 2C); and, despite the ephemeral life cycle, they followed the pattern established for the Arum morphological type. The arbuscular interface was similar in the Arum and Paris morphological types.

In the opinion of Armstrong and Peterson (2002), the coiled hyphae of Paris interact with the cytoskeleton and are separated from the cytoplasm of the host cells by an interfacial matrix, formed in the apoplastic compartment, showing this similarity with Arum mycorrhiza. It should be noted that the interface of the intercellular hyphae contributes significantly to the release of phosphorus to the host cells.

contrario ocurrió con las vesículas; la ausencia de estas se atribuyó a que el hongo se encuentra en una fase activa de desarrollo (Hawley & Dames, 2004).

La inoculación con HMA causó resultados satisfactorios; sin embargo, no hubo prevalencia constante de un hongo micorrízico sobre otro, aunque los porcentajes de colonización hayan sido elevados. Este resultado permite inferir que una planta hospedante puede interrelacionarse con diversos HMA, respuesta que puede medirse a través de los efectos en la sobrevivencia y diversidad de especies vegetales en un ecosistema (Scotti & Corrêa, 2004). Es necesario considerar los factores extrínsecos de la planta (Jansa, Smith, & Smith, 2008), ya que la cuantificación de estructuras del hongo dentro de la raíz es variable.

Cada especie fúngica tiene características potenciales para establecer las simbiosis, tal es el caso de las especies de Gigasporaceae que son lentas para colonizar, pero sus hifas alcanzan mayor extensión en el suelo durante la germinación de la espora y posterior a este periodo (Matekwor, Andoh, & Nonaka, 2007). La dinámica de crecimiento y desarrollo de la planta hospedante y del hongo micorrízico regula simultáneamente el intercambio bidireccional; por tanto, la sincronización depende de diversos factores que definen la complejidad de la relación (van del Heijden & Scheublin, 2007).

Anatomía de la colonización

La Figura 2 ilustra la colonización de los hongos micorrízicos arbusculares *S. heterogama* (A y C), *R. manihotis* (B y H) y *F. mosseae* (D, E, F y G). En las secciones longitudinales y transversales de raíces de *P. diadelphum* se observó un gran volumen de hifas delgadas, transparentes y cenocíticas, rodeando las raíces terminales (Figura 2A).

En las raíces se evidenció la presencia de esporas e hifopodios en la rizodermis, los cuales iniciaron la colonización intraradical (Figuras 2C, 2E y 2F); posteriormente, las hifas se ramificaron extendiéndose desde la exodermis hasta la región del cilindro central (Figura 2H). Sbrana y Giovannetti (2005) y Zhu et al. (2006) afirmaron que la germinación de la espora y la formación de hifopodios representan el principal evento morfogenético específico, cuya diferenciación es mediada por señales desconocidas, lo que probablemente incluya las químicas y mecánicas sensitivas, propias del tipo de hifa.

Durante la colonización intraradical en *P. diadelphum*, las hifas de los HMA presentaron patrones de desarrollo correspondientes a tipos intermedios entre el Paris (Figuras 2D y 2G) y Arum (Figura 2H). La colonización se extendió de una célula a otra y se

Apparently, the expression of one or another morphological development of AMF is strongly controlled by the host plant (Matekwor et al., 2007). Urcelay, Tecco, and Chiarini (2005) affirmed that the intermediate types between Arum and Paris present characteristics formed by the same AMF species and that the formation of mycorrhizal structures in the roots is determined by the interaction of the species of plants and fungi involved. The intermediate type of morphological development of AMF observed in *P. diadelphum* coincided with that reported by Smith and Smith (1997) for Fabaceae. On the other hand, Cavagnaro et al. (2003) considered that this is the most common morphological behavior.

formaron espirales para originar rulos intercelulares (Figuras 2 D y 2G); estas características correspondieron al tipo *Paris*. El desarrollo de las hifas se extendió en sentido longitudinal intercelularmente y a nivel de la corteza. Las hifas formaron, en ciertos intervalos, ramificaciones laterales que penetraron la pared celular; se ramificaron dicotómicamente originando arbusculos (Figura 2C); y, a pesar del ciclo de vida tan efímero, siguieron el patrón establecido para el tipo morfológico *Arum*. La interfase arbuscular fue similar en los tipos morfológicos *Arum* y *Paris*.

