



Universidad de Granada

Facultad de Ciencias

Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrícicos y sus efectos en la estabilización de suelos degradados

Pablo Enrique Cornejo Rivas

Granada, 2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Pablo Enrique Cornejo Rivas
D.L.: Gr. 1361 - 2006
ISBN: 978-84-338-4026-4



Estación Experimental del Zaidín
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Granada

Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrícicos y sus efectos en la estabilización de suelos degradados

Memoria que presenta el Ingeniero
Agrónomo Pablo Enrique Cornejo Rivas
para aspirar al Título de Doctor

Fdo: Pablo Enrique Cornejo Rivas

VºBº

Las Directoras de la Tesis Doctoral

Fdo. D ^a . Concepción Azcón González de Aguilar	Fdo. D ^a . Nuria Ferrol González
Doctora en Biología	Doctora en Química
Profesor de Investigación del C.S.I.C.	Científico Titular del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

2006

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada, y financiada mediante una beca predoctoral MAE (AECI) del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación de España, por una Beca del Grupo Santander-Universia de Chile, y el Proyecto de Investigación "Análisis de la estructura y diversidad funcional de las comunidades de hongos micorrícicos asociados a plantas de especial interés ecológico en el parque Natural "Sierra de Baza" (Granada) y su aplicación, en interacción con la industria viverística, para la revegetación de zonas degradadas" (REN2003-00968-GLO).

INDICES

INDICE GENERAL

	Contenido	Nº pág
I	INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	1
II	INTRODUCCIÓN	9
1.	ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS	11
1.1	Características generales	11
1.2	Problemática de los ecosistemas mediterráneos	12
1.2.1	Erosión	14
1.2.2	Degradación de la cubierta vegetal	15
1.2.3	Desertificación	15
1.3	Ecosistemas mediterráneos en España	16
2.	DIVERSIDAD BIOLÓGICA	18
2.1	Estudio de la diversidad biológica	18
2.1.1	Diversidad taxonómica	19
2.1.2	Diversidad funcional	19
2.1.3	Diversidad genética	20
2.2	Diversidad microbiana del suelo	21
2.3	Diversidad microbiana del suelo en ecosistemas degradados	23
3.	MICORRIZAS	24
3.1	Ectomicorrizas	25
3.2	Endomicorrizas	26
3.3	Ectendomicorrizas	26
4.	MICORRIZAS ARBUSCULARES	27
4.1	Características generales	27
4.2	Filogenia y taxonomía	28
4.3	Estructura de las micorrizas arbusculares	30
4.4	Ciclo de vida de los hongos MA	31
4.4.1	Preinfección	32
4.4.2	Desarrollo de unidades de infección	32
4.4.3	Crecimiento del hongo en el suelo	33
4.5	Fisiología de la simbiosis	35
4.6	Ecofisiología de los hongos MA	37

4.7	Interacción de las micorrizas arbusculares con otros grupos microbianos del suelo	39
4.8	Características generales del genoma de los hongos MA	41
4.9	Herramientas moleculares utilizadas en el estudio de la diversidad de hongos MA	43
5.	RECUPERACIÓN DE ECOSISTEMAS MEDITERRANEOS DEGRADADOS	45
5.1	Papel de los microorganismos del suelo en procesos de revegetación	47
5.2	Utilización de hongos micorrizicos para la recuperación de la cubierta vegetal	48
III	PLAN DE TRABAJO	51
IV	MATERIAL Y MÉTODOS	57
1.	DISEÑO EXPERIMENTAL	59
2.	MATERIAL UTILIZADO	61
2.1	Suelo y Sustrato	61
2.2	Plantas	62
2.2.1	Lavanda	62
2.2.2	Mejorana	62
2.2.3	Retama	62
2.2.4	Romero	63
2.3	Hongos micorrizico arbusculares	64
2.3.1	<i>Glomus clarum</i>	65
2.3.2	<i>Glomus constrictum</i>	66
2.3.3	<i>Glomus coronatum</i>	66
2.3.4	<i>Glomus intraradices</i>	66
2.3.5	<i>Glomus mosseae</i>	66
2.3.6	<i>Glomus viscosum</i>	67
3.	CONDICIONES DE CRECIMIENTO	74
3.1	Obtención de las plántulas, estaquillas y tratamientos germinativos	74
3.2	Reestablecimiento de la flora microbiana	75
3.3	Irrigación	76
3.4	Obtención de las muestras y reposición	76

4.	METODOLOGÍA	77
4.1	Métodos físico-químicos	77
4.1.1	Determinación de pH	77
4.1.2	Fósforo disponible	77
4.1.3	Glomalina fácilmente extractable	78
4.1.4	Estabilidad estructural de los agregados	78
4.2	Métodos microbiológicos y determinación de la biodiversidad	80
4.2.1	Potencial micorrícico de los inóculos y del suelo	80
4.2.2	Esporas de hongos micorrícicos arbusculares	82
4.2.3	Longitud de micelio micorrícico	82
4.2.4	Raíz micorrizada	85
4.2.5	Índices de biodiversidad	86
4.3	Métodos para la determinación de crecimiento vegetal	87
4.3.1	Longitud de raíz	87
4.3.2	Cobertura vegetal	87
4.4	Métodos usados en biología molecular	88
4.4.1	Extracción de ADN genómico de material vegetal	88
4.4.2	Extracción de ADN desde esporas de hongos micorrícicos	89
4.4.3	Cuantificación de ADN genómico	89
4.4.4	Condiciones de PCR	90
4.4.5	Electroforesis en geles de agarosa	90
4.4.6	Purificación de productos de PCR	91
4.4.7	Preparación de geles de poliacrilamida y condiciones para TTGE	91
4.4.8	Tinción de geles con plata	92
4.4.9	Obtención de productos de PCR desde geles teñidos con plata	92
4.4.10	Preparación de células de E. coli competentes	93
4.4.11	Ligación en vectores de clonación	94
4.4.12	Transformación de células competentes	95
4.4.13	Extracción de ADN plasmídico	96
4.4.14	Secuenciación	96
4.4.15	Búsqueda de secuencias de interés en base de datos	96
4.4.16	Análisis de las secuencias nucleotídicas	97
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS	97
5.1	Análisis de varianza unifactorial	97
5.2	Análisis de medidas repetidas	98
5.3	Análisis de correlación	98

5.4	Análisis multivariante	98
5.4.1	Análisis de regresión	98
5.4.2	Análisis factorial	99
5.4.3	Análisis de conglomerados	99
5.4.4		
V	RESULTADOS	101
1.	CARACTERÍSTICAS DEL SUELO	104
1.1	Valoración de pH _w	104
1.2	Contenido de P asimilable en el suelo	107
1.3	Estabilidad estructural del suelo	108
1.3.1	Agregados hidroestables en el sustrato	108
1.3.2	Influencia de la fracción lábil de Glomalina sobre la estabilidad estructural	109
2.	COBERTURA VEGETAL	109
2.1	Cobertura total	110
2.1.1	Evolución de la cobertura vegetal	110
2.1.2	Efecto de las asociaciones vegetales sobre la cobertura	111
2.2	Contribución específica a la cobertura	112
2.2.1	Contribución a la cobertura por Lavanda	113
2.2.2	Contribución a la cobertura por Mejorana	114
2.2.3	Contribución a la cobertura por Retama	114
2.2.4	Contribución a la cobertura por Romero	115
2.3	Componentes de crecimiento por especie vegetal	115
2.3.1	Altura	119
2.3.2	Ramificaciones	120
2.3.3	Floraciones	121
3	DESARROLLO DE LOS HONGOS MICORRÍCICOS EN EL SUELO Y EN RAÍZ	122
3.1	Micelio micorrícico	122
3.1.1	Determinación del tamaño de la muestra de sustrato	123
3.1.2	Densidad de micelio vivo y total	124
3.2	Colonización micorrícica	127
3.2.1	Proporción de raíz micorrizada	127
3.2.2	Densidad de raíz micorrizada	129
3.3	Esporas de hongos micorrícico arbusculares	131

3.3.1	Tamaño de la comunidad de esporas de hongos micorrícicos	131
3.3.2	Composición media de la comunidad de esporas de hongos micorrícicos	133
4.	DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍCICOS	134
4.1	Optimización de TTGE como herramienta para estudiar la diversidad de hongos micorrícicos	134
4.1.1	TTGE aplicada a especies del género <i>Glomus</i> .	134
4.1.2	Sensibilidad de la técnica de TTGE	138
4.1.3	Aplicación de TTGE al estudio de aislados de una misma especie de <i>Glomus</i>	138
4.1.4	TTGE como herramienta para determinar especies de HMA colonizadoras de raíces	139
4.2	Tamaño y densidad de las poblaciones de hongos micorrícicos	140
4.2.1	<i>Glomus clarum</i>	143
4.2.2	<i>Glomus constrictum</i>	144
4.2.3	<i>Glomus coronatum</i>	145
4.2.4	<i>Glomus intraradices</i>	145
4.2.5	<i>Glomus mosseae</i>	146
4.2.6	<i>Glomus viscosum</i>	147
4.3	Presencia de hongos micorrícicos en raíces y su relación con las poblaciones en suelo	148
4.4	Índices de biodiversidad de la comunidad de hongos	153
4.4.1	Riqueza de especies	153
4.4.2	Equidad	156
4.4.3	Dominancia	156
5.	RELACIONES ENTRE MEJORA DEL SUELO, COBERTURA VEGETAL, DESARROLLO Y DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍCICOS	158
5.1	Relaciones bivariadas entre los distintos parámetros estudiados	158
5.2	Análisis multivariante de los grupos formados sobre las variables de respuesta	160
5.2.1	Relación entre características edáficas y de crecimiento vegetal	161
5.2.2	Relación entre características edáficas y de desarrollo del hongo	162
5.2.3	Relación entre características edáficas y diversidad	163
5.2.4	Relación entre crecimiento vegetal y desarrollo del hongo	164
5.2.4	Relación entre crecimiento vegetal y diversidad	165
5.2.6	Relación entre desarrollo del hongo y diversidad	166

VI	DISCUSIÓN GENERAL	169
VII	CONCLUSIONES	201
VIII	BIBLIOGRAFÍA	207
IX	ANEXOS	243

INDICE DE FIGURAS

		Nº pág
Figura 1	Degradación de los sistemas suelo-planta en ambientes mediterráneos	13
Figura 2	Diferentes tipos de micorriza	25
Figura 3	Últimas revisiones de la clasificación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares	29
Figura 4	Ciclo vital de la asociación micorrícico arbuscular y diferentes estructuras componentes de las fases intra y extraradical	31
Figura 5	Estructura de los genes ribosómicos nucleares de eucariotas	44
Figura 6	Impacto de las actividades humanas y procesos naturales sobre los cambios en los ecosistemas, tanto estables como alterados y/o modificados	46
Figura 7	Zona de degradación de la vegetación autóctona "Encinar Mesomediterráneo" de la sierra de Baza	63
Figura 8	Especies utilizadas en el estudio	64
Figura 9	<i>Glomus clarum</i> BEG 125	68
Figura 10	<i>Glomus constrictum</i> EEZ 22	69
Figura 11	<i>Glomus coronatum</i>	70
Figura 12	<i>Glomus intraradices</i> BEG 121	71
Figura 13	<i>Glomus mosseae</i> BEG 122	72
Figura 14	<i>Glomus viscosum</i> BEG 126	73
Figura 15	Sistema de producción de estaquillas en bandejas alveoladas para la obtención de plántulas viables	74
Figura 16	Sistema mecánico para la determinación de la estabilidad estructural de los agregados al agua	79
Figura 17	NMPP para los inóculos de HMA y del suelo	81
Figura 18	Micelio de hongos micorrícico arbusculares	84
Figura 19	Análisis de la cobertura de las plantas correspondientes al tratamiento Lavanda-Romero	88
Figura 20	Evolución de diversos parámetros edáficos determinados en el sustrato de crecimiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	106
Figura 21	Valores medios de diversos parámetros edáficos determinados en el sustrato de crecimiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	107
Figura 22	Evolución de la superficie de cobertura total por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	110
Figura 23	Valores medios para superficie de cobertura vegetal total por tratamiento en función de la asociación vegetal. Las barras representan el error standard	111
Figura 24	Contribución específica media a la cobertura total por tratamiento en función de la asociación vegetal	112
Figura 25	Valores medios para superficie de cobertura individual por tratamiento en función de la asociación vegetal	113
Figura 26	Evolución de la longitud (A) y del número de escapos florales (B) de lavanda por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	116
Figura 27	Evolución de la longitud (A) y del número de inflorescencias (B) de mejorana por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	116

Figura 28	Evolución de la longitud (A) y del número de ramificaciones (B) de retama por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio.	117
Figura 29	Evolución de la longitud (A), del número de inflorescencias (B) y del número de ramificaciones de romero (C) por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	118
Figura 30	Micelio extraradical de hongos micorrícicos arbusculares (vivo y total) extraído de 0,5-1,0-1,5 y 2,0 g de suelo Gorafe	123
Figura 31	Relación establecida entre la densidad de hifas del micelio total y la densidad de hifas vivas determinadas en suelo utilizando la tinción doble sobre el material obtenido para una muestra simple	124
Figura 32	Evolución de la densidad de hifas del micelio de hongos micorrícicos en suelo por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	125
Figura 33	Valores medios para densidad de hifas del micelio micorrícico en suelo por tratamiento en función de la asociación vegetal	126
Figura 34	Evolución de los parámetros de colonización por hongos micorrícicos de la raíz por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	128
Figura 35	Valores medios para los parámetros de colonización por hongos micorrícicos de la raíz por tratamiento en función de la asociación vegetal	129
Figura 36	Evolución de la densidad total de esporas de hongos micorrícico-arbusculares por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	132
Figura 37	Contribución específica media al tamaño de la comunidad de hongos micorrícico-arbusculares por tratamiento en función de la asociación vegetal	133
Figura 38	Productos de PCR de la región NS31/AM1 del gen 18S	135
Figura 39	Análisis de TTGE de la región NS31-AM1 del gen ADNr 18S	136
Figura 40	Perfiles de fusión	136
Figura 41	Alineamiento múltiple de algunas de las secuencias obtenidas para el fragmento NS31-AM1	136
Figura 42	Análisis de TTGE de la región GC-NS31/Glo1 del gen ADNr 18S	137
Figura 43	Análisis de sensibilidad de TTGE	138
Figura 44	Análisis de TTGE de la región NS31-Glo1 del gen ADNr 18S de diversos ecotipos	139
Figura 45	Detección de HMA colonizando las raíces de diversas plantas por análisis de TTGE	140
Figura 46	Evolución de la densidad específica (Di) de seis especies de hongos micorrícico-arbusculares por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	142
Figura 47	Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrícico-arbuscular <i>G. clarum</i> BEG 125, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	149
Figura 48	Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrícico-arbuscular <i>G. constrictum</i> EEZ 22, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	149
Figura 49	Evolución de la densidad de esporas del hongos micorrícico-arbuscular <i>G. coronatum?</i> , y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	150
Figura 50	Evolución de la densidad de esporas del hongos micorrícico-arbuscular <i>G. intraradices</i> BEG 121, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	151

Figura 51	Evolución de la densidad de esporas del hongos micorrícico-arbuscular <i>G. mosseae</i> BEG 122, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	152
Figura 52	Evolución de la densidad de esporas del hongos micorrícico-arbuscular <i>G. viscosum</i> BEG 126, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	152
Figura 53	Evolución de los índices de biodiversidad de las comunidades de hongos micorrícico-arbusculares formadas por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio	154
Figura 54	Valores medios para índices de biodiversidad de las comunidades de hongos micorrícico-arbusculares formadas por tratamiento en función de la asociación vegetal	155
Figura 55	Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento vegetal (88 % de la varianza total explicada) y las variables de características edáficas (63 % de la varianza total explicada)	162
Figura 56	Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento del hongo micorrícico en suelo (65 % de la varianza total explicada) y las variables de características edáficas (63 % de la varianza total explicada)	163
Figura 57	Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para los índices de biodiversidad de hongos micorrícicos (66 % de la varianza total explicada) y las variables de características edáficas (63 % de la varianza total explicada)	164
Figura 58	Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento vegetal (88 % de la varianza total explicada) y las variables de crecimiento del hongo micorrícico en suelo (65 % de la varianza total explicada)	165
Figura 59	Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento vegetal (88 % de la varianza total explicada) y los índices de biodiversidad de hongos micorrícicos (66 % de la varianza total explicada)	166
Figura 60	Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para los índices de biodiversidad de hongos micorrícicos (66 % de la varianza total explicada) y las variables de crecimiento del hongo micorrícico en suelo (65 % de la varianza total explicada)	167

INDICE DE TABLAS

	Nº pág
Tabla 1	Características de los HMA y plantas que pueden influenciar procesos involucrados en la formación de las micorrizas arbusculares 38
Tabla 2	Diferentes tratamientos analizados y especies vegetales utilizadas. 60
Tabla 3	Algunas propiedades del suelo utilizado en el estudio en mesocosmos 61
Tabla 4	Proporción de arena, suelo y peso total de sustrato por maceta 61
Tabla 5	Composición del inóculo de hongos micorrízico-arbusculares utilizado en el estudio en mesocosmos 65
Tabla 6	Tratamientos efectuados sobre las semillas para el análisis de germinación y posterior obtención de plántulas viables 75
Tabla 7	Diferentes oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCR, secuencias nucleotídicas y condiciones de PCR 90
Tabla 8	Geles de poliacrilamida 37.5:1 para uso en TTGE (1.5 X TAE, 7 M urea) 91
Tabla 9	Medias repetitivas para diferentes componentes de crecimiento (altura (L), Nº de flores/inflorescencias(Nºfl.) y ramificaciones (Ram)) por especie vegetales en función de la asociación vegetal utilizada 119
Tabla 10	Medias repetitivas para densidad específica (D_i) y para el tamaño de la población de esporas ($n^\circ \text{ esp } 100 \text{ g}^{-1}$) de cada una de las especies de HMA inoculadas de acuerdo a la asociación vegetal 143
Tabla 11	Relaciones bivariadas (correlación lineal de Pearson) establecidas entre las distintas variables de respuesta analizadas 158
Tabla 12	Grupos formados de acuerdo al tipo de variable, variables incluidas en el análisis factorial y estadísticos del análisis 160

*“El hombre de estos campos, que incendia los pinares
y sus despojos aguarda como botín de guerra
antaño hubo raído los negros encinares
y talado los robustos robledos de la sierra.”*

(Antonio Machado, Campos de Castilla).



Es un hecho bien conocido que el funcionamiento, la estabilidad y la productividad de los ecosistemas terrestres dependen en gran medida de la riqueza de especies de la cubierta vegetal, su diversidad y la estructuración de las poblaciones de la misma. Por otra parte, el que algunas especies de plantas puedan o no desarrollar una cubierta adecuada depende de las interacciones que se produzcan entre las distintas especies presentes y de la competencia temporal y espacial que establezcan por los limitados recursos del suelo. Las interacciones con los diferentes grupos de organismos que constituyen la biocenosis pueden favorecer el establecimiento de determinadas especies de plantas y/o su posterior desarrollo mediante mecanismos de diversa índole.

De las interacciones entre plantas y otros organismos de un ecosistema, las que se establecen con microorganismos, aunque frecuentemente ignoradas, revisten especial interés. Muy en particular, los denominados hongos formadores de micorrizas arbusculares juegan un papel clave en el establecimiento y desarrollo de la mayoría de las plantas. Estos hongos, de tamaño microscópico y habitantes comunes de la mayoría de los suelos, establecen simbiosis mutualistas (micorrizas) con la mayoría de las plantas terrestres, permitiendo a éstas una mayor absorción de nutrientes y agua, gracias al aumento de la superficie útil de exploración que representan las hifas del hongo que se

desarrollan en el suelo, conectadas al sistema radical de las plantas. El hongo formador de micorrizas arbusculares recibe, a su vez, compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis de la planta, indispensables para sus procesos metabólicos por tratarse de simbiontes obligados, que necesitan de la interacción con la planta para completar su ciclo de vida.

El establecimiento de la micorriza no sólo resulta ventajoso para la planta y el hongo, sino que también favorece al ecosistema en su conjunto, ya que mejora la calidad del suelo, la diversidad y productividad de la cubierta vegetal y el establecimiento de otros microorganismos beneficiosos, como son *Rhizobium* y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). No obstante, y a pesar de ejercer un importante efecto sobre la estabilidad de los ecosistemas, las micorrizas arbusculares han sido objeto de pocos estudios en este contexto.

Por otra parte, los ecosistemas mediterráneos se caracterizan por ser extremadamente frágiles. Esto se debe, en gran medida, a las características climáticas, con una marcada estacionalidad que alterna períodos de elevada temperatura y xericidad, con otros más fríos y húmedos. Además, con mucha frecuencia los ecosistemas mediterráneos presentan una orografía y un sustrato litológico que actúan como coadyuvantes en el desencadenamiento de procesos de degradación de la cubierta vegetal. La decisiva intervención humana ha contribuido también a reducir el efecto de amortiguación del proceso de degradación, impidiendo así su autorrecuperación.

Es de destacar, además, que la conjunción de influencias paleoárticas y paleotropicales han otorgado a la Cuenca Mediterránea una excepcional riqueza florística, con un elevado nivel de biodiversidad y un número considerable de endemismos. La vegetación climática estaría basada en el bosque esclerófilo de hoja perenne. A pesar de ello, la formación más frecuentemente presente es el matorral mediterráneo, especialmente formaciones como tomillares, romerales, retamares, espinales, y otros, caracterizados por una escasa producción de biomasa aérea y una limitada cobertura vegetal. Consecuentemente, las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo se degradan, lo que a su vez condiciona un mayor deterioro de la estructura y diversidad de las comunidades vegetales.

Para evitar esta “espiral de degradación”, generada por la conjunción de los factores antes mencionados, es fundamental detener el avance de los procesos de degradación que están sufriendo las áreas más frágiles de la Cuenca Mediterránea mediante la adopción de prácticas adecuadas de manejo del suelo y la vegetación existentes. Es necesario restaurar también la diversidad y calidad de la cubierta vegetal, para lo cual se requiere incrementar el número de plantas en zonas con un número inferior al óptimo, tras lo cual se debe promover el desarrollo de las especies climáticas de la sucesión vegetal.

Como se ha mencionado anteriormente, hay que destacar el papel que juegan los microorganismos del suelo, en especial los hongos micorrícicos, sobre la diversidad y la calidad de la cubierta vegetal. Sin embargo, no sólo los microorganismos del suelo pueden condicionar a las comunidades vegetales. También estas pueden afectar la diversidad y composición de las comunidades microbianas. Debido a la importancia cuali y cuantitativa de los hongos micorrícicos, se propuso una investigación que tuvo como objetivo general el *Estudio de la influencia de la diversidad y estructura de la comunidad vegetal sobre las comunidades de hongos micorrícicos, y sus consecuencias en la estabilización y recuperación de ecosistemas degradados, especialmente en ambientes mediterráneos áridos y semiáridos.*

La consecución de este objetivo general implicó el planteamiento de los siguientes objetivos metodológicos y/o complementarios:

- i)* Desarrollo de técnicas moleculares que permitieran la identificación y caracterización de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares tanto en suelo como en planta (raíces).
- ii)* Determinación del efecto de la diversidad y estructura vegetal sobre la comunidad de hongos micorrícicos en suelo (tamaño, diversidad y estructura) y en planta.
- iii)* Determinación del efecto de la interacción de diferentes especies de plantas y hongos micorrícicos sobre las características físicoquímicas del suelo.

- iv) Determinación del resultado de la interacción entre las distintas especies de plantas y hongos micorrícicos sobre las características de la propia cubierta vegetal establecida, así como la identificación de especies facilitadoras o antagonistas.
- v) Por último, y en la medida de lo posible, se pretende determinar las posibles pautas y/o estrategias de colonización de la raíz y el suelo por diferentes hongos micorrícicos, en función tanto de la planta hospedadora, así como de la estacionalidad climática.

Aunque los objetivos propuestos pretenden avanzar en el conocimiento de la ecología de los hongos micorrícicos en ecosistemas semiáridos característicos de ambientes mediterráneos, la investigación propuesta presenta también un marcado carácter finalista. Este viene determinado por la posibilidad de caracterizar las pautas de comportamiento y/o estrategias de colonización de las distintas plantas y hongos micorrícicos objetos de estudio, con vistas a su utilización posterior en programas de revegetación y/o recuperación de suelos degradados.

*A las tierras sin nombres y sin números
bajaba el viento desde otros dominios,
traía la lluvia hilos celestes,
y el dios de los altares impregnados
devolvía las flores y las vidas.*

En la fertilidad crecía el tiempo.

(Pablo Neruda, La lámpara en la tierra, Canto General)



1. ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS

1.1 Características generales.

Los ecosistemas mediterráneos incluyen un importante número de comunidades bióticas que se desarrollan bajo la influencia del denominado *Clima Mediterráneo*. Éste está definido por la coincidencia en la época cálida o verano de al menos dos meses con carácter de aridez en cuanto a la precipitación, considerando que un mes árido es aquel en el que la precipitación (en $L\ m^{-2}$) es inferior al doble de la temperatura media mensual en grados centígrados ($P < 2T$) (Rivas-Martínez 1976). Por otra parte, existe una alternancia regular de esta estación cálida y seca, con una estación fría y húmeda, con precipitaciones irregulares y esporádicas, pero frecuentemente torrenciales (López-Bermúdez y Albadalejo 1990).

A pesar de denominarse clima mediterráneo debido a que su principal área de influencia abarca las regiones circundantes del mar Mediterráneo, es importante señalar que en el planeta existen numerosas zonas que comparten las características de este clima. Entre estas zonas se encuentran la costa de California, Sudáfrica, el sudoeste de Australia y la zona central de Chile. Su ubicación geográfica se encuentra distribuida de

preferencia entre los 30 y 40° de latitud N y S, y principalmente en las costas oeste de los continentes.

Los ecosistemas de la región Mediterránea son muy variados, y su vegetación climática varía desde los matorrales paquicaules a bosques esclerófilos deciduos, y desde bosquetes espinosos y estepas templadas a semidesiertos helados, todos ellos adaptados a soportar un período de aridez de hasta nueve meses, incluyéndose en ombroclimas desde el árido inferior al hiperhúmedo (Rivas-Martínez 1976).

Según Montalvo (1992) la vegetación mediterránea desarrolla, principalmente, dos tipos alternativos de adaptación xerófila, que son por una parte la presencia de estructuras aéreas persistentes, como en el caso de los matorrales, y la que expresa la vegetación de temporada, en el caso de las plantas terófitas, como por ejemplo los pastizales de especies anuales. Además, resulta interesante destacar que la biomasa aérea en estos ecosistemas es pequeña; no obstante, la relación de la biomasa subterránea respecto de la aérea es más alta que en otros ecosistemas (Montalvo 1992).

Otra característica importante de estos ecosistemas es su excepcional riqueza florística, la cual ha sido determinada por la conjunción de factores bióticos y ambientales, como son las variaciones climáticas y los cambios de las posiciones relativas de las grandes masas continentales (Blanca y Morales 1991; López-González 2001). Como ejemplo de esta, Puigdefabregás (1994) señala que existen unas 25.000 especies de familias fanerógamas en ambientes mediterráneos.

1.2 Problemática de los ecosistemas mediterráneos.

Los ecosistemas desarrollados en ambientes mediterráneos pueden ser alterados por cambios en la actividad de agentes naturales, perdiendo su estabilidad y degradándose (Herrera et al. 1993). Los procesos que interactúan en la degradación de los ecosistemas mediterráneos se muestran en la Figura II-1. Estos procesos degradativos están especialmente potenciados por las características del clima en estos ecosistemas (lluvias irregulares, aridez, etc.) y la fuerte y decisiva acción del hombre (presión antrópica) (López-Bermúdez 1996).

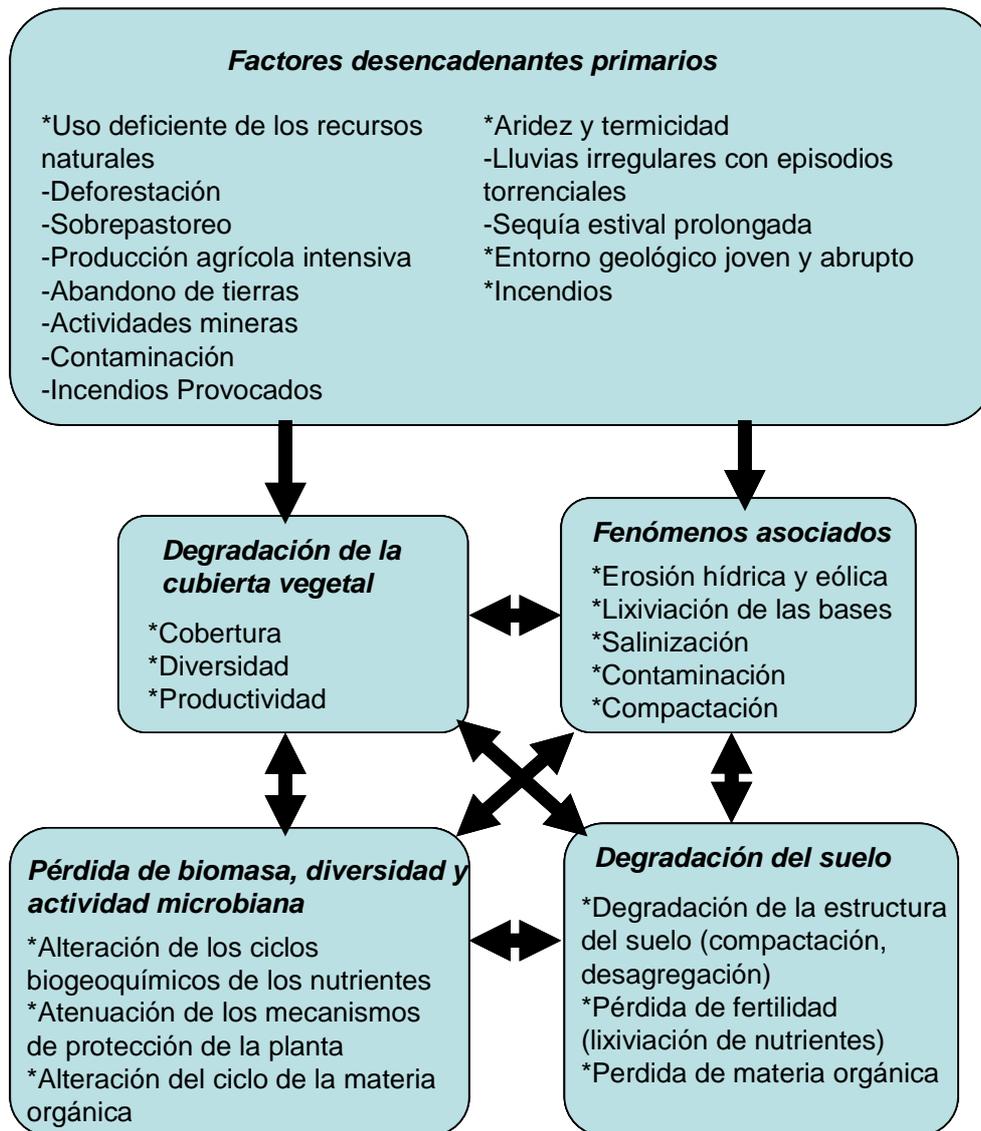


Figura 1. Degradación de los sistemas suelo-planta en ambientes mediterráneos (tomado de Barea et al. 1999).

La degradación de la diversidad de especies, y la consecuente degradación de la estructura y morfología de las comunidades, supone a su vez un deterioro generalizado de las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo (López-Bermúdez y Albaladejo 1990; Herrera et al. 1993; Barea y Jeffries 1995; Requena et al. 1996; Barea y Olivares 1998). En este contexto, se puede señalar que en ambientes mediterráneos la erosión y degradación de las propiedades físico químicas y biológicas del suelo, y la degradación consecuente de la cubierta vegetal, propicia y acelera procesos de desertificación.

1.2.1 Erosión.

En las regiones mediterráneas es bien sabido que la erosión de los suelos es el resultado de una compleja y dinámica combinación de procesos que conducen a una elevada tasa de pérdida de suelo y elementos nutritivos, así como a una disminución de su potencial biológico. Estos procesos, si no son convenientemente revertidos, conducen a la desertificación, siendo el sureste de España la región de Europa más afectada en este sentido (López-Bermúdez y Romero-Díaz, 1992).

Las lluvias de alta intensidad son uno de los principales agentes erosivos en estas regiones mediterráneas, puesto que unido a las precipitaciones de elevada energía, actúan como factores potenciadores el vigor del relieve, una escasa resistencia mecánica de los materiales, una reducida superficie de cobertura y, frecuentemente, la deficiente gestión humana de los recursos (López-Bermúdez y Romero-Díaz 1992).

Como ejemplo de lo anterior, López-Bermúdez y colaboradores (1984), trabajando en un ecosistema semiárido de la comunidad de Murcia, demostraron que las variaciones en la cobertura vegetal (del 0 al 86 % de cobertura), así como las variaciones en los coeficientes de infiltración del suelo tenían una fuerte influencia sobre la magnitud de los procesos erosivos y la consecuente producción de materiales sedimentarios.

Por su parte, Belmonte-Serrato y colaboradores (1999) trabajando en un matorral caracterizado por la presencia de romero (romeral) en condiciones ambientales semiáridas propias del clima mediterráneo, encontraron que a medida que aumentaba la pendiente del terreno, desde un 11 a un 25%, la necesidad de una cobertura vegetal optimizada aumentaba desde un 58 a un 64%, para alcanzar un equilibrio entre las necesidades hídricas del sistema y la protección del suelo.

Entre otros factores que han mostrado ejercer una influencia en la erosión del suelo en ecosistemas mediterráneos semiáridos se encuentran la gestión del suelo y la incidencia de incendios (naturales o provocados) (Lasanta et al. 2000; Pardini et al. 2003; 2004). Pardini et al. (2004), trabajando en cinco suelos mediterráneos del noreste de España, encontraron que los distintos usos del suelo son determinantes de importantes diferencias en su potencial erosivo, demostrando que suelos con un inadecuado manejo agrícola presentan altos índices de producción de sedimentos y de pérdida de carbono orgánico. No obstante, en suelos reforestados con *Pinus silvestris* y *P. halepensis* durante 50 años se encontraron igualmente efectos deletéreos sobre las propiedades del suelo, debido probablemente a un deficiente manejo forestal. Por el contrario, suelos con

50 años de abandono agrícola, dominados por la presencia espontánea de *Quercus suber*, presentaban las mejores características y los menores índices de erodabilidad.

Pardini y colaboradores (2003, 2004) encontraron además que el efecto del fuego tiene una gran importancia en los procesos erosivos, especialmente en aquellos ecosistemas dominados por especies más susceptibles de sufrir daños severos por ocurrencia de fuegos espontáneos, como *Cistus monspeliensis* y *Calicotome spinosa*, representativos del matorral mediterráneo.

1.2.2 Degradación de la cubierta vegetal.

Aunque la vegetación potencial de la cuenca mediterránea está basada en el bosque esclerófilo de hoja perenne (encinares, alcornocales, acebuchares, enebrales, etc.), los procesos degradativos, debido especialmente a la presión antrópica, han ocasionado que en la actualidad predominen las agrupaciones vegetales de sustitución, en especial el matorral mediterráneo (Blanca y Morales 1991; López-González 2001).

Por otra parte, evidencias paleoecológicas parecen demostrar que las profundas y continuas transformaciones ambientales en ecosistemas mediterráneos han ocasionado la ausencia de un paisaje estable, en el cual el hombre ha sido un agente desencadenante tanto de acciones destructivas como de acciones conservadoras del paisaje (Puigdefabregás 1994).

A pesar de ello, los diversos flujos causa-efecto implicados en la degradación de los ecosistemas mediterráneos (ver Figura II-1), pueden originar una “espiral de degradación”, en el transcurso de la cual se va acentuando el deterioro general del suelo, pudiendo llegarse a la desertificación del ecosistema, dada la reducida habilidad de regeneración natural de la cubierta vegetal presente *per se*. La razón última de esta situación de deterioro es la sobreexplotación o el desarrollo de actividades humanas mal controladas (Requena 1997).

1.2.3 Desertificación.

Aunque el término desertificación no tiene una definición aceptada universalmente, los científicos concuerdan en que se trata de un proceso de degradación de suelo que comienza con un gradual deterioro de la cubierta vegetal por actividades

humanas y luego continúa con erosión del suelo acelerada y deterioro de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, que repercuten en una disminución de la producción actual y la productividad futura del suelo. Por tanto, este proceso es el resultado de complejas interacciones de factores humanos y naturales (flora, fauna, ambiente edáfico y climatología del ecosistema) (Albaladejo et al. 1988; Requena 1997). Entre las principales consecuencias que acarrea este proceso de degradación del suelo se incluyen la pérdida de materia orgánica y estructura del suelo, que resulta en una reducida capacidad de infiltración y de almacenamiento de agua y nutrientes (Requena 1997), incremento de la erosión del suelo, pérdida de diversidad microbiana y disminución de la protección de las plantas a diferentes estreses de tipo biótico y abiótico (Barea et al. 1996).

1.3 Ecosistemas mediterráneos en España.

Biogeográficamente, España se encuentra incluida en el reino de flora y vegetación Holártico, distribuyéndose de forma desigual en tres regiones corológicas: *i*) región Eurosiberiana, que ocupa la franja septentrional de la península, ocupando ciertas comarcas luso-galaico-cantábrico-pirenaicas; *ii*) región Macaronésica, en el archipiélago Canario; y *iii*) región Mediterránea, que abarca todo el resto de la península y las islas Baleares. Además, en la región mediterránea de España se presentan cinco de los seis pisos bioclimáticos correspondientes, termo-, meso-, supra-, oro- y crioromediterráneo (Rivas-Martínez 1976).

Los ecosistemas mediterráneos de España poseen una de las floras más ricas y variadas de toda Europa, sólo comparable a la de países como Grecia e Italia, existiendo unas 7.500-8.000 especies de plantas vasculares, probablemente un 15% de ellas endémicas (López-González 2001). Esto es debido al acontecimiento de grandes alteraciones históricas del clima, la vegetación, oscilaciones en el nivel del mar (en el mediterráneo occidental principalmente), y el contacto entre las placas tectónicas europea y africana, permitiendo de esta manera la migración directa de las plantas, especialmente esteparias, termófilas, xerófilas, orófilas, boreo-alpinas, etc., entre puntos anteriormente aislados (López-González 2001).

En la región mediterránea de España se reconocen 65 series de vegetación, todas ellas con una vegetación climática correspondiente a un bosque esclerófilo, y que en sus

series de degradación incluyen matorrales densos, matorrales degradados, y finalizan como pastizales (Rivas-Martínez 1976). En tales matorrales se presentan especies leñosas típicas, siendo común la presencia de géneros tales como *Thymus*, *Lavandula*, *Salvia*, *Sideritis*, *Teucrium*, *Rosmarinus*, *Juniperus*, Rosáceas, etc., y leguminosas arbustivas como *Anthyllis*, *Retama*, *Coronilla*, *Genista*, etc. (López-Bermúdez y Albaladejo 1990; Blanca y Morales 1991; Navarro-Reyes, 1995).

Cabe señalar que la vegetación potencial se encuentra todavía presente en determinadas áreas, donde la presión antrópica ha sido reducida; no obstante, se estima que de la superficie total del país, un 5% podría estar potencialmente ocupada por vegetación no arbórea, un 8% por coníferas, un 4% por sotos y bosques ribereños y hasta un 83% por bosques de fagáceas (López-González 2001). En términos generales, las comunidades mas degradadas tenderían hacia la vegetación potencial si cesara la influencia humana, hecho que se ha observado parcialmente en los últimos años cuando la utilización de derivados del petróleo ha sustituido al carbón y otros combustibles de origen vegetal (López-González 2001), cesando como consecuencia la presión antrópica sobre la misma.

Sin embargo, la extrema fragilidad de determinados ecosistemas, especialmente del ombroclima seco o semiárido, ha posibilitado la perturbación del equilibrio ecológico con perturbaciones mínimas, en cuyo caso los daños resultan prácticamente irreparables. Así nos encontramos con que en España aproximadamente un 18% del territorio presenta graves procesos de erosión y desertificación, siendo la cifra en Andalucía del 36%, debido principalmente a las características accidentadas del relieve, con fuertes pendientes y desniveles, que acentúan el efecto de las precipitaciones, como se ha observado en zonas de especial interés ecológico como es el Parque Natural de la Sierra de Baza (Blanca y Morales 1991), elegido como modelo en el presente estudio.

La serie típica en este Parque Natural es la Mesomediterránea, bética, basófila de la encina (*Quercus rotundifolia*), denominada *Paeonio coriaceae-Querceto rotundifoliae* S. (Rivas-Martínez 1976; Valle 2003), que presenta como formaciones arbóreas encinares en zonas puntuales menos influenciadas por la actividad antrópica, y otras especies mesófilas (caducifolias, espinares y pinares de montaña) en zonas con ombroclima progresivamente subhúmedo. No obstante, las principales formaciones en el paisaje de la Sierra de Baza son formaciones arbustivas, matorrales de degradación y pastizales vivaces, destacando comunidades como romerales y tomillares, retamares y espinares (Blanca y Morales 1991).

Como soluciones al impacto negativo que la presión antrópica ha ejercido sobre la vegetación en la Sierra de Baza, Blanca y Morales (1991) sugieren una serie de medidas como son una correcta planificación y utilización territorial, control del fuego, incentivo del turismo verde y la educación de los visitantes, control de las actividades silvoagropecuarias y una gestión forestal menos productivista y más acorde con la regeneración de la vegetación autóctona, medidas que sin duda resultan extensibles para la recuperación de otras áreas degradadas en ecosistemas mediterráneos.