A juicio de Armstrong y Peterson (2002), las hifas enrolladas del tipo *Paris* interactúan con el citoesqueleto

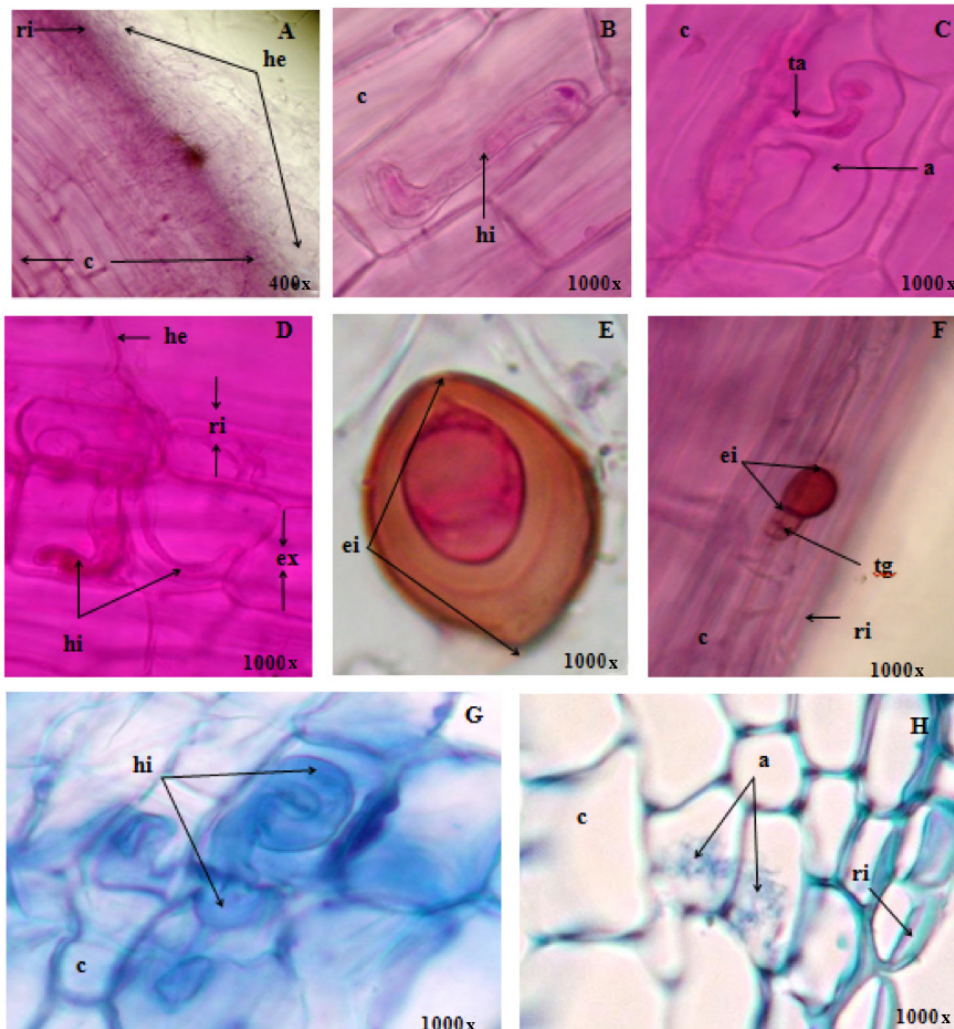


Figure 2. Colonization of the arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* (A and C), *Rhizopagus manihotis* (B and H) and *Funneliformis mosseae* (D, E, F and G) in rinse (A, B, C, D, E and F) and transverse sections (G and H) from roots of *Platymiscium diadelphum*; where we can see rhizodermis (ri), exodermis (ex), bark (c), extraradical hypha (he), intraradical hypha (hi), arbuscule (a), intraradical spore (ei) and germinative tube (tg) and trunk or base of the arbusculo (ta).