2. DIVERSIDAD BIOLÓGICA

El concepto de diversidad biológica, o biodiversidad, es bastante reciente, y ha sido foco de atención creciente desde finales de los 80. En 1992 se definió como *“la variabilidad existente entre los diversos organismos vivos de todo origen, incluidos el sistema terrestre, el marino y otros sistemas acuáticos, así como complejos ecológicos de los que dichos sistemas forman parte. Se incluye la diversidad inter e intra específica y la de los ecosistemas”* (UNEP 1992).

La importancia del estudio y conservación de la biodiversidad radica en asegurar la multiplicidad de funciones que poseen los distintos organismos del ecosistema, a la vez que de mantener esas funciones cuando se produzcan alteraciones del medio. De esta forma, un mayor grado de diversidad de especies o de grupos funcionales aumentará la capacidad de reacción del ecosistema.

2.1 Estudio de la diversidad biológica.

El estudio de los distintos componentes de la diversidad ha sido recurrente en los últimos años, con la finalidad de asociar los cambios registrados como respuesta frente a diversas alteraciones. No obstante, dado que el concepto de biodiversidad es extremadamente amplio, y que incluye tanto aspectos de su variación como de su abundancia, resulta de gran dificultad el poder expresarla (Magurran 1988), por lo que los

estudios en este tema pueden tener muchas aproximaciones, dependiendo en gran medida de las características de la población que vaya a ser analizada.

Dado lo anterior, y que el término comprende diferentes escalas biológicas, se han definido tres niveles básicos de diversidad, que permiten aproximaciones distintas al sistema a analizar: *i*) diversidad taxonómica, *ii*) diversidad funcional, y *iii*) diversidad genética (Gaston 1996).

2.1.1 Diversidad taxonómica.

Se compone de los distintos taxa a los que pertenecen los individuos en una comunidad o ecosistema (desde subespecie o especie hasta reino). Existe un número elevado de índices que intentan caracterizar la diversidad de una muestra o una comunidad, hecho que dificulta la homogenización de resultados y la comparación de comunidades biológicas distintas (Magurran 1988).

Las medidas que representan la diversidad de especies pueden dividirse en tres categorías: *i*) índices de riqueza de especies, que son esencialmente una medida del número de especies en una unidad de muestreo definida; *ii*) modelos de abundancia de especies, que describen la distribución de las poblaciones de acuerdo a distintos modelos establecidos (serie geométrica, logarítmica, normal logarítmica, modelo de palo quebrado, etc...); y *iii*) abundancia proporcional de especies, que pretenden incluir la riqueza de especies y la uniformidad de su distribución en una expresión sencilla (Magurran, 1988).

2.1.2 Diversidad funcional.

Hace referencia al conjunto de todos los procesos biológicos que se desarrollan en una comunidad. En este sentido, los distintos organismos de un ecosistema en particular pueden realizar distintas funciones, debido principalmente a los diferentes mecanismos que tienen para obtener compuestos carbonados o energía, o para realizar otros procesos metabólicos. Así sabemos que existen poblaciones de organismos que son clave para que se lleven a cabo determinados procesos como, por ejemplo, la nitrificación, descomposición de celulosa, fijación de N o diferentes procesos de oxidoreducción (Loreau et al. 2001; Rösch et al. 2006).

El patrón de utilización de distintos sustratos es, por tanto, un reflejo cualitativo y cuantitativo de la composición de una comunidad, reflejando los cambios en la utilización de éstos las variaciones en la estructura de las comunidades, a la vez que aportan información sobre las capacidades metabólicas potenciales y sobre las distintas funciones de la comunidad (Loreau et al. 2001).

2.1.3 Diversidad genética.

Las diversas variantes genéticas pueden detectarse a escala molecular mediante el estudio de los cambios en la estructura del ADN, o en proteínas codificadas por genes específicos. Este nivel de estudio de la diversidad, de la cual es responsable las características genética particulares de cada especie, es la base fundamental de la biodiversidad a niveles superiores, debido a que es el genotipo el que determina la forma en que una especie interactúa con su ambiente y con otras especies (Moreno 2001).

Existe una gran cantidad de técnicas para establecer mediciones de biodiversidad a escala genética. Una de las primeras técnicas en usarse fue la hibridación ADN/ADN, utilizando la suma de las diferencias entre la unión del ADN de un taxón con el de otro como referencia del grado de divergencia respecto de un ancestro común (Martínez 1997). Actualmente es poco utilizada dadas las limitaciones técnicas que presenta para recuperar suficiente cantidad de ADN de calidad.

Otras aproximaciones utilizadas en el estudio de la diversidad genética han sido la variación morfológica de caracteres cuantitativos (Solbrig 1991), el nivel de heterocigosidad, la proporción de loci polimórficos, el número de alelos por locus (Mallet 1996; Martínez 1997), las diferencias de las estructuras proteicas como reflejo de la variación genética (Solbrig 1991), y diversas aproximaciones tendentes a medir el polimorfismo del ADN entre individuos de la misma especie, como son el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), o el polimorfismo ampliado aleatoriamente (RAP) (Solbrig 1991; Hunter y Sulzer 1996).

No obstante, la utilización de secuencias génicas es uno de los métodos más extensivamente utilizados (Martínez 1997). Dentro de este enfoque, la secuenciación directa de fragmentos de PCR y el análisis de subunidades de genes ribosómicos han representado un importante avance para estudios evolutivos y de filogenia (Sogin 1990; White et al. 1990), llegando a constituir la herramienta más utilizada para caracterizar la diversidad de diversos tipos de comunidades.

La irrupción hace poco más de una década de técnicas de electroforesis en geles desnaturalizantes, como la electroforesis con gradientes desnaturalizantes (*denaturing gradient gel electrophoresis* -DGGE-) o con gradiente de temperatura (*temperature gradient gel electrophoresis* -TGGE-) ha supuesto un nuevo impulso a los estudios de diversidad, en especial de comunidades microbianas, y en la monitorización de las dinámicas poblacionales (Muyzer y Smalla 1998; Muyzer 1999; Heuer et al. 2001). Estas herramientas permiten la caracterización de poblaciones por su huella genética en un gel desnaturalizante debido a las variaciones en las secuencias de productos de PCR de ADN ribosómico. Estas variaciones producen cambios en la desnaturalización del ADN, con lo cual la movilidad del fragmento analizado varía en el gel a medida que cambia la intensidad del agente desnaturalizante, produciéndose por lo tanto la detención de la migración en distintos puntos del gel, de acuerdo a la composición nucleotídica del fragmento analizado (Muyzer y Smalla 1998; Muyzer 1999).

Otras herramientas para estudiar la biodiversidad a nivel molecular, en especial aquellas que han sido aplicadas para el estudio de la diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares, se describirán en el apartado correspondiente del punto 4 de esta revisión.

2.2 Diversidad microbiana del suelo.

De los componentes fundamentales de cualquier eco o agrosistema, el más difícil de estudiar y analizar en cuanto a las comunidades microbianas que lo integran, es el suelo. Esto es debido a la complejidad estructural que presenta al contar con tres fases (sólida, líquida y gaseosa) y sus interfases, y por la carencia de métodos eficaces para su evaluación *in situ* (Turco et al. 1994). Las últimas herramientas moleculares diseñadas para el estudio de la diversidad de los microorganismos del suelo han permitido mostrar que las comunidades presentes son mucho más diversas de lo que se pensaba (Torsvik et al. 1990). Inicialmente, la caracterización implicaba el cultivo y la identificación de las distintas especies, con las limitaciones que ello suponía. Hoy se sabe que por ese medio sólo se puede caracterizar una pequeña fracción de los aproximadamente 10^4 ribotipos que puede contener un gramo de suelo, y que representaría aproximadamente el número de especies presentes (Torsvik et al. 1990; Turco et al. 1994; Rösch et al. 2006).

Por otra parte, el componente biológico del suelo es el principal responsable de los cambios en la calidad del mismo, debido a que son los microorganismos del suelo los responsables últimos de los diferentes procesos y transformaciones que en él ocurren, como son el ciclado de nutrientes, la descomposición de la materia orgánica, la formación de agregados estables, etc... Es por ello por lo que cambios en el tamaño de las poblaciones microbianas y en su diversidad, afectan las propiedades del suelo, la estabilidad del ecosistema y a las diversas relaciones que se establecen entre el suelo y la planta (Dick 1994; Turco et al. 1994; Barea y Jeffries 1995; Barea 1998). De ahí la creciente preocupación por desarrollar bioindicadores que permitan rastrear los cambios en la calidad del suelo especialmente los generados por actividades humanas, centrándose en esto una buena parte de la investigación realizada desde la pasada década (Insam 2001). Actualmente, se utilizan cuatro diferentes enfoques metodológicos para abordar el estudio de la diversidad de microorganismos en suelo, que son *i)* el análisis del uso de sustratos *in vitro*, *ii)* análisis del uso de sustratos *in situ*, *iii)* análisis de patrones de ácidos grasos, y *iv)* análisis de patrones de ADN (Insam 2001; Jansa et al. 1999; Larsen y Bødker 2001; Madan et al. 2002; Mansfeld-Giese et al. 2002). Además, cabe mencionar que estos enfoques metodológicos mencionados se utilizan en la actualidad en diferentes áreas de estudio de la diversidad biológica del suelo, entre las cuales las más importantes serían *i)* la reclasificación taxonómica, *ii)* el monitoreo de genes funcionales en el ambiente o metagenómica, *iii)* el monitoreo de especies transgénicas, *iv)* el estudio e identificación de microorganismos de interés biotecnológico, y *v)* diversos estudios de carácter ambiental y de evaluación del impacto de las actividades antropogénicas (Graham et al. 1995; Siciliano et al. 1998; van Elsas et al. 1998).

En la sostenibilidad de los sistemas suelo-planta los microorganismos beneficiosos juegan un papel fundamental, y entre ellos destacan los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA), los microorganismos fijadores de nitrógeno y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Azcón 2000). A través de distintas actividades, como son la protección de la planta frente a estreses, la fijación de N₂ atmosférico o la protección frente a patógenos, todos ellos ejercen un papel clave en el establecimiento de plantas en ambientes estresados, y por lo tanto en la recuperación de la cubierta vegetal en áreas degradadas (Barea et al. 1997). Por esta razón, se introducirán a continuación algunos conceptos generales sobre biodiversidad microbiana en ambientes mediterráneos, aunque los aspectos referentes a ecología y diversidad, puntualmente de hongos MA, se abordarán con mayor detalle en el apartado correspondiente del punto 4 de esta revisión.

2.3 Diversidad microbiana del suelo en ecosistemas degradados.

Considerando que la planta es el motor principal de la vida de la microbiana en el suelo, es lógico constatar que en suelos degradados se produce un descenso en el número de microorganismos o de sus propágulos infectivos, así como de su actividad (Miller y Lodge 1997). Esto genera un círculo vicioso de efectos negativos, en los que el descenso de la actividad vegetal condiciona la degradación de la vida microbiana, lo que a su vez incide negativamente en el crecimiento y la nutrición de la planta. Esta es una de las principales limitantes que puede presentar un proceso natural o inducido de recuperación de la cubierta vegetal.

De los grupos microbianos mencionados con anterioridad, y que tienen una gran importancia en el mantenimiento de la sostenibilidad en agro- y ecosistemas, las bacterias conocidas genéricamente como *Rhizobium* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, etc...) destacan entre los fijadores de N₂. Estas bacterias establecen simbiosis mutualistas con leguminosas y representan una entrada fundamental de N en los ecosistemas (Barea y Olivares 1998), función que en ambientes mediterráneos adquiere una gran importancia, por cuanto entre las diversas especies arbustivas autóctonas de la Cuenca Mediterránea, existen numerosas leguminosas leñosas de interés en estudios de recuperación de la cubierta vegetal (Herrera et al. 1993; Barea et al. 1996).

Por su parte, las rizobacterias, colonizadoras de la rizosfera, destacan por sus efectos de promoción del enraizamiento y del ciclado biogeoquímico de los nutrientes que utilizarán las plantas (Barea 1997), efecto particularmente intenso en la rizoplanea (superficie de la raíz) (Barea 1998). Presentan además otra serie de actividades beneficiosas, tales como formación de agregados y estabilización del suelo, promoción del crecimiento, control de patógenos (mediante antibiosis, producción de sideróforos, inducción de resistencia, etc...), degradación de xenobióticos y liberación de enzimas, entre otras (Kennedy y Smith 1995; Kennedy 1998).

Finalmente, resultan de gran importancia en ecosistemas naturales (entre ellos los mediterráneos) las micorrizas, puesto que estas simbiosis ayudan a las plantas en la adquisición de nutrientes y en la tolerancia a diversos tipos de estrés, entre ellos la sequía (Smith y Read 1997). De todas ellas, destacan por su importancia cuantitativa las MA y las ectomicorrizas (ECM) (Barea y Honrubia 1993). Actualmente se considera que

las micorrizas son claves en las estrategias destinadas a controlar la degradación de los ecosistemas, en especial en la revegetación con especies autóctonas de ambientes mediterráneos, puesto que juegan un papel crucial en las primeras etapas del establecimiento de las plantas, en especial en suelos afectados por procesos erosivos, incendios, laboreo excesivo, contaminación y sometidos a condiciones de estrés (sequía, salinidad, temperaturas elevadas, deficiencias nutricionales, etc...) (Salamanca 1991; Requena 1996).

3. MICORRIZAS

El término micorriza, que etimológicamente significa “hongo-raíz”, fue propuesto por primera vez por el botánico alemán A.B. Frank (1885), haciendo referencia a la simbiosis observada entre las raíces de ciertos árboles con un micelio fúngico a la que ya, en aquel momento, supuso la función de favorecer las condiciones hídricas de la zona adyacente al sistema radical, además de un importante papel nutricional.

La simbiosis micorrícica se distingue de otras asociaciones entre hongos y plantas principalmente por su carácter mutualista. Está caracterizada por el flujo de componentes inorgánicos desde el hongo hacia la planta y de compuestos orgánicos de la planta hacia el hongo. Las estructuras del micosimbionte, que se extiende dentro de la raíz de la planta hospedadora y en el sustrato circundante, son características de cada tipo de micorriza diferente, y sirven para su diferenciación (Allen 1991).

Un aspecto importante de estas asociaciones es su universalidad, dado que la gran mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre son capaces de desarrollarlas, estando presentes en la casi totalidad de los ecosistemas terrestres (Allen 1991), tanto longitudinal como altitudinalmente.

A pesar de presentar muchas similitudes en cuanto a función y, en algunos casos, morfología, se pueden reconocer cinco tipos principales de micorrizas en base a las estructuras formadas y a la naturaleza de los simbioses implicados (Harley y Smith 1983; Barea 1998). Los tipos fundamentales de micorriza se describen a continuación (ver Figura II-2).

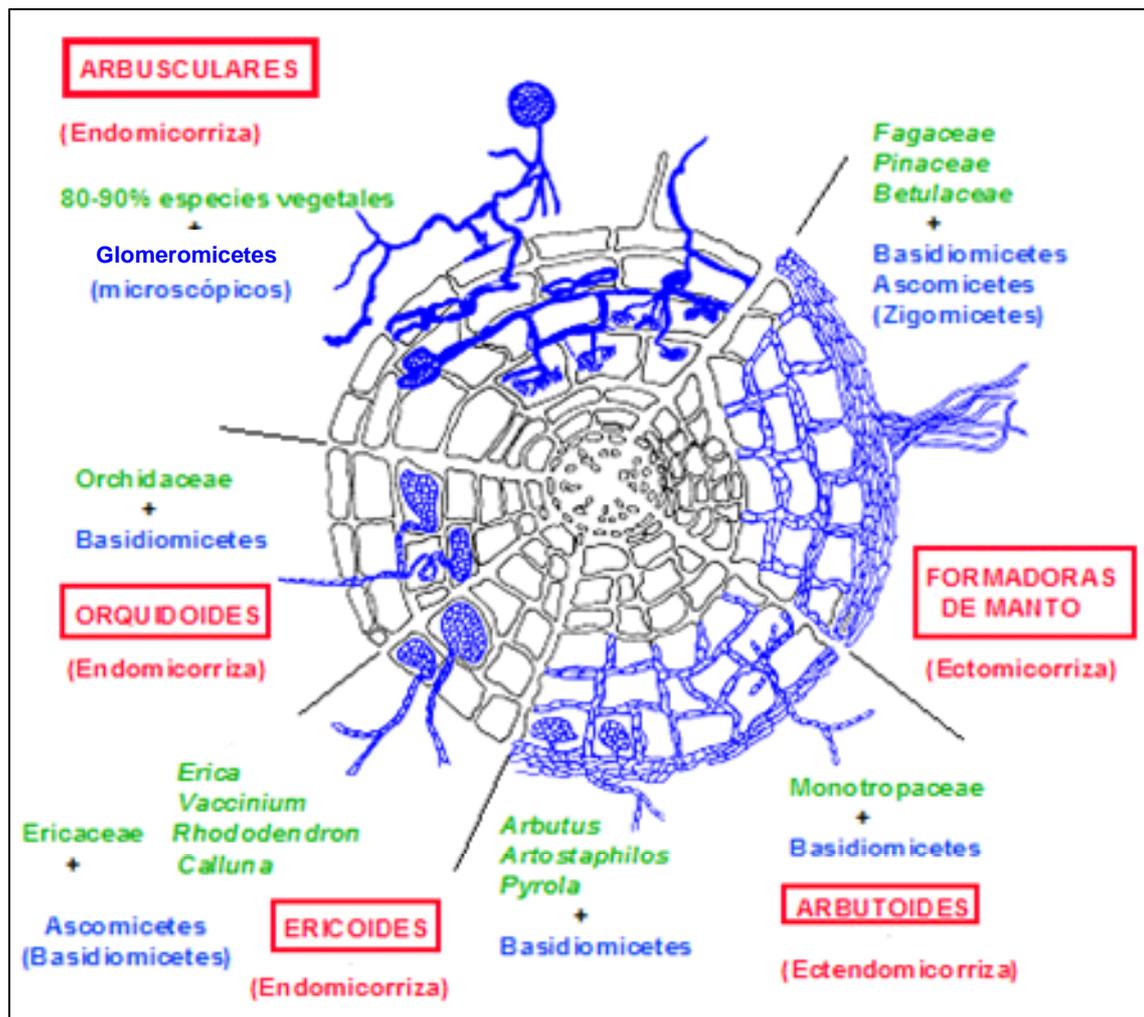


Figura 2. Esquema de los diferentes tipos de micorriza. Se muestran las estructuras características de cada uno de ellos, así como los simbiontes implicados (modificado de Barea 1998).

3.1 Ectomicorrizas.

En estas micorrizas el hongo se desarrolla en los espacios intercelulares de la corteza radical, sin penetrar al interior de las células, formando de esta manera la denominada red de "Hartig". Es característico además, el desarrollo de un denso "manto" de hifas que cubre la superficie de la raíz (Smith y Read 1997). Los hongos que desarrollan este tipo de micorriza pertenecen a las clases de los Basidiomicetos, Ascomicetos y Zigomicetos, y muchos de ellos presentan interés comercial (*Tuber melanosporum*, *Cantharellus sp.*, *Lactarius deliciosus*, *Amanita sp.*, *Boletus edulis*, etc.).

Las ectomicorrizas suponen, aproximadamente, un 3% del total de las asociaciones micorrícicas (Meyer 1973), presentándose sobre todo en especies vegetales de interés forestal, tales como Fagáceas, Pináceas, Betuláceas, Quercíneas, etc.

3.2 Endomicorrizas.

Existen tres tipos fundamentales de endomicorrizas, que se caracterizan por la penetración de las hifas del hongo en las células de la epidermis y cortex de la raíz y por la ausencia de manto sobre la superficie de la misma.

Orquidoides. Formadas por hongos basidiomicetos y plantas de la familia Orquidaceae exclusivamente. En esta asociación las plantas, tras su germinación presenta una fase de crecimiento heterotrofa, que requiere de compuestos carbonados cedidos por el hongo para su posterior desarrollo (Smith 1966).

Ericoides. Formada por ascomicetos, y ocasionalmente basidiomicetos y plantas de la familia de las Ericáceas, como son los brezos (*Erica sp.* y *Calluna vulgaris*), azaleas (*Rhododendron sp.*) y arándanos (*Vaccinium sp.*). El micosimbionte presenta una gran versatilidad en el uso de diversas fuentes de macronutrientes, por lo que las plantas están capacitadas para crecer en suelos con elevado contenido de materia orgánica (Pearson y Read 1975; St-John et al. 1985).

Arbusculares. Dada la temática de este estudio, las micorrizas arbusculares se tratan con mayor detalle en los siguientes apartados de este capítulo.

3.3 Ectendomicorrizas.

Este tipo de micorrizas se forma entre algunas especies de basidiomicetos y plantas arbutoides o monotropales, siendo el tipo menos extendido de micorriza. Se caracteriza por presentar un manto relativamente desarrollado, red de Hartig, y una ligera penetración de las hifas al interior de las células de la corteza, donde forman ovillos (Yu et al. 2001). Su nombre deriva de presentar características tanto de ecto, como de endomicorriza.

4. MICORRIZAS ARBUSCULARES

4.1 Características generales.

Las micorrizas arbusculares constituyen el tipo de simbiosis más extendido en la naturaleza, siendo capaz de establecerlo entre el 80 y el 85 % de las plantas y encontrándose en la práctica totalidad de los ecosistemas terrestres (Smith & Read 1997). Su origen se remonta al período devónico, hace unos 400 millones de años, cuando, según evidencias fósiles (Taylor et al. 1995) y moleculares (Simon et al. 1993), se asociaron las primitivas primeras plantas terrestres con hongos que posibilitaron su adaptación a las nuevas condiciones ambientales que implicaban el paso de un ambiente acuático al medio terrestre (Malloch et al. 1980). Todavía en la actualidad es posible encontrar evidencias de esta primitiva asociación en la simbiosis establecida entre algunos briofitos y hongos similares a los micorrícicos actuales, y posiblemente antecesores suyos, como *Geosiphon pyriformis* (Schüßler 2000). Desde entonces, los hongos MA y las plantas han evolucionado en una estrecha relación. Quizá sea esta evolución conjunta la causa de una de las características principales de este tipo de hongos, su biotrofia obligada. Esto condiciona que el hongo tenga la necesidad de encontrar y colonizar una raíz hospedadora para poder continuar su crecimiento y completar su ciclo de vida, que culmina con la formación de nuevos propágulos viables (Azcón-Aguilar et al. 1991; 1998). Esta es una de las principales limitantes del estudio de este grupo de hongos, ya que no es posible su multiplicación en condiciones axénicas (Azcón-Aguilar et al. 1991; 1998; Bago et al. 2000).

Las bases fundamentales sobre las que se establece la simbiosis son nutritivas, cediendo la planta al hongo productos carbonados procedentes de la fotosíntesis, mientras que éste cede a la planta nutrientes minerales, especialmente aquellos menos disponibles para la misma (Baligar y Fageria 1997; Clark y Zeto 2000), y agua, dada la mayor accesibilidad del hongo a recursos del suelo más distantes del sistema radical (Bago et al. 2000).

No obstante, se generan otros beneficios de la asociación, entre los que destacan una mayor resistencia de la planta micorrizada al ataque de patógenos del sistema radical (Hooker et al. 1994), a la presencia de metales pesados en el suelo (del Val et al. 1999; Vivas et al. 2004, 2005), al estrés hídrico (Sánchez-Díaz y Honrubia 1994;

Marulanda et al. 2003), o a condiciones extremas de pH del suelo (Siqueira y Moreira 1997; Clark et al. 1999). Por otra parte, la red de hifas extrarradicales y ciertas sustancias secretadas por el hongo durante la asociación favorecen la formación de agregados estables en el suelo y, por ende, la conservación de la estructura física de este (Wright y Upadhyaya 1998; Borie et al. 2000; Jeffries y Barea 2001).

4.2 Filogenia y taxonomía.

Los primeros intentos de clasificar los hongos MA datan de finales del siglo XIX y comienzos del XX, incluyéndose inicialmente en la familia Endogonaceae, dentro del phylum Zygomycota, debido al parecido de sus esporas con las de los zigomicetos (Gerdemann y Trappe 1974). En los últimos años, la sistemática del grupo de hongos formadores de micorrizas arbusculares ha sufrido numerosas modificaciones, debido principalmente la incorporación de estudios moleculares en la filogenia de estos hongos.

Según Morton y Benny (1990), las alrededor de 150 especies de hongos MA conocidas hasta esa fecha se incluían dentro del orden Glomales (más correctamente Glomerales) de la clase Zygomycota, distribuidos en seis géneros y tres familias: *Gigaspora* y *Scutellospora* (Fam. Gigasporaceae), *Glomus* y *Sclerocystis* (Fam. Glomaceae) y *Acaulospora* y *Entrophospora* (Fam. Acaulosporaceae). Esta clasificación ha sido, hasta hace relativamente poco tiempo, aceptada de forma generalizada.

Posteriormente, Morton y Redecker (2000), considerando caracteres morfológicos e incluyendo por primera vez evidencias moleculares, incluyeron dos nuevas familias, que presentaban mayores distancias en el árbol filogenético: i) Archaeosporaceae, representada por el género *Archaeospora* y que incluye especies anteriormente consideradas como *Acaulospora*, y ii) Paraglomaceae, representada por el género *Paraglomus*, y que incluye especies anteriormente consideradas como *Glomus*. Por otra parte, el género *Sclerocystis* se incluye dentro del género *Glomus* (ver Figura II-3a). A pesar de esto, Redecker y colaboradores (2000), estudiando las secuencias de la subunidad pequeña del gen ribosómico (18S ADNr), y el desarrollo ontogénico de algunas especies de HMA, encontraron que existían divergencias en cuanto a su agrupación taxonómica, y que presentaban un desarrollo dimórfico, compartiendo características tanto de *Glomus* como de *Acaulospora* (eg. *Glomus leptotichum* y *Acaulospora gerdemaniai*).

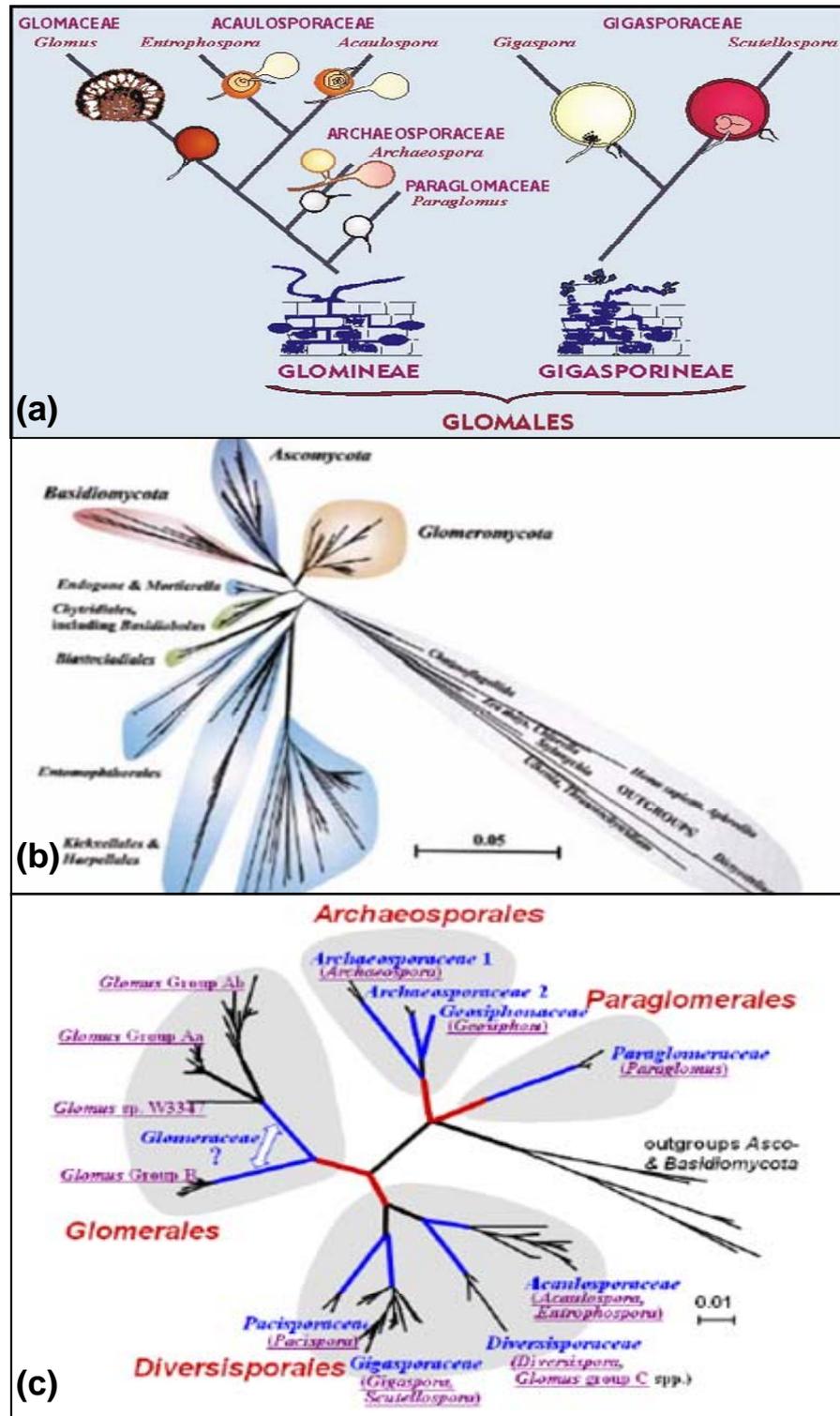


Figura 3. Últimas revisiones de la clasificación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. (a) Relaciones filogenéticas en el orden Glomales, según Morton y Redecker (2000). (b) Relaciones filogenéticas del phylum Glomeromycota respecto de otros grupos de hongos. (c) Relaciones filogenéticas en el phylum Glomeromycota basadas en las secuencias de la subunidad pequeña del ARNr (SSU, 18S) (basado en Schüßler et al. 2001, revisado por Walker y Schüßler 2004).

Estudios moleculares posteriores, basados igualmente en el análisis de 18S ADNr, han demostrado la naturaleza monofilética de este grupo de hongos, lo que ha permitido incluirlos en un nuevo phylum denominado Glomeromycota (Schüßler et al. 2001) (ver Figura 3b). Este phylum se compone de una sola clase, los Glomeromycetes, que a su vez comprende cuatro órdenes: Glomerales, Diversisporales, Paraglomerales y Archaesporales. Es de destacar el hecho de que el género *Glomus*, que presenta características morfológicas y estructurales bien definidas, muestra divergencias filogenéticas importantes, que han implicado su subdivisión en al menos tres grupos, dos de los cuales se incluyen en el orden Glomerales (*Glomus* A y B), y el tercero en Diversisporales (*Glomus* C) (Schwarzott et al. 2001). Walker y Schüßler (2004) realizaron la última modificación del phylum Glomeromycota, incluyendo la familia Pacisporaceae, representada por el género *Pacispora* (Oehl y Sieverding 2004). En la Figura II-3b se muestra la clasificación actualmente aceptada para los hongos formadores de micorrizas arbusculares.

4.3 Estructura de las micorrizas arbusculares.

En términos generales, se considera que en una micorriza activa existe una fase extrarradical, que incluye el micelio externo del hongo que se desarrolla en el suelo, y las esporas y células auxiliares (en algunos casos), una fase intrarradical, que incluye hifas intracelulares (micorrizas tipo *Paris*) y frecuentemente intercelulares (tipo *Arum*), los arbusculos, que se forman por división dicotómica repetida de hifas intercelulares, y ocasionalmente vesículas (ver Figura II-4). Es importante señalar que la colonización de la raíz por hongos formadores de micorrizas arbusculares no produce alteraciones morfológicas en la raíz apreciables a simple vista, y que el hongo sólo coloniza la epidermis y el parénquima cortical de las raíces, no produciéndose nunca la penetración al cilindro vascular ni a las zonas meristemáticas (Bonfante-Fasolo 1984).

La formación de una micorriza arbuscular ocurre mediante una sucesión de interacciones entre el hongo y la planta, que van a conducir a una integración morfológica y funcional de ambos simbioses (Gianinazzi-Pearson et al. 1996). Durante la formación de la simbiosis la planta acepta al hongo sin desencadenar reacciones generalizadas de defensa (Dumas-Gaudot et al. 2000). Esto es debido al establecimiento de un continuo diálogo molecular entre ambos simbioses, dirigido por el intercambio de señales, que

conducen al reconocimiento de ambos y al desarrollo de programas genéticos de aceptación (Vierheilig y Piché 2002).

4.4 Ciclo de vida de los hongos MA.

En general, las diferentes etapas del ciclo vital de los hongos micorrízico arbusculares son las que se muestran en la Figura 4.

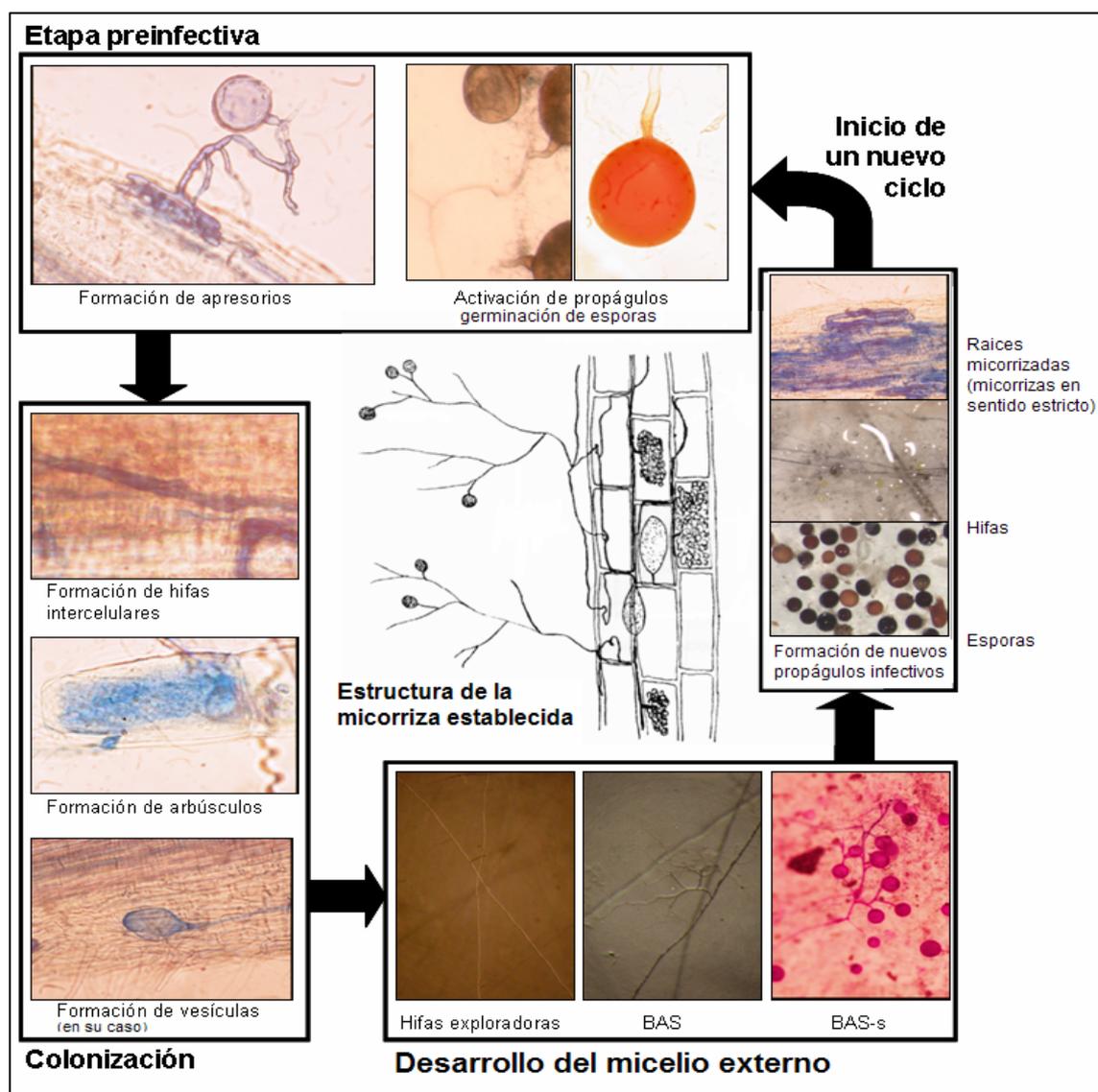


Figura 4. Ciclo vital de los hongos MA y estructuras características de las fases intra y extraradical, y del mismo. *Branched absorbing structures*, BAS (estructuras ramificadas de absorción); BAS asociados a esporas, BAS-s.

4.4.1 Preinfección.

Las esporas son las estructuras de resistencia de este tipo de hongos, y por sus características de tamaño y forma se pueden dispersar con relativa facilidad a nuevos ambientes (Koske y Gemma 1990). Además de las esporas pueden funcionar como propágulos infectivos para iniciar nuevas colonizaciones hifas del hongo preexistentes en el suelo y en trozos de raíces micorrizadas (Brundrett 1991).

El ciclo de vida del hongo se inicia con la germinación de las esporas de resistencia o la activación de los propágulos infectivos. La germinación comienza con la activación del metabolismo y la formación de tubos de germinación (Bonfante-Fasolo 1984). Está condicionada por una serie de factores físicos, químicos o biológicos, como son la temperatura (Hepper 1981), la concentración de CO₂, la presencia de diversos tipos de exudados radicales (Bécard y Piché 1989, Espinoza-Victoria 2000) o de determinados microorganismos, como hongos y bacterias del suelo (Azcón-Aguilar et al. 1986, Hildebrandt et al. 2002).

Una vez producida la germinación, si las condiciones son adecuadas, el tubo de germinación puede dar origen a un micelio que crece de forma radial y errática hasta que, fundamentalmente por azar, alcanza la rizosfera de una planta hospedadora (Giovanetti 2000; Giovanetti et al. 2002). En caso de que el micelio del hongo no encuentre una raíz susceptible de ser colonizada, el citoplasma se retrae y la espора vuelve nuevamente a un estado de reposo (Azcón-Aguilar et al. 1998; Bago et al. 1999).

Cuando el micelio llega a la rizosfera de una planta hospedadora, experimenta una activación que conduce a una profusa ramificación del mismo, aumentando así sus posibilidades de contacto con la raíz. Una vez producido esto, se forma un apresorio sobre la superficie de la misma, a partir del cual se inicia la colonización intrarradical (Barea et al. 1991; Giovanetti et al. 1993; Bago et al. 2000).

4.4.2 Colonización de la planta.

A partir del apresorio se forma una hifa, denominada hifa infectiva, que penetra las primeras capas de células de la epidermis, al parecer por presión física de la hifa, sumada a una cierta actividad hidrolítica (pectinasa y celulasa) de las paredes celulares (García-Romera et al. 1990; García-Romera et al. 1991; García-Garrido et al. 2002; Bonfante-Fasolo et al. 1992). Inicialmente, mediante circunvoluciones de hifas

intracelulares, se forman estructuras denominadas ovillos o “coils”, que pueden estar implicados en la absorción inicial de compuestos carbonados por parte del hongo (Smith y Smith 1997).

Como ya se ha indicado anteriormente, la colonización de la raíz puede realizarse a través de los espacios intercelulares (micorrizas tipo *Arum*) o bien colonizando célula a célula (micorrizas tipo *Paris*) (Smith y Read 1997). En la colonización tipo *Arum*, la que se presenta más comúnmente, a partir de las hifas intercelulares, a intervalos regulares se forman hifas que penetran las células y mediante ramificaciones dicotómica repetida, dan lugar a los arbusculos, la estructura más característica de este tipo de asociación. Las hifas del hongo no penetran el plasmalema de la célula hospedadora, aunque sí producen su invaginación, por lo que hasta las ramificaciones más finas del arbusculo quedan estrechamente rodeadas por la membrana plasmática. Se constituye así una interfase simbiótica, formada por la membrana de la célula hospedadora o membrana peri-arbuscular, una matriz interfacial entre ambos simbioses, la pared celular del hongo (muy reducida a nivel de las hifas más finas) y su membrana plasmática (Bonfante-Fasolo et al. 1986, 1992; Balestrini et al. 1994; Gianinazzi-Pearson et al. 1996; Bonfante 2001). A nivel de esta interfase es donde se presupone que tiene lugar el flujo bidireccional de nutrientes entre el hongo y la planta (Smith y Gianinazzi-Pearson 1990; Smith et al. 1994). Los arbusculos tienen una vida media de entre 4 a 10 días, después de lo cual degeneran y se reabsorben por la célula hospedadora, la cual vuelve a recuperar la situación previa a la colonización (Scanerini y Bonfante-Fasolo 1983; Bonfante-Fasolo 1984; Alexander et al. 1988).

La mayoría de las especies de hongos MA (prácticamente todas, exceptuando a las pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*) forman además estructuras de forma globosa llamadas vesículas, que se generan por el hinchamiento terminal o intercalar de las hifas, y cuya función parece ser el almacenamiento de productos de reserva (Abbott, 1982; Smith y Gianninazzi-Pearson 1988; Barea et al. 1991).

4.4.3 Colonización del suelo.

La fase extrarradical de la simbiosis está representada por la red de micelio del hongo que se desarrolla en el suelo circundante a la raíz. Este micelio se desarrolla simultáneamente a la colonización intrarradical del hongo, funcionando como un sistema radical complementario, muy efectivo, y fundamental en la adquisición de nutrientes y

agua por la planta más allá de la zona de agotamiento cercana a la raíz (Sanders y Tinkers 1973; Barea 2000). En este sentido, diversos estudios, realizados en condiciones controladas, han mostrado que por cada metro de raíz se producen entre 7 y 250 m de hifas externas (Barea et al. 1991; Smith y Read 1997). El micelio extrarradical tiene una capacidad elevada para absorber eficazmente nutrientes que difunden lentamente en el suelo, en especial P (Harrison y van Buursen 1995; Jakobsen 1995), diversas formas de N (Johansen et al. 1992, 1993; Tobar et al. 1994) y micronutrientes esenciales para la planta, como son Zn y Cu (George et al. 1995; Clark y Zeto 2000).

El estudio del desarrollo del micelio extrarradical del hongo MA y de los factores que lo influyen ha resultado difícil dada la condición de simbiote estricto de este tipo de hongos (Azcón-Aguilar et al. 1991, 1998). El desarrollo de técnicas de cultivos monoxénicos, iniciado por Bécard y Fortin (1988), ha permitido abordar, entre otros, los estudios sobre morfogénesis y metabolismo del componente extrarradical del hongo. Los citados autores formularon un medio de cultivo (medio mínimo o M) en el cual el hongo *Gigaspora margarita* era capaz de completar su ciclo de vida estableciendo la simbiosis con raíces de *Daucus carota* transformadas con el plásmido *Ri T*. Es así como se ha puesto de manifiesto que el hongo inicialmente genera unas hifas gruesas, con una marcada apicalidad, denominadas hifas exploradoras. Estas hifas pueden experimentar una serie de ramificaciones de primer y segundo orden que forman la red del micelio externo, y sobre las que se desarrollan estructuras características del hongo. Así, a intervalos regulares sobre las hifas se producen estructuras muy ramificadas, con cierto parecido a los arbusculos, conocidas como BAS (*branched absorbing structures*, o estructuras ramificadas de absorción), que serían las encargadas de la absorción de nutrientes del medio circundante, y que a veces aparecen asociados a esporas (BAS-espora) (Bago et al. 1998a, 1998b; Bago et al. 2000).

Finalmente, con la formación de las esporas se completaría el ciclo de vida del hongo MA. En cualquier caso, y como se indicó anteriormente, el propio micelio es una fuente importante de potencial infectivo para continuar la colonización del mismo sistema radical o de algún otro próximo (Barea, 1991). Dada su ubicación en el suelo, establece una serie de interacciones con los organismos (micro y Macro) allí presentes y con el ambiente físico que lo constituye (Jeffries y Barea 2001), lo que convierte al micelio extrarradical, o la micorriza que lo sustenta, en un elemento clave, tanto desde el punto de vista físico, como biológico, en el desarrollo y mantenimiento de las interfases suelo-planta.

4.5 Fisiología de la simbiosis.

Asumiendo que el papel principal que desempeña la simbiosis es de tipo nutricional, es importante conocer los aspectos fundamentales de los mecanismos de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, de gran importancia para ambos simbioses sobre todo si se considera la biotrofia estricta del hongo.

En lo referente al metabolismo carbonado, el uso de $^{14}\text{CO}_2$ permitió comprobar que la planta proporcionaba C orgánico procedente de la fotosíntesis al hongo (Ho y Trappe 1973). El hongo es capaz de absorber glucosa (Pfeffer et al. 1999), que es rápidamente transformada a trehalosa y glucógeno (Sachar-Hill et al. 1995), con menor capacidad osmótica, y también a lípidos de reserva (triacilglicéridos) (Bécard et al. 1991).

No obstante lo anterior, se ha puesto de manifiesto la existencia de una dualidad fisiológica entre las hifas internas (intrarradicales) y externas del hongo MA, presentando las primeras una significativa capacidad de metabolizar glucosa (y un poco menos fructosa) e incapaces de utilizar otros compuestos carbonados. Por su parte, las hifas del micelio externo son incapaces de metabolizar glucosa y fructosa, pero por gluconeogénesis son capaces de metabolizar compuestos lipídicos, formados en el micelio intrarradical, y desde allí transportados al micelio extrarradical (Pfeffer et al. 1999, Bago et al. 2002). Esta compartimentación del metabolismo carbonado, sería uno de los factores que explicaría la incapacidad del hongo para completar su ciclo de vida de forma libre.

Una situación intermedia presenta el hongo en su estado presimbótico, siendo capaz de utilizar glucosa y fructosa de forma poco eficaz, además de acetato y CO_2 , lo que demuestra que su metabolismo es básicamente lipolítico y que tiene capacidad de fijación oscura de CO_2 , siendo además incapaz de sintetizar lípidos de reserva (Bago et al. 1999)

La importancia de las micorrizas arbusculares en la nutrición mineral de las plantas es, sin duda, uno de los aspectos más estudiados de la simbiosis por su repercusión en el desarrollo vegetal. La mejora nutricional que ocasiona a la planta el establecimiento de la simbiosis se podría deber a varias causas, como son: *i*) el aumento del volumen de suelo explorado, al actuar las hifas del hongo como un sistema radical complementario altamente efectivo; esto se verifica sobre todo en nutrientes que difunden con dificultad en la solución del suelo (Sanders y Tinkers 1973; Barea 2000); *ii*) una

mayor competitividad de las hifas del hongo con respecto a otros microorganismos del suelo que la presentada por las propias raíces (Linderman 1992); *iii*) una mayor especificidad de los transportadores del hongo respecto de los de la planta (Cress et al. 1979); y *iv*) la posibilidad de absorber fuentes de nutrientes minerales no disponibles a la propia planta (Swaminathan 1979; Clark y Zeto 2000).

Entre los nutrientes cuya absorción favorece la formación de micorrizas, el P es uno de los más importantes, por tratarse de un macronutriente, y además porque entre un 95 y un 99% del fósforo presente en el suelo se encuentra de forma no disponible para la planta (Bielecki 1973). En general, la micorriza permite una mayor absorción de P por las plantas (Merryweather y Fitter 1995; Raghothama 1999; Jia et al. 2004), llegando en algunas especies a ser responsables del 100% de la absorción de P (Smith et al. 2004).

Respecto a los mecanismos implicados en la absorción, transporte y transferencia de P por las hifas del hongo a la planta, se puede señalar que la absorción de P como ión ortofosfato es un proceso rápido y eficiente. Esto es debido a la existencia de transportadores de H_2PO_4^- de alta afinidad en las hifas del hongo (Harrison y van Buuren 1995; Maldonado-Mendoza et al. 2001), que operan asociados a un simporte de H^+ creado por distintas H^+ -ATPasas (Ferrol et al. 2002, Requena et al. 2003). El H_2PO_4^- absorbido es rápidamente transformado en polifosfato en el micelio extrarradical (Ezawa et al. 2004). Los polifosfatos se acumulan fundamentalmente a nivel de las vacuolas (Rasmussen et al. 2000), y en ellas son transportados hasta el micelio intrarradical mediante corrientes citoplasmáticas (Olsson et al. 2002; Uetake et al. 2002). Ya en el micelio intrarradical, el polifosfato es hidrolizado por diversas fosfatasas alcalinas (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi 1978, Aono et al. 2004). El paso del H_2PO_4^- liberado hacia la matriz interfacial todavía no se ha descrito, aunque probablemente ocurre de forma pasiva, a favor de un gradiente de concentración. Sí se ha descrito la existencia de varios transportadores de H_2PO_4^- , que se expresan específicamente en células colonizadas por arbusculos (Rausch et al. 2001; Harrison et al. 2002), y que son responsables de la entrada de P en la célula hospedera.

Las hifas de los hongos MA presentan además la capacidad de absorber captar tanto NO_3^- como NH_4^+ del suelo (Johansen et al. 1994; Tobar et al. 1994; Bago et al. 1996; 2001; Johansen et al. 1996; Johansen 1999; Hawkins y George 2001), y se ha estudiado la posibilidad de que puedan también absorber cantidades importantes de N orgánico (Hawkins et al., 2000). Recientemente se ha descrito la existencia de un transportador de alta afinidad por NH_4^+ expresado en las hifas extrarradicales de *Glomus intraradices* (López-Pedroza et al. 2006). Es probable que exista un sistema GS/GOGAT

para la asimilación de N inorgánico por parte de hifas de micorrizas arbusculares, además de una actividad Nitrato Reductasa (Bago et al. 2001).

Por otra parte, plantas micorrizadas en sistemas bicompartimentados, suplementadas con ^{15}N -Gly como única fuente de N en el compartimiento de desarrollo exclusivo de hifas extrarradicales del hongo MA, alcanzaron hasta los 150 nmol de ^{15}N por gramo de raíz, lo que demostraría la capacidad del micelio extrarradical de hongos MA de transportar el N como aminoácidos (Hawkins y George 2000). Existen además evidencias de que el ciclo de la urea estaría implicado en la formación de arginina en las hifas extrarradicales, la cual asociada a polifosfatos en las vacuolas sería el medio de transporte de N desde la zona extrarradical hacia las hifas intrarradicales, habiéndose encontrado altas concentraciones de arginina especialmente en el sistema vacuolar (Bago et al. 2001; Govindarajulu et al. 2005). Se debe considerar separadamente las partes sintética (en el micelio extrarradical) y degradativa, liberándose la arginina junto con los iones fosfato por hidrólisis de los polifosfatos en el micelio intrarradical, siendo poco probable la salida desde las hifas del hongo a la matriz interfacial, ya que ello representaría una importante pérdida de C para el hongo, y se ha demostrado la ausencia de un flujo carbonado desde el hongo a la planta (Fitter et al. 1998). La probable vía de degradación de la arginina sería a ornitina, urea y, finalmente a NH_4^+ , hipótesis que está reforzada por el hecho de que se ha encontrado ornitina en cantidades importantes en las estructuras del hongo y actividad ureasa en las hifas (Bago et al. 2001).

4.6 Ecofisiología de los hongos MA.

A pesar de la universalidad de las micorrizas arbusculares, hasta el momento no se ha prestado suficiente atención al papel que juegan sobre la diversidad, estabilidad y productividad de los ecosistemas terrestres. En cuanto a la autoecología del hongo, se sabe que sus niveles poblacionales son altamente variables y dependientes de una serie de condiciones ecológicas, como son los niveles nutricionales y de pH del suelo, la temperatura, humedad, etc., y por diferentes prácticas agronómicas (fertilización, prácticas fitosanitarias, labranza del suelo, etc...) cuando se trata de agroecosistemas (Rosendahl et al. 1989; Abbott y Gazey 1994; Kabir et al. 1997; Gavito y Miller 1998). Resulta por tanto difícil llegar a conclusiones respecto de los efectos que los distintos factores, así como sus interacciones, presentan sobre las poblaciones de hongos MA (Brundrett 1991). Por otra parte, existe una marcada estacionalidad tanto en la actividad

de la simbiosis, como en la presencia de propágulos infectivos por parte del hongo (Brundrett 1991; Kabir et al. 1997). En la Tabla 1 se resumen los factores intrínsecos del hongo y de la planta que pueden influenciar el proceso de micorrización.

Tabla 1. Características de los HMA y las plantas que pueden influenciar los procesos involucrados en la formación de las micorrizas arbusculares (Abbott y Gazey 1994).

Proceso	Característica que influye*
Germinación de los propágulos	<ul style="list-style-type: none">• Periodo de tiempo requerido por las esporas para madurar y completar la dormancia• Porcentaje de germinación de las esporas• Longitud y distribución de las hifas producidas a partir de esporas, hifas activas o de micorrizas preexistentes
Colonización de la raíz	<ul style="list-style-type: none">• Susceptibilidad de las raíces de diferentes edades y/o especies de planta a la micorrización• Grado de desarrollo de las hifas y características de colonización en la raíz• Ritmo de crecimiento de las raíces
Colonización del suelo	<ul style="list-style-type: none">• Longitud y distribución de hifas en el suelo
Formación de propágulos	<ul style="list-style-type: none">• Número y producción de propágulos en relación al estado de la colonización

* Muchas de las características mencionadas pueden estar afectadas por factores edáficos como el nivel de P del suelo, el pH, la salinidad, temperatura y humedad. Estos factores pueden alterar al hongo, a la planta o a ambos simbioses.

Desde un punto de vista más general, se ha sostenido durante mucho tiempo que la divergencia entre las distintas especies de hongos MA es reducida, dada la gran diferencia existente entre el número de especies de plantas capaces de establecer la simbiosis (unas 225000), respecto del número de especies de hongos capaces de colonizarlas (unas 150) (Law y Lewis 1983; Walker y Trappe 1993; Morton et al. 1998). Esto ha llevado a pensar que casi cualquier planta micorrizable es susceptible de establecer la simbiosis con casi cualquier hongo formador de micorrizas arbusculares. De hecho cabe la posibilidad de que todas, o muchas de las plantas que integran un ecosistema, estén comunicadas a través de una red de micelio micorrícico (Requena 1996; Jeffries y Barea 2001).

A pesar de esto, y aunque no existe evidencia de una especificidad hongo-planta estricta, se ha puesto de manifiesto en numerosas investigaciones que no todas las especies de hongos MA colonizan con la misma intensidad y eficiencia distintas especies vegetales (Graw et al. 1979; Azcón y Ocampo 1981; Estaún et al. 1987). De hecho, se ha demostrado la existencia de distintos grados de compatibilidad funcional en la simbiosis como resultado de las influencias del ambiente sobre la expresión genotípica de ambos

simbiontes, lo que se refleja en un distinto nivel de eficacia de la asociación formada entre una planta y diversos hongos MA presentes en el medio (Smith y Gianninazzi-Pearson 1998). Un ejemplo claro de esto lo presentan Requena y colaboradores (2001), quienes demostraron que hongos MA nativos presentaron una mejor adaptación que hongos alóctonos a la zona objeto de estudio, a partir de los beneficios obtenidos por parte de la planta hospedadora.

La existencia de distintos grados de compatibilidad funcional en la simbiosis tiene una connotación clara sobre la función que pueden presentar los hongos MA como factores influyentes de la composición florística de los diferentes ecosistemas (Allen 1995). En este sentido, van der Heijden y colaboradores (1998b) encontraron que diferentes especies de hongos MA podían ser potenciales determinantes de la estructura de la comunidad vegetal, dado el distinto nivel de dependencia de las diferentes especies de plantas a los distintos hongos MA presentes. Además, la diversidad y productividad de diferentes comunidades vegetales está determinada en gran medida por la diversidad de hongos MA (van der Heijden et al. 1998a). En sentido inverso, existen numerosos estudios (Hetrick y Bloom 1983; Anderson y Liberta 1985; Bever et al. 1996; Burrows y Pflieger 2002) que indican la influencia de la diversidad y estructura florística sobre la composición y diversidad de las comunidades de hongos MA.

Otra importante función ecológica de la asociación micorrícica es la estabilización de la estructura del suelo, dado que las hifas del hongo pueden formar una red mediante la cual enlazan las partículas del suelo (Miller y Jastrow 1990; 1992a; b; Borie et al. 2000; Neergarden y Petersen 2000). Por otra parte, en 1996 Wright y Upadhyaya describieron la existencia de una proteína producida por hongos MA, conocida como glomalina, que tiene un papel importante en la agregación del suelo, representando a la vez una importante fuente de carbono y nitrógeno (Miller y Jastrow 2000).

4.7 Interacción de los hongos MA con otros grupos microbianos del suelo.

Entre los microorganismos cuyas acciones juegan un papel beneficioso en el establecimiento y desarrollo de las plantas los hay de naturaleza saprofítica o simbiótica. Entre ellos existen especies a las que se les ha atribuido un papel en el control biológico de patógenos, la mejora del enraizamiento vegetal, transformaciones químicas de nutrientes desde formas no asimilables y biorremediación entre otros (Barea 1986;

Bethlenfalvay y Linderman 1992). En general, se les denomina PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal), puesto que por distintos mecanismos son capaces de estimular el crecimiento vegetal (Kloepper et al. 1991).

De otra parte, otros grupos microbianos rizosféricos son capaces de influenciar la formación y el funcionamiento de la simbiosis MA (Azcón-Aguilar y Barea 1992). Estos efectos se pueden llevar a cabo mediante actividades de distinta índole como, por ejemplo, la activación de los propágulos infectivos del hongo en estadios presimbóticos (Mayo et al. 1986; Azcón 1987; Azcón-Aguilar y Barea 1995; Giovannetti et al. 2002), aunque también podrían facilitar la formación de puntos de entrada en la raíz (Azcón-Aguilar et al. 1986).

Las MA son, por su parte, capaces también de minimizar los daños producidos por un patógeno en el sistema radical (Hooker et al. 1994; Slezack et al., 2000), efecto que se manifiesta especialmente cuando la simbiosis se establece antes de que se produzca el ataque del patógeno (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Azcón-Aguilar et al., 2002 a,b). Los mecanismos por los cuales se podría explicar este efecto protector de la simbiosis MA incluyen la mejora del estatus nutricional de la planta, la competencia por lugares de colonización/infección, la competencia por fotosintetizados, cambios morfológicos y anatómicos en el sistema radical y activación de los mecanismos de defensa de la planta, entre otros (Linderman 1988; Caron 1989).

El desarrollo de la simbiosis altera la fisiología de la planta, y mediante cambios en la cantidad y calidad de los exudados radicales, repercute en las diferentes comunidades microbianas rizosféricas (Azcón-Aguilar y Barea 1992; Barea 1997; Gryndler 2000; Marschner et al. 2001; Marschner y Baumann 2003). Surge así un nuevo concepto: la micorrizosfera, compuesta por la rizosfera de la planta y la hifosfera del hongo (Linderman 1988). Además, se ha evidenciado que determinadas bacterias y hongos están asociados fundamentalmente a las estructuras de los hongos MA (Filippi et al. 1998; Budi et al. 1999; Mansfeld-Giese et al. 2002). En este sentido se ha descrito la existencia de estas bacterias endosimbóticas, como el caso del género *Burkholderia*, encontrado en el citoplasma de algunas especies de la familia Gigasporaceae (Minerdi et al. 2002).

Una de las interacciones más importantes de las MA se produce en la simbiosis tripartita HMA-*Rhizobium*-leguminosa, de gran interés ecológico y agronómico, ya que los requerimientos de N y P de la planta pueden quedar cubiertos en gran medida por la

actividad interactiva de los simbioses (Barea et al. 1992). La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y las MA presentan analogías fisiológicas, celulares y genéticas, como son el hecho de que ambos microsimbiontes se alojen en el parénquima cortical de la raíz y producen una reactivación del citoplasma y del núcleo de las células colonizadas (Gianinazzi-Pearson et al. 1994). En ambos casos se produce un incremento en la actividad fotosintética de la planta, lo que permite a ésta suministrar los compuestos carbonados que requieren los microorganismos simbioses e incluso generar un balance positivo de la asociación, efecto conocido como “compensación fotosintética” (Ruiz-Lozano y Azcón 1993), causado por el mayor aporte de nutrientes y la mayor actividad hormonal registrada en presencia de los endófitos. Además del efecto interactivo en la simbiosis tripartita, González. (1988) encontró que en estado presimbótico se estimulaba el desarrollo del micelio del hongo y la formación de puntos de entrada en el sistema radical, tanto por la presencia de células de *Rhizobium*, como por la participación de diversos metabolitos presentes en el sobrenadante del cultivo de células de *Rhizobium* en vida libre.

Otro grupo de organismos que interacciona con las MA son las bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB). Esta interacción puede deberse a la exploración por las hifas de los microhábitats en los que se ha solubilizado el P, a los cuales, con frecuencia, no tienen acceso (Azcón et al. 1976). Por otra parte, se ha encontrado ocasionalmente incrementos en la actividad fosfatasa en la rizosfera de raíces micorrizadas (Tarafdar y Marschner 1994), lo que, en parte, puede ser atribuido al incremento de poblaciones microbianas con esta actividad (Dodd et al. 1987).

4.8 Características generales del genoma de los hongos MA.

No se conocen estadios sexuales en el ciclo de vida de los HMA, siendo las estructuras reproductivas las esporas, como se mencionó con anterioridad. Estas pueden albergar cientos o incluso varios miles de núcleos (Bécard y Pfeffer 1993; Giovannetti y Gianinazzi-Pearson 1994; Hosny et al. 1998a). Por otra parte, el hecho de que no se conozcan fases sexuales en los hongos MA no significa necesariamente que no existan procesos de flujo genético entre los individuos, ya que se suelen producir anastomosis vegetativas entre hifas originadas a partir de esporas diferentes de una misma especie y entre hifas de micelios desarrollados sobre distintas raíces, dándose así la posibilidad de un intercambio nuclear y de la generación de un estado heterocariótico (Casana y

Bonfante-Fasolo 1988; Giovannetti et al. 2001; de la Providencia et al. 2005). Esto está apoyado por la presencia de polimorfismos a nivel del ADNr en una misma espora (Clapp et al. 2001), así como por la existencia de más de uno de estos loci en un mismo núcleo (Trouvelot et al. 1999). No obstante, Pawlowska y Taylor (2004) sugieren que estos polimorfismos puedan ser de origen intranuclear, sugiriendo la existencia de una poliploidización del genoma y cambios periódicos del nivel de ploidía siendo en todo caso los núcleos genéticamente uniformes. Sobre el tipo de multiplicación nuclear, existen evidencias de que puede ser tanto de tipo clonal, como recombinante (Rosendahl y Taylor 1997; Vandenkoornhuysen et al. 2001; Koch et al. 2004). En general se acepta que, aunque el nivel de ploidía de los HMA no está todavía bien definido, los núcleos de sus esporas serían haploides (Rosendahl y Sen 1992; Hijri y Sanders 2004).

El valor C (contenido de ADN en el genoma haploide) para estos hongos es muy variable entre las distintas especies, habiéndose obtenido valores de entre 0.13 a 1.08 pg de ADN por núcleo en especies del género *Scutellospora* (Hosny et al. 1998a), mucho más elevados de lo que presentan, por ejemplo, diversas especies de Zigomicetos, cuyos valores C oscilan entre 0.3-0.4 pg/núcleo. Esta gran variación en el tamaño del genoma, tanto dentro de los distintos hongos MA estudiados, como con respecto a otros eucariotas, puede deberse a la presencia de cantidades variables de secuencias no codificantes de ADN repetidas, como por ejemplo, las 2600 copias de la secuencia SC1 encontrada en *Scutellospora castanea* (Zézé et al. 1996). Otro ejemplo de secuencias de ADN repetitivas encontradas en HMA son los minisatélites (de unos 20 pb) y los microsátélites (de hasta 8 pb), los que, sin embargo, resultan una interesante herramienta para estudiar la variabilidad genética entre distintas especies, así como dentro de la misma especie (Longato y Bonfante 1997; Zézé et al. 1997).

En cuanto a la composición de bases del ADN, Hosny et al. (1998b) encontraron que el contenido en GC es muy bajo en comparación al de otros grupos de hongos, con entre un 30 y un 35% del total, lo que se puede deber a las condiciones de privación de luz bajo las que se desarrollan. Además, entre los residuos de citosina, hasta un 25% pueden estar metilados (mC, 5-metilcitosina), un valor significativamente alto si se compara con el 1-2% de *Neurospora crassa* (Russell et al. 1987). Esto puede ser una evidencia indirecta de la existencia de ADN repetitivo en HMA, puesto que la mC es frecuente en secuencias repetidas (Radman 1991). Además, la mutación de mC a T resulta relativamente fácil, lo que podría explicar los altos contenidos de AT (Sueoka 1988).

4.9 Herramientas moleculares utilizadas en el estudio de la diversidad de hongos MA.

El estudio de la diversidad de los hongos MA hasta hace poco era una tarea que presentaba una serie de complicaciones, entre otros motivos por los descritos con anterioridad, que hacían referencia a su biotrofía obligada y la imposibilidad de estudiar a los hongos o sus comunidades en funcionamiento si no es asociados a una planta. Por otra parte, la mayoría de los estudios de diversidad en este tipo de hongos se ha basado en las diferencias morfológicas que presentan sus esporas remanentes en el suelo. No obstante, el polimorfismo genético en el orden de los Glomeromicetos es mucho mayor al que se espera en base en las características morfológicas de sus esporas (Gianinazzi-Pearson et al. 2001).

Se han utilizado muchas herramientas moleculares para el estudio de los hongos MA, muchas de las cuales se basan en la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*, reacción de la polimerasa en cadena). En este sentido, Bruns y Gardes (1993), señalan que la región ideal para realizar amplificaciones de PCR deben de cumplir con los siguientes criterios: *i)* estar presentes en todos los hongos de interés; *ii)* ser fáciles de amplificar; *iii)* amplificar preferencialmente el ADN del hongo, cuando éste se encuentra junto con el de la planta; y *iv)* ser lo suficientemente variable como para permitir diseñar pruebas para numerosas jerarquías taxonómicas. Los genes que codifican para el ARN ribosómico (ADNr) cumplen muchos de estos criterios, por lo que han sido comúnmente utilizados en este tipo de estudios. Por otra parte, hay en el genoma, tanto de procariontes como de eucariotas, repetidas copias de genes ribosómicos, y están altamente conservados.

Dentro de éstos genes, las regiones codificantes (18S, 5.8S y 28S) son las más conservadas, las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) muestran un cierto grado de variación, y las regiones espaciadoras intergénicas (IGS) son las más variables (ver Figura II-5) (Lanfranco et al. 1998). En hongos, la cuarta subunidad de ADNr implicada en la estructura del ribosoma (5S) es codificada por una zona situada entre los IGS o en otra parte del genoma (Garber et al. 1988).

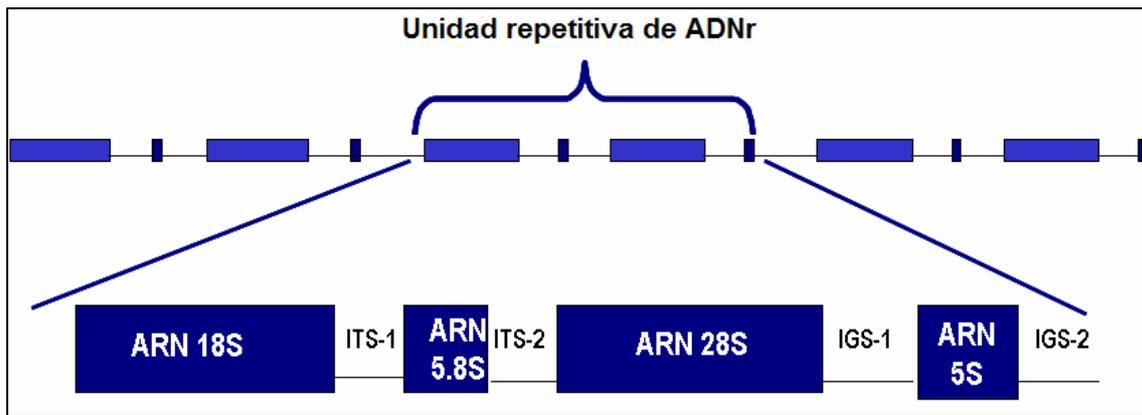


Figura 5. Estructura de los genes ribosómicos nucleares de eucariotas.

Las secuencias de la subunidad pequeña del gen ribosómico (ADNr 18S) evolucionan muy lentamente, por lo que son comúnmente usadas para estudiar la distancia evolutiva ente organismos relacionados (White et al. 1990). Para el caso particular de los hongos MA, Simon y colaboradores (1992a; b; 1993a; b) fueron los primeros en aplicar técnicas de PCR al estudio de genes nucleares codificantes de la subunidad 18S ADNr, diseñando el primer oligonucleótido “específico” de Glomales (actuales Glomeromicetos) capaz de amplificar ADN fúngico en raíces colonizadas por este tipo de hongos. Estos autores realizaron también los primeros estudios tendientes a detectar polimorfismos en este grupo de hongos mediante SSCP (*Single-Stranded Conformational Polymorphisms*, polimorfismo conformacional de cadena simple).

Adicionalmente al análisis de las secuencias de las distintas subunidades de ADNr, se han utilizado otras numerosas técnicas para estudiar la biodiversidad de los HMA, muchas de ellas basadas en técnicas de PCR (Lanfranco et al. 1998). Entre estas técnicas contamos la secuenciación directa de fragmentos de PCR de las distintas subunidades del gen ribosómico de hongos MA (Helgason et al. 1998; 1999; Ferrol et al. 2004), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*, análisis de restricción de fragmentos amplificados de ADNr) (Sanders et al. 1995; Anderson y Cairney 2004), SEAD (*Selective Enrichment of Amplified DNA*, enriquecimiento selectivo de ADN amplificado) (Clapp et al. 1995), SSCP (Kjøller y Rosendahl 2000), DGGE (Kowalchuk et al. 2002; Öpik et al. 2003; Anderson y Cairney 2004) y T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms*, polimorfismo del fragmento Terminal de restricción) (Tonin et al. 2001; Mummey et al. 2005).

5. RECUPERACIÓN DE ECOSISTEMAS MEDITERRANEOS DEGRADADOS

Cuando se habla de recuperación de ecosistemas degradados se hace referencia a la restauración de la diversidad y de la calidad de la cubierta vegetal. Para ello, se hacen necesarias una serie de medidas de gestión del ecosistema, tratando de revertir los efectos perjudiciales de los procesos de degradación. Cuando el grado de degradación es mayor, y las medidas de gestión no son suficientes para controlar y revertir los procesos deletéreos sobre la cubierta vegetal y la calidad del suelo, se hace necesaria la utilización de especies de la sucesión natural, en zonas en las que las plantas se encuentran en un número subóptimo de individuos o ausentes.

Entre los principales factores limitantes para el establecimiento óptimo de las distintas especies vegetales en condiciones naturales, con especial referencia al sudeste ibérico, se encuentran las deficientes condiciones físico-químicas del suelo (costras superficiales, bajo estado de agregación y de contenido de materia orgánica), la limitada actividad biológica del mismo y la baja disponibilidad de semillas (Correal et al. 1987; Cerdá 1995; Albadalejo et al. 1996; Barea et al. 1996; López-Bermúdez 1996). Además, las distintas especies vegetales difieren en su idoneidad para la protección del suelo, lo que en conjunción con una serie de limitaciones ecofisiológicas inherentes a su crecimiento y reproducción, limita la recuperación natural de estas especies, o determina que ésta se produzca de forma muy lenta (Herrera et al. 1993; Albadalejo et al. 1996). En términos generales, la revegetación natural espontánea está muy limitada en áreas donde las precipitaciones anuales estén por debajo de 350 mm. Por todo lo anterior se hace necesario un estudio exhaustivo previo de las condiciones que posee el ecosistema degradado que se pretende mejorar. Entre los aspectos que deben ser considerados están las características del suelo del área en estudio, el relieve y su pendiente, el régimen de precipitaciones y, por supuesto, la cubierta vegetal remanente y su grado de cambio respecto de la vegetación climácica del ecosistema (Requena 1997).

En la Figura 6 se muestran los distintos procesos de degradación a que puede estar sometido un ecosistema natural, y las estrategias de actuación posibles para revertirlos. En cuanto al tipo de vegetación apropiado para la recuperación es importante definir el destino final de uso del área y la capacidad del ecosistema de soportar determinado tipo de vegetación (Requena 1997).

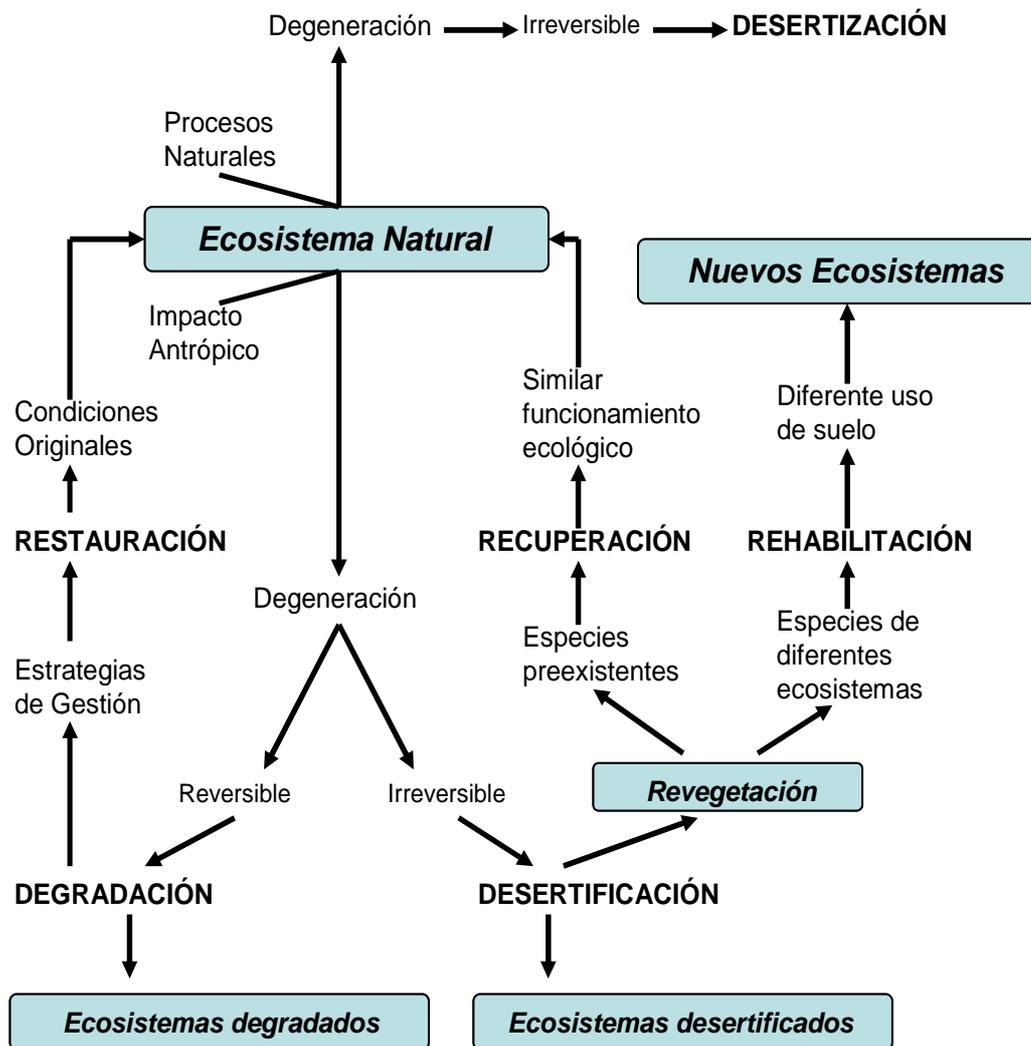


Figura 6. Impacto de las actividades humanas y procesos naturales sobre los cambios en los ecosistemas, tanto naturales como alterados y/o modificados (tomado de Herrera et al. 1993). Las distintas alternativas de manejo de los ecosistemas degradados dan origen a diferentes procesos de recuperación, denominándose restauración cuando la alteración del ecosistema ha sido reversible y se puede volver al estado climácico con medidas eficaces de gestión. Cuando la alteración ha sido mayor se produce un ecosistema desertificado, que sólo puede ser mejorado aplicando alternativas de revegetación, ya sea con especies preexistentes (recuperación), o con especies de ecosistemas diferentes, en cuyo caso se genera un ecosistema distinto del original (rehabilitación).

En ecosistemas semiáridos la temperatura y las limitadas precipitaciones dificultan la utilización de especies arbóreas, por lo que para frenar los procesos de desertificación de la Cuenca Mediterránea, en particular en el sudeste ibérico, la estrategia de revegetación más apropiada se base en especies arbustivas, subarbustivas y herbáceas más que en especies leñosas arbóreas, ya que se ha puesto de manifiesto que presentan una capacidad similar de protección del suelo (Carreras 1992; Herrera et al. 1993;

Puigdefábregas 1994; Barea et al. 1996; Requena 1997). Por otra parte, son justamente este tipo de especies las que han sufrido una intervención antrópica más significativa (Albadalejo et al. 1996). El uso de especies nativas *versus* exóticas es altamente recomendable, puesto que están mejor adaptadas al clima local y las condiciones edáficas, por lo que su capacidad para sobrevivir a los estreses múltiples que previsiblemente tendrán que soportar es más elevada (Requena 1997). Como ejemplo de esto, Herrera et al. (1993), trabajando con seis especies arbustivas de leguminosas, mostraron como sólo las especies nativas de la zona piloto de estudio fueron capaces de establecerse y prosperar.

5.1 Papel de los microorganismos del suelo en procesos de revegetación.

Es importante, además, que el material vegetal utilizado en la recuperación de ecosistemas degradados se haya obtenido con tecnologías orientadas a mejorar su calidad y resistencia frente a los diversos estreses ambientales propios del ecosistema. Entre las metodologías aconsejadas está la utilización de microorganismos del suelo, principalmente micorrizas y rizobacterias, para dotar a la planta de una rizosfera optimizada, que le ayude a superar los estreses ambientales y facilite el éxito de la recuperación de la cubierta vegetal (Barea et al. 1996).

En este sentido, y como se ha mencionado con anterioridad, el funcionamiento de los ecosistemas terrestres es dependiente de la actividad de los microorganismos del suelo, puesto que la mayoría de los ciclos biogeoquímicos que ocurren en la naturaleza son desarrollados por ellos (Requena 1997; Barea 1998; Jeffries y Barea 2001). La desaparición o disminución de la microbiota del suelo debido a procesos de erosión y desertificación afecta al normal funcionamiento de estos ciclos, a la calidad del suelo, y en consecuencia al establecimiento del material vegetal en el contexto de los programas de revegetación, siendo el reestablecimiento de la diversidad microbiana una prioridad en este tipo de programas (Requena 1997). Para esto, puede ser necesaria una estrategia de inoculación en aquellos suelos sujetos a alteraciones severas, como son los sometidos a actividades extractivas, en los cuales se remueve o elimina la capa superficial, (Requena 1997), o aquellos en que esta parte del perfil de suelo se pierde por erosión severa (Wu et al. 2002), alterándose de forma considerable las poblaciones microbianas.

Por otra parte, en el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas, se establecen diversos círculos viciosos de relación causa-efecto. En este sentido, se puede mencionar que la calidad del suelo está definida por una serie de parámetros físicos y químicos del mismo (como son porosidad, agregación de partículas, contenido de materia orgánica, erodabilidad, etc.) (Parr et al. 1992), aunque el parámetro de evaluación más importante es la actividad biológica del suelo (Parr et al. 1992; Visser y Parkinson 1992; Albadalejo et al. 1996). En el sentido inverso, el establecimiento y desarrollo de las plantas depende en gran medida de la calidad del suelo (Barea et al. 1996).

Esta estrecha interrelación entre los componentes edáficos y de la cubierta vegetal es la determinante de la generación de espirales de degradación en ambientes frágiles y con una acentuada intervención antrópica (Pérez-Solís 2001). Por esto, en un programa de revegetación de un ecosistema degradado una premisa importante es mejorar la calidad del suelo como requisito para la sostenibilidad del proceso (Barea et al. 1996). Además, considerando que buena parte de la calidad del suelo es debida a la actividad microbiana, el efecto rizosférico cobra una importancia clave, puesto que las raíces representan no sólo el soporte físico, sino también el soporte nutricional de la microbiota. Esta se beneficia de los exudados y restos celulares, y a su vez la planta se beneficia de actividades microbianas tales como liberación de nutrientes, producción de fitohormonas, protección contra patógenos, descomposición de sustancias tóxicas o mejora de la estructura del suelo (Azcón-Aguilar y Barea 1992; Barea y Jeffries 1995; Requena 1997). A pesar de que el proceso de recuperación del suelo es muy lento, existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que el adecuado manejo de las micorrizas en los ecosistemas degradados acelera de forma importante este proceso (Allen et al. 1992; Jeffries y Barea 1994; Allen 1996; Gould y Hendrix 1997).

5.2 Utilización de hongos micorrizicos para la recuperación de la cubierta vegetal.

Como se ha mencionado con anterioridad, el objetivo final de la revegetación es el reestablecimiento de un ecosistema estable, con el funcionamiento óptimo de los procesos de ciclado de nutrientes, en lo que los microorganismos del suelo, como es bien sabido, son los principales responsables (Jasper 1994), por lo que deben ser considerados de forma prioritaria en este tipo de programas. De gran importancia en este sentido resulta el efecto de las micorrizas en la mejora de la estructura del suelo

mediante la agregación de sus partículas y la formación de agregados hidroestables (Tisdall 1991; 1994; Tisdall et al. 1997; Bethlenfalvay et al. 1999; Borie et al. 2000). Esto es debido a la combinación de un efecto físico, que produce la red de micelio del hongo entrelazando las partículas entre sí, junto a otro químico, debido a la producción de glomalina, una glicoproteína sintetizada por el hongo, que actúa como material cementante de las partículas del suelo. La glomalina, dadas sus condiciones de hidrofobicidad, y por ser altamente recalcitrante, puede llegar a ser un factor clave para la mejora de las condiciones físicas de los suelos en ecosistemas degradados (Wright et al. 1996; Wright y Upadhyaya 1996; 1998; 1999).

Por tanto, es preciso mencionar que el máximo beneficio de la inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares sólo se conseguirá después de una selección muy controlada del hongo o el consorcio de hongos que demuestren el más alto nivel de compatibilidad funcional y ecológica para cada sistema planta-suelo, y que se correspondan con la diversidad natural de las comunidades del ecosistema del que forman parte.

En estudios anteriores (Herrera et al. 1993; Requena et al. 1996, 1997) se ha logrado aislar hongos micorrízicos arbusculares y otros microorganismos rizosféricos desde especies arbustivas de interés en ecosistemas mediterráneos. Este hecho resulta muy importante si se considera que, como se ha mencionado, la reintroducción de estos organismos autóctonos puede resultar clave en un programa de revegetación, en especial en el sudeste ibérico, que sufre una importante pérdida e incluso desaparición de propágulos microbianos del suelo (Weinbaum et al. 1996; Requena et al. 1996, 1997, 2000). En este sentido, los avances en las técnicas de selección y preparación de inoculantes de hongos micorrízicos pueden ser una útil herramienta para la reproducción de hongos con interés en revegetación y su mantenimiento en cantidades suficientes para su utilización como inoculantes de una forma optimizada (Jarstfer y Sylvia 1992; Dodd y Thomson 1994; Barea et al. 1997; Azcón-Aguilar et al. 1999). Finalmente, se debe considerar también a los otros grupos microbianos rizosféricos (inóculos de “segunda generación”), los que deben ser co-inoculados durante la producción del material vegetal, para favorecer de esta manera la promoción de los mayores beneficios para la planta (Barea et al. 1996; Barea 1997; Leseur et al. 2001).