Figura 2. Colonización de los hongos micorrízicos arbusculares *Scutellospora heterogama* (A y C), *Rhizopagus manihotis* (B y H) y *Funneliformis mosseae* (D, E, F y G) en aclarado (A, B, C, D, E y F) y secciones transversales (G y H) de raíces de *Platymiscium diadelphum*; donde se pueden observar rizodermis (ri), exodermis (ex), corteza (c), hifa extraradical (he), hifa intraradical (hi), arbusculo (a), espora intraradical (ei) y tubo germinativo (tg) y tronco o base del arbusculo (ta).

The Paris-type association has been determined more frequently in trees and plants of semi-arid ecosystems (Yamato & Iwasaki, 2002), a characteristic present in *P. diadelphum*.

Conclusions

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Rhizopagus manihotis*, *Funnelformis mosseae* and *Scutellospora heterogama* established high symbiotic association with *Pithecellobium dulce* and *Platymiscium diadelphum*, which is why inoculation of these is recommended in the nursery phase. The morphological association in *P. dulce* and *P. diadelphum* inoculated with AMF was of Paris type, mainly, with occasional presence of *Arum*. In *P. dulce*, *S. heterogama* tended to produce more arbuscules; structures that allow bidirectional exchange between the arbuscular mycorrhizal fungi and the host plant. In the case of *P. diadelphum*, the colonization of the three fungi inoculated and the development of fungal structures were similar.

Acknowledgment

The authors wish to thank the Council for Scientific, Humanistic and Technological Development (CDCHT), of the Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, for the partial grant provided to this research through project 020-AG-2013.

End of English version

References / Referencias

- Alexander, T., Meier, R., Toth, R., & Weber, H. (1988). Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytologist*, 110(3), 363–370. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb00273.x
- Ali, M., Mubassara, S., Rahman, M., Alam, S., & Khan, Z. (2008). Status of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizae in vegetable crop plants of Bangladesh. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(6), 704–708. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/242322942_Status_of_Vesicular-arbuscular_VA_Mycorrhizae_in_Vegetable_Crop_Plants_of_Bangladesh
- Analytical Software (2003). Statistix for Windows Manual. Copyright© 1985-2003. Version 8.0. USA: Author.
- Armstrong, L., & Peterson, L. (2002). The interfase between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and root cells of *Panax quinquefolius*: a Paris-type mycorrhizal association. *Mycologia*, 94(4), 587–595. Retrieved from <http://www.mycologia.org/content/94/4/587.full.pdf+html>
- Augé, R., Sylvia, D., Park, S., Bittery, B., Saxton, A., Moore, J., & Cho, K. (2004). Partitioning mycorrhizal influence

y están separadas del citoplasma de las células del hospedante por una matriz interfacial, formada en el compartimiento apoplástico, mostrando esta similitud con la micorriza tipo *Arum*. Cabe destacar que la interfase de las hifas intercelulares contribuye de forma significativa en la liberación de fósforo a las células hospedantes.

Al parecer, la expresión de uno u otro desarrollo morfológico del HMA está fuertemente controlado por la planta hospedante (Matekwor et al., 2007). Urcelay, Tecco, y Chiarini (2005) afirmaron que los tipos intermedios entre *Arum* y *Paris* presentan características formadas por las mismas especies de HMA y que la formación de estructuras micorrízicas en las raíces está determinada por la interacción de las especies de plantas y hongos involucrados. El tipo intermedio de desarrollo morfológico del HMA observado en *P. diadelphum* coincidió con lo reportado por Smith y Smith (1997) para Fabaceae. Por su parte, Cavagnaro et al. (2003) consideraron que este es el comportamiento morfológico más común.

La asociación tipo *Paris* ha sido determinada con mayor frecuencia en árboles y plantas de ecosistemas semiáridos (Yamato & Iwasaki, 2002), característica presente en *P. diadelphum*.

Conclusiones

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) *Rhizopagus manihotis*, *Funnelformis mosseae* y *Scutellospora heterogama* establecieron alta asociación simbiótica con las especies arbóreas *Pithecellobium dulce* y *Platymiscium diadelphum*, por lo cual se recomienda la inoculación de estos en la fase de vivero. La asociación morfológica en *P. dulce* y *P. diadelphum* inoculados con HMA fue de tipo *Paris*, principalmente, con presencia ocasional del tipo *Arum*. En *P. dulce*, *S. heterogama* tuvo la tendencia de producir mayor cantidad de arbusculos; estructuras que permiten el intercambio bidireccional entre el hongo micorrízico arbuscular y la planta hospedante. En el caso de *P. diadelphum*, la colonización de los tres hongos inoculados y el desarrollo de estructuras fúngicas fueron similares.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT), de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, por la subvención parcial a esta investigación a través del proyecto 020-AG-2013."

Fin de la versión en español

- on water relations of *Phaseolus vulgaris* into soil and plant components. *Canadian Journal of Botany*, 82(4), 503–514. doi: 10.1139/b04-020
- Bonfante, P., & Genre, A. (2012). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*, 1(48). doi: 10.1038/ncomms1046
- Cavagnaro, T., Smith, F., Ayling, S., & Smith, S. (2003). Growth and phosphorus nutrition of a Paris-type arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 157(1), 127–134. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00654.x
- Cuenca, G., Cáceres, A., Oirdobro, G., Hasmy, Z., & Urdaneta, C. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativas para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*, 32(1), 23–29. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932104>
- Garriock, B., Peterson R., & Ackerley, C. (1989). Early stages in colonization of *Allium porrum* (leek) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*. *New Phytologist*, 112(1), 85–92. doi: 10.1111/j.1469-8137.1989.tb00312.x
- González, M., & Cuenca, G. (2008). Respuesta de plantas de plátano (*Musa AAB* cv. Hartón) a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares nativos e introducidos, bajo condiciones de campo. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 25, 470–495. Retrieved from http://revfacagronluz.org.ve/PDF/julio_septiembre2008/v25n3a20085.pdf
- Habte, M., Fox, R., Aziz, T., & El-Swaify, S. (1988). Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with erosion in an oxisol. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(4), 945–950. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/54/4/945.long>
- Hawley, G., & Dames, J. (2004). Mycorrhizal status of indigenous tree species in a forest biome of the Eastern Cape, South Africa. *South African Journal of Science*, 100, 633–637. Retrieved from https://www.academia.edu/18501488/Mycorrhizal_status_of_indigenous_tree_species_in_a_forest_biome_of_the_Eastern_Cape_South_Africa
- Ingleby, K., Wilson J., & Munro, R. (2007). Mycorrhizas in agroforestry: spread and sharing of arbuscular mycorrhizal fungi between trees and crops complementary use of molecular and microscopic approaches. *Plant Soil*, 294, 125–136. doi: 10.1007/s11104-007-9239-z
- Jansa, J., Smith, F., & Smith, S. (2008). Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*, 177(3), 779–789. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x
- Kubota, M., McGonigle, T., & Hyakumachi, M. (2005). Co-occurrence of Arum- and Paris-type morphologies of arbuscular mycorrhizae in cucumber and tomato. *Mycorrhiza*, 15(2), 73–77. doi: 10.1007/s00572-004-0299-0
- Kumar, A., Raghuvanshi, R., & Upadhyay, R. (2003). Vesicular-arbuscular mycorrhizal association in naturally revegetated coal mine spoil. *Tropical Ecology*, 44(2), 253–256. Retrieved from http://tropecol.com/pdf/open/PDF_44_2/44213.pdf
- McGonigle, T., Hiller, M., Evans, D., Fairchild, G., & Swan, J. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115(3), 495–501. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
- Matekwor, E., Andoh, H., & Nonaka, M. (2007) Host-related variability in arbuscular mycorrhizal fungal structures in roots of *Hedera rhombea*, *Rubus parvifolius* y *Rosa multiflora* under controlled conditions. *Mycorrhiza*, 17(2), 93–101. doi: 10.1007/s00572-006-0080-7
- Ortas, I. (2009). Mycorrhizae applications in horticultural production on plant growth. Retrieved from <https://cloudfront.escholarship.org/dist/prd/content/qt16t0m0hx/qt16t0m0hx.pdf?t=kro69w>
- Parra, S., Sanabria, M. E., & Maciel, N. (2011). Aspectos descriptivos de la semilla, emergencia y crecimiento de plántulas de Yacure (*Pithecellobium dulce*) y Roble (*Platymiscium diadelphum*). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 28(1), 576–585. Retrieved from <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/12528/12515>
- Patreze, C., & Cordeiro, L. (2005). Nodulation, arbuscular mycorrhizal colonization and growth of some legumes native from Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 19(3), 527–537 doi: 10.1590/S0102-33062005000300014
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Rey, A., Chamorro, D., & Ramírez, M. (2005). Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad de forraje de *Leucaena leucocephala*. *Revista Corpoica*, 6(2), 52–59. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5624616>
- Saslis-Lagoudakis, C., Chase, M., Robinson, D., Russell, S., & Klitgaard, B. (2008). Phylogenetics of neotropical *Platymiscium* (Leguminosae: Dalbergieae): systematics, divergence times, and biogeography inferred from nuclear ribosomal and plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany*, 95(10), 1270–1286. doi: 10.3732/ajb.0800101
- Sbrana, C., & Giovannetti, M. (2005). Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Funnelformis mosseae*. *Mycorrhiza*, 15(7), 539–545. doi: 10.1007/s00572-005-0362-5
- Scheublin, T., & van der Heijden, M. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi colonize non fixing root nodules of several legume species. *New Phytologist*, 172(4), 732–738. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01858.x
- Schmitz, A. M., & Harrison M. (2014). Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 250–261. doi: 10.1111/jipb.12155