*Templaron tus lloros la sed de mi sequía
hicieron tus fuerzas el ceder de mis pedregales,
inmersos en un mar de inutil tierra.
Ayer fuistes despojo de buenas y fertiles cosechas.
Hoy, tu ancla, recalca en mi fondo, despertando
vida en tierra muerta.*

(Angel P. Blázquez, Tu alma y mi tierra)



III PLAN DE TRABAJO

Para abordar el objetivo general de esta tesis doctoral se hizo necesaria la reproducción de un sistema modelo que fuese representativo, tanto de las comunidades vegetales como de la microbiota micorrícica presentes en suelos de ambientes áridos y semiáridos de la cuenca mediterránea. No obstante, la utilización de espacios naturales no resultaba en la práctica realizable, puesto que se presentaron una serie de limitaciones, entre las cuales se contaban la imposibilidad de manejar las comunidades vegetales a fin de obtener un nivel de diversidad y una estructura de las comunidades vegetales fija y estable durante el período de duración de la investigación propuesta y, por el desconocimiento y la incapacidad de caracterizar de manera fehaciente las distintas comunidades de hongos micorrícicos presentes bajo las condiciones observadas, tanto en el suelo como colonizando las raíces de las plantas. Esto, además, condicionado por las condiciones edafoclimáticas propias de estos ecosistemas, que debido a su alta inestabilidad determinaban una elevada incertidumbre al momento de definir las condiciones iniciales como factores fijos y estables, que reflejaran su grado de injerencia en las respuestas y/o variables estudiadas de forma constante a través del tiempo.

Por esto, para la consecución del objetivo general, de los objetivos metodológicos y de los complementarios, se utilizó un sistema de mesocosmos en el cual se establecieron plantas de especies representadas en los ecosistemas naturales, que se encontraran presentes en ecosistemas mediterráneos, con especial atención al nivel de degradación del Encinar mesomediterráneo, y que mostraran niveles de diversidad vegetal fijos a lo largo del estudio. Debido a esto, las plantas que se eligieron fueron Lavanda (*Lavandula latifolia* Medik.), Mejorana (*Thymus mastichina* (L.) L.), Retama (*Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.) y Romero (*Rosmarinus officinale* L.), las cuales se establecieron solas y en combinación de dos o cuatro especies en los diferentes mesocosmos establecidos.

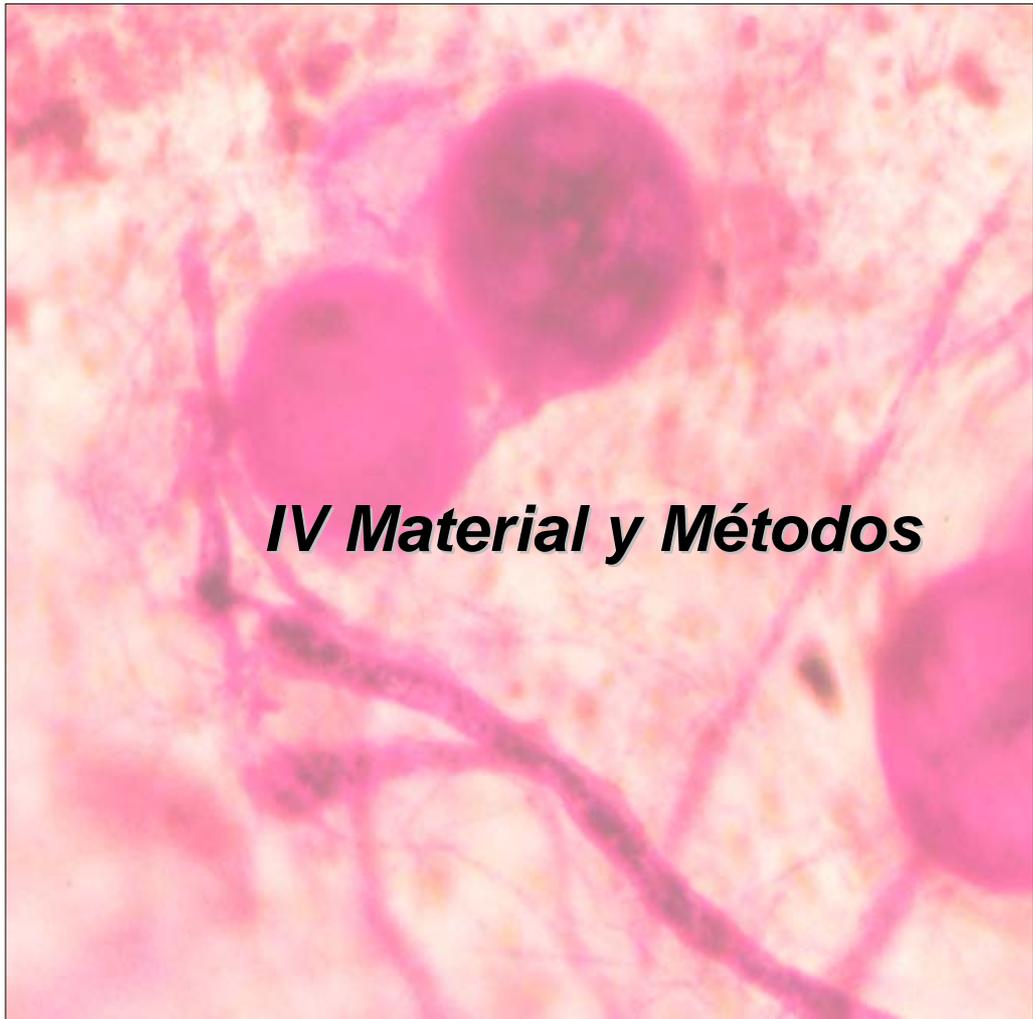
Por otra parte, se utilizó un inóculo de hongos micorrícicos que incluyó seis especies representativas y comunes en ecosistemas mediterráneos áridos y semiáridos, que fueron *Glomus clarum*, *G. constrictum*, *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. mosseae* y *G. viscosum*. El consorcio de hongos micorrícicos utilizado fue distribuido de manera homogénea en todos los sistemas de mesocosmos, a fin de obtener un nivel de diversidad inicial idéntico en todas las asociaciones vegetales estudiadas.

Por su parte, el sustrato de crecimiento fue un suelo representativo de zonas degradadas de ecosistemas mediterráneos, obtenido de un área con un fuerte nivel de degradación y una casi nula cobertura vegetal actual, en el término municipal de Gorafe (Granada), representativo de la hoya Guadiciano-Baztetana. También se utilizó a modo comparativo un sistema de mesocosmos que utilizó la diversidad fúngica presente en el momento de la colección del sustrato, por lo que no fue esterilizado ni inoculado con el consorcio fúngico antes mencionado.

Para que el efecto ambiental se viese reflejado en el comportamiento de las variables, y se pudiese estudiar de forma lo más representativa posible el efecto de la estacionalidad climática sobre la diversidad y la estructura de las comunidades de hongos micorrícicos, los sistemas de mesocosmos diseñados fueron mantenidos bajo condiciones ambientales reales en un sistema abierto a lo largo de los tres ciclos anuales analizados.

Por consiguiente, el organigrama de trabajo consideró la realización de las siguientes actividades en el orden en que son mencionadas a continuación.

1. Caracterización de las comunidades vegetales y fúngicas utilizadas, así como sus niveles de diversidad inicial.
2. Optimización de las metodologías físicoquímicas, bioquímicas y moleculares para la determinación de la evolución temporal de los diferentes índices y/o variables utilizados(as) para reflejar el efecto de la cobertura vegetal y de la estacionalidad climática sobre las propiedades del suelo y las comunidades vegetales y fúngicas.
3. Determinación de las variables definidas, de forma estacional, para evaluar el comportamiento de las condiciones edáficas, de las comunidades de hongos micorrícicos, del tamaño de las poblaciones de propágulos del hongo, y del comportamiento de la cobertura vegetal en las distintas comunidades vegetales formadas.
4. Y, finalmente, desarrollo de los estudios tendientes a dilucidar las respuestas observadas, tanto por efecto de los tipos de cobertura vegetal utilizados como de la estacionalidad climática, sobre los diferentes parámetros establecidos como índices, así como su interrelación, y las interacciones producidas en los diferentes tratamientos formados.



IV Material y Métodos

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio en mesocosmos se realizó en macetas de 6 L de capacidad bajo condiciones de umbráculo (condiciones de humedad y temperatura ambiente). El diseño utilizado fue completamente aleatorizado, con 5 replicaciones por cada uno de los niveles estudiados (tratamientos). Los niveles de la variable influyente fueron definidos de acuerdo a las distintas asociaciones vegetales que se formaron con las cuatro especies de plantas utilizadas, como se muestra en la Tabla 2.

Dado el diseño adoptado y la necesidad de realizar muestreos periódicos para la realización de los análisis de forma estacional (cada tres meses, comenzando el 13 de agosto de 2002), la unidad experimental correspondió, en cada ocasión, a una fracción del sistema de mesocosmos, que fue recolectada de forma dirigida para evitar retirar sustrato desde una zona con una muestra previamente repuesta, evitando así la influencia del muestreo en las determinaciones posteriores.

Tabla 2. Diferentes tratamientos analizados y especies vegetales utilizadas.

Tratamiento	Especies vegetales consideradas *
I	Lavanda
II	Mejorana
III	Retama
IV	Romero
V	Lavanda + Mejorana
VI	Lavanda + Retama
VI	Lavanda + Romero
VIII	Mejorana + Retama
IX	Mejorana + Romero
X	Retama + Romero
XI	Las cuatro especies
XII**	Las cuatro especies

* En cada maceta se establecieron cuatro plantas, ya sea de la misma especie, dos de cada especie o una de cada especie.

**Este tratamiento difiere del XI en que el sustrato correspondió a suelo natural no esterilizado.

2. MATERIAL UTILIZADO

2.1 Suelo y Sustrato.

Se utilizó un suelo representativo de la localidad de Gorafe, Granada (Lat 37°27' Long -3°02'; 850 msnm), representativo de la hoya Guadiano-Bacense. El suelo se obtuvo desde el perfil entre 5 y 25 cm de profundidad.

La zona de extracción del suelo se caracteriza por su origen de materiales conglomerados (pleistocénico, xerorthens), posiciones geográficas de colina, una acusada abundancia de piedras finas, casi nula aptitud agrícola por textura y profundidad y una muy baja tolerancia a la degradación por erosión ($4 \text{ tm ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) (Pujalte y Prieto, 1980). Algunas características fisicoquímicas determinadas en el suelo se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Algunas propiedades del suelo utilizado en el estudio en mesocosmos.

pHw	P Disp ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CO ₃ - (%)	M.O. (%)	N tot (%)	C/N	GFE* (mg g^{-1})	Arena (%)
8,7	15	25	1,51	0,10	8,8	5,0	53

* Glomalina fácilmente extractable.

Como sustrato de crecimiento de las plantas se utilizó una mezcla de suelo y arena en proporción 3/1 p/v, como se describe en la Tabla 4. El suelo fue tamizado a un tamaño de 4 mm., homogeneizado mecánicamente por agitación y tinalizado a 90°C por dos horas durante tres días consecutivos. La arena fue esterilizada en autoclave a 120°C por 20 min.

Tabla 4. Proporción de arena, suelo y peso total de sustrato por maceta.

	% Volumen	% Peso	Volumen (L)	Cantidad (kg)
Arena	29	33	3,5	3,8
Suelo	71	67	1,4	1,9
TOTAL			4,9	5,7

2.2 Plantas.

Se utilizaron cuatro especies vegetales de formaciones arbustivas y matorrales presentes en la serie de degradación de la vegetación autóctona correspondientes al Encinar Mesomediterráneo (retamar, romeral, tomillar, ver Figuras 7 y 8) (Blanca & Morales, 1991; Navarro-Reyes, 1995); Lavanda (*Lavandula latifolia* Medik.), Mejorana (*Thymus mastichina* (L.) L.), Retama de bolas (*Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.) y Romero (*Rosmarinus officinalis* L.).

2.2.1 Lavanda (*Lavandula latifolia* Medicus; alhucema, espliego; Angiosperma-Labiatae).

Es una planta presente en buena parte de la región mediterránea, de forma frecuente. Constituyente de matorrales heliófilos establecidos sobre sustratos calizos, principalmente en los pisos meso y supramediterráneo con ombroclima seco. Su floración se presenta de julio a septiembre (Blanca y Morales, 1991).

2.2.2 Mejorana (*Thymus mastichina* (L.) L.; tomillo blanco; Angiosperma-Labiatae).

Se presenta en buena parte de la península ibérica, de forma abundante. Forma parte de matorrales heliófilos como tomillares, en los pisos meso y supramediterráneos con ombroclima seco. Su floración se presenta entre junio y julio (Blanca y Morales, 1991).

2.2.3 Retama (*Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.; retama común; Angiosperma-Leguminosae).

Se encuentra presente en la zona íberonorteafricana, más frecuentemente en zonas basales. Forma parte del matorral subserial, en el piso mesomediterráneo seco, en formaciones arbustivas tipo retamares. Arbusto de 1,5 a 3 m, con ramas estriadas. Pierde pronto la hoja, por lo que principalmente el tallo realiza la función asimiladora. Florece de abril a junio-julio (Blanca y Morales, 1991). Puede crecer en cualquier tipo de terrenos, desde 0-1400 msnm en lugares secos y despejados. Requiere un clima mediterráneo no excesivamente frío ni húmedos (López-González, 2001).

2.2.4 Romero (*Rosmarinus officinalis* L.; Angiosperma-Labiatae).

Se encuentra presente en casi toda la región mediterránea, de forma abundante. Forma parte del matorral heliófilo en el piso mesomediterráneo seco. Arbusto siempre verde de 0,5 a 1,5 m, profusamente ramificado con ramas pardo-rojizas. Gran profusión de hojas verdes lustrosas por el haz y blancas por el envés, casi cilíndricas y sésiles. Florece casi todo el año, principalmente entre septiembre y mayo (Blanca y Morales, 1991). Aparece en todo tipo de terrenos, preferentemente calcáreos desde 0 a 1500 msnm en las montañas más cálidas, donde forma matorrales en sitios secos y soleados, principalmente en ambiente de encinar (López-González, 2001).

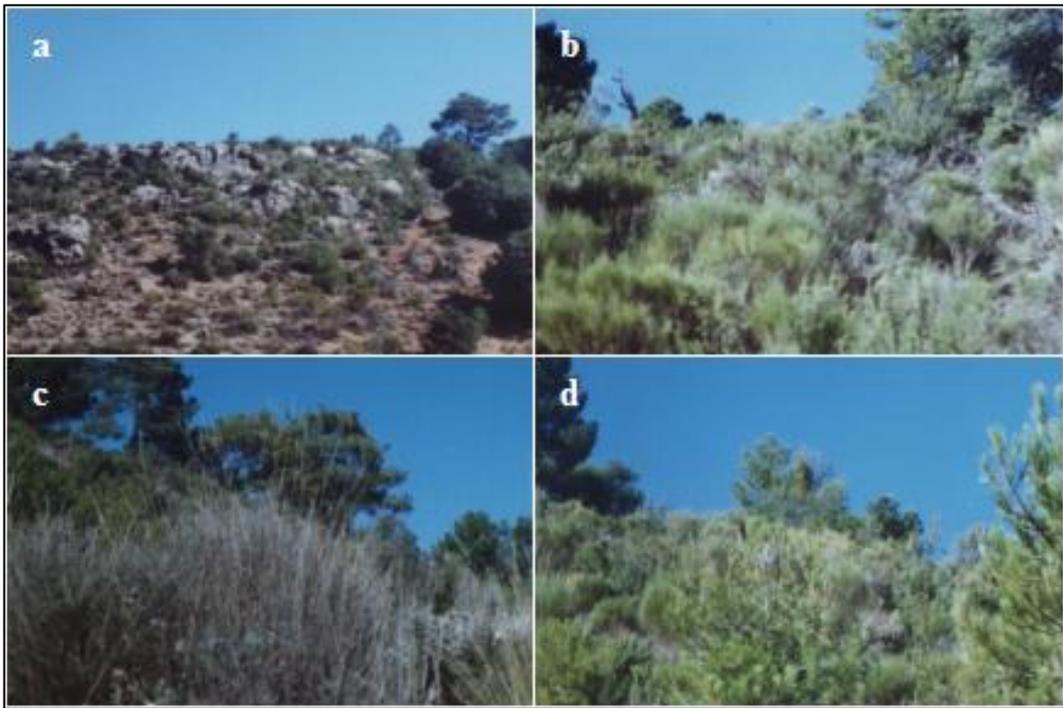


Figura 7. Zona de degradación de la vegetación autóctona “Encinar Mesomediterráneo” de la Sierra de Baza. (a) Cubierta vegetal degradada del romeral. Asociaciones características (b) genista-romero y (c) lavanda-tomillo en adecuado estado de conservación. (d) Coníferas introducidas con fines de revegetación.



Figura 8. Especies utilizadas en el estudio. (a) *Lavandula latifolia*. (b) *Thymus mastichina*. (c) *Retama sphaerocarpa*. (d) *Rosmarinus officinale*.

2.3 Hongos micorrícico arbusculares.

Se utilizó como inóculo una mezcla de seis cultivos monoespecíficos de HMA del género *Glomus* característicos de ecosistemas mediterráneos del sur de España: *G. clarum*, *G. constrictum*, *G. coronatum*, *G. intraradices*, *G. mosseae* y *G. viscosum*. Los inóculos fueron obtenidos de diversos ecosistemas, tanto agrícolas como naturales, por multiplicación de aislados en cultivos trampa, utilizando como sustrato una mezcla de suelo estéril:arena:sepiolita 1/1/1 v/v/v y *Trifolium repens* y *Sorghum hybridum* como plantas hospederas.

Para conocer las características del inóculo mixto utilizado, se evaluó tanto el potencial infectivo como la cantidad inicial de esporas de cada especie de hongo y se estudió las características morfológicas de las esporas de cada especie para su posterior identificación con fines de estudiar la biodiversidad de esporas. La caracterización del inóculo micorrícico utilizado se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del inóculo de hongos micorrízico-arbusculares utilizado en el estudio en mesocosmos.

ESPECIE HMA	Clasif ¹	PROVINCIA ²	CANTIDAD ³	ESP/100g ⁴	NMPP ⁵
<i>Glomus clarum</i>	BEG125	Jaen	80	580	62,5
<i>Glomus constrictum</i>	EEZ22	Alicante	80	260	62,5
<i>Glomus coronatum</i>	EEZ44	Murcia	60	70	418,7
<i>Glomus intraradices</i>	BEG121	Jaen	40	310	79,3
<i>Glomus mosseae</i>	BEG122	Jaen	60	550	240,5
<i>Glomus viscosum</i>	BEG126	Jaen	40	950	46,9
TOTAL			360	430	202,3

¹ Clasificación del aislado en el banco de glomales de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) o en el Banco Europeo de Glomales (BEG).

² Provincia de aislamiento del ecotipo.

³ Gramos de inóculo usados en la mezcla de hongos y total por maceta.

⁴ Esporas de HMA en 100 g de inóculo mono-específico o 100 g de inóculo mixto.

⁵ Propágulos micorrízicos en 100 g de sustrato o de inóculo mixto.

Algunas esporas obtenidas por tamizado húmedo (ver protocolo 4.2.2) se fijaron en preparaciones semipermanentes, utilizando alcohol polivinílico ácido láctico glicerol (PVLG; ddH₂O 100 mL, ácido láctico 100 mL, glicerol 10 mL, alcohol polivinílico 16.6 g), con y sin reactivo de Melzer (PVLG+M; reactivo Melzer: Hidrato cloral 100 g, ddH₂O 100 mL, I_(s) 1.5 g, KI 5.0 g), para analizar bajo microscopio las características morfológicas que permitieron su identificación (diámetros polares-ecuatoriales, color, paredes, gránulos lipídicos, forma de la hifa de sustentación, etc.). Para la identificación de las esporas obtenidas se utilizaron las claves morfológicas recopiladas por Schenck y Pérez (1990) y la base de datos disponible en internet (<http://invam.caf.wvu.edu>, 2005).

2.3.1 *Glomus clarum* Nicolson & Schenk.

Las clamidosporas (Figura 9) se forman solas o en pequeñas agrupaciones en el suelo, frecuentemente también dentro de las raíces. Las esporas poseen un diámetro de 100-260 µm, que van desde un color blanco hasta un amarillo-marrón, con un contenido de glóbulos de tamaño variable, y su forma va desde globosa a subglobosa. La pared de la espora se compone de tres capas (L1, L2 y L3), la primera de las cuales forma un continuo desde la hifa, descomponiéndose a medida que la espora se va desarrollando. Las distintas paredes se unen estrechamente entre ellas, salvo la L3, que en estado maduro es posible de separar mediante presión (Nicolson y Schenck 1979; INVAM 2005).

2.3.2 *Glomus constrictum* Trappe.

Las clamidosporas (Figura 10) se forman solas o en racimos laxos en el suelo, son de forma globosa a subglobosa, con 150-330 μm de diámetro. Su coloración es marrón oscura a negra. Posee un contenido de glóbulos lipídicos de tamaño variable. Se distinguen de una hasta dos capas en su superficie. Característica de esta especie es la constricción de la hifa de sustentación en la base de la espora, con un diámetro de 3-6 μm , y un engrosamiento posterior en la hifa de hasta 20 μm , con una transición de color del marrón oscuro al amarillo (Trappe 1977).

2.3.3 *Glomus coronatum* Giovannetti.

Clamidosporas (Figura 11) globosas a subglobosas, frecuentemente irregulares, de color naranja pálido a marrón con un diámetro entre 80 y 220 μm . La pared de la espora la constituyen dos capas (L1 y L2), la primera de las cuales aparece granular o ausente en estados maduros o de degradación. La segunda capa posee columnas radiadas, que genera la apariencia de estructuras tipo corona en su observación microscópica. Su hifa de sustentación es recia, con forma de embudo, y son la continuación de las paredes de la espora (INVAM 2005).

2.3.4 *Glomus intraradices* Schenck & Smith.

Las esporas (Figura 12) se forman solas o en racimos al interior de la raíz, y menos frecuentemente fuera de ésta. La forma de las esporas es de globosa a irregular, siendo el color de las esporas un carácter altamente variable, desde el blanco de las esporas jóvenes hasta el amarillo-marrón en las maduras. El tamaño se comprende entre los 40-140 μm . El conjunto de la pared lo forman hasta cuatro capas, siendo las interiores más oscuras que las exteriores. La más externa se degrada con facilidad. La hifa de sustentación frecuentemente puede estar constreñida en el punto de unión a la espora (Schenck y Smith 1982; INVAM 2002).

2.3.5 *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe.

Las esporas (Figura 13) se pueden producir de forma libre o envueltas en un peridio (esporocarpo) que puede contener de 1 a 10 esporas. Las esporas son globosas a elipsoides, de color amarillo a marrón y de un tamaño de entre 100 y 260 μm . La pared de la espora se compone de tres capas (L1, L2 y L3), la primera de las cuales suele degradarse, constituyendo una capa granular. Una característica que resalta en esta

especie es un notorio septo que tabica la hifa de sustentación, dando una característica forma de embudo a esta parte de la base de la espora (Nicolson y Gerdemann 1968; INVAM 2002).

2.3.6 *Glomus viscosum* Nicol.

Sus clamidosporas (Figura 14) son globosas a subglobosas muy uniformes, formadas en agregados laxos ramificándose desde una hifa común. Las clamidosporas son de color hialino a amarillo pálido, con tamaños comprendidos entre los 50 y los 120 μm . Se presentan tres paredes en el conjunto, permaneciendo la primera adherida hasta avanzadas etapas. La hifa de sustentación tiene un tamaño de 8-11 μm y tiene una forma cilíndrica a ligeramente achatada (INVAM, 2002).

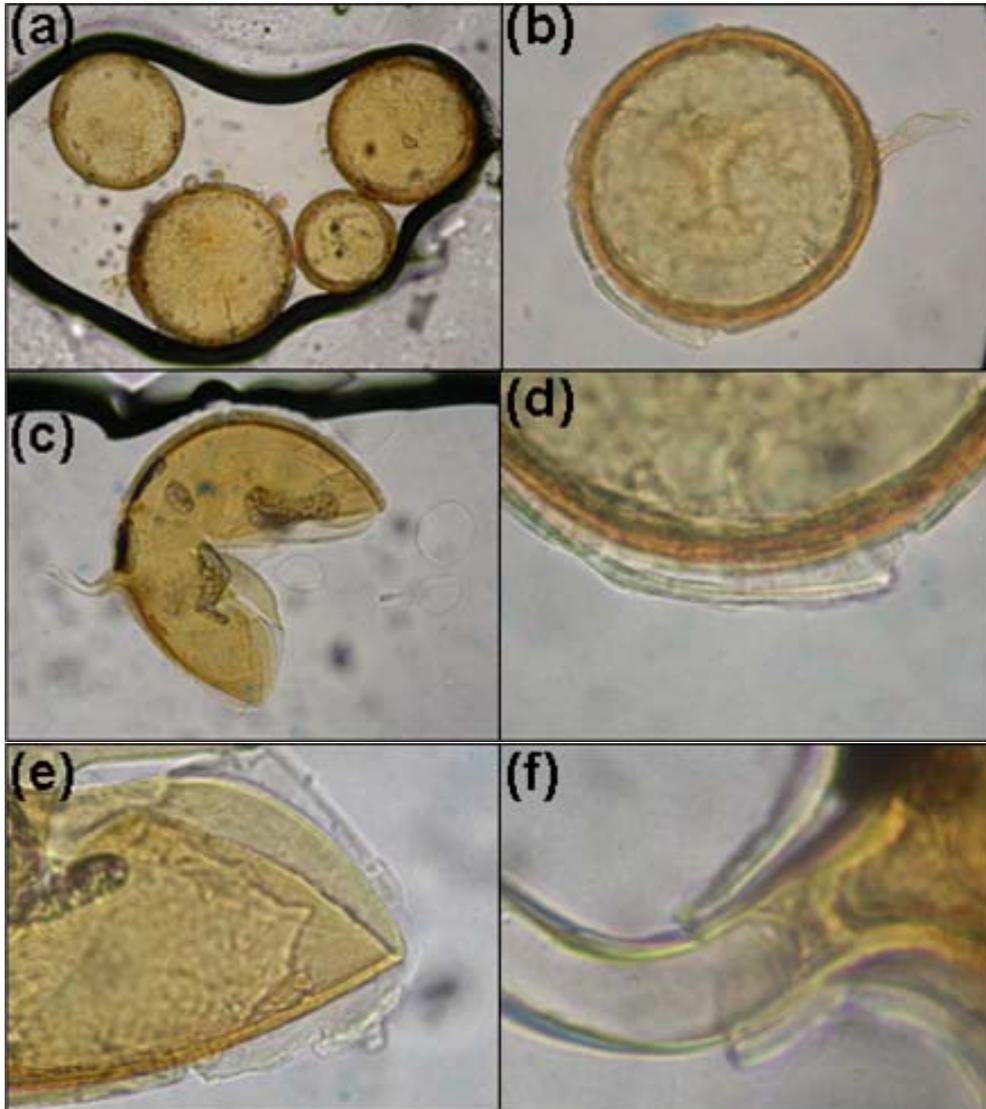


Figura 9. *Glomus clarum* BEG 125. (a) Grupo de esporas maduras (50X). (b) Espora individual (100X). (c) Espora destruida, mostrando los gránulos lipídicos. (d) Detalle de las capas de la pared de la espora, mostrando la incipiente pérdida de la L1 (400X). (e) Detalle de la pared en espora destruida por presión, mostrando la separación de las tres unidades. (f) Detalle del punto de inserción de la hifa de sustentación, mostrando el septo y la continuación de las distintas unidades de la pared en la hifa (1000X).

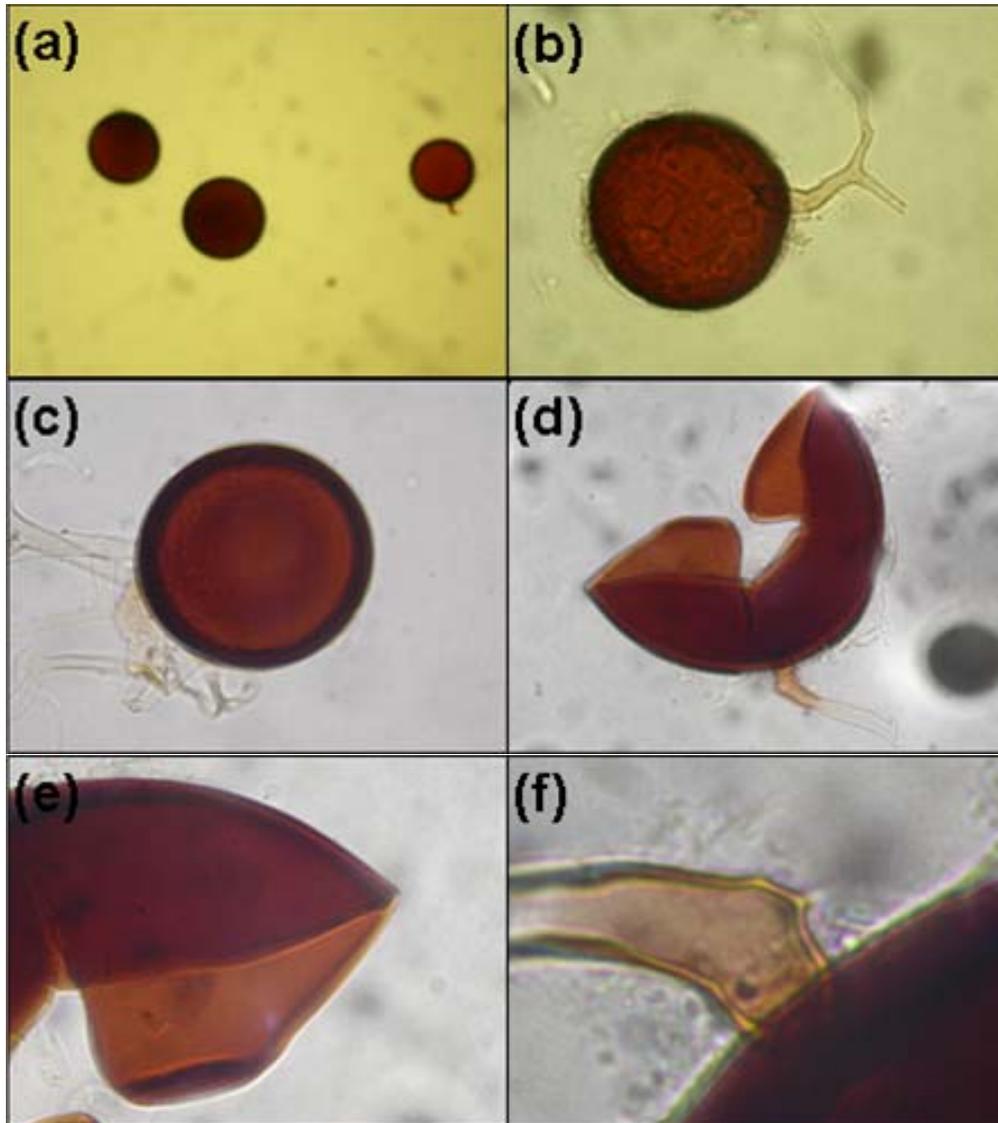


Figura 10. *Glomus constrictum* EEZ 22. (a) Grupo de esporas maduras (50X). (b, c) Esporas individuales (100X). (d) Detalle de las capas de la pared de la espora, mostrando restos de L1 (200X). (e) Detalle de la pared en espora destruida por presión, mostrando una sola capa (400X). (f) Detalle del punto de inserción de la hifa de sustentación, mostrando la constricción típica característica de esta especie (1000X).

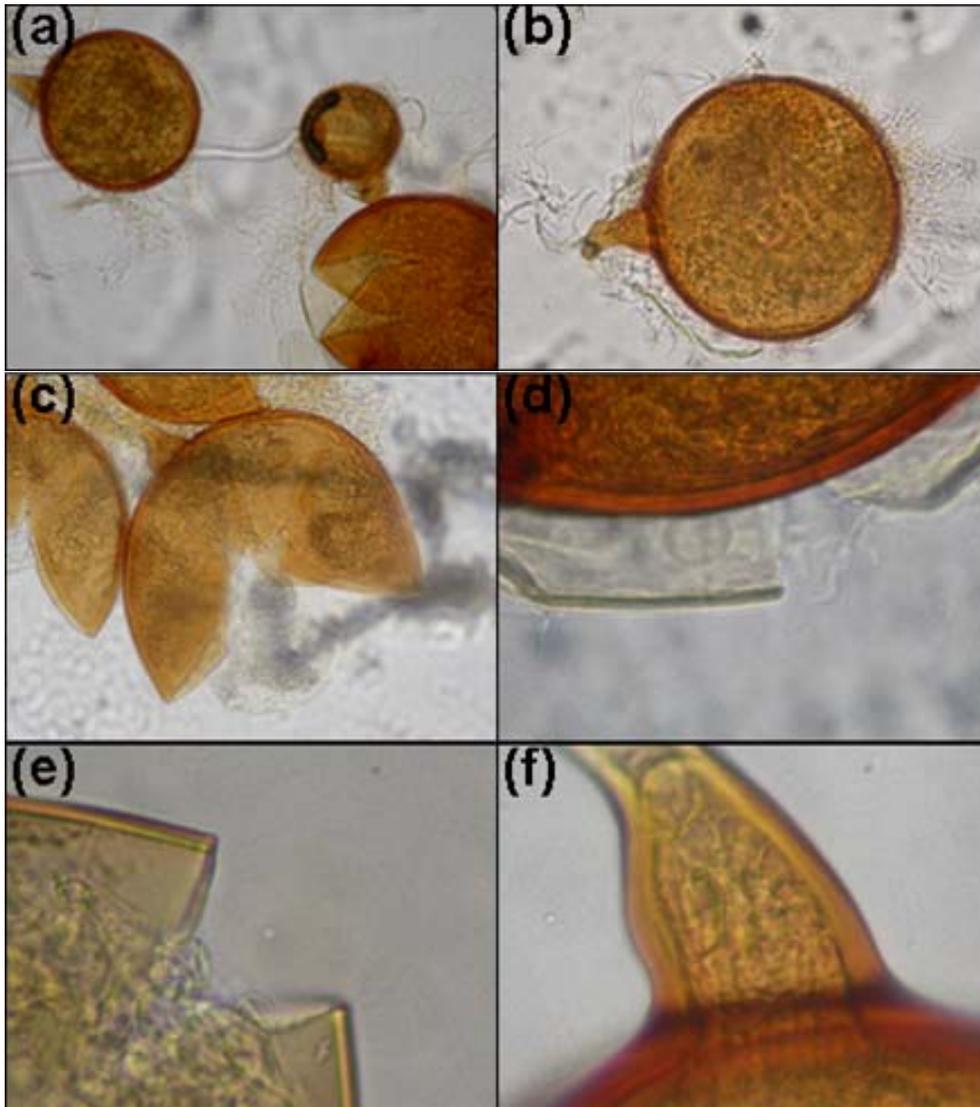


Figura 11. *Glomus coronatum*. (a) Grupo de esporas maduras (50X). (b) Espora individual (100X). (c) Esporas maduras destruidas (100X). (d) Detalle de las capas de la pared de la espora, mostrando restos de L1 (400X). (e) Detalle de la pared en espora destruida por presión, mostrando una sola capa (400X). (f) Detalle del punto de inserción de la hifa de sustentación, mostrando la continuación de las paredes en la hifa y en el engrosamiento basal (1000X).

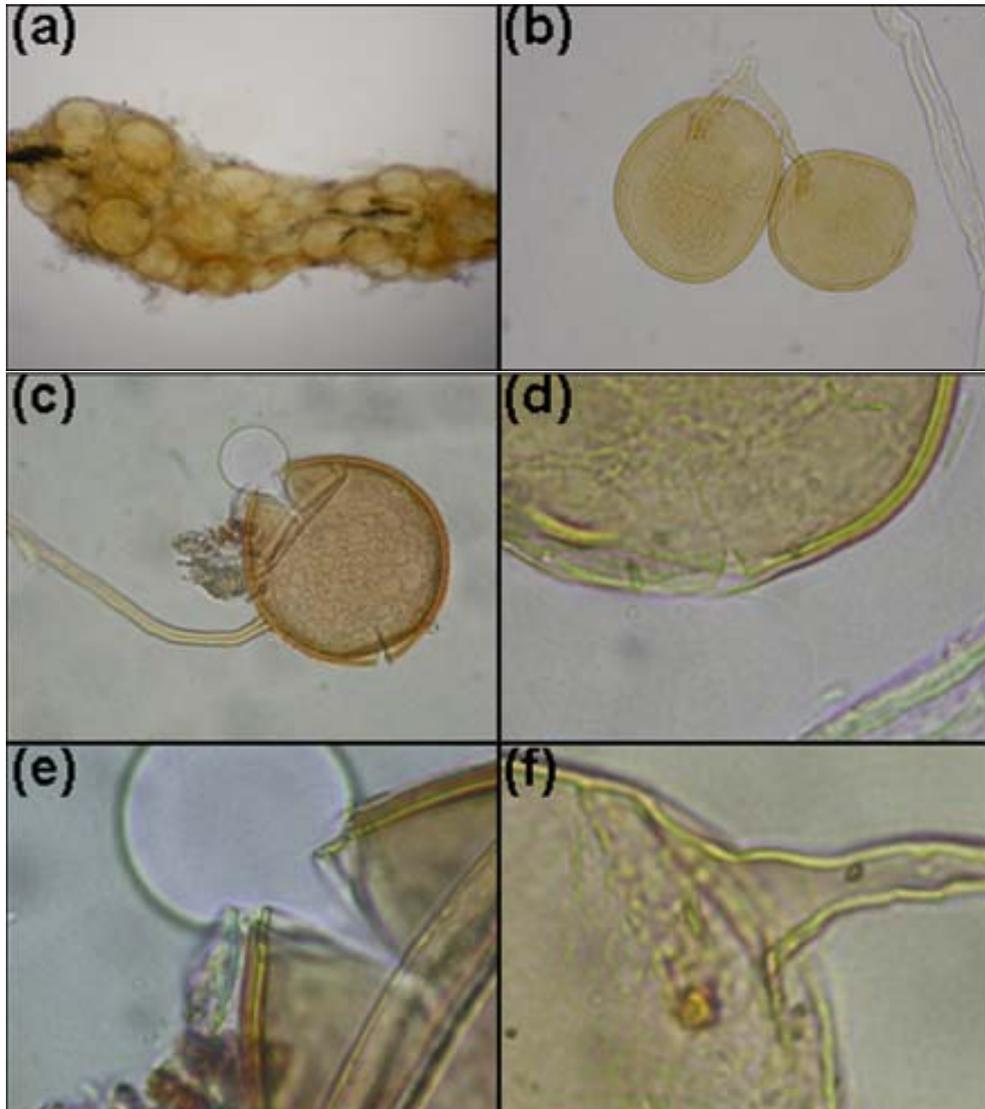


Figura 12. *Glomus intraradices* BEG 121. (a) Grupo de esporas maduras (50X). (b, c) Esporas individuales (100X). (d) Detalle de las capas de la pared de la espora (400X). (e) Detalle de la pared en espora destruida por presión, mostrando la separación de las capas (1000X). (f) Detalle del punto de inserción de la hifa de sustentación (1000X).

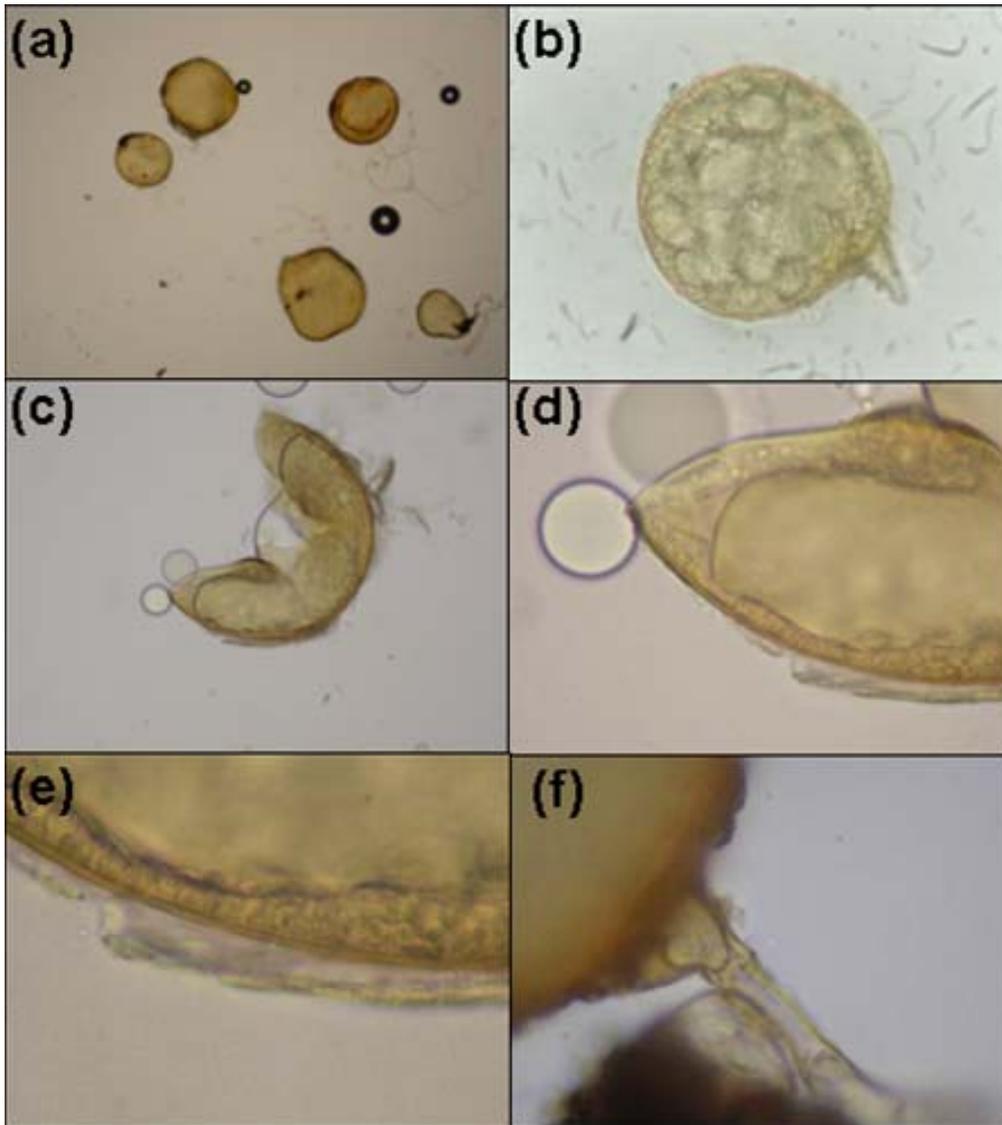


Figura 13. *Glomus mosseae* BEG 122. (a) Grupo de esporas maduras (50X). (b) Esporas individuales (100X). (c) Detalle de las capas de la pared de una espora destruida por presión (100X). (d) Detalle de la pared en espora destruida por presión, mostrando la separación de las capas (4000X). (e) Detalle de la superficie de una espora, mostrando el desprendimiento de L1. (f) Detalle del punto de inserción de la hifa de sustentación (4000X).

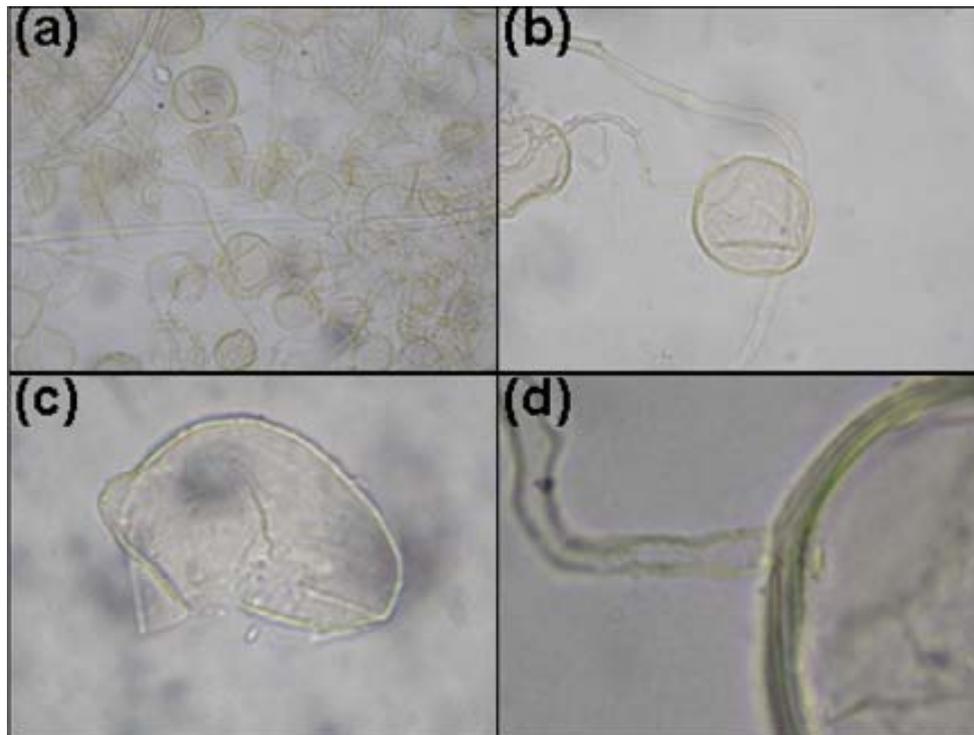


Figura 14. *Glomus viscosum* BEG 126. (a) Racimo con gran número de esporas (50X). (b) Espora individual (200X). (c). Detalles de la pared en una espora destruida por presión, se puede ver la separación entre L1 y la unión de L2 con L3 (400X). (d) Detalle de la inserción de la hifa (1000X).

3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

3.1 Obtención de las plántulas, estaquillas y tratamientos pregerminativos.

Las plantas para el estudio fueron obtenidas por estaquillado de ramillas jóvenes provenientes de plantas adultas de lavanda, mejorana y romero, las que fueron recolectadas desde las distintas asociaciones vegetales del Encinar Mesomediterráneo de la Sierra de Baza, Granada (ver Figura 15). Adicionalmente, se utilizaron semillas de todas las especies vegetales para obtener plántulas viables al momento de establecer el estudio en mesocosmos. Las semillas también fueron colectadas de plantas presentes en la Sierra de Baza.

Las estaquillas o esquejes se prepararon dejando unos 5-7 cm de raquis central y los elementos foliares vecinos a la yema apical, lavándolos profusamente con agua varias veces, desinfectándolas con propamocarb clorhidrato 60,5%, al 0,5% (p/v) en solución durante 15 min y lavándolas con abundante agua. Las estaquillas se mantuvieron en bandejas alveoladas conteniendo como sustrato de crecimiento una mezcla de perlita/vermiculita 1/1 v/v, conservadas permanentemente húmedas mediante adición de ddH₂O hasta su utilización, cuando las plántulas presentaron un significativo desarrollo radical.



Figura 15. Sistema de producción de estaquillas en bandejas alveoladas para la obtención de plántulas viables.

Por otra parte, las semillas fueron sometidas a diferentes tratamientos pregerminativos (Tabla 6), para facilitar de ésta manera su germinación. Posteriormente, las semillas se depositaron en bandejas alveoladas conteniendo como sustrato una mezcla de arena:vermiculita:sepiolita en una relación volumétrica de 2:2:1, las que permanecieron permanentemente húmedas hasta que se llevase a cabo la germinación y la plántula tuviese un tamaño adecuado para su trasplante al sistema de mesocosmos.

Tabla 6. Tratamientos efectuados sobre las semillas para el análisis de germinación y posterior obtención de plántulas viables.

Especie vegetal	Tratamiento(s) pregerminativos	Nº semillas
Retama	<ul style="list-style-type: none"> • ½ hora en H₂SO₄ concentrado 	100
Romero	<ul style="list-style-type: none"> • Agua destilada (24 h) • agua caliente y 24 h en agua • peróxido de hidrógeno 0,5% (24 h) • peróxido de hidrógeno 1% (24 h) 	100
Lavanda	<ul style="list-style-type: none"> • agua destilada (24 h) • agua caliente y 24 h en agua • peróxido de hidrógeno 0,5% (24 h) • peróxido de hidrógeno 1% (24 h) 	100
Mejorana	<ul style="list-style-type: none"> • agua destilada (24 h) 	No cuantificado

3.2 Reestablecimiento de la flora microbiana.

Para reestablecer las poblaciones de microorganismos del suelo, una vez tinalizado éste, a excepción del componente micorrícico, se le adicionó a cada maceta un volumen de 10 mL de un filtrado de una suspensión de 100 g de suelo Gorafe natural en un litro de ddH₂O estéril. Para esto, la suspensión se dejó decantar unos 5 min y el sobrenadante se filtró a través de papel filtro Watman nº1.

3.3 Irrigación.

La necesidad de agua fue estimada visualmente, aplicándose aproximadamente 500 mL de agua corriente por maceta cada dos o tres días; aunque durante el período estival los riegos fueron realizados diariamente, a fin de que las plantas no fuesen sometidas a estrés hídrico en ningún momento.

3.4 Obtención de las muestras y reposición.

Las muestras fueron obtenidas desde las macetas mediante el uso de un nucleador de acero de 1.5 cm de diámetro. Aproximadamente 100 g de sustrato se obtuvieron en cada oportunidad por este sistema.

A fin de no retirar las muestras desde el mismo sector de la maceta en las distintas estaciones, se establecieron zonas dentro de las macetas, con lo que fue posible programar la obtención de muestras desde la maceta de zonas que no se hubiesen disturbado con anterioridad. Además, cada repetición en un mismo tiempo de muestreo, presentaba distintas zonas de obtención de la muestra, de modo que la mayor cantidad de sectores en la maceta estuviesen representados en cada ocasión. La muestra retirada era repuesta inmediatamente con sustrato de suelo y arena estériles en las mismas proporciones que al establecimiento del estudio.

4. METODOLOGÍA

4.1 Métodos físico-químicos.

4.1.1 Determinación de pH.

Para esta determinación se utilizó la técnica de pH al agua (pH_w) en una suspensión de sustrato: dH_2O en proporción 2:5.

Procedimiento.

1. Se pesaron 4 g de muestra seca, y se adicionaron 10 mL de dH_2O .
2. Se mezcló vigorosamente y se dejó reposar 12 horas.
3. Posteriormente, el pH se determinó directamente en el sobrenadante de la mezcla mediante pH-meter electrónico.

4.1.2 Fósforo disponible.

El P disponible en el sustrato fue determinado por colorimetría utilizando el método de formación de molibdato azul de Olsen y Dean (1965) con menores modificaciones.

Procedimiento.

1. Se pesaron 0.5 g de sustrato y se le añadió 0.5 g de carbón activado.
2. Se adicionó 10 mL de solución extractante (NaHCO_3 0.5 M; pH 8.5) y se agitó durante 30 min a 210 rpm.
3. La mezcla se filtró en papel Watman n^o1 y se cogió una alícuota de 1 mL, que se añadió a 3 mL de solución neutralizante (H_2SO_4 0.1 M).
4. Se añadió 1 mL de solución colorimétrica (1.25 M H_2SO_4 ; 5 mM molibdato amónico ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$); 0.9 mM tartrato de potasio y antimonio ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$); 0.03 M ácido (L+) ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)).
5. Se dejó la solución desarrollar color durante 15 min y se realizó la medición espectroscópica a 700 nm.

Nota: Se utilizó como patrón una serie de diluciones de KH_2PO_4 para un rango comprendido entre 0 y 5 $\mu\text{g P mL}^{-1}$. Cuando los valores de las muestras superaban el límite superior de la curva patrón se realizaron diluciones según fue necesario. El color desarrollado es estable durante 72 h.

4.1.3 Glomalina fácilmente extractable.

Se determinó la cantidad de glomalina fácilmente extractable de acuerdo al procedimiento descrito por Borie et al. (2000) y Wright y Upadhyaya (1996), con algunas modificaciones.

Procedimiento.

1. Se tamizó una muestra de sustrato en tamices de la serie Tyler de 2 y 1 mm de luz, y se tomó 0.5 g de la fracción contenida sobre el tamiz de 1 mm de luz, el que fue depositado en tubos plásticos de tapa rosca de 15 mL de capacidad.
2. Se añadió 4 mL de solución extractante (20 mM citrato sódico ($C_6H_5Na_3O_7$), pH 7.0) y se agitó vigorosamente.
3. La mezcla fue autoclavada a una temperatura de 121°C por 30 min.
4. Se centrifugó la muestra a 10000 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante, al que se le determinó el volumen.
5. La cuantificación de la proteína extraída se realizó utilizando el método Bradford (1976). Para esto, a 700 μ L de agua se agregaron 100 μ L del sobrenadante recuperado y 200 μ L de reactivo BioRad Protein Assay (BioRad Laboratories), se agitó la mezcla y se dejó desarrollar color durante 10 min.
6. La concentración de glomalina en la muestra se determinó espectrofotométricamente, a una λ de 595 nm.

Nota: Se utilizó como patrón una serie de diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) para un rango comprendido entre 0 y 20 μ g BSA mL⁻¹. Se utilizan tubos plásticos para evitar su rotura en los procesos de autoclavado y centrifugado. El color desarrollado es estable durante una hora aproximadamente.

4.1.4 Estabilidad estructural de los agregados.

La estabilidad de los agregados es el resultado de las fuerzas de cohesión entre las partículas de suelo para resistir la aplicación de fuerzas disruptivas. Para su determinación se utilizó la metodología descrita por Kemper y Rosenau (1986), utilizando cribado húmedo en equipamiento electrónico diseñado para tal fin (ver Figura 16).

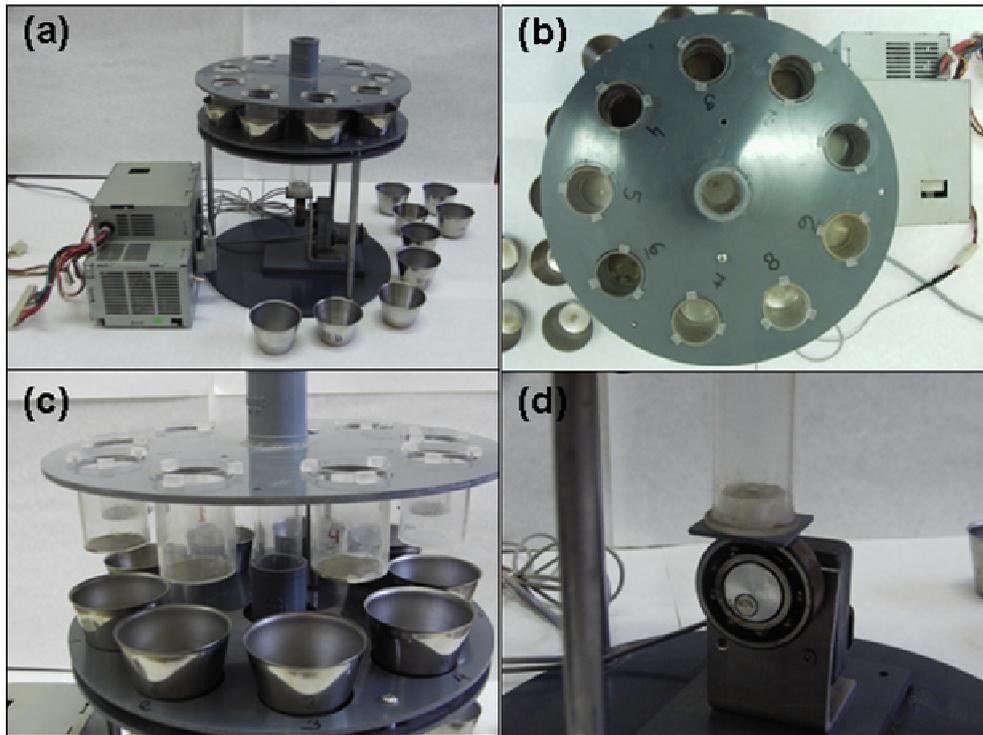


Figura 16. Sistema mecánico para la determinación de la estabilidad estructural de los agregados al agua. (a) Vista general del sistema. (b) Vista superior, mostrando las posiciones de los cribadores de 0.25 mm. (c) Posiciones de los recipientes metálicos conteniendo agua o solución disgregante. (d) Elevador excéntrico, con una frecuencia de 35 rpm.

Procedimiento.

1. Se tamizó una proporción de sustrato seco al aire en tamices de la serie Tyler de 2 y 1 mm de luz.
2. Se pesaron 4 g de sustrato recogido sobre el tamiz de 1 mm de luz, el que fue depositado sobre un cribador de 0.25 mm y humectado a saturación con agua destilada sobre baño de arena lavada.
3. El cribador con la muestra húmeda se colocó en el equipo de tamizado sobre depósitos de acero inoxidable conteniendo 25 mL de agua destilada.
4. El equipo funcionó durante 3 min ($35 \text{ ciclos min}^{-1}$) para completar 105 inmersiones del cribador en el depósito de acero con agua.
5. Los depósitos de acero fueron secados y pesados. El suelo que queda en el depósito es el material no estable a la disgregación por efecto del agua.
6. Los depósitos de acero fueron cambiados por otro set, conteniendo 25 mL de una solución dispersante ($2 \text{ g hexametáfosfato de sodio L}^{-1}$) y se hace funcionar nuevamente el equipo, hasta que sólo queden partículas de arena sobre el

cribador. Cuando el tiempo requerido para la disgregación era considerable (más de 20 min), se procedió a la disgregación mecánica de los agregados con una varilla. Posteriormente, los depósitos fueron secados y pesados. El suelo que queda en los depósitos en este caso corresponde al material agregable.

La proporción de material agregable en la muestra será

$$AEA(\%) = \frac{(DH - d2 - 0.05)}{(DA - d1) + (DH - d2 - 0.05)} \times 100 \quad (IV-1)$$

donde AEA(%) es el porcentaje de suelo agregado estable al agua; DH el peso en gramos del depósito de acero más el suelo y solución dispersante del segundo tamizado húmedo; d2 es el peso en gramos del depósito usado para el segundo tamizado; 0.05 es la cantidad en gramos de hexametáfosfato de sodio presente en 25 mL de dispersante; DA es el peso en gramos del depósito más suelo y agua del primer tamizado húmedo; y d1 es el peso en gramos del depósito usado en el primer tamizado.

Nota: Se usó hexametáfosfato de sodio como dispersante debido a que el pH de las muestras analizadas era superior a 7.0. En caso de tratarse de muestras con un pH inferior a 7.0 se debe utilizar como dispersante una solución de 2 g NaOH/L.

4.2 Métodos microbiológicos y determinación de la biodiversidad.

4.2.1 Potencial micorrízico de los inóculos y del suelo.

El número más probable de propágulos micorrízicos (NMPP), es un procedimiento de estimación de densidades poblacionales de hongos micorrízicos, puesto que la evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. Está basado en la determinación de presencia/ausencia de colonización en raíces de plantas en réplicas de diluciones consecutivas. Sólo determina organismos vivos e infectivos.

Procedimiento.

Se realizó utilizando una modificación de la metodología descrita por Sieverding (1991). Para esto, se realizaron diluciones seriadas de factor 4 del suelo o inóculo a estudiar el cual se homogeneizó con un sustrato estéril de sepiolita: vermiculita (1:1 v:v) utilizándose sorgo (*Sorghum hybridum* cv. Tuareg) como planta indicadora (Figura 17).

Las plantas se dejaron crecer durante un mes en condiciones de invernadero (25±3°C:15±3°C día:noche; 80% Hr; fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad). Posteriormente, se extrajeron las raíces, que fueron aclaradas y teñidas (Philips y Hayman 1970). Finalmente, se determinó la presencia/ausencia de colonización bajo lupa estereoscópica a 30 aumentos.

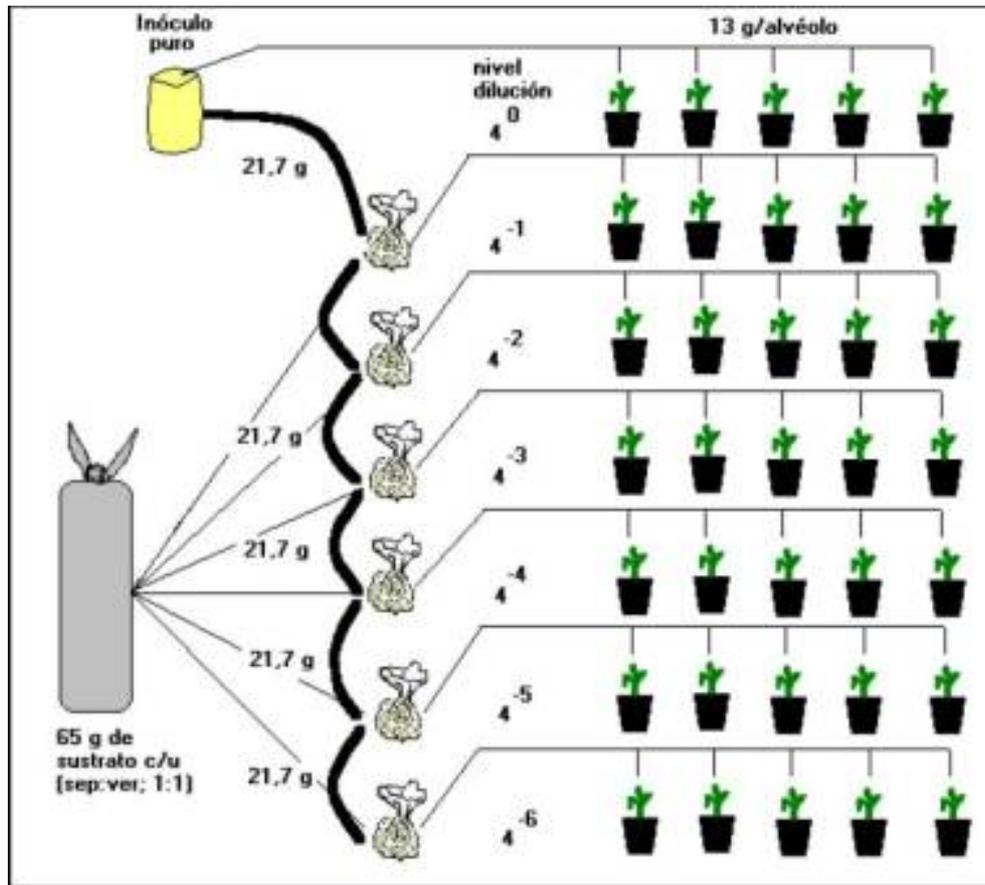


Figura 17. NMPP para los inóculos de HMA y del suelo. Cada unidad experimental contenía 13 g para todas las diluciones, con 5 repeticiones para cada nivel de dilución.

El valor del NMPP se obtuvo mediante la siguiente igualdad:

$$\text{Log } \Omega = X \log \alpha - K \quad (\text{IV-2})$$

donde Ω es el número de propágulos micorrícicos infectivos, X es el número medio de casos con infección (total de infecciones +/número de repeticiones), α es el factor de dilución (4 en este caso) y K es un valor variable, dependiente de X , que se encuentra en las tablas de Fisher y Yates (Sieverding 1991).

Para el caso de este estudio, el valor de K, obtenido por regresión polinómica correspondió a

$$K = 0,0662X^6 - 0,5631X^5 + 1,9645X^4 - 3,6882X^3 + 4,0574X^2 - 2,545X + 1,267$$

$$r^2 = 0,99$$

4.2.2 Esporas de hongos micorrícicos arbusculares.

Las esporas fueron separadas del sustrato por el método de decantado y tamizado húmedo (Gerdemann y Nicholson 1963) con algunas modificaciones. Las esporas separadas del sustrato fueron utilizadas para su conteo, caracterización morfológica y para estudiar su diversidad en suelo.

Procedimiento.

1. Se pesaron 25 g de sustrato, los que fueron mezclados vigorosamente con agua y centrifugados a 2500 rpm durante 2 min.
2. El sobrenadante, conteniendo buena parte de los materiales orgánicos gruesos de suelo, esporas destruidas, trozos de raíz y otros materiales poco densos, fue descartado.
3. Seguidamente, el sustrato decantado fue mezclado y suspendido en una solución de sacarosa al 50% p/v y centrifugado en las mismas condiciones anteriores.
4. Esta vez el sobrenadante fue vertido sobre una serie de tamices Tyler de 500, 250 y 50 μm de luz, lavado con agua corriente y arrastrado a placa Doncaster para su observación microscópica bajo lupa estereoscópica a 50-75 aumentos.
5. Finalmente, de acuerdo a las características estudiadas para cada especie, descritas en el apartado 2.4 de este capítulo, se realizó la cuantificación de las esporas correspondientes a cada una de las especies inoculadas.

4.2.3 Longitud de micelio micorrícico.

Para la determinación de la densidad de hifas de hongos micorrícicos arbusculares se utilizaron modificaciones y adecuaciones de numerosos protocolos (Abbott et al. 1984, Jakobsen et al. 1992, Sylvia 1992, Borie et al. 2000), tanto para la extracción como para su cuantificación.

Para la determinación de la densidad de las hifas vivas de hongos micorrícicos se utilizó la tinción vital por la enzima succinato deshidrogenada (SDH) de acuerdo a Kough et al. (1987). El siguiente procedimiento describe el protocolo utilizado para poder obtener tanto la tinción vital como la de las hifas totales sobre la misma muestra experimental (Figura 18).

Procedimiento para la separación y tinción del micelio.

1. Se pesó 1 g de suelo y se le agregaron 20 mL de agua. Se agitó vigorosamente durante 10 segundos.
2. Se dejó decantar la mezcla durante 1 min, y se cogió desde el centro de la suspensión 1 mL, que fue transferido a un tubo plástico de 15 mL con tapa rosca.
3. Se adicionó 1 mL de solución incubadora de la tinción vital SDH (succinato de sodio 0.25 M; NBT 1 mg mL⁻¹; Tris 0.05 M; MgCl 0.5 mM; pH 7.0) y se dejó incubando 12-16 horas con agitación suave a 28°C.
4. Posteriormente, se vertió el contenido sobre un tamiz de 50 µm de luz de malla, se lavó con agua y se recogió con 3-5 mL de agua sobre un tubo plástico, donde se le adicionó 5 mL de lejía (NaClO 3.5 % p/v) durante 10 min.
5. Inmediatamente después, se vertió nuevamente sobre un tamiz de 50 µm de luz, se lavó con abundante agua, y se recogió con 3-5 mL de agua sobre un tubo plástico.
6. Se le adicionó 5 mL de solución contrastante de fucsina ácida 0.2 g L⁻¹ (ácido láctico 875 mL; glicerina 63 mL; agua destilada 63 mL; fucsina ácida 0.2 g) y se dejó teñir durante 2 horas con agitación suave
7. Finalmente, se vertió el contenido sobre un tamiz de 50 µm de luz, se lavó con abundante agua, y se arrastró el micelio teñido con frasco lavador sobre un filtro de nitrocelulosa con cuadrícula, de 0.2 µm de tamaño de poro, posicionado en aparato para filtración al vacío.

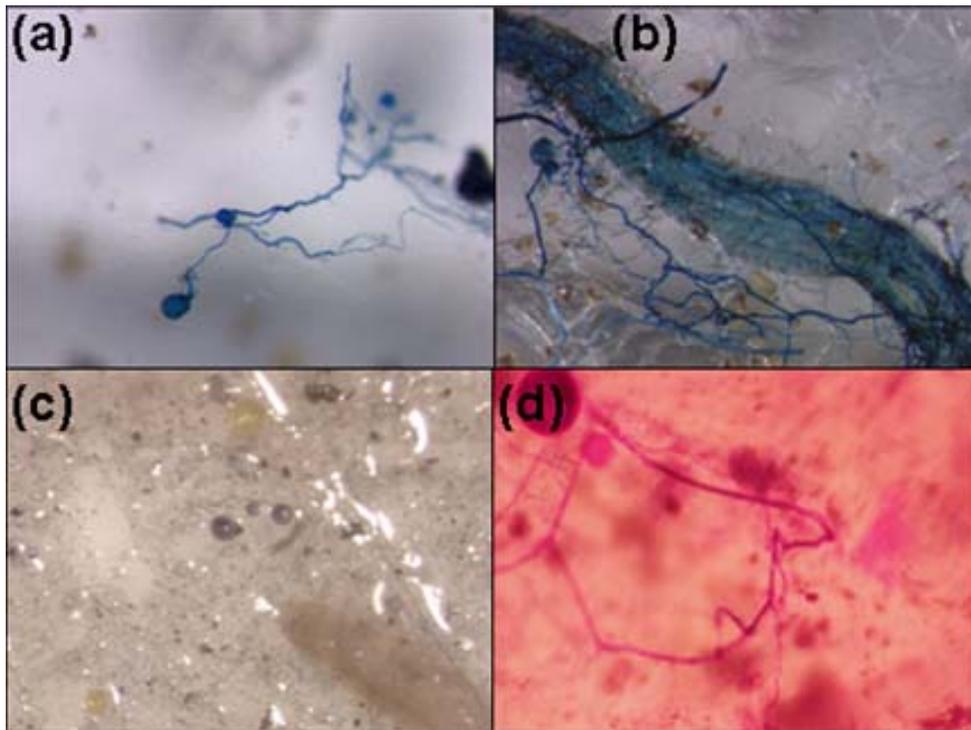


Figura 18. Micelio de hongos micorrízico arbusculares. (a, b) Micelio teñido con azul de tripano (100X). (c) Micelio teñido sólo con tinción vital de SDH (100X). (d) Micelio teñido con la tinción vital de SDH y contrastado con fucsina ácida.

Procedimiento para la observación y cuantificación del micelio.

1. Los filtros de nitrocelulosa se montaron sobre portaobjetos y fueron observados al microscopio a 100-200 aumentos. Es necesario que uno de los oculares del microscopio posea una retícula de 10 x 10 líneas.
2. Se posicionó la cuadrícula para que la retícula quedara posicionada dentro de una de las áreas cuadrangulares definidas por las líneas del filtro y se contaron las intersecciones entre hifas (vivas y no vivas) y la retícula del ocular, tanto en sentido horizontal como vertical. Este procedimiento se repite el mayor número posible de veces por cada muestra.
3. Se definió la longitud total de la retícula, y el área total analizada, y se obtuvo la longitud de micelio presente en la superficie analizada del filtro usando la ecuación de Newman (1969), que se representa según

$$R = \left(\frac{\pi AN}{2H} \right) \times Fd \times Fps \quad (IV-3)$$

en donde R es la longitud de hifas en el área de medición (m), A es el área de medición en el filtro (m²), N es el número de intersecciones, H es la longitud total de la retícula utilizada, Fd es el factor de dilución de suelo (en este caso 20) y Fps es el factor de humedad del suelo.

4.2.4 Raíz micorrizada.

Para obtener el índice de micorrización se utilizó el método de intersección en línea de McGonigle et al. (1990), luego de teñir la raíz con azul-tripán (Phillips y Hayman 1970) con algunas modificaciones. El colorante azul-tripán interacciona con las estructuras que presentan quitina, como es el caso de las paredes celulares de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Bartnicki-García 1968).

Procedimiento.

Las raíces fueron separadas del sustrato utilizando tamices de la serie Tyler de 2 y 1 mm de luz. Posteriormente fueron lavadas en agua corriente, secadas y pesadas. Se tomaron dos submuestras de aproximadamente 0,2 g de raíz, una para tinción y otra para caracterización molecular de los hongos colonizadores. Los siguientes pasos fueron realizados a las submuestras ocupadas para tinción:

1. Las raíces fueron cortadas en segmentos de alrededor de 1 cm y se sumergieron en una solución de KOH al 10% p/v, donde permanecieron por tres días.
2. Posteriormente se eliminó la solución de KOH y las raíces se lavaron con abundante agua.
3. Las raíces fueron sumergidas en una solución de HCl al 1% p/v, donde permanecieron por un día.
4. Posteriormente fue eliminada la solución de HCl y se añadió solución de azul-tripán al 0.05% p/v en ácido láctico, dejándolas por 24 h en esas condiciones.
5. Finalmente, se eliminó la solución de azul-tripán, se lavaron con agua y se conservaron en ácido láctico hasta su observación.
6. Para la cuantificación de la colonización, las raíces teñidas fueron extendidas sobre placas de metacrilato, con una cuadrícula de 1 x 1 cm, contándose las intersecciones entre las raíces y la cuadrícula. La proporción de raíz micorrizada se obtiene de la relación entre las intersecciones donde la raíz presenta colonización respecto del total de intersecciones cuadrícula-raíz.

4.2.5 Índices de biodiversidad.

Se han utilizado diferentes métodos para estimar la diversidad de especies alfa, así como su estructura. Estos índices se determinaron a partir de la cuantificación de los distintos morfotipos de esporas y de la presencia/ausencia de hongos colonizando las raíces de las plantas de los distintos tratamientos.

Riqueza de especies (S): o Índice de Riqueza Específica, se define como el número total de especies encontradas por censo de una comunidad. Se determinó, en las distintas muestras, al momento de realizar la cuantificación bajo lupa de las muestras de esporas. En las raíces se determinó según la presencia, ausencia de bandas características en TTGE.

Densidad específica (Di): se define como la proporción de individuos de la especie i en la muestra en relación al número total de individuos. Se representa según la siguiente igualdad

$$D_i = \frac{n_i}{N} \quad (IV-4)$$

en donde n_i es el número de esporas de la especie o morfotipo i, y N es el número total de esporas en la muestra.

Equidad de Shannon-Wiener (H'): este índice de abundancia proporcional relaciona la cantidad de especies presentes con el número de individuos de cada una. Expresa, por tanto, el grado promedio de incertidumbre en la predicción de la especie de un individuo escogido al azar desde una comunidad (Magurran 1988). Su expresión es

$$H' = - \left(\sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \times \ln \frac{n_i}{N} \right) \quad (IV-5)$$

Dominancia de Simpson (λ): este índice de abundancia proporcional es inverso al de uniformidad o equidad, y toma en cuenta la representatividad de las especies con mayor importancia en la comunidad. Manifiesta por ende, la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie (Magurran 1988). Se representa por la relación

$$\lambda = \sum p_i^2 \quad (IV-6)$$

donde p_i es la abundancia proporcional de la especie i (su densidad específica).

4.3 Métodos para la determinación de crecimiento vegetal.

4.3.1 Longitud de raíz.

La longitud de la muestra de raíz teñida con azul-tripán fue obtenida utilizando el sistema DIAS DT de análisis digital de imágenes de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Delta-T Devices, 1991).

Para obtener la longitud total de la raíz colectada conjuntamente a la muestra experimental se realizó una ponderación con el peso de la raíz total obtenida de acuerdo a la ecuación

$$L = \left(\frac{Lp \times RT}{Rp} \right) \times \left(\frac{100}{PM} \right) \times Fps \quad (IV-7)$$

en donde L es la longitud total de raíz en cm por 100 g de sustrato, Lp es la longitud parcial de la raíz teñida, obtenida por el sistema DIAS DT en cm, RT es el peso fresco en gramos de la raíz total, Rp es el peso fresco en gramos de la submuestra usada para la tinción, PM es el peso en gramos de la muestra de sustrato extraído y fps es el factor de humedad de la muestra colectada.

4.3.2 Cobertura vegetal.

Para determinar la superficie cubierta por las plantas se utilizó software de análisis de imágenes. Para esto se tomaron fotografías digitales aéreas de cada unidad experimental, seguido de lo cual, utilizando el programa Adobe Photoshop v. 6.0 (Adobe Systems Inc.) se añadieron capas hasta completar la superficie bidimensional que ocupaba cada planta (ver Figura 19). Seguidamente se obtuvo la cantidad de píxeles ocupados por las capas seleccionadas y se realizó la conversión a superficie con la ayuda de un patrón de superficie conocida, al cual también se le calculó su número de píxeles.

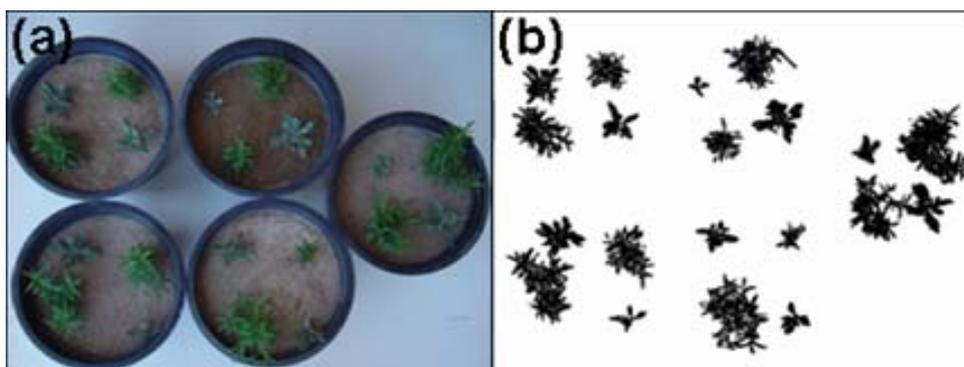


Figura 19. Análisis de la cobertura de las plantas correspondientes al tratamiento Lavanda-Romero. (a) Imágen de las plantas normales. (b) Imagen de las plantas transformadas a capas uniformes para determinación de su superficie en píxeles.

4.4 Métodos usados en biología molecular.

4.4.1 Extracción de ADN genómico de material vegetal.

El ADN genómico de material vegetal (parte aérea o raíces) se extrajo utilizando el protocolo para aislamiento de ADN del kit DNeasy® Plant Mini kit (Qiagen 2000), siguiendo las instrucciones de fabricante con menores modificaciones en el caso de extracción de ADN genómico desde raíces. En este caso, las modificaciones realizadas son las siguientes:

1. En el paso 2, se utilizó hasta un máximo de 200 μg de material fresco.
2. En el paso 11, posterior a la centrifugación con el tampón AW, se realizó hasta dos lavados de la columna con 500 μL de alcohol etílico puro y centrifugación a máxima velocidad.
3. En el paso 12, la primera elución se realizó con 50 μL de buffer AE. Posteriormente, la segunda elución se realizó con 100 μL de buffer AE, sin combinar los extractos. El primer extracto suele contener sustancias coloreadas, de características húmicas, que podrían inhibir las subsecuentes reacciones enzimáticas.

4.4.2 Extracción de ADN desde esporas de hongos micorrícicos.

Según se tratase de extracción de ADN de esporas individuales o de gran número de esporas (1000 a 5000 esporas) se utilizaron dos sistemas diferentes:

Extracción de ADN de esporas individuales: se utilizó una adaptación del método de Lee y Taylor (1990). Para esto, sobre un portaobjetos esterilizado-siliconizado, se depositó una gota de 20 μL de ddH₂O estéril. Posteriormente, con ayuda de un fórceps, se depositó en la gota una única espora de HMA limpiada en superficie dos a tres veces con ddH₂O estéril. Bajo lupa estereoscópica a 50 aumentos, utilizando un estilete estéril, se destruyó la espora. El extracto crudo así obtenido fue utilizado en su totalidad como molde para PCR usando cebadores específicos de HMA.

Extracción de ADN desde numerosas esporas: se cogieron unas 1000 esporas desde cultivo mono específico bajo lupa estereoscópica (5000 en el caso de *G. intraradices* y *G. viscosum*), se depositaron en 1 mL de ddH₂O en un vial de 1.5 mL, donde se lavaron con ddH₂O estéril tres veces, centrifugando en cada ocasión a 6000 g durante 5 min. Finalmente, se añadieron 50 μL de ddH₂O, se trituraron con ayuda de micropistilo de punta cónica y se utilizó el protocolo para aislamiento de ADN del kit DNeasy® Plant Mini kit (Qiagen 2000), siguiendo las instrucciones de fabricante.

4.4.3 Cuantificación de ADN genómico.

El ADN aislado se cuantificó espectrofotométricamente o en gel de agarosa. En el primer caso, se midió la absorbancia de una alícuota de 10 μL de muestra diluida 100 veces en ddH₂O estéril a λ de 230, 260 y 280 nm. Con este método, cada unidad de absorbancia a 260 nm se considera equivalente a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ADN de doble cadena.

Para estimar una posible contaminación por carbohidratos, se calculó la relación entre los valores de absorbancia obtenidas a 260 y 230 nm. Para considerar que las muestras no presentaban una contaminación significativa por carbohidratos la relación debía ser mayor a 2. Por su parte, para considerar ausencia de contaminación por proteínas y/o fenol, la relación entre los valores de absorbancia a 260 y 280 nm debía ser superior a 1.8.

Para cuantificar la cantidad de ADN en gel de agarosa se utilizó comparación visual de la intensidad de la banda de ADN genómico, luego de teñirlo en una solución de bromuro de etidio, respecto de las distintas bandas del marcador de peso molecular III.

4.4.4 Condiciones de PCR.

Las diferentes PCR se optimizaron utilizando un termociclador automático (Mastercycler, Eppendorf). Las amplificaciones fueron realizadas usando el producto comercial pure-Taq™ Ready-To-Go PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech) en un volumen final de 25 µL. Este producto contiene todos los componentes, con una concentración final en 25 µL de 2.5 unidades de puReTaq DNA polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCL pH 9.0, 50 mM KCl y 1.5 mM MgCl₂.

Los diferentes oligonucleótidos empleados fueron usados en una concentración final de 0.4 µM. Las condiciones de tiempo y temperatura para las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión se muestran en la Tabla 7. Para todas las reacciones se utilizó un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, un paso final de extensión a 72°C durante 7 min y 35 ciclos del programa presentado en la Tabla 7, según fuera el caso.

Tabla 7. Diferentes oligonucleótidos utilizados en las distintas PCR, secuencias nucleotídicas y condiciones de PCR.

Oligonuc.	Secuencia 5`-3`	Denat	Hibr.	Ext.	Uso
NS31	ttggagggaagctctggtgcc	94°C	50°C	72°C	Universal eucariotas 18s
NS41	cccgtgttgagtc aaatta	1`	1`	1` 20``	
NS31	ttggagggaagctctggtgcc	94°C	58°C	72°C	Específico Glomerales 18s
AM1	gtttcccgaaggcgccgaa	45``	1`	1` 20``	
NS31(GC)	cgcccggggcgccccgggcgg ggcgggggcacggggg+NS31	45°C	50°C	72°C	PCR nidada desde producto NS31-AM1
Glo1	gcctgcttaaacactcta	45``	45``	1`	
M13F	gtaaacgacggccagtg	45°C	50°C	72°C	Amplificación inserto en vectores
M13R	ggaaacagctatgacatg	1`	1` 20``	1` 30``	

4.4.5 Electroforesis en geles de agarosa.

La separación electroforética del ADN, tanto genómico como amplicones, se realizó en geles de agarosa al 1.6% en tampón 1X TAE (1 X TAE = 40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA disódico, pH 8,3). La electroforesis se realizó en tampón 1 X TAE con una diferencia de potencial eléctrico de 100 V durante 35-60 minutos, dependiendo del tamaño de los productos.

Para estimar el tamaño de los productos depositados en los geles, así como su cuantificación, se depositó en una de las calles del gel un marcador de peso molecular. En el caso de los segmentos de más de 500 pb se utilizó el marcador III (Lambda DNA/EcoRI + Hind III, Promega) y para los productos de menor tamaño se utilizó el marcador pGEM (pGEM® DNA, Promega).