- Scotti, M., & Corrêa, E. (2004). Growth and litter decomposition of woody species inoculated with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in semiarid Brazil. *Annals of Forest Science*, 61(1), 87–95. doi: 10.1051/forest:2003088
- Shi, Z., Chen, L., Feng, G., Liu, R., & Christie, P. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the Meliaceae on Hainan island, China. *Mycorrhiza*, 16(2), 81–87. doi: 10.1007/s00572-005-0017-6
- Smith, F., & Smith, S. (1997). Tansley review No. 96: Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 137(3), 373–388. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00848.x
- Sylvia, D., Alagely, A., Kent, D., & Mecklenburg, R. (1998). Mycorrhizae of landscape trees produced in raised beds and containers. *Journal of Arboriculture*, 24(6), 308–315.
- Urcelay, C., Tecco, P., & Chiarini, F. (2005). Micorrizas arbusculares del tipo 'Arum' y 'Paris' y endófitos radicales septados oscuros en *Miconia ioneura* y *Tibouchina paratropica* (Melastomataceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 40(3–4), 151–155. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-23722005000200002&script=sci_abstract
- van der Heijden, M. G., & Scheublin, T. R. (2007). Functional traits in mycorrhizal ecology: their use for predicting the impact of arbuscular mycorrhizal fungal communities on plant growth and ecosystem functioning. *New Phytologist*, 174(2), 224–250. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02041.x
- Yamato, M., & Iwasaki, M. (2002). Morphological types of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of understory plants in Japanese deciduous broad leaved forest. *Mycorrhiza*, 12(6), 291–296. doi: 10.1007/s00572-002-0187-4
- Zhu, H., Riely, B., Burns, N., & Ané, J. (2006). Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Genetics*, 172(4), 2491–2499. doi: 10.1534/genetics.105.051185