Las muestras se prepararon en tampón de carga 1X (tampón de carga 6X=sacarosa 50% p/v; 0.3% azul bromofenol). Posterior a la electroforesis, los geles fueron teñidos por 20 minutos en bromuro de etidio (1 mg L^{-1} en 1X TAE), lavados por 10 min en ddH₂O, visualizados y fotografiados bajo luz UV (260 nm; Gel Doc 2000, BioRad Laboratories).

4.4.6 Purificación de productos de PCR.

Las bandas de interés para secuenciación, clonación o carga en TTGE presentes en los geles de agarosa fueron extraídas cortándolas con un escalpelo, y purificadas utilizando el protocolo del kit comercial QiaexII Gel Extraction kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.4.7 Preparación de geles de poliacrilamida y condiciones para TTGE.

Los geles de poliacrilamida se prepararon siguiendo las instrucciones del manual del equipo DCode™ universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories).

Los geles tuvieron una dimensión de 16 cm x 16 cm x 1 mm y se prepararon utilizando soluciones comerciales de acrilamida y bis-acrilamida (Acrylamide and Bis-Acrylamide Solutions, Bio-Rad Laboratories). En la siguiente Tabla se muestra la composición de los distintos geles utilizados.

Tabla 8. Geles de poliacrilamida 37.5:1 para uso en TTGE (1.5 X TAE, 7 M urea).

Reactivo	6% PAA¹	8% PAA²
40 % Acrilamida (mL)	5.83	7.77
2 % Bis-acrilamida (mL)	3.22	4.29
50 X TAE (mL)	1.20	1.20
Urea (g)	16.80	16.80
TEMED (μL)	40.00	40.00
10 % Persulfato amonio (μL)	400.00	400.00
Volumen total (mL)	40.00	40.00

¹ Utilizado para electroforesis de los productos NS31-GC/AM1.

² Utilizado para electroforesis de los productos NS31-GC/Glo1.

Para seleccionar la región de la subunidad 18S ADNr que era factible de separar por TTGE se realizó un análisis predictivo de los perfiles de fusión de diferentes secuencias de especies de hongos del género *Glomus* utilizando el programa WinMelt™ v. 2.0.13 (Bio-Rad Laboratories).

Las secuencias de la región 18S ADNr de 20 diferentes especies del género *Glomus* utilizadas fueron las siguientes: *G. caledonium* BEG20: Y17635, *G. claroideum*: AJ276075, *G. clarum*: AJ505619, *G. coronatum*: AJ699076, *G. constrictum*: AJ506090, *G. etunicatum*: Y17639, *G. fasciculatum*: BEG53 Y17640, *G. fragilistratum*: AJ276085, *G. geosporum*: AJ245637, *G. intraradices* BEG121: AJ536822, *G. lamellosum*: AJ276087, *G. luteum*: AJ276079, *G. manihotis*: Y17648, *G. mosseae* BEG69: U96141, *G. mosseae* BEG122: AJ505616, *G. proliferum*: AF213462, *G. sinosum*: AJ133706, *G. versiforme*: X86687, *G. verruculosum*: AJ301858, *G. viscosum* BEG126: AJ505620.

Las muestras a separar en TTGE se prepararon en tampón de carga 1 X para TTGE (tampón de carga 2X=glicerol 70% p/v; xileno cianol 0.05% p/v; azul bromofenol 0.05% p/v). Para la separación de los fragmentos NS31-GC/AM1 se utilizó una temperatura inicial de 54°C y una temperatura final de 61°C, con una rampa de 1°C h⁻¹. Para la separación de los fragmentos NS31-GC/Glo1 se utilizó una temperatura inicial de 52°C y una temperatura final de 59°C, con una rampa de 1°C h⁻¹. Ambos tipos de geles fueron sometidos a electroforesis con una diferencia de potencial eléctrico de 130 V, en tampón TAE 1.5X.

4.4.8 Tinción de geles con plata.

Para realizar la tinción de geles de poliacrilamida con plata, se utilizó el kit comercial Bio-Rad Silver Stain (Bio-Rad Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.4.9 Obtención de productos de PCR desde geles teñidos con plata.

Para recuperar los productos de PCR incluidos en geles de poliacrilamida teñidos con el kit de tinción de plata de BioRad (BioRad Laboratories) se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Con escalpelo, se cortó desde el gel la banda de interés y se depositó en vial de microcentrifuga.

2. Se destruyó con ayuda de micropistilo de terminación cónica en 50 μ L de ddH₂O estéril.
3. Se centrifugó a 13000 g durante 10 min y se recogió el sobrenadante.
4. Se redujo el volumen en VacuumSpeed a aproximadamente 20 μ L y se utilizó completamente en PCR utilizando los primers NS31 (sin extremo GC) y Glo1.
5. Los productos de PCR se cargaron en su totalidad en gel de agarosa, se purificaron y se secuenciaron.

4.4.10 Preparación de células de E. coli competentes.

Para la preparación de células competentes de E. coli se utilizó la metodología descrita por Hanahan (1983).

Procedimiento.

1. Partiendo de un cultivo madre de E. coli, conservado en glicerol a -80°C, se realizó un precultivo, sembrando con un asa 5 ml de medio LB estéril (Tryptona 0.1% p/v; extracto de levadura 0.05% p/v; NaCl 0.1% p/v; pH 7.0). Se dejó creciendo durante una noche a 37 °C en rotatubos.
2. El precultivo se utilizó para inocular 50 mL de LB suplementado con 10 mM de MgSO₄. Posteriormente, se incubó a 37°C en agitación constante hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0,5 a 550 nm (aproximadamente 1-2 h).
3. El cultivo se distribuyó en tubos de centrifuga de 25 mL y se enfriaron en hielo durante 15 min.
4. Las bacterias se sedimentaron, centrifugando a 750 g por 12 min a 4°C, eliminándose posteriormente el sobrenadante de forma suave, intentando secar las paredes de los tubos.
5. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 16 mL de la solución RFI (RbCl 100 mM; MnCl₂ 50 mM; acetato potásico 10 mM; CaCl₂ 10 mM; glicerol 11.9% p/v; pH 5.8 ajustado con ácido acético 0.2 M; esterilizar por filtración) y se incubaron durante 15 minutos en hielo.
6. Las bacterias se sedimentaron nuevamente, como en el paso 4, y se resuspendieron en 2 mL de solución RFII (MOPS 10 mM; RbCl 1 mM; CaCl₂ 100 mM; Glicerol 11.9% p/v; pH 6.8 ajustado con NaOH 0.5 M; esterilizar por filtración) incubándose durante 15 minutos en hielo.

7. Se prepararon alícuotas de 100 μL , las que se enfriaron inmediatamente en N_2 líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

4.4.11 Ligación en vectores de clonación.

Se utilizaron los vectores de clonación pGEM-T Easy (Promega) y pCR®2.1 del Kit de clonación TA Cloning® (Invitrogen). Estos vectores de clonación usan las colas de adenina típicas de productos PCR, resultantes de la actividad transferasa terminal de la Taq polimerasa sin actividad correctora de prueba.

El sitio de clonación se encuentra en el marco del gen LacZ, por lo que es posible selección de los plásmidos portadores del inserto mediante la diferenciación de colonias blancas/azules de *E. coli* cultivadas en presencia de X-gal. La selección se realiza por la tolerancia al antibiótico ampicilina que confieren estos plásmidos.

Procedimiento para ligación en pGEM-T Easy.

En un tubo de microcentrífuga se incubó durante toda una noche a 4°C la siguiente mezcla de reacción:

X μL Inserto
1 μL Ligasa
1 μL Vector (50 ng μL)
X+2 μL Tampón (2X)

Nota: La proporción inserto/vector debe ser 3/1. La cantidad de inserto necesaria depende pues, del tamaño de éste y del vector donde va a ser ligado. Esto se puede determinar según la siguiente ecuación

$$Ci = \left(\frac{50ng\text{Vector} \times Ti}{Tv} \right) \times 3 \quad (\text{IV-8})$$

en donde Ci es la cantidad de inserto en ng, Ti es el tamaño del inserto en pb, y Tv es el tamaño del vector en pb.

Procedimiento para ligación en pCR®2.1.

En un tubo de microcentrífuga se incubó entre 4 h y una noche a 14°C la siguiente mezcla de reacción:

- 1 µL Inserto
- 1 µL T4 DNA Ligasa
- 2 µL Vector (25 ng/µl)
- 1 µL Tampón (10X)
- 5 µL ddH₂O estéril

Nota: generalmente 1 µL de productos de PCR es suficiente. No obstante, se debe utilizar no menos de 10 ng de inserto, disminuyendo la cantidad de ddH₂O cuando sea necesario.

4.4.12 Transformación de células competentes.

La transformación tiene por objeto introducir plásmidos con el inserto deseado en cepas de *E. coli* competentes. Se utilizó la metodología descrita por Rodríguez y Tait (1983), según el siguiente procedimiento.

Procedimiento.

1. Se añadió a un vial con células competentes la mitad del volumen de la reacción de ligación, manteniéndose esta mezcla en hielo durante 30 minutos.
2. Inmediatamente después, se le aplicó un choque térmico durante 90 segundos a 42 °C, se enfrió durante 2 minutos en hielo y se añadió 1 mL de medio LB líquido estéril.
3. Este cultivo se incubó a 37 °C, durante 1,5 horas en agitación constante. En el intertanto, se preparan placas Petri con medio de cultivo LB sólido (LB líquido+1% p/v de agar) suplementado con ampicilina 100 µg µL⁻¹.
4. Una vez solidificado el medio en las placas Petri, se extendieron en su superficie 100 µL de IPTG 100 mM y 30 µL de X-Gal 50 mg mL⁻¹. Se dejaron secar unos 30 minutos para asegurar que los reactivos se habían absorbido.
5. Se extendieron 100, 200 µL y una resuspensión del cultivo remanente en dichas placas, las que fueron incubadas toda la noche a 37°C.

6. Las colonias seleccionadas (colonias blancas que supuestamente fueron transformadas con el vector conteniendo el inserto) fueron replicadas en otras placas para su estudio posterior.

Nota: Las soluciones de IPTG y X-Gal se conservan a -20°C . El X-Gal se disuelve en dimetilformamida. Dada la fotosensibilidad de este último se debe conservar en un recipiente opaco.

4.4.13 Extracción de ADN plásmidico.

Las colonias seleccionadas fueron exploradas, para lo cual se extrajo una porción de cada colonia con un palillo de madera estéril, se agitó en un vial con 50 mL de ddH₂O estéril y se calentó a 95°C durante 10 min. La suspensión fue utilizada como molde para la PCR.

Aquellas colonias que demostraron tener el inserto adecuado fueron cultivadas en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina 1 mg mL^{-1} durante una noche. Posteriormente se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4.14 Secuenciación.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC, Granada). Las secuencias se determinaron mediante secuenciación de cadena única, usando un secuenciador automático Perkin-Elmer ABI Prism 373.

En el caso de secuencias de productos de PCR, cada reacción consistió de 10-40 ng de ADN molde. Para la secuenciación de los plásmidos, cada reacción consistió de 400-1000 ng de ADN molde. En ambos casos se utilizó 6.4 pmol de oligonucleótido, para un volumen final de 12 μL cada reacción.

4.4.15 Búsqueda de secuencias de interés en base de datos.

Se realizó una búsqueda de numerosas secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del gen ribosómico (18S rDNA, SSU rDNA) de diversos hongos formadores de micorrizas arbusculares. La búsqueda se realizó por Internet a través de la página del EBI (European Bioinformatics Institute; <http://www.ebi.ac.uk>).

4.4.16 Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Las secuencias de los productos de PCR y plásmidos obtenidos se contrastaron con las presentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para de esta forma poder conocer el organismo con el cual la secuencia presenta el mayor grado de homología (Altschul et al. 1990).

Por otra parte, para realizar el alineamiento múltiple de las secuencias, tanto de las presentes en la base de datos como de las obtenidas por secuenciación, se utilizó la herramienta ClustalW presente en la página del EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Thompson et al. 1994). Esto permitió conocer las zonas conservadas de la subunidad pequeña del gen ribosómico, que resultó de gran ayuda para el diseño del oligonucleótido Glo1.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se usaron diferentes técnicas estadísticas para analizar los resultados de este estudio. En todos los análisis, cuando los datos no cumplieron los supuestos estadísticos de homogeneidad de varianza, normalidad y distribución independiente de residuales, los datos fueron transformados; no obstante, los datos son presentados en su escala original. Cuando $p < 0.05$, se consideró que existían diferencias significativas entre los distintos niveles de la(s) variable(s) influyente(s) analizada(s). Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico SPSS v. 10.0.

5.1 Análisis de Varianza unifactorial.

Los datos obtenidos en los distintos tratamientos sobre cada una de las variables escalares analizadas, y para cada una de los muestreos realizados, fueron estudiados mediante Análisis de Varianza de una vía, con el objetivo de analizar el efecto de los distintos tratamientos sobre el comportamiento de la variable de respuesta en un momento puntual del estudio (cada etapa de muestreo). Cuando se presentó $p < 0.05$ se realizó la prueba post-hoc de Tukey para la formación de grupos de varianza homogénea.

5.2 Análisis de medidas repetidas.

Dado el diseño del experimento, donde se tomó la misma medida en distintas ocasiones a cada sujeto (maceta), se realizó un análisis de varianza de las Medidas Repetidas para analizar el efecto de las distintas variables influyentes sobre las respuestas de los parámetros escalares determinados, así como la interacción con respecto al factor temporal introducido. Cuando se presentó $p < 0.05$ se realizó la prueba post-hoc de Tukey para la formación de grupos de varianza homogénea.

5.3 Análisis de correlación.

Los valores de las medias repetitivas de las variables escalares de respuesta obtenidas fueron sometidos a análisis de correlación bivariada para observar la relación lineal existente entre estas. Cuando la probabilidad asociada al coeficiente de correlación obtenido fue $p < 0.05$ se consideró que las variables se encontraban relacionadas entre sí.

5.4 Análisis multivariante.

Para obtener el efecto del factor influyente sobre las medias de las agrupaciones de una distribución conjunta de variables dependientes se realizó análisis de varianza multivariante sobre las variables dependientes de carácter escalar. Se analizaron así mismo las interacciones entre las variables analizadas.

5.4.1 Análisis de regresión.

Se utilizó regresión lineal múltiple para analizar la dependencia lineal de las distintas variables de respuesta analizadas por conjuntos (parámetros edáficos, parámetros de crecimiento vegetal, parámetros de crecimiento de HMA y parámetros de biodiversidad). Para realizar la selección de un subconjunto óptimo de variables se utilizó el método de pasos sucesivos (stepwise). Las variables incluidas en el modelo fueron utilizadas posteriormente en el análisis factorial.

5.4.2 Análisis factorial.

Para reducir y simplificar la dimensión de las variables influyentes en los modelos utilizados, se realizó análisis factorial con el método de reducción de componentes principales, que permitió resumir las variables que mayor injerencia presentaran y que explicaran una proporción alta de la varianza global. Para obtener el número de variables a retener se utilizó el criterio de la media, autovalores y los gráficos de sedimentación.

5.4.3 Análisis de conglomerados.

Para realizar la clasificación de grupos que englobaran individuos relacionados se realizó análisis de conglomerados no jerárquico. Este análisis permitió clasificar los distintos grupos de la variable influyente según el efecto que determinaron en las distintas variables de respuesta. Como método aglomerativo se utilizó el vecino más lejano (encadenamiento completo). Los conglomerados formados permitieron el análisis descriptivo de los factores obtenidos del análisis factorial mediante diagramas de dispersión.

*Han florecido los matorrales, las orillas de los caminos, las
cercas, la humilde escoba de sus florecitas amarillentas.
Cuando ha soplado el viento el río se cubre de
flores y hasta las criques arrastran pétalos.
Vuelan abejas y mariposas.*

(José Coronel Urtecho, Febrero en La Azucena)



Dado que el estudio en mesocosmos se efectuó a lo largo de tres ciclos anuales completos de crecimiento, se presentan los resultados obtenidos, en términos generales, de la evolución estacional de los diferentes parámetros analizados durante las determinaciones trimestrales (desde verano de 2002 hasta primavera de 2005) por una parte; y por otra, se presentan los efectos medios que las diversas asociaciones vegetales, utilizadas como tratamientos en este estudio, tuvieron sobre las distintas variables. Éstas, además, fueron agrupadas en cuatro bloques de variables, englobándose en cada uno de ellos aquellas variables que definieran y/o mostraran *i)* la mejora en las características físico-químicas del sustrato, *ii)* el crecimiento de las plantas en los distintos tratamientos y el efecto de la planta acompañante sobre el desarrollo de cada una de ellas, *iii)* el crecimiento del HMA y el desarrollo de la simbiosis micorrícica, tanto *in planta* como en el suelo, y *iv)* la presencia de las diversas especies de HMA en la zona extra e intraradical, así como su diversidad y la estructura de la comunidad micorrícica resultante. Se presenta, además de esto, los resultados de la optimización de las técnicas para la determinación de la densidad de hifas y para la caracterización de las especies de HMA colonizando raíces. Finalmente, se presentan las relaciones establecidas entre los distintos parámetros, así como su análisis multivariante.

1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUSTRATO

En este apartado se describe el comportamiento que presentan algunas características del sustrato de crecimiento por efecto del establecimiento de las diferentes asociaciones vegetales. Los parámetros analizados que se presentan son pH_w , contenido de P disponible en el sustrato, contenido de glomalina fácilmente extractable (FE) y proporción de agregados hidroestables. La evolución a través de las distintas estaciones climáticas en que se analizaron estas variables se presenta en la Figura 20. Por otra parte, los efectos globales de las diferentes asociaciones vegetales empleadas sobre las variables ya mencionadas se muestran en la Figura 21.

1.1 Valoración de pH_w .

Como se observa en la Figura V-1A, los valores iniciales (verano 2002) de pH se presentaron en torno a 8.7-9.0, mostrándose escasa diferencia estadística entre los distintos tratamientos. Posteriormente, se produjo un descenso generalizado en todos los tratamientos, alcanzándose los menores valores en Primavera de 2003, ocasión en que se registraron importantes diferencias, siendo los tratamientos Mejorana y Lavanda solas donde se presentaron los valores más bajos (7.97 y 8.02 respectivamente), y los tratamientos Retama+Romero y la asociación múltiple en suelo natural los más altos (8.13). Seguido de esto, los valores de pH ascendieron hasta el otoño de 2003, siendo el tratamiento Retama sola el que alcanzó el valor más alto (8.54) y la asociación Mejorana+Lavanda la que mostró los niveles más bajos (8.29).

Este comportamiento cíclico en los valores de pH se volvió a observar durante las sucesivas etapas de análisis, descendiendo hacia la temporada primavera-verano de 2004 (registrándose los valores más extremos en Retama sola, con un valor de 8.07, y Retama+Romero, con un valor de 7.81), volviendo a ascender nuevamente hacia la temporada otoño 2004-invierno 2005 (8.41 en Romero solo y 8.59 en la asociación en suelo natural) y descendiendo finalmente en primavera de 2005 (7.92 en Lavanda sola y 8.21 en la asociación múltiple en suelo natural).

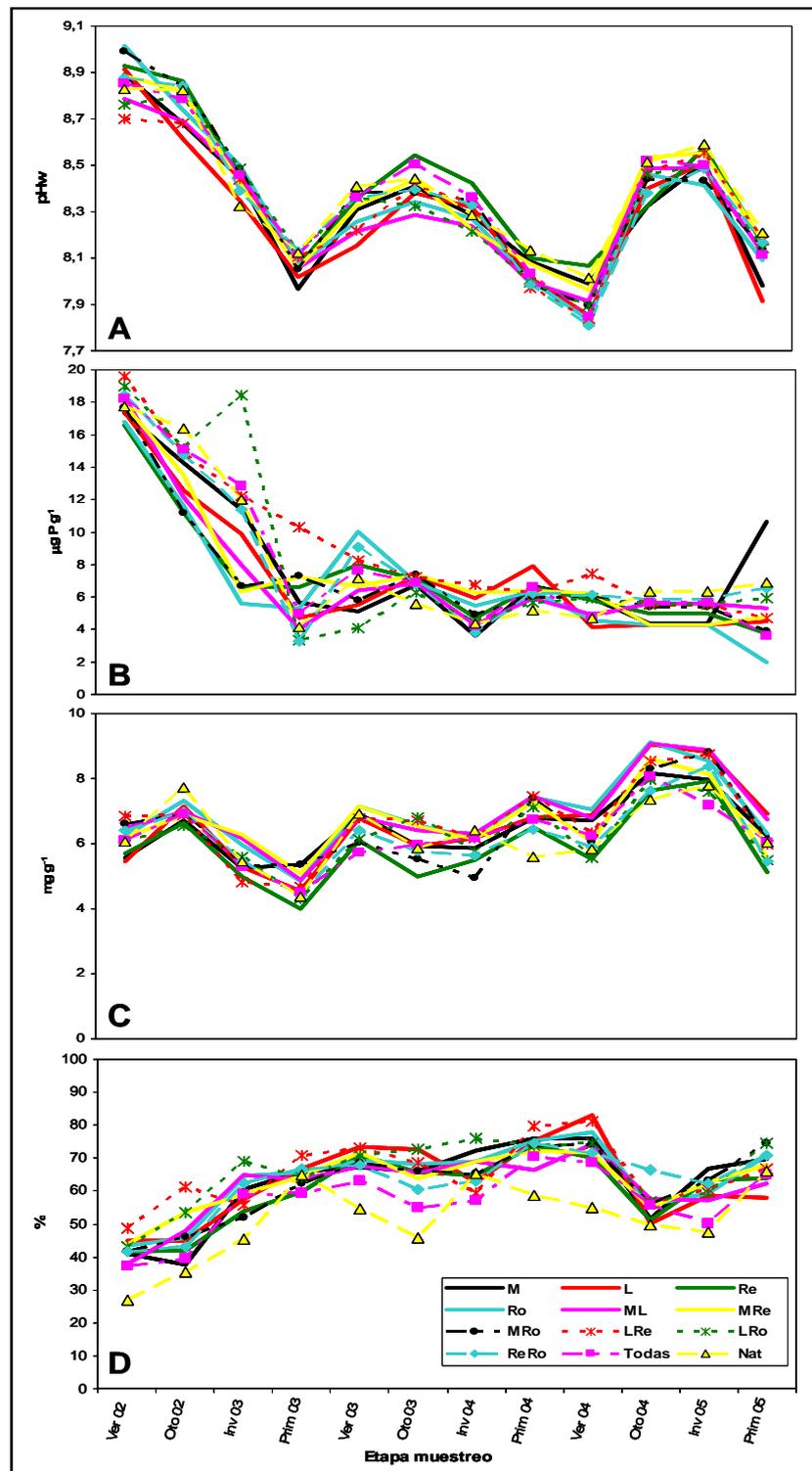


Figura 20. Evolución de diversos parámetros edáficos determinados en el sustrato de crecimiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. (A) Evolución de los valores de pHw. (B) Evolución del contenido de P disponible (Olsen). (C) Evolución del contenido de glomalina fácilmente extractable. (D) Evolución de la proporción de agregados hidroestables.

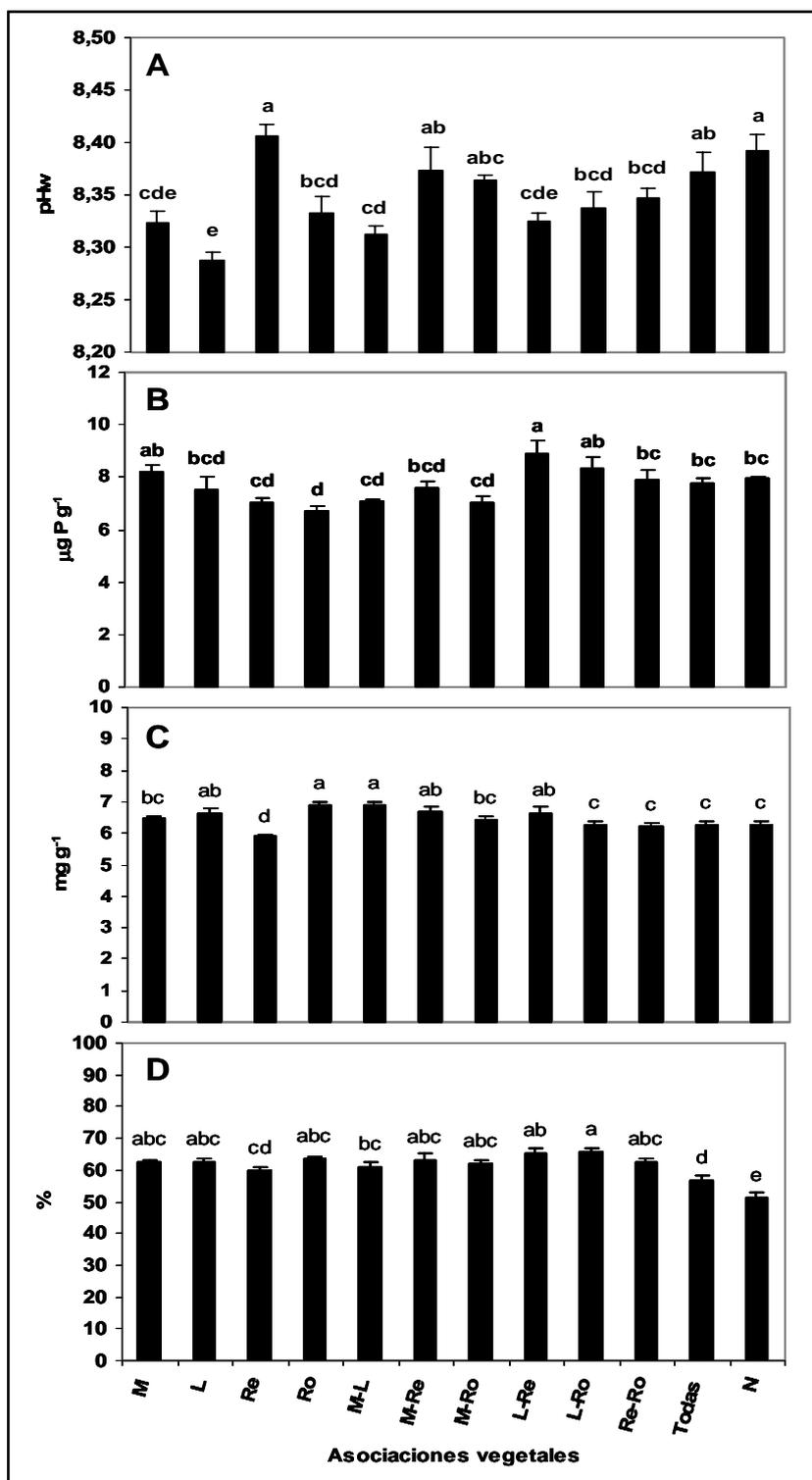


Figura 21. Valores medios de diversos parámetros edáficos determinados en el sustrato de crecimiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. (A) Medias repetitivas para valores de pHw. (B) Medias repetitivas para contenido de P disponible (Olsen). (C) Medias repetitivas para contenido de glomalina fácilmente extractable. (D) Medias repetitivas para proporción de agregados hidrostables. Las barras representan el error standard. Letras distintas en las gráficas son significativamente distintas según el test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$; $n=5$).

En la Figura 21A se muestran los valores de las medias repetitivas para pH de acuerdo a las diferentes asociaciones vegetales formadas en el estudio en mesocosmos. Se puede observar que los tratamientos donde el descenso de pH fue más acusado correspondieron a los tratamientos en los que se incluyó Lavanda (Lavanda sola 8.29; Lavanda+Mejorana 8.31; Lavanda+Retama 8.32) y Mejorana sola (8.32). Por su parte, los tratamientos en los que se presentaron los mayores valores de pH fueron Retama sola (8.41) y todas las plantas en suelo natural (8.39). Como se verá más adelante, este comportamiento tiene una alta relación negativa con el crecimiento de los componentes fúngicos y vegetal.

1.2 Contenido de P asimilable en el suelo.

Los contenidos de P disponible en el sustrato de crecimiento presentaron un descenso sostenido en el tiempo para todos los tratamientos analizados (Figura 20B). Los descensos más acusados de P disponible se produjeron durante las primeras etapas de muestreo, especialmente hasta primavera 2005, cuando se estabilizaron las tasas de descenso. Cabe señalar que estos cambios observados en el descenso de P disponible en el sustrato se asocian con un incremento de la superficie de cobertura vegetal, produciéndose una estabilización de ese incremento en el mismo momento en que se produce la estabilización de los valores de P disponible, lo que puede estar representando su agotamiento e inmovilización en los tejidos vegetales.

Por otra parte, los contenidos medios repetitivos de P disponible se encuentran en valores de entre 6.70 y 8.90 $\mu\text{g g}^{-1}$, en Romero solo y la asociación Lavanda+Retama respectivamente (aunque los valores finales alcanzaron valores de entre 2 y 7 $\mu\text{g g}^{-1}$), no registrándose diferencias importantes entre las distintas asociaciones vegetales estudiadas; de hecho este parámetro, como se verá más adelante, no presentó relaciones que pudieran ser explicadas por las demás variables estudiadas ni por efecto de las asociaciones vegetales utilizadas.

1.3 Estabilidad estructural del sustrato.

1.3.1 Agregados hidroestables en el sustrato.

En la Figura 20D se muestra la evolución de la proporción de agregados hidroestables en el sustrato de crecimiento a lo largo de los tres años de duración del estudio. Se puede observar una tendencia generalizada al aumento de la proporción de agregados hidroestables desde el primer momento en que se analizó este parámetro.

Es interesante destacar que la proporción de agregados inicial del suelo se corresponde con la del suelo en condiciones naturales en verano 2002 (alrededor de 25%), registrándose en todos los tratamientos inoculados valores significativamente mayores (entre 37% en el tratamiento todas las plantas y 49% en el tratamiento Lavanda+Retama). El ascenso de los valores se registró hasta la temporada de primavera-verano de 2004, ocasión en que la proporción de los agregados hidroestables superó el 80% en algunos tratamientos (Lavanda sola y Lavanda+Retama). Por su parte, la asociación múltiple en suelo natural presentó de forma general a lo largo de todo el estudio los valores más reducidos. Para la etapa de muestreo de otoño de 2004 se registró un descenso de la agregación de suelo, hasta valores de 50% en los tratamientos con menos proporción de agregados hidroestables (suelo natural), y no superiores a 66% (en la asociación Retama-Romero), valores que tendieron al aumento con posterioridad, aunque no lograron alcanzar el nivel presentado justo antes de otoño 2004. Este comportamiento es similar al que presentó la densidad de hifas totales.

En la Figura 21D se muestran las medias repetitivas para la proporción de agregados hidroestables de acuerdo a las diferentes asociaciones vegetales formadas en el estudio en mesocosmos. Como se observa, los tratamientos en los que se utilizó la asociación vegetal múltiple presentaron los menores valores conjuntos de agregación de suelo, siendo de 51,3% para el tratamiento en suelo natural y de 56,7% en el caso del sustrato inoculado. Los tratamientos en los que se registró la mayor agregación de suelo, por su parte, fueron las asociaciones Lavanda+Retama (65,1%) y Lavanda+Romero (65,7%).

1.3.2 Influencia de la fracción lábil de Glomalina sobre la estabilidad estructural.

De acuerdo a Wright y Upadhyaya (1998), la fracción fácilmente extractable de la glomalina resulta ser un buen indicador de la estabilidad estructural del suelo. En este estudio la asociación de la estabilidad estructural (determinada como la formación de agregados hidroestables) relacionó significativamente con el contenido global de glomalina FE (ver Tabla 11). No obstante, la evolución de este parámetro no presentó un comportamiento que pudiese asociarse a la evolución de alguna otra variable, presentándose variaciones temporales leves, dentro de un rango restringido, que estuvo comprendido entre unos 4 y 9 mg glomalina FE g⁻¹. Importante de señalar resulta sí que la cantidad media de glomalina se asocia significativamente a la densidad de micelio, raíz total y colonizada, y superficie de cobertura vegetal, debido a que esta glicoproteína es producida en grandes cantidades por hifas y el componente fúngico de la raíz micorrizada (Wright et al. 1996).

2. COBERTURA VEGETAL

La cobertura vegetal, que fue obtenida por tratamiento informático de imágenes de las plantas, fue uno de los principales parámetros determinados de crecimiento vegetal. La superficie de cobertura así obtenida se presenta de forma total por las distintas asociaciones vegetales, así como también la superficie de cobertura presentada por plantas individuales de cada especie. Esta determinación ha permitido visualizar el efecto que tienen sobre el crecimiento de una planta de determinada especie su asociación con plantas de otra especie, así como la contribución específica de cada planta al total de la cobertura del suelo. Por otra parte, se presentan además resultados para diferentes componentes de crecimiento, tales como la longitud de las plantas, el número de flores/inflorescencia, y de ramificaciones.

2.1 Cobertura total.

2.1.1 Evolución de la cobertura vegetal.

En la Figura 22 se presenta la evolución de la superficie de cobertura vegetal total para cada tratamiento. Se puede observar un aumento sostenido de la superficie cubierta, situación que tendió a la estabilización hacia la mitad del estudio y, finalmente, una disminución de la superficie cubierta. Cabe señalar por ejemplo, que los tratamientos Lavanda y Lavanda+Mejorana, entre primavera de 2004 y otoño de ese mismo año, alcanzaron a cubrir una superficie superior en todos los casos a 345 cm² (hasta 440 cm² en Lavanda+Mejorana en otoño de 2004) para posteriormente descender los valores de superficie cubierta, la que no alcanzó a superar los 230-280 cm² en la temporada invierno-primavera del año 2005.

Por otra parte, se observa un comportamiento estacional en algunos tratamientos, que presentaron mayores superficies de cobertura en temporadas específicas, como ocurrió en primavera con tratamientos que incluyeron Mejorana o Lavanda. Se observan además importantes diferencias entre las distintas asociaciones vegetales establecidas, siendo los tratamientos Retama sola y la asociación múltiple en suelo natural los que presentaron menores valores de cobertura. Por su parte, los tratamientos en que se incluyó Lavanda fueron los que presentaron las mayores coberturas.

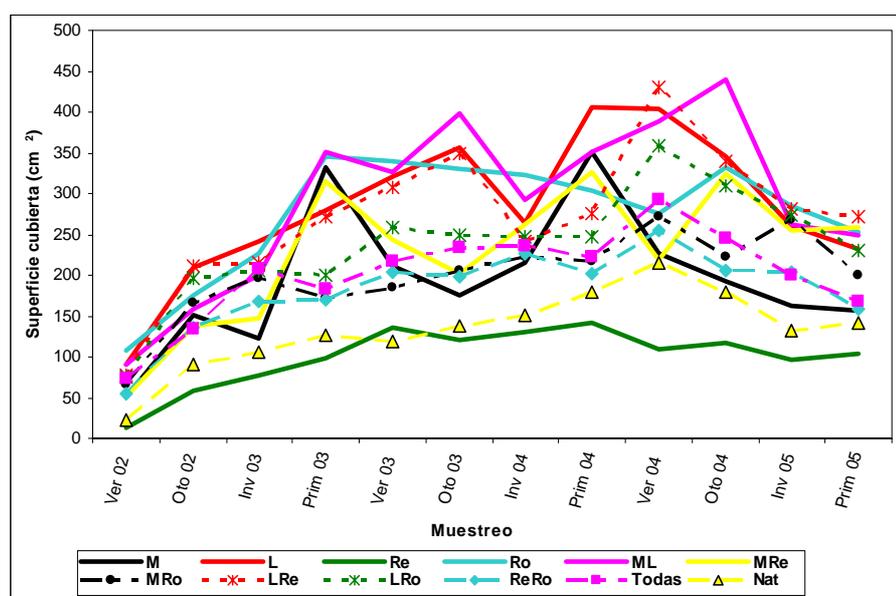


Figura 22. Evolución de la superficie de cobertura total por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio.

2.1.2 Efecto de las asociaciones vegetales sobre la cobertura.

En la Figura 23 se exhiben las medias repetitivas para la superficie de cobertura total en las diferentes asociaciones vegetales formadas en el estudio en mesocosmos. Se pueden apreciar fuertes y significativas diferencias entre los distintos tratamientos estudiados.

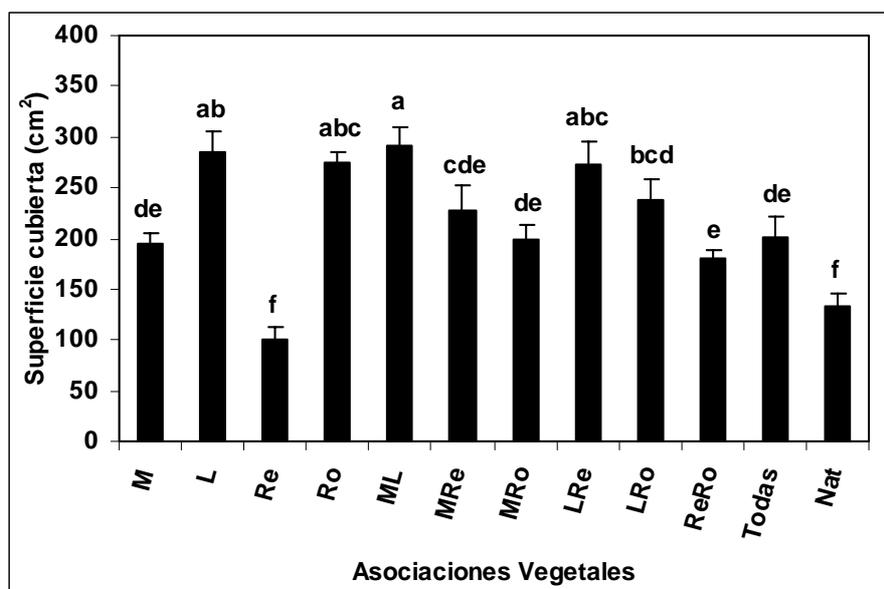


Figura 23. Valores medios para superficie de cobertura vegetal total por tratamiento en función de la asociación vegetal. Las barras representan el error standard. Letras distintas en las gráficas son significativamente distintas según el test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$; $n=5$).

De forma global, se observa que el tratamiento que menor cobertura ofreció al sustrato es Retama sola (100 cm^2), seguido por la asociación múltiple en suelo natural (133 cm^2). Por su parte, los tratamientos donde se presentó la mayor superficie de cobertura fueron las asociaciones Lavanda+Mejorana (292 cm^2), Lavanda+Retama (272 cm^2), y los tratamientos de Lavanda (284 cm^2) y Romero (275 cm^2) solos. Se debe considerar, no obstante, que estos valores corresponden a la superficie de cobertura que se produce por la adición de la cobertura de cada una de las plantas en la unidad experimental, por lo que el efecto que se produce en una especie en particular por la presencia de otra especie en los tratamientos asociados no se aprecia. Este desglose de la cobertura producida por cada especie se analiza en el siguiente punto.

2.2 Contribución específica a la cobertura.

En la Figura 24 se presenta la contribución específica media a la superficie de cobertura vegetal total, y en la Figura 25 se presentan los valores medios de cobertura específica para cada especie. Como se observa, y considerando que cada asociación consistió de cuatro plantas, existen especies vegetales que en algunos casos presentaron una mayor capacidad de cubrir el sustrato cuando estaban asociadas, aunque también se registra el caso contrario. Por ejemplo, nótese que la contribución a la cobertura del Romero en sus asociaciones fue consistentemente mayor que la de las especies acompañantes, representando un 80,5 % de la cobertura total en el caso de la asociación Mejorana-Romero, 71 % en Lavanda-Romero, 91 % en Retama-Romero, 51,3 % en el tratamiento con todas las especies y 44,2 % en el tratamiento con todas las plantas en suelo natural.

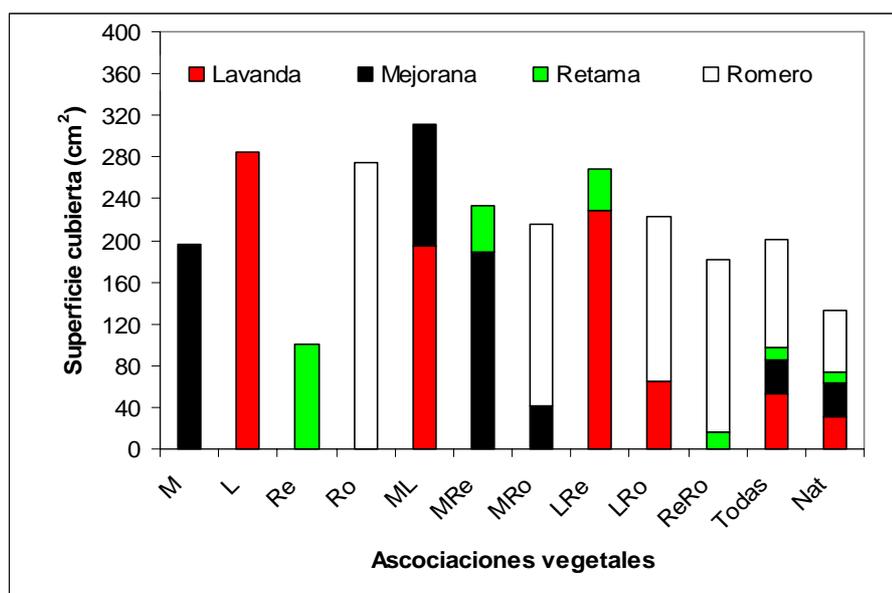


Figura 24. Contribución específica media a la cobertura total por tratamiento en función de la asociación vegetal. Cada barra representa cuatro plantas, por lo que en tratamientos asociados cada color representa a dos plantas de cada especie en el caso de las asociaciones dobles, y a una planta en las asociaciones múltiples.

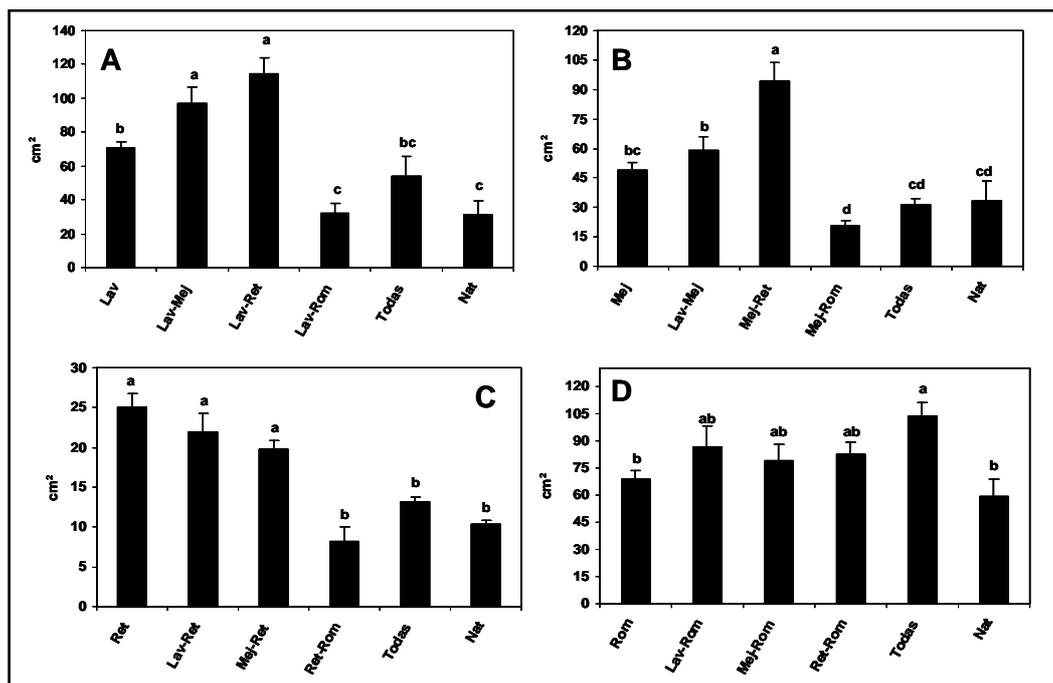


Figura 25. Valores medios de superficie de cobertura individual por tratamiento en función de la asociación vegetal. (A) Cobertura individual de plantas de Lavanda. (B) Cobertura individual de plantas de Mejorana. (C) Cobertura individual de plantas de Retama. (D) Cobertura individual de plantas de Romero. Las barras representan el error standard. Letras distintas en las gráficas son significativamente distintas según el test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$; $n=5$).

2.2.1 Contribución a la cobertura por Lavanda.

Los efectos de las asociaciones sobre la superficie de cobertura individual producida por Lavanda se presentan en la Figura 25A. En esta especie vegetal se observó una influencia de la asociación con otras especies vegetales sobre su contribución individual a la cobertura, viéndose claramente favorecida por la presencia de Retama y Mejorana, y desfavorecida con la presencia de Romero o la falta de inoculación. Globalmente, una planta de Lavanda cubrió una superficie de 71 cm^2 , que se vio aumentada un 37% cuando se asocia con Mejorana, y 61% cuando la asociación fue con Retama. Por el contrario, cuando la asociación fue con Romero se alcanzó una superficie de cobertura de 32 cm^2 , similar a los 31 cm^2 que se alcanzó en el tratamiento en suelo natural no inoculado, y que representó sólo un 44-46% de la superficie alcanzada por la planta no asociada. La asociación múltiple tampoco favoreció la cobertura de Lavanda, alcanzándose en este caso 58 cm^2 de superficie cubierta, que aunque no representó diferencia estadística, significó un descenso de un 24% de cobertura respecto del tratamiento no asociado.

2.2.2 Contribución a la cobertura por Mejorana.

Los efectos de la asociación vegetal sobre la superficie de cobertura individual producida por Mejorana se presentan en la Figura V25B. En esta especie vegetal se observó un comportamiento muy similar al descrito para Lavanda, presentándose mayores superficies de cobertura en los tratamientos asociados con Lavanda y Retama, y las menores coberturas en la asociación con Romero. En los casos en los que Mejorana no se encontró asociada presentó una cobertura media de 49 cm², de 59 cm² (20.4% de incremento, sin diferencia significativa) cuando se asoció con Lavanda y de 94 cm² (93% de incremento) en asociación con Retama. Por otra parte, la asociación con Romero produjo un descenso de la superficie de cobertura de Mejorana de un 57.4%, alcanzándose sólo 21 cm² de cobertura. En las asociaciones múltiples, aunque se registró igualmente en ambas un importante descenso en la superficie de cobertura, esta no alcanzó a ser estadísticamente significativa, presentándose valores de 31 cm² en el sustrato inoculado y 33 cm² en el suelo natural.

2.2.3 Contribución a la cobertura por Retama.

Los efectos de la asociación vegetal sobre la superficie de cobertura individual producida por Retama se presentan en la Figura 25C. A diferencia de lo visto en las dos especies anteriores, en Retama no se registraron efectos sinérgicos por efecto de la asociación con otras plantas, presentándose en todas las asociaciones superficies de cobertura menores que en el tratamiento Retama sola. Cuando la Retama se asoció con Lavanda o Mejorana no se presentaron diferencias estadísticas para la superficie de cobertura, alcanzándose 22 cm² y 20 cm² respectivamente, comparado con los 25 cm² que se registraron en Retama sola. En la asociación con Romero se registraron las menores coberturas, alcanzándose 8.22 cm² (un 32.7% de la cobertura de Retama sola), dado por el efecto deletéreo que se observó en Retama desde verano de 2003, llegando a desaparecer las plantas de Retama en invierno-otoño de 2005. Las asociaciones múltiples, por su parte, presentaron también coberturas significativamente menores que en Retama sola o las asociaciones de ésta con Lavanda y Mejorana, presentándose valores de 13.2 cm² en el caso de la asociación múltiple en sustrato inoculado y de 10.3 cm² en el suelo natural.

2.2.4 Contribución a la cobertura por Romero.

Los efectos de la asociación vegetal sobre la superficie de cobertura individual producida por Romero se presentan en la Figura 25D. En el caso de la superficie de cobertura por Romero se presentó un comportamiento totalmente distinto al observado en las otras especies vegetales. En el caso de las asociaciones de Romero se presentaron mayores niveles de cobertura que los registrados en Romero solo. Cuando el Romero se asoció con Lavanda, Mejorana y Retama se obtuvieron valores bastante homogéneos, de 86.5 cm² en el primer caso, de 78.9 cm² en el segundo, y de 82.6 cm² en el tercero, representando un incremento de 26, 15 y 20% respectivamente comparado con la superficie de cobertura producida por plantas de Romero solas (68.7 cm²). La asociación múltiple en sustrato inoculado representó el mayor incremento de superficie de cobertura por Romero, alcanzándose los 103 cm² por planta, un 50% más que la cobertura en el tratamiento de Romero no asociado. Sólo la cobertura de las plantas de Romero en la asociación múltiple en el suelo natural no inoculado (58.9%) fue menor que la presentada por las plantas de Romero en el tratamiento no asociado, aunque no se presentó diferencia estadística.

2.3 Componentes de crecimiento por especie vegetal.

Los efectos sinérgicos o deletéreos sobre el crecimiento vegetal también se observaron en otros parámetros, en los que igualmente se presentó una fuerte influencia debida a la asociación de especies vegetales. Algunos de estos parámetros pueden estar a su vez relacionados con algunas tendencias mostradas por otras variables estudiadas, como por ejemplo la floración sobre el tamaño de la comunidad de hongos en suelo. Los resultados de la evolución temporal de los parámetros de crecimiento estudiados se muestran en las Figuras 26 a 29. Los valores de las medias repetitivas globales para las variables de crecimiento estudiadas, por especie vegetal, se presentan en la Tabla 9.

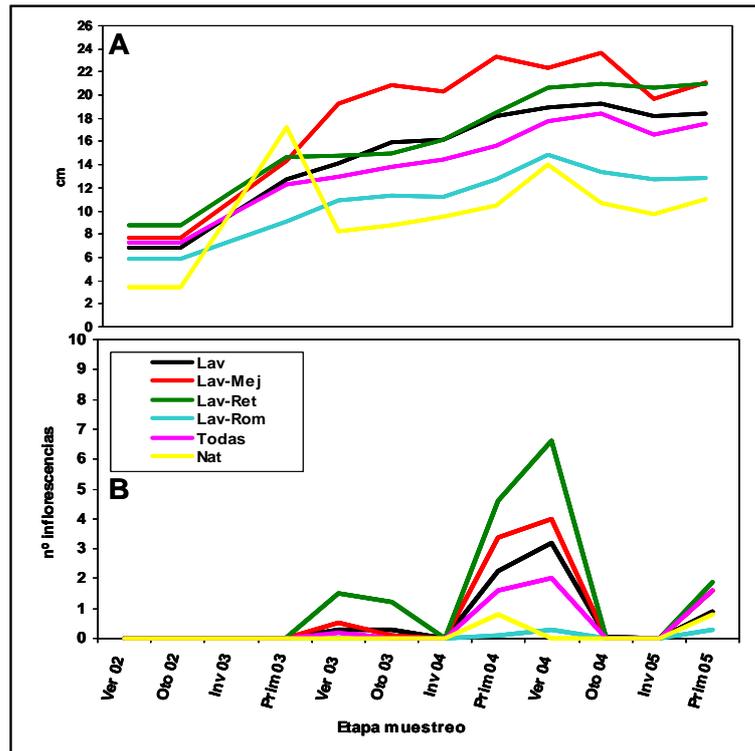


Figura 26. Evolución de la longitud (A) y del número de escapos florales (B) de Lavanda por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio.

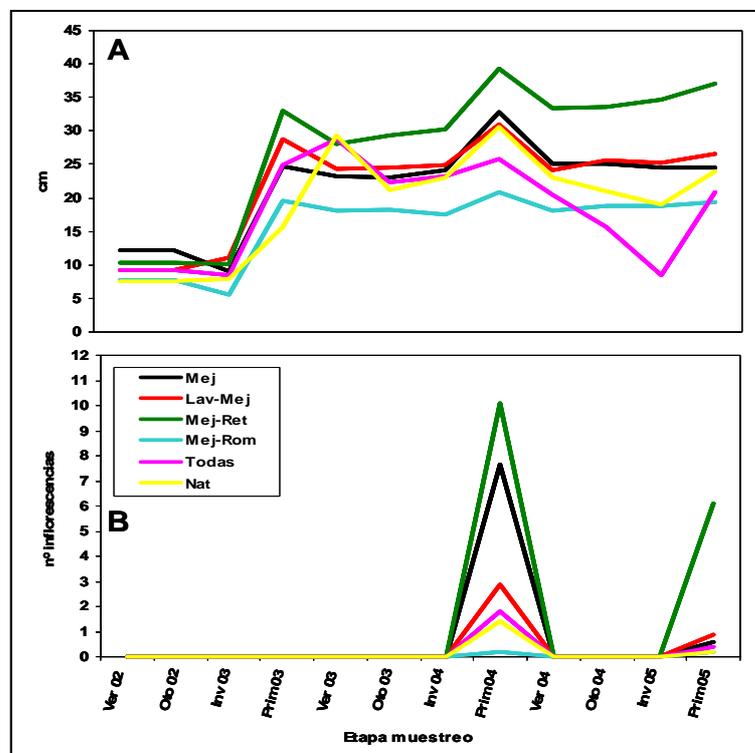


Figura 27. Evolución de la longitud (A) y del número de inflorescencias (B) de Mejorana por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio.

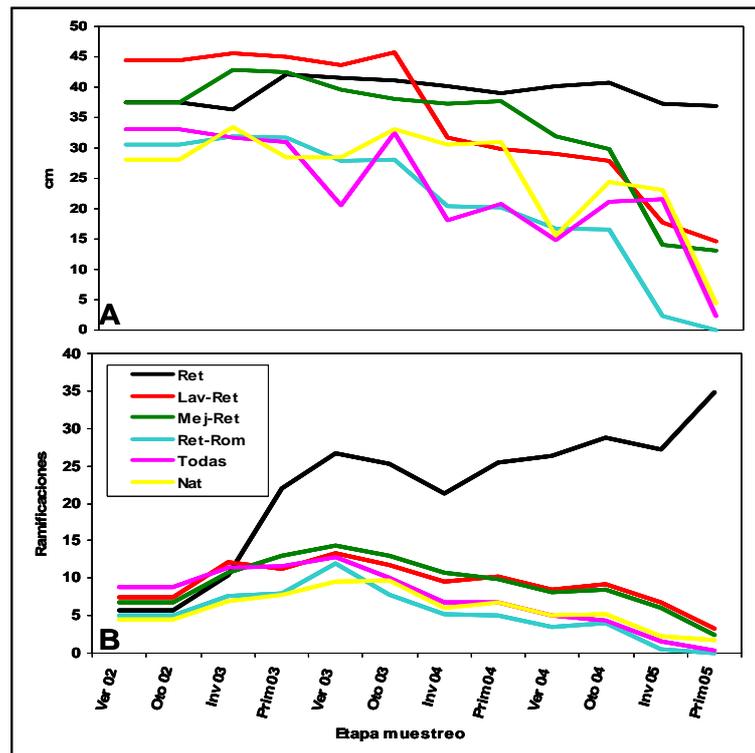


Figura 28. Evolución de la longitud (A) y del número de ramificaciones (B) de Retama por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio.

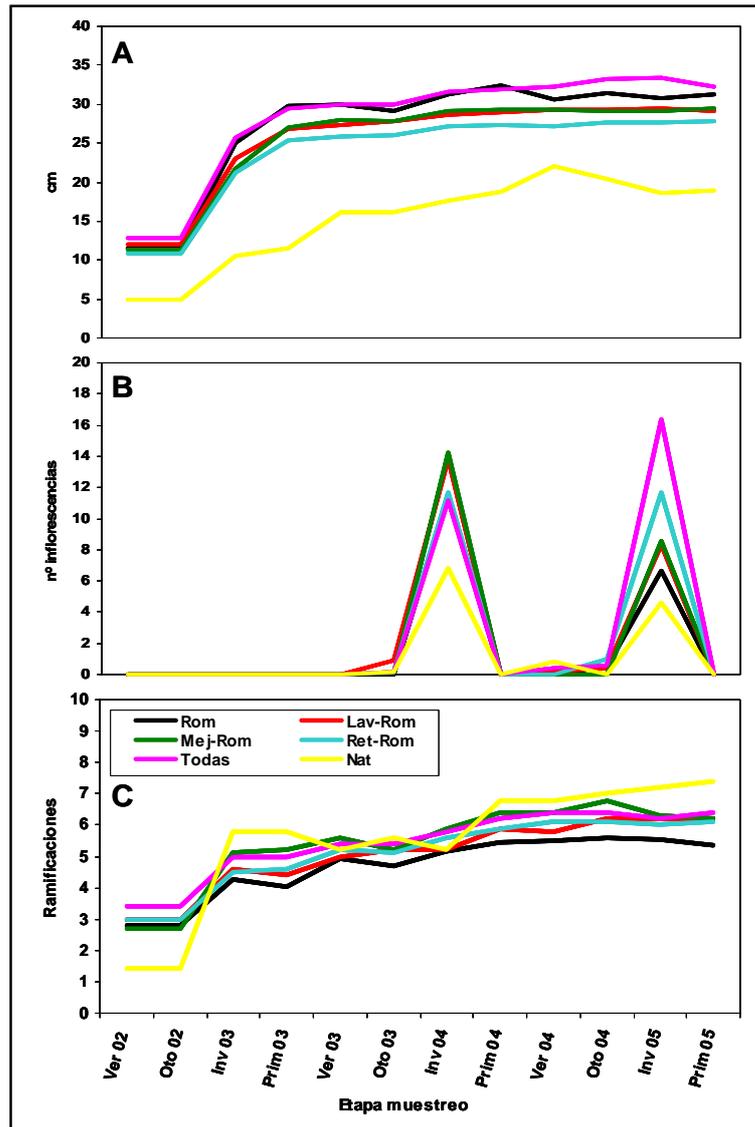


Figura 29. Evolución de la longitud (A), del número de inflorescencias (B) y del número de ramificaciones de Romero (C) por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio.

Tabla 9. Medias repetitivas para diferentes componentes de crecimiento (altura (L), N° de flores/inflorescencias(N°fl.) y ramificaciones (Ram)) por especie vegetales en función de la asociación vegetal utilizada.

Asoc.	Mejorana		Lavanda		Retama		Romero		
	L	N°fl.	L	N°fl.	L	Ram.	L	N°fl.	Ram
M	21.7 b*	0.69 b	-	-	-	-	-	-	-
L	-	-	14.6 ab	0.58 bc	-	-	-	-	-
Re	-	-	-	-	39.23 a	21.62 a	-	-	-
Ro	-	-	-	-	-	-	27.07 a	1.55 ab	4.68 a
ML	22.1 b	0.32 b	17.6 a	0.80 ab	-	-	-	-	-
MRe	27.5 a	1.35 a	-	-	34.98 a	.9.24 b	-	-	-
MRo	15.9 c	0.03 b	-	-	-	-	25.32 a	1.97 ab	5.06 a
LRe	-	-	16.0 ab	1.32 a	33.48 a	.9.18 b	-	-	-
LRo	-	-	10.7 cd	0.06 c	-	-	25.24 a	1.91 ab	5.38 a
ReRo	-	-	-	-	21.44 b	.5.27 b	23.73 a	2.05 ab	5.10 a
Todas	18.0 bc	0.18 b	13.7 bc	0.45 bc	22.98 b	.7.37 b	27.94 a	2.40 a	5.42 a
Nat	18.6 bc	0.13 b	9.7 d	0.13 c	24.59 b	.5.83 b	15.07 b	1.03 b	5.47 a

*Letras distintas en las columnas representan diferencia estadística de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$; $n=5$).

2.3.1 Altura.

La longitud de las plantas, en general, presentó el mismo comportamiento que se registró en la evolución de la superficie de cobertura general. En el caso de Lavanda no se registraron las fluctuaciones estacionales que sí se presentaron en la cobertura (datos no mostrados) (ver Figura V26A). La longitud de las plantas de Lavanda aumentó de forma uniforme, alcanzándose valores de entre 17.6 y 21.1 cm en los tratamientos que más creció (todos menos la asociación con Romero y la asociación múltiple en suelo natural no inoculado) en la primavera de 2005. En el caso de la asociación con Romero la longitud de la planta sólo alcanzó 12.9 cm, y 11 cm en el suelo natural no inoculado en el mismo momento. Las medias para la longitud de plantas de Lavanda han seguido prácticamente el mismo patrón presentado por la superficie de cobertura en esta especie, aunque el tratamiento en que se alcanzó la mayor longitud fue en la asociación con Mejorana (ver Tabla 9).

La Mejorana, por su parte, presentó el mismo comportamiento que la evolución de su superficie de cobertura, mostrando un importante aumento de su longitud durante primavera en todos los tratamientos, especialmente durante la primavera del año 2003, ocasión en la que aumentó su longitud entre 2 y 4 veces en comparación al invierno previo de ese mismo año (ver Figura 27A). Las medias de longitud no presentaron variaciones pronunciadas, rescatándose que al igual que ocurrió con la superficie de cobertura, el tratamiento que menores valores alcanzó fue la asociación Mejorana-Romero (18 cm) y que la asociación más ventajosa resultó ser con Retama (27,5 cm).

Una situación completamente distinta se pudo observar en el caso de Retama (Figura 28A). En este caso particular, las plantas en los distintos tratamientos fueron capaces de alcanzar su máxima longitud durante el primer año (hasta primavera de 2003), posterior a lo cual comenzó una disminución de la longitud de las plantas en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento no asociado. Hacia el final del estudio este descenso se materializó en la desaparición de todas las plantas de Retama en el tratamiento asociado a Romero, y la casi total desaparición en los tratamientos con asociaciones múltiples. Esto ha justificado que de forma global estos tres tratamientos formen un grupo altamente homogéneo y significativamente distinto del resto (ver Tabla 9).

Finalmente, en las plantas de Romero se observa que todos los tratamientos, exceptuando la asociación múltiple en suelo natural no inoculado, presentaron un aumento significativo de su longitud durante el primer año (hasta primavera de 2003) y leves incrementos posteriormente, formando un grupo bastante homogéneo (ver Figura 29A). Por su parte, las plantas de Romero en la asociación múltiple en suelo natural presentaron durante todo el estudio las menores longitudes, lo que se reflejó en que fue el único tratamiento en que la longitud media de las plantas fue estadísticamente distinta (ver Tabla 9).

2.3.2 Ramificaciones.

El número de ramificaciones fue determinado en las plantas tanto de Retama como de Romero. Como se puede observar en la Figura 28B, se presentó una clara diferencia en el número de ramificaciones de Retama a partir de primavera de 2003, siguiendo en aumento en el tratamiento no asociado. En el resto de tratamientos tendió a la disminución, situación que como se comentó en el punto anterior, es particularmente notable en los tratamientos asociados a Romero y en las asociaciones múltiples, donde las plantas de Retama prácticamente desaparecieron. Esto también se puede observar en las medias repetitivas para este parámetro, donde se produjo una diferencia entre la media de ramificaciones de las plantas de Retama en el tratamiento no asociado, siendo entre 2.3 y 4.1 veces superior que en el resto de tratamientos (ver Tabla 9).

No obstante, en el caso de Romero no se presentó diferencia entre los distintos tratamientos, observándose leves incrementos en el número de ramificaciones desde el comienzo del estudio hasta el final del mismo (ver Figura 29C). Finalmente se alcanzó

entre 4.7 y 5.5 ramificaciones en todas las plantas, sin diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos (Tabla 9).

2.3.3 Floración.

Las especies que produjeron flores/inflorescencias durante el estudio fueron Lavanda, Mejorana y Romero. Se puede apreciar en todas ellas fuertes influencias estacionales al momento de emitir las estructuras florales. Así por ejemplo, la Lavanda presentó flores predominantemente en verano, aunque su floración se pudo apreciar desde primavera (ver Figura 26B). Por otra parte, el efecto de las distintas asociaciones vegetales sobre la cantidad de escapos florales emitidos fue altamente significativo, registrándose un fuerte incremento respecto del tratamiento no asociado sobre todo en la asociación con Retama (128% mayor). Por el contrario, en la asociación con Romero y en la asociación múltiple en suelo natural apenas se produjeron escapos (ver Tabla 9).

En el caso de Mejorana, la producción de inflorescencias presentó un carácter aun más estacional, observándose su emisión solamente durante la primavera de los años 2004 y 2005 (ver Figura 27B). Además, se pudo observar el mismo efecto sinérgico/detrimental producto de la asociación con otras especies vegetales. En este caso, la asociación de Mejorana con Retama promovió la producción de inflorescencias, presentándose como término medio un 96% más de inflorescencias en este tratamiento en comparación con el de Mejorana sola, siendo significativamente distinto del resto. En el extremo opuesto, aunque no se registraron diferencias estadísticas, la asociación con Romero redujo la emisión de inflorescencias (reducción del 96%, ver Tabla 9).

Romero, por su parte, también presentó una marcada estacionalidad en la producción de flores (ver Figura 29B). Esta se concentró básicamente en los períodos invernales de 2004 y de 2005 y, en mucho menor medida en otoño y en verano en algunas asociaciones. La producción de flores en Romero fue, en términos medios, mucho más homogénea que la presentada por las otras especies estudiadas, presentándose diferencias significativas sólo en dos casos (ver Tabla 9). De todas formas, se puede observar la tendencia que los tratamientos asociados promovieron la producción de un mayor número de flores en esta especie, alcanzándose los valores máximos en la asociación múltiple en sustrato inoculado (55% mayor número de flores respecto del tratamiento no asociado). Por el contrario, la producción de flores en Romero en el suelo natural no inoculado, a pesar de contar con la asociación múltiple, fue un 34% menor que en Romero solo.

3. DESARROLLO DE LOS HONGOS MICORRÍCICOS EN EL SUSTRATO Y EN LA RAÍZ

Es bien sabido que el desarrollo del hongo micorrícico en el suelo puede influir favorablemente sobre diversas propiedades del suelo, situación que se analizará en el apartado 5 de este capítulo. Por otra parte, las distintas asociaciones vegetales y el régimen de termicidad pudieron haber determinado diferencias en el desarrollo del hongo y en su comportamiento temporal.

El desarrollo y la evolución de los distintos componentes de los HMA, tanto intra, como extraradical fue determinado por medio de los siguientes parámetros: *i*) densidad del micelio extraradical, tanto en su fracción viva como en su totalidad, *ii*) la proporción de colonización micorrícica de la raíz, así como la densidad de raíz colonizada, y *iii*) la densidad de esporas de HMA en suelo, parámetro este último que se analizará con mayor detenimiento en el apartado 4 de este capítulo, haciendo referencia a la diversidad del hongo en el suelo.

3.1 Micelio micorrícico.

Para determinar la densidad de las hifas de hongos micorrícicos en el sustrato fue necesario optimizar diferentes pruebas citohistoquímicas para conseguir una tinción diferencial sobre una misma muestra, tanto de la totalidad del micelio presente en el sustrato así como de su fracción vital. El protocolo optimizado (que se describe en el apartado 4.2 de Material y Métodos) ha resultado de la adaptación de diferentes metodologías descritas con anterioridad, tanto para la extracción del componente fúngico desde el suelo, como para las diferentes tinciones de éste y su cuantificación (Newman 1969; Abbot et al. 1984; Kough et al. 1987; Sylvia 1992).

Por otra parte, fue también necesario determinar el volumen de sustrato que se necesitaba para la cuantificación, puesto que al tratarse de una metodología que se realiza microscópicamente, resulta muy susceptible de brindar un significativo error, debido a las interferencias que se pudieran presentar. Finalmente, la determinación de los componentes del micelio micorrícico ha permitido establecer relaciones entre este parámetro con otras importantes variables que describen la calidad del suelo, como son su estado de agregación, y las lógicas diferencias establecidas entre las distintas

asociaciones vegetales estudiadas, como con su grado de micorrización y su desarrollo a través del tiempo.

3.1.1 Determinación del tamaño de la muestra de sustrato.

Para determinar el tamaño de muestra de sustrato a analizar se utilizó una serie creciente de volumen de suelo, desde 0.5 a 2.0 g (ver Figura 30). Se observó un aumento lineal de la cantidad de hifas del micelio cuantificado, tanto en su fracción viva como en su totalidad, al duplicar la cantidad de suelo utilizado de 0.5 a 1.0 g de suelo. No obstante, al aumentar la cantidad de suelo utilizado no se apreció linealidad en el aumento de la cantidad de hifas cuantificadas, debido al aumento consecuente de la interferencia en la detección producida por una mayor cantidad de partículas presentes en el suelo acompañantes del extracto. Por consiguiente, se utilizó 1 g de sustrato para determinar la densidad de hifas, tanto vivas como totales.

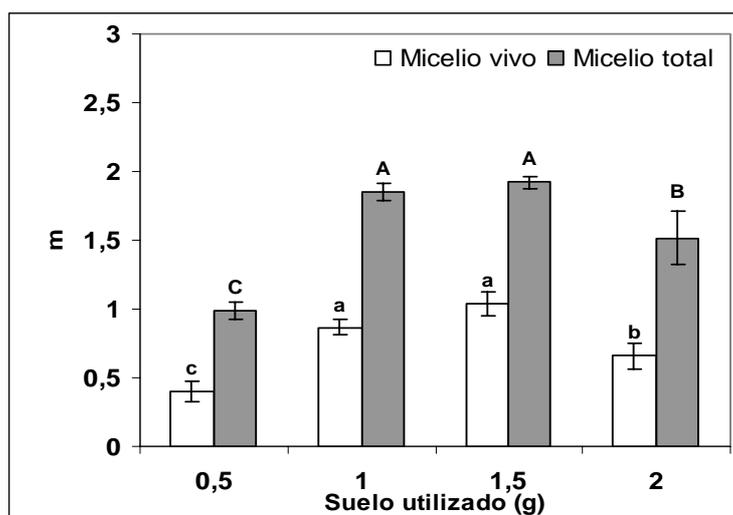


Figura 30. Micelio extraradical de hongos micorrícicos arbusculares (vivo y total) extraído de 0.5-1.0-1.5 y 2.0 g de suelo Gorafe. Las barras verticales representan la desviación standard. Letras distintas en cada serie de barras son significativamente distintas según el test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$; $n=4$).

Por otra parte, se observó una alta correlación entre la cantidad de hifas vivas en relación a la cantidad de hifas totales determinadas mediante la tinción doble de la muestra (Figura 31), utilizando la reacción de la enzima succinato deshidrogenada para la detección de la fracción vital de micelio micorrícico (Kough et al. 1987) y el contraste posterior con fucsina ácida para la detección del total de hifas micorrícicas en la muestra.

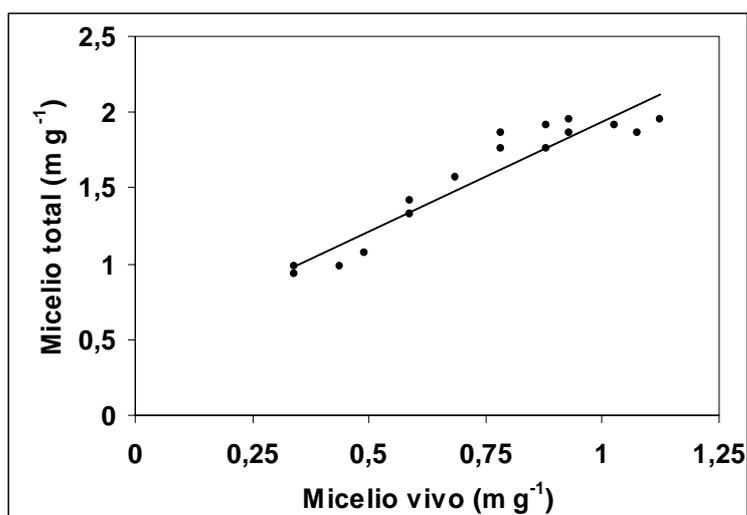


Figura 31. Relación establecida entre la densidad de hifas del micelio total y la densidad de hifas vivas determinadas en suelo utilizando la tinción doble sobre el material obtenido para una muestra simple. La relación obtenida se representó por la ecuación $y = 1,4514x + 0,4902$ ($r = 0.948$; $p = 0.000$; $n = 16$).

3.1.2 Densidad de micelio vivo y total.

La evolución de la densidad de micelio micorrícico (vivo y total) se presenta en la Figura 32. Como se puede observar, durante las primeras etapas se produjo un aumento progresivo de la densidad de hifas fúngicas, especialmente durante el primer año, desde unos $0.2-0.45 \text{ m g}^{-1}$ en verano de 2002 hasta unos $1.7-2.7 \text{ m g}^{-1}$ en verano de 2003 para el componente de micelio total (Figura 32B). Posteriormente, la densidad de hifas se mantuvo relativamente estable hasta el verano de 2004, ocasión en la que comenzó un descenso generalizado hasta invierno-primavera de 2005, alcanzándose valores de entre $1.2-1.8 \text{ m g}^{-1}$. Se puede observar además tendencias en algunos tratamientos, como en la asociación múltiple en suelo natural y Retama sola, que fueron los tratamientos que menor densidad de hifas fúngicas presentaron, o Lavanda y Mejorana solas, que presentaron las mayores densidades. Cabe destacarse además que el comportamiento global que se presentó en este parámetro fue similar al que presentó la evolución de los agregados hidroestables y algunos de crecimiento de la planta.

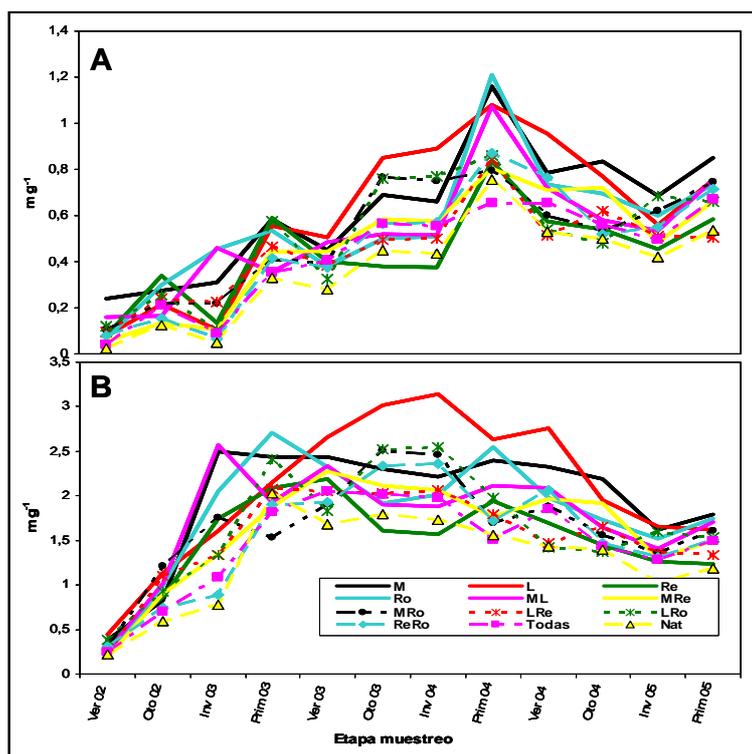


Figura 32. Evolución de la densidad de hifas del micelio de hongos micorrícicos en suelo por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. (A) Evolución de la densidad de hifas vivas. (B) Evolución de la densidad de Hifas totales.

Por su parte, la evolución de la densidad de la fracción viva de hifas fúngicas (Figura 32A) presentó un comportamiento similar al observado en el conjunto del micelio micorrícico, aunque sí es destacable que se apreció una influencia de la estación climática sobre las densidades de hifas micorrícicas vivas, registrándose aumentos puntuales para todas las asociaciones vegetales tanto en primavera como en otoño. En este sentido, la cantidad de micelio vivo, muy baja en primavera de 2002 (entre 0.03 m g^{-1} en el tratamiento múltiple en sustrato inoculado y 0.24 en Mejorana sola) presentó un fuerte aumento, hasta primavera de 2004, cuando alcanzó densidades de entre 0.7 m g^{-1} en tratamientos como la asociación múltiple en sustrato inoculado y 1.2 m g^{-1} en Mejorana y Romero solas. Con posterioridad se registró un descenso de la densidad de hifas vivas, alcanzándose los menores valores en invierno de 2005 (0.4 m g^{-1} en la asociación múltiple en suelo natural y 0.7 m g^{-1} en Mejorana sola y asociación Lavanda+Romero, como valores mínimo y máximo respectivamente). En este caso, el comportamiento global presentado por determinados tratamientos se adecuó a lo observado en la densidad de hifas totales, siendo los tratamientos en que a lo largo del estudio se presentaron los valores más bajos la asociación múltiple en suelo natural y Retama sola, y los tratamientos con mayores densidades Lavanda y Mejorana solas.

En cuanto al comportamiento global de los distintos tratamientos, se registró la misma tendencia tanto en la densidad de micelio total como vivo, como se puede observar en la Figura 33. En el caso de la densidad de micelio vivo, se obtuvo una media global de 0.37 m g^{-1} en la asociación múltiple en suelo natural, que es el valor más bajo y significativamente distinto del resto. Una densidad un 20% superior presentaron los tratamientos Retama sola, Lavanda+Retama y todas en sustrato inoculado. Por el contrario, los tratamientos que presentaron una mayor densidad de micelio vivo fueron Lavanda sola y Mejorana, con un aumento de 65 y 70% respectivamente respecto de la asociación múltiple en suelo natural. Por su parte, la densidad media de micelio micorrícico total reflejó el mismo orden ascendente que la respectiva de micelio vivo, presentándose un valor medio global de 1.29 m g^{-1} en la asociación múltiple en suelo natural (el tratamiento con la densidad significativamente menor), una densidad un 51% mayor en Mejorana sola y un 56% mayor en Lavanda sola. Cabe señalarse además, que los tratamientos Retama sola y la asociación múltiple en sustrato inoculado presentaron las menores densidades de micelio de los tratamientos inoculados, con valores de 1.50 y 1.46 m g^{-1} respectivamente.

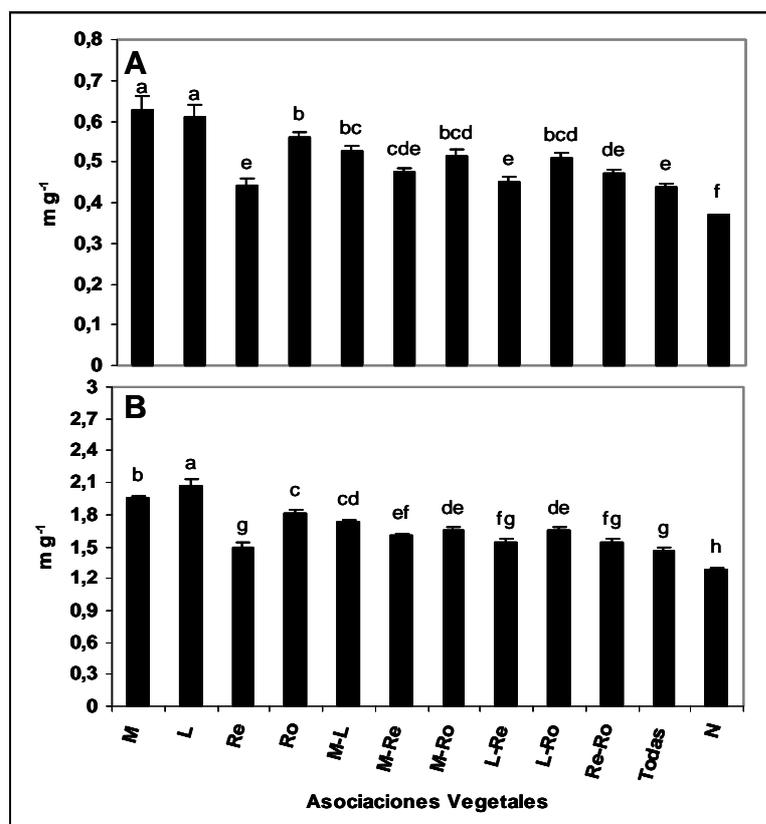


Figura 33. Valores medios para densidad de hifas del micelio micorrícico en suelo por tratamiento en función de la asociación vegetal. (A) Densidad de hifas vivas. (B) Densidad de hifas totales. Letras distintas en las gráficas son significativamente distintas según el test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$; $n=5$).

3.2 Colonización micorrícica.

La colonización de la raíz por parte de los hongos micorrícico arbusculares es un factor clave y limitante para el desarrollo de las restantes estructuras, puesto que debido a su micotrofia obligada, el hongo debe colonizar exitosamente una raíz susceptible para posteriormente realizar su desarrollo extraradical, influyendo además sobre otros parámetros de interés en este estudio, como la biodiversidad y la estructura de la comunidad de HMA formada. En este punto se presentan los resultados obtenidos para la evolución de la colonización intraradical del hongo, tanto como la proporción de micorrización como el valor absoluto de la densidad de raíz micorrizada (Figura 34), y el efecto que las distintas asociaciones vegetales tienen en el comportamiento global de estas variables (Figura 35).

3.2.1 Proporción de raíz micorrizada.

La evolución de la proporción de raíz micorrizada se presenta en la Figura 34B. Como se observa, se produjo un aumento de la micorrización desde la primera etapa de muestreo en que fue posible determinar este parámetro, en otoño de 2002. En verano de 2002 no fue posible recuperar una cantidad suficiente de raíz, debido al reducido crecimiento radical en las primeras etapas de crecimiento (ver Figura 34A). Posteriormente, los niveles de micorrización aumentaron hasta niveles en los que, en términos generales, se mantuvieron a lo largo de la duración de este estudio. Se puede observar que el tratamiento Retama sola presentó la micorrización más alta durante casi todo el estudio, con valores de entre 55% (en otoño de 2003) y 80% (en invierno de 2003). Otros tratamientos que presentaron altos niveles de micorrización fueron la asociación múltiple en suelo natural y la asociación Lavanda+Retama, aunque en términos globales, su nivel de micorrización alcanzó 55%, bastante inferior comparado con el 69.3% presentado por Retama sola (ver Figura 35B). Los demás tratamientos no presentaron un comportamiento regular, mostrando en términos globales, un nivel de micorrización de entre 40% (en la asociación múltiple en sustrato inoculado, el valor más bajo) y 51% (en el tratamiento Mejorana sola).

Por otra parte, es posible observar una tendencia estacional en el comportamiento de la proporción de raíz micorrizada observándose aumentos de este parámetro en la mayoría de los tratamientos tanto en invierno como en verano durante los tres años de duración del estudio (ver Figura 34B).

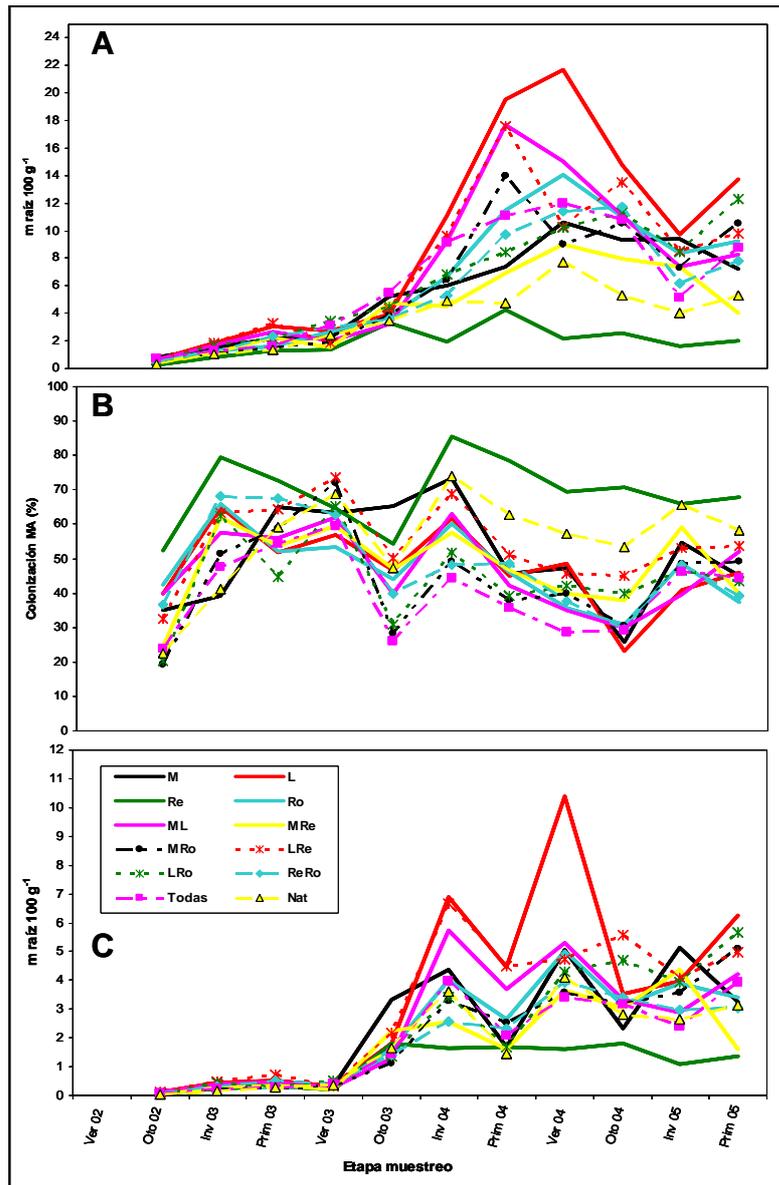


Figura 34. Evolución de los parámetros de colonización por hongos micorrícicos de la raíz por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. (A) Evolución de la densidad de raíces totales. (B) Evolución de la proporción de raíz micorrizada. (C) Evolución de la densidad de raíces colonizadas.

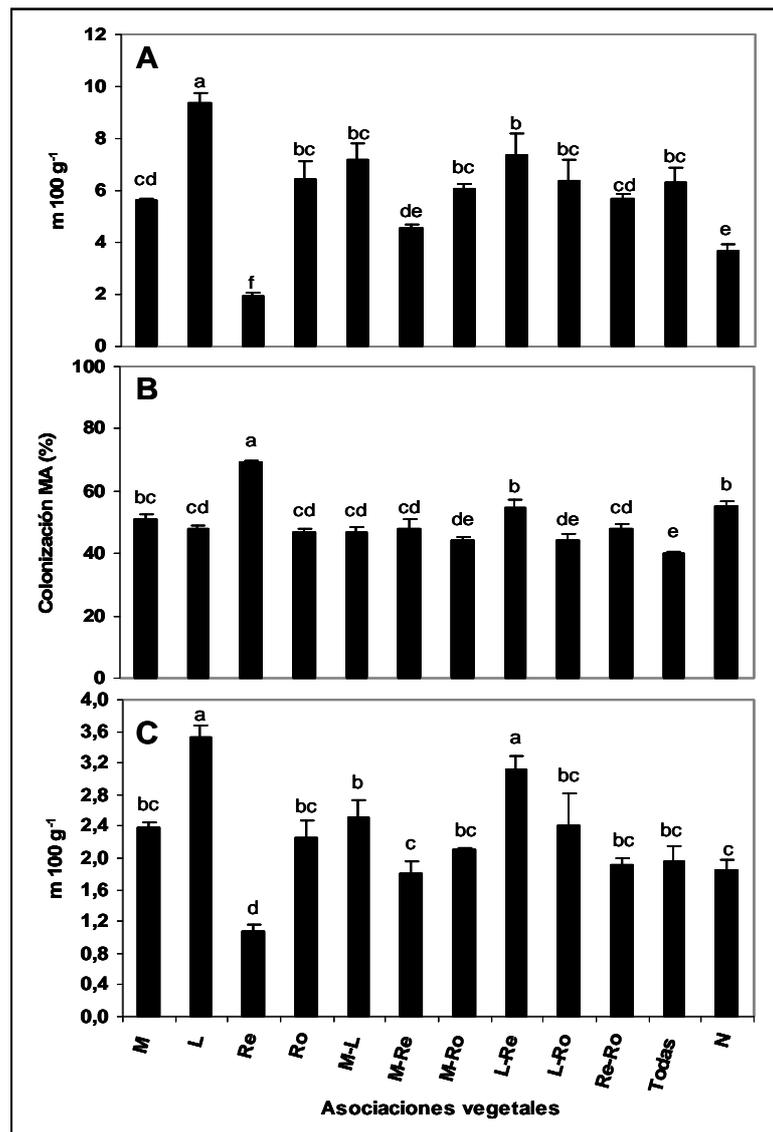


Figura 35. Valores medios para los parámetros de colonización por hongos micorrícicos de la raíz por tratamiento en función de la asociación vegetal. (A) Densidad de raíces totales. (B) Proporción de raíces colonizadas por hongos micorrícicos. (C) Densidad de raíces colonizadas por hongos micorrícicos. Las barras representan el error standard. Letras distintas en las gráficas son significativamente distintas según el test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$; $n=5$).

3.2.2 Densidad de raíz micorrizada.

Es interesante aclarar por un parte que la proporción de la raíz micorrizada no es un parámetro que directamente nos muestre la magnitud del componente micorrícico intraradical, puesto que las raíces pueden tener distintas densidades en las diferentes asociaciones vegetales establecidas. En este sentido, la densidad de raíz micorrizada es un parámetro que representa de mejor forma el tamaño de este componente, puesto que pondera la densidad total del sistema radical por la proporción de colonización de éste por HMAs.

Como se puede observar en la Figura 34A, la densidad radical presentó un crecimiento reducido durante el primer año y medio de estudio, posterior a lo cual (desde otoño de 2003) se produjo un fuerte incremento en la densidad radical, que es significativamente mayor en aquellos tratamientos que presentaron a su vez mayores crecimientos en su parte aérea (expresado como superficie cubierta). Como se muestra en la Figura 35A, este incremento de la densidad radical fue especialmente apreciable en aquellos tratamientos en que se incluyó Lavanda, obteniéndose como media global 9,35 m de raíz en 100 g de sustrato en el tratamiento Lavanda sola, 7.4 m en la asociación Lavanda+Retama y 6.4 m en las asociaciones Lavanda+Mejorana y Lavanda+Romero; por el contrario, en la asociación múltiple en suelo natural se alcanzó de forma global 3.7 m, y en Retama sola tan sólo 2 m en 100 g de sustrato, que representa un 21% de la densidad alcanzada por Lavanda sola.

En cuanto a la densidad de raíz micorrizada (ver Figura 34C y Figura 35C), se observa una alta correspondencia con los resultados obtenidos para la densidad de raíz total, siendo destacable que los tratamientos en los que se alcanzó las menores densidades de raíz total se obtuvieran las mayores proporciones de micorrización. Al igual que se observó en la densidad de raíz total, la raíz colonizada presentó un significativo aumento desde otoño de 2003, manteniéndose en niveles relativamente estables en las sucesivas etapas hasta el final del estudio. Otro aspecto destacable es la estacionalidad observada en la densidad de raíz micorrizada, siguiendo un comportamiento similar al presentado por la evolución de la proporción de raíz micorrizada, presentándose mayores valores en las temporadas invierno y verano respecto de las temporadas de otoño y primavera, en la gran mayoría de los tratamientos, que no sólo resulta de la mayor proporción de micorrización en estas etapas, sino que al parecer por neo-colonización micorrícica.

En términos globales, los tratamientos en los que se presenta una mayor densidad de raíz colonizada (ver Figura 35C) son aquellos en que se presentó Lavanda, siendo Lavanda sola donde se alcanzó la mayor densidad con 3.5 m de raíz colonizada en 100 g de sustrato, seguida de las asociaciones Lavanda+Retama (3.1 m 100 g⁻¹) y Lavanda+Mejorana (2.5 m 100 g⁻¹). Por contraparte, el tratamiento que presentó la menor densidad de raíz micorrizada fue Retama sola, con sólo 1.1 m 100 g⁻¹, que representó un 30% de lo observado en Lavanda sola. Seguidos de éste, se tienen la asociación múltiple en suelo natural y la asociación Mejorana+Retama, con 1.8 m 100 g⁻¹, densidades superiores un 68% de lo presentado por Retama sola.

3.3 Esporas de hongos micorrízico arbusculares.

Las esporas de resistencia de los HMA son las estructuras naturales de dispersión y multiplicación del hongo, y hasta no hace mucho, eran las únicas estructuras que habían permitido su identificación taxonómica, basándose en los caracteres morfológicos de éstas. Por consiguiente, muchos de los estudios de biodiversidad de este grupo de organismos se han basado en el estudio de estas estructuras. En este punto se presentan los resultados obtenidos para el tamaño de la comunidad de esporas en el suelo en su totalidad en las distintas asociaciones vegetales, en particular en los tratamientos inoculados, puesto que en estos casos la comunidad de esporas inicial está bien caracterizada. Los resultados que describen el comportamiento de cada especie en particular se analizará con mayor detalle en el apartado correspondiente a biodiversidad de HMA.

3.3.1 Tamaño de la comunidad de esporas de hongos micorrízicos.

En la Figura 36 se presenta la evolución de la densidad total de esporas de HMA en las asociaciones vegetales analizadas en este estudio. Como se puede observar en la Tabla 10, el inóculo que se aplicó (en primavera de 2002) fue homogéneo en los distintos tratamientos, y consistió de un total de poco más de 27 esporas (de todas las especies) por 100 g de sustrato. Se observa un aumento generalizado de la densidad de esporas, hasta hacerse máxima durante el primer año en primavera de 2003. En esa ocasión fue el tratamiento Mejorana sola el que alcanzó las mayores densidades de esporas en el sustrato, con 794 esporas 100 g^{-1} , 29 veces más que lo inoculado. Por el contrario, la asociación Mejorana+Retama presentó los menores valores de este parámetro, con 203 esporas 100 g^{-1} . Posterior a esta etapa, se produjo un descenso en las densidades de esporas en verano de 2003, un leve aumento en casi todos los tratamientos en otoño de 2003 y un nuevo descenso general en invierno de 2004.

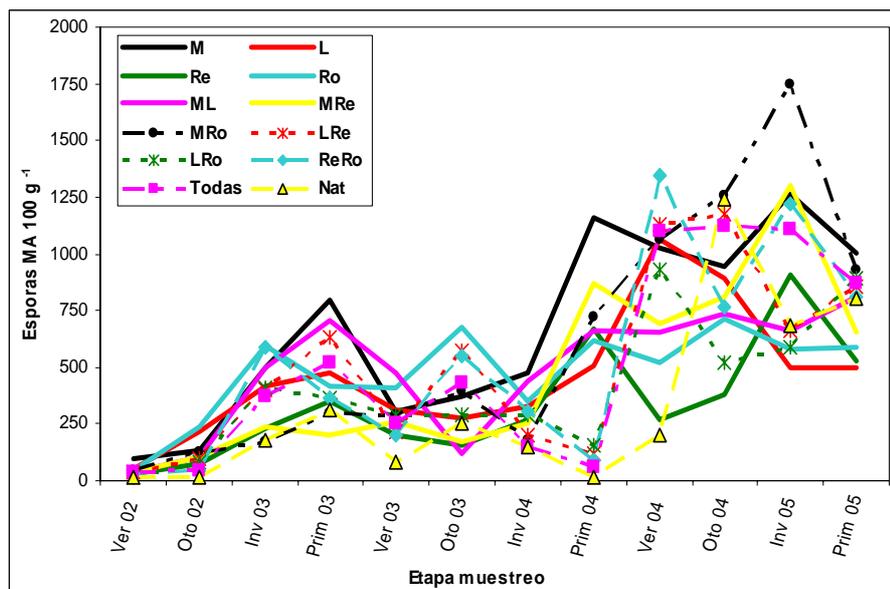


Figura 36. Evolución de la densidad total de esporas de hongos micorrízico-arbusculares por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio.

No obstante, entre primavera y verano de 2004 se produjo un fuerte incremento de la densidad de esporas en todos los tratamientos que no se presentó al mismo tiempo en todos los tratamientos. Se puede observar que los tratamientos Lavanda+Retama, Lavanda+Romero, Retama+Romero, y las asociaciones múltiples tanto en sustrato inoculado como en suelo natural registraron el aumento hacia el verano de 2004, en tanto los demás tratamientos lo hicieron en la primavera anterior. Estas altas densidades de esporas se mantienen hasta la finalización del estudio, presentándose en algunos tratamientos valores superiores a 1000 esporas en numerosas ocasiones, como se observa en los tratamientos Mejorana sola (hasta 1268 esporas en invierno 2005), Mejorana+Retama (hasta 1298 esporas 100 g⁻¹ en invierno de 2005), Mejorana+Romero (hasta 1746 esporas 100 g⁻¹ en invierno de 2005), Lavanda+Retama (hasta 1173 esporas 100 g⁻¹ en otoño de 2004), Retama+Romero (hasta 1220 esporas 100 g⁻¹ en invierno 2005) y las asociaciones múltiples en sustrato inoculado y en suelo natural (hasta 1122 y 1242 esporas 100 g⁻¹ respectivamente en otoño de 2004). Como se verá más adelante el importante incremento registrado en la densidad de esporas se debe principalmente al aumento de las poblaciones de *G. constrictum*.

3.3.2 Composición media de la comunidad de esporas de hongos micorrícicos.

En la Figura 37 se muestran las densidades globales de las poblaciones de esporas de HMA en el sustrato, así como la contribución media global a la comunidad por parte de cada una de las especies inoculadas (se excluye la asociación múltiple en suelo natural).

Como se observa, se presentaron fuertes diferencias de densidad de esporas en el sustrato entre las distintas asociaciones vegetales estudiadas, siendo el tratamiento en que se presentaron los mayores valores Mejorana sola, con una media global de 633 esporas 100 g^{-1} . La asociación Mejorana+Romero presentó una densidad media un 11% menor, siendo los tratamientos en que se alcanzó, por su parte, una menor densidad global Retama sola (con 321 esporas 100 g^{-1}) y la asociación múltiple en suelo natural (con 329 esporas 100 g^{-1} , dato no mostrado). Se puede observar así mismo, que la composición media de las comunidades micorrícicas formadas estuvo fuertemente dominada por la presencia mayoritaria de esporas de *G. constrictum*, siendo la representación de las otras especies en la comunidad bastante minoritaria, llegando algunas especies a desaparecer en el transcurso de este estudio, situación que se analiza en el siguiente apartado de este capítulo.

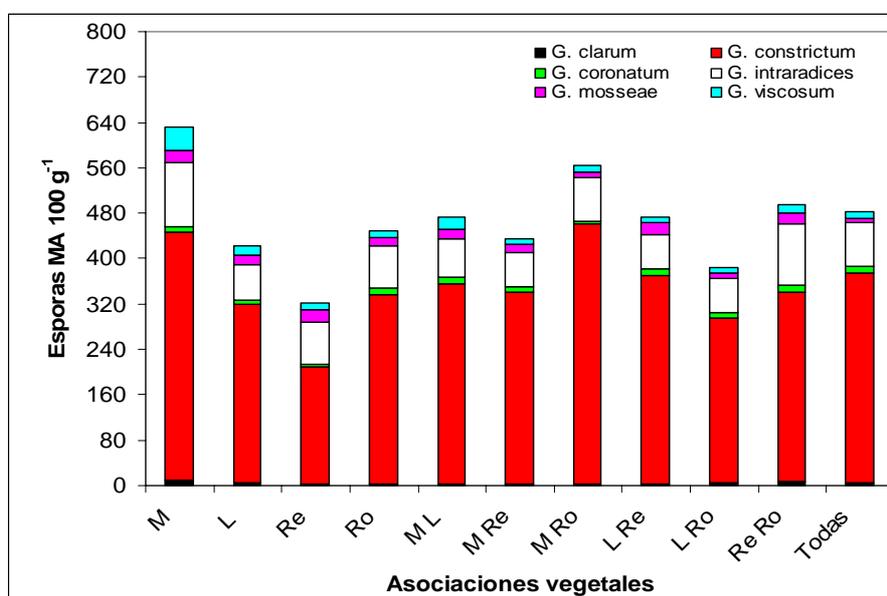


Figura 37. Contribución específica media al tamaño de la comunidad de hongos micorrícico-arbusculares por tratamiento en función de la asociación vegetal. En cada barra se representan las seis especies de hongos inoculadas.

4 DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍCICOS

En este apartado se describe en una primera parte la optimización de la técnica de TTGE para su utilización en la identificación de las especies que se encontraban colonizando las raíces a lo largo del estudio. A continuación se muestran los resultados de diversidad y estructura de las comunidades de hongos establecidas en los tratamientos inoculados. Se presenta, inicialmente, el tamaño y la densidad específica de las poblaciones de esporas de cada especie inoculada, posteriormente la diversidad de hongos que se encuentra colonizando las raíces de las plantas en las diferentes asociaciones vegetales y su relación con las poblaciones presentes en el suelo, y finalmente diferentes índices de diversidad que describen la estructura de las comunidades de HMA formadas, y su cambio temporal.

4.1 TTGE como herramienta para estudiar la diversidad de hongos micorrícicos.

Para conseguir la identificación de los HMA presentes en las raíces de las plantas de las asociaciones vegetales estudiadas, se optimizó la técnica de electroforesis en geles con gradiente temporal de temperatura (TTGE) luego de realización de PCR-nidada. Este procedimiento es una de las técnicas de biología molecular orientadas al estudio de la biodiversidad basadas en las diferencias de las temperaturas de fusión de la doble cadena de ADN debidas a los cambios en la secuencia nucleotídica (Muyzer 1998; 1999). Se utilizó para la optimización los mismos hongos inoculados en el estudio en mesocosmos, además de otros ecotipos de las mismas especies, con el fin de definir el nivel de especificidad de la técnica. Se utilizó como modelo para definir las huellas los perfiles obtenidos desde esporas de las especies de hongos utilizadas.

4.1.1 TTGE aplicada a especies del género *Glomus*.

La región NS31-AM1 del gen ADNr 18S, que permite la discriminación de los HMA a nivel de especie (Helgason et al. 1998; Schubler et al. 2001; Ferrol et al. 2004), fue analizado para estudiar el potencial de la técnica de TTGE para caracterizar HMA. La amplificación por PCR de ADN de esporas de seis especies de *Glomus* usando el cebador específico AM1 y el universal NS31 produjo una única banda de aproximadamente 550 pb en todas las especie probadas (Figura 38).

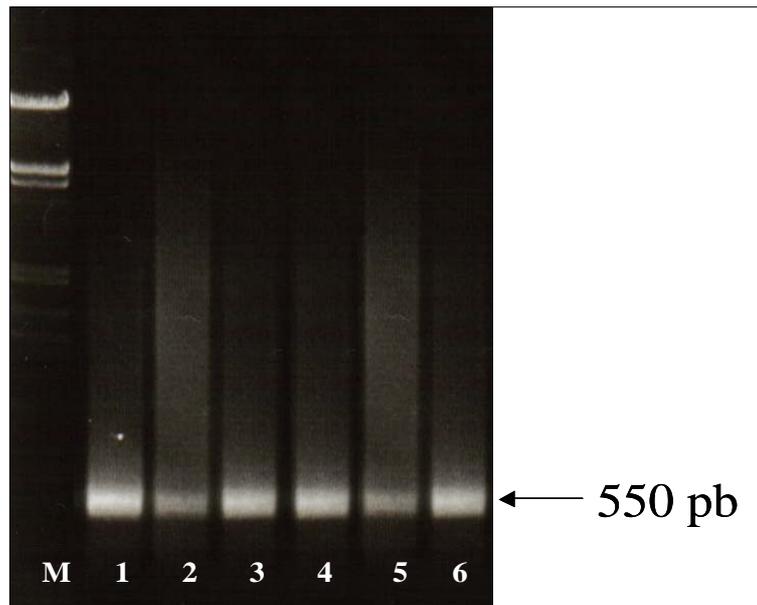


Figura 38. Productos de PCR de la región NS31/AM1 del gen 18S de *G. clarum* (línea 1), *G. constrictum* (línea 2), *G. coronatum* (línea 3), *G. intraradices* BEG121 (línea 4), *G. mosseae* BEG122 (línea 5) y *G. viscosum* BEG126 (línea 6). La línea M es el Marcador III para peso molecular.

El análisis por TTGE de los amplicones NS31-AM1 mostró diferencias leves en los patrones obtenidos para ciertas especies; sin embargo, especies tales como *G. coronatum* y *G. mosseae*, así como *G. constrictum* y *G. viscosum* produjeron patrones en TTGE indistinguibles (Figura 39). Por otra parte, cuando una mezcla de los amplicones GC-NS31/AM1 de toda las especies fúngicas estudiadas fue cargada en el gel denaturante no fue posible la resolución de las bandas de los distintos HMA (Figura 39, carril 8). A pesar de un protocolo extenso de optimización de la técnica de TTGE, en la que se utilizó variación del gradiente de temperatura, del tiempo y rampa, y del voltaje, la resolución no pudo ser mejorada al analizar esta región ribosomal.

Para incrementar la resolución de la técnica de TTGE se estudió una región diferente del gen ribosómico. Para seleccionar una región discriminatoria dentro de AM1-NS31, se obtuvo el perfil de fusión de las secuencias de las diferentes especies estudiadas (Figura 40A) y un nuevo cebador, Glo1, fue diseñado (Figura 41), el que en conjunto al cebador NS31 amplifica una región de unas 270 pb que presenta diferencias en la temperatura de fusión del dominio más bajo para las distintas especies de *Glomus* (Figura 40B).

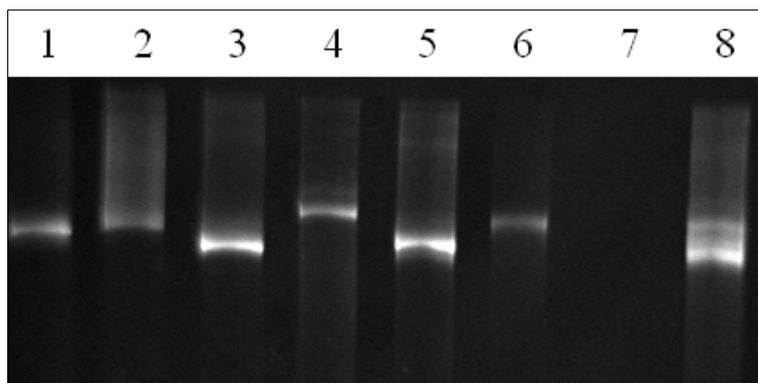


Figura 39. Análisis de TTGE de la región NS31-AM1 del gen ADNr 18S de *G. clarum* (línea 1), *G. constrictum* (línea 2), *G. coronatum* (línea 3), *G. intraradices* BEG121 (línea 4), *G. mosseae* BEG122 (línea 5) y *G. viscosum* BEG126 (línea 6). La línea 7 es un control negativo de PCR y la línea 8 representa una mezcla de los productos de PCR de cada especie de *Glomus*.

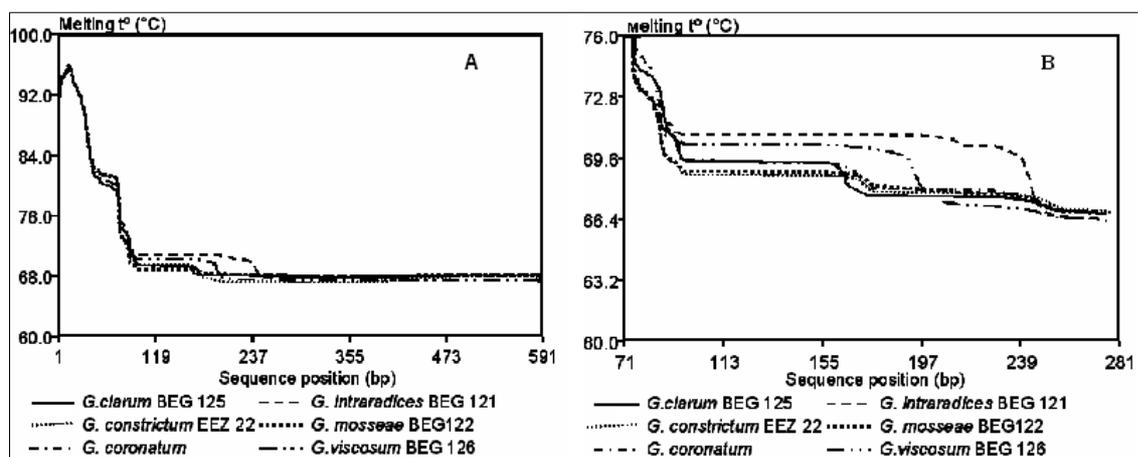


Figura 40. Perfiles de fusión de: (A) secuencias NS31-AM1 de *G. clarum* (Nº accesión AJ505619), *G. constrictum* (AJ506090), *G. coronatum* (AJ699076), *G. intraradices* BEG121 (AJ536822), *G. mosseae* BEG122 (AJ505616) y *G. viscosum* BEG126 (AJ505620) con una extensión GC en el extremo 5'; y (B) secuencias de NS31-Glo1 de las mismas especies de *Glomus*.

```

G. mosseae BEG69          GTTACGGGGAATTAGGACTGTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TCACG 241
G. mosseae Alic          GTTACGGGGAATTAGGACTGTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TCACG 241
G. mosseae DAOM212595    GTTACGGGGAATTAGGACGTTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TCACG 241
G. mosseae AJ505616      GTTACGGGGAATTAGGACCTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TCACG 774
G. coronatum AJ699076    GTCACGGGGAATTAGGACTGTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TCACG 241
G. coronatumbasedata     GTCACGGGGAATTAGGACTGTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TCACG 711
G. viscosum AJ505620     GTTGTGGGGAATTAGGACTGTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TAACG 240
G. viscosumTarr          GTTGTGGGGAATTAGGACTGTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TAACG 240
G. intraradices AJ536822 GTTGCGGGGAATTTGGACTGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAAGC-TAACG 240
G. intraradicesbasedata  GTTGCGGGGAATTTGGACTGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAAGC-TAACG 740
G. clarum AJ505619       GTTGCGGGGAATCTGGACTGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TAACG 240
G. clarumbasedata        GTTGCGGGGAATCTGGACTGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGC-TAACG 770
G. viscosum Y17652       GCCACGAGGAACCAGGACCTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGCATTTTG 245
G. viscosumbasedata      GCCACGAGGAACCAGGACCTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAGGCATTTTG 777
* * * * *
    
```

Figura 41. Alineamiento múltiple de algunas de las secuencias obtenidas para el fragmento NS31-AM1 de diferentes especies de Hongos Micorrízico Arbusculares del género *Glomus* para el diseño del cebador para la realización de PCR nidada Glo1.

Puesto que el cebador Glo1 no es específico de HMA, una PCR nidada que usaba la banda purificada de AM1-NS31 como molde fue realizado para evitar la amplificación de ADN de otros organismos. Los fragmentos GC-NS31/Glo1 de las seis especies analizadas migraron a diversas posiciones en el gel de TTGE (Figura 42).

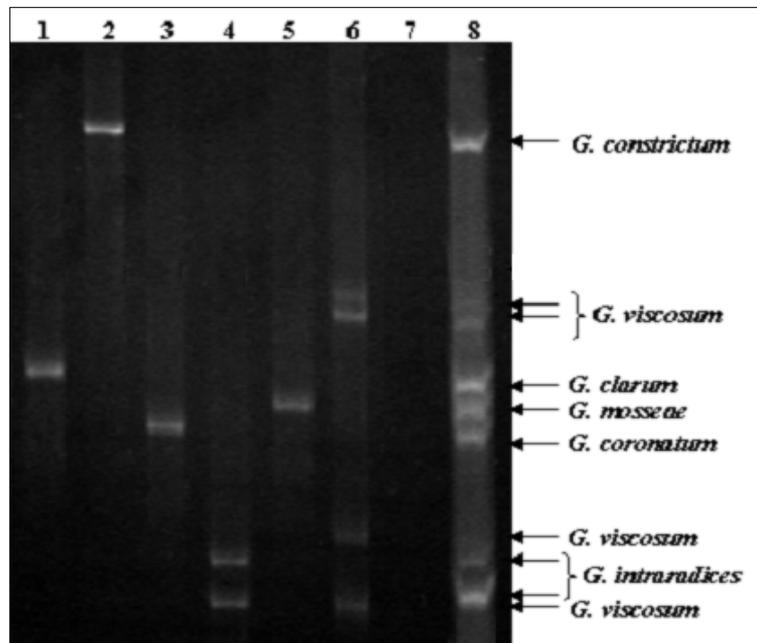


Figura 42. Análisis de TTGE de la región GC-NS31/Glo1 del gen ADNr 18S de *G. clarum* (línea 1), *G. constrictum* (línea 2), *G. coronatum* (línea 3), *G. intraradices* BEG121 (línea 4), *G. mosseae* BEG122 (línea 5) y *G. viscosum* BEG126 (línea 6). La línea 7 es un control negativo de PCR y la línea 8 representa una mezcla de los productos de PCR de cada especie de *Glomus*. La posición de las bandas para las diferentes especies se indica a la derecha.

Mientras que una banda específica fue obtenida para *G. clarum*, *G. constrictum*, *G. coronatum*, *G. intraradices* y *G. mosseae*, cuatro fueron detectadas para *G. viscosum*. El análisis de las secuencias de las distintas bandas producidas por *G. viscosum* reveló que todas mostraron una alta homología con la secuencia del ADNr 18S de *G. viscosum* presente en la base de datos (no mostrado). Aunque esta variabilidad genética puede complicar la interpretación de los resultados de TTGE, cada especie es caracterizada por una huella específica de TTGE.

Para determinar si el TTGE permite la discriminación de diversos hongos en una mezcla compleja, 2 μ l de los amplicones GC-NS31/Glo1 obtenidos para las diferentes especies fue mezclado y cargado en el gel. Las bandas de las diferentes especie de *Glomus* eran claramente distinguibles (Figura 42, línea 8), lo que indica el potencial de la técnica combinada de PCR nidada-TTGE para analizar comunidades complejas de HMA.

4.1.2 Sensibilidad de la técnica de TTGE.

La sensibilidad para la detección de las poblaciones fúngicas minoritarias por extracción de ADN, la amplificación por PCR nidada y el análisis de TTGE fueron probados para diferente número de esporas de *G. clarum* y de *G. coronatum* (Figura 43).

El ADN se extrajo de mezclas que contenían 1 espora de *G. clarum* más 1 de *G. coronatum*, 1 de *G. clarum* más 10 de *G. coronatum*, y 10 esporas de *G. clarum* más 1 de *G. coronatum*. En los tres casos ambas especies fueron identificadas en el gel de TTGE, aunque el ADN de *G. clarum* fue amplificado preferentemente cuando fue extraído a partir de una espora de cada especie (Figura 43A). Puesto que el éxito en la obtención de productos de PCR de esporas individuales es variable e imprevisible, la sensibilidad de TTGE también fue probada combinando ADNs extraído de *G. clarum* y de *G. coronatum* en diversas proporciones. Un límite de la detección fue observado cuando la especie minoritaria se encontró en relación 1:1000 o menor respecto de la concentración total de ADN (Figura 43B).

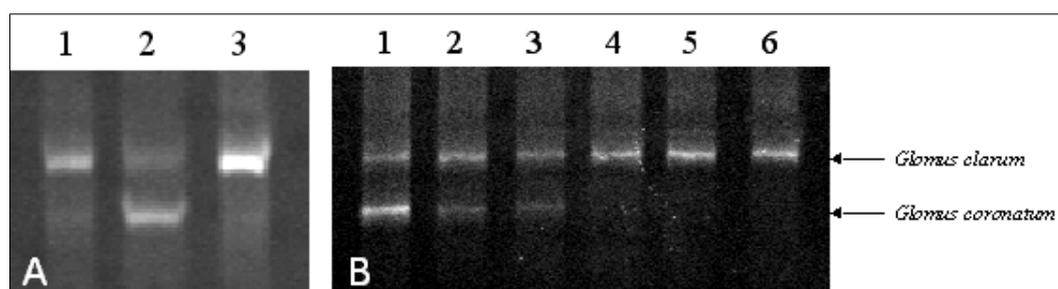


Figura 43. Análisis de sensibilidad de TTGE. Los fragmentos 18S del gen ADNr fueron obtenidos por PCR nidada de: (A) ADN genómico de mezclas que contienen diferente número de esporas de *G. clarum* y *G. coronatum*. Línea 1, 1 espora de *G. clarum* más 1 espora de *G. coronatum*; Línea 2, 1 espora de *G. clarum* más 10 esporas de *G. coronatum*; Línea 3, 10 esporas de *G. clarum* más 1 espora de *G. coronatum*; o (B) una mezcla que contiene diferentes cantidades de ADN genómico de cada especie. Línea 1, 100 ng ADN de *G. clarum* más 100 ng ADN de *G. coronatum*; Línea 2, 100 ng ADN de *G. clarum* más 10 ng ADN de *G. coronatum*; Línea 3, 100 ng ADN de *G. clarum* más 1 ng ADN de *G. coronatum*; Línea 4, 100 ng ADN de *G. clarum* más 0,1 ng ADN de *G. coronatum*; Línea 5, 100 ng ADN de *G. clarum* más 0,01 ng ADN de *G. coronatum*; Línea 6, 100 ng ADN de *G. clarum* más 0,001 ng ADN de *G. coronatum*. Las posiciones de las bandas para las dos especies se indican a la derecha.

4.1.3 Aplicación de TTGE al estudio de aislados de una misma especie de *Glomus*.

Los perfiles de TTGE de dos ecotipos de *G. intraradices*, tres de *G. mosseae* y dos de *G. viscosum* fueron comparados para observar si los aislados de la misma especie se podían distinguir en el gel denaturante. Los diferentes aislados de *G.*

intraradices y de *G. mosseae* migraron siempre a la misma posición en el gel de TTGE, y no podían por lo tanto ser distinguidos (Figura 44). Sin embargo, los dos aislados de *G. viscosum* produjeron dos bandas que migraron a la misma posición en el gel de TTGE, pero bandas adicionales fueron observadas en uno de los aislados, permitiendo así la distinción entre ellos. La comigración de los diferentes aislados de *G. mosseae* y de *G. intraradices* es consecuente con la alta identidad de la secuencia del ADNr 18S analizada entre los aislados de la misma especie.

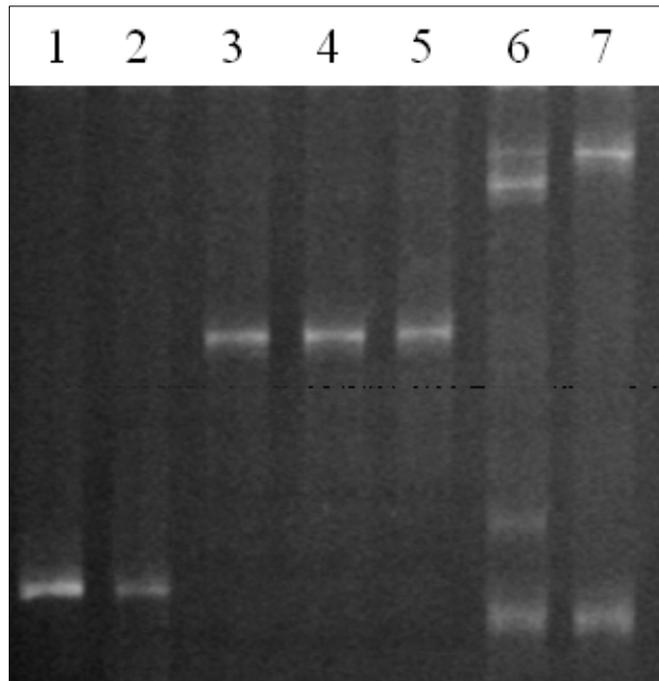


Figura 44. Análisis de TTGE de la región NS31-Glo1 del gen ADNr 18S de ecotipos de *G. intraradices* (líneas 1 y 2), *G. mosseae* (líneas 3, 4 y 5) y *G. viscosum* (líneas 6 y 7).

4.1.4 TTGE como herramienta para determinar especies de HMA colonizadoras de raíces.

Para probar el potencial de la técnica para detectar la especie de HMA colonizando una raíz, ADN fue extraído de las raíces de diferentes plantas de arbustos inoculadas con tres especies de HMA caracterizados en este trabajo, y se realizó una PCR nidada usando los sistemas de cebadores descritos anteriormente. En todas las muestras de raíz analizadas, las especies de hongos que colonizaban las raíces fueron identificadas claramente por análisis de TTGE (Figura 45).

La comparación de las bandas de TTGE obtenidas de las raíces con la huella de TTGE de cada una de las especies de hongos permitió la identificación de *G. constrictum*, de *G. intraradices* y de *G. mosseae* en las raíces de *Lavandula latifolia*, de *Thymus*

mastichina y de *Retama sphaerocarpa*. Estos datos revelan claramente la viabilidad del enfoque de PCR anidada-TTGE descrito para identificar la(s) especie(s) de HMA que coloniza(n) una raíz.

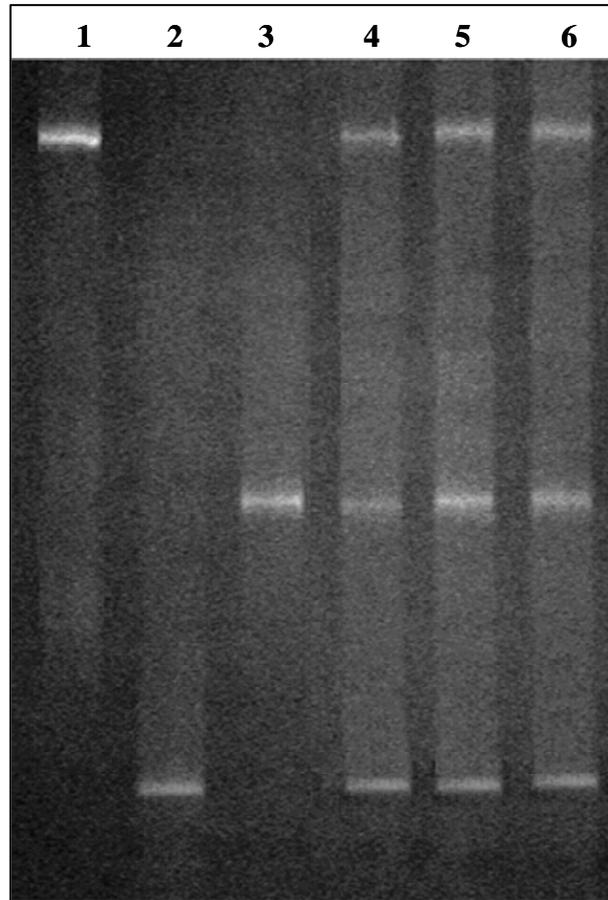


Figura 45. Detección de HMA colonizando las raíces de diversas plantas por análisis de TTGE de sus regiones NS31-Glo1 del gen ADNr 18S. Las líneas 1 a 3 son fragmentos de PCR anidada de esporas de *G. constrictum* (línea 1), *G. intraradices* (línea 2) y *G. mosseae* (línea 3). Las líneas 4 a 6 son fragmentos de PCR anidada de raíces de *Lavandula latifolia* (línea 4), de *Thymus mastichina* (línea 5) y *Retama sphaerocarpa* (línea 6) inoculadas con una mezcla de los hongos indicados.

4.2 Tamaño y densidad de las poblaciones de hongos micorrícicos.

La comunidad de HMA formada en el suelo ha sido descrita mediante la densidad de esporas remanentes en el suelo en cada etapa del muestreo, para cada una de las especies utilizadas en este estudio, en los tratamientos en los que se ha realizado la inoculación con el consorcio de hongos descrito en el capítulo de Material y Métodos.

Por una parte, la densidad específica, que corresponde en este caso a la proporción de esporas de una especie en el total de esporas de la comunidad, demuestra

la importancia relativa que cada especie representa en la comunidad en un momento determinado, y su interpretación puede ser de utilidad para describir su estructura, así como la evolución temporal puede ser de gran valor para describir la pauta y/o estrategia que tiene una especie particular para realizar la colonización de su medio. Por otra parte, las diferencias en el tamaño de las poblaciones de esporas de cada especie pudo ser resultado de la colonización preferencial de alguna de las especies de hongo micorrícico presentes, resultando ser más numerosas las poblaciones de aquellas especies que realicen una colonización preferencial en las raíces de las comunidades vegetales establecidas. Esto se podrá analizar conjuntamente al presentar los resultados de las especies detectadas en raíz, por medio de la técnica de TTGE antes descrita, en conjunto con la densidad de esporas de cada especie en el sustrato.

En la Figura 46 se presenta la evolución de los valores de densidad específica (D_i) de las especies de hongos micorrícicos utilizados en este estudio. Los valores medios globales por especie, para la densidad de esporas y D_i se presentan en la Tabla 10. Por su parte, la evolución del tamaño de las poblaciones de esporas en suelo para cada especie se presenta desde la Figura 47 a 52, en conjunto con la indicación de la detección realizada de las especies en la raíz mediante TTGE.

Como se desprende de la Figura 46, existen diferentes pautas en la evolución temporal de D_i por las distintas especies de HMA. Por una parte, se observó que algunas especies se ajustaban a una pauta de colonización que las llevó a desaparecer de la comunidad, otras especies se establecieron en la comunidad en una proporción baja respecto del total, pero constante en el tiempo, y otras especies presentaron una colonización preferencial, llegando a formar parte importante de la comunidad y estando presentes a altos niveles a lo largo de todo el estudio. En el primer caso se encuentran especies como *G. clarum* y *G. coronatum*, en el segundo caso encontramos a especies como *G. mosseae* y *G. viscosum*, y en el tercer caso encontramos a especies como *G. constrictum* y *G. intraradices*.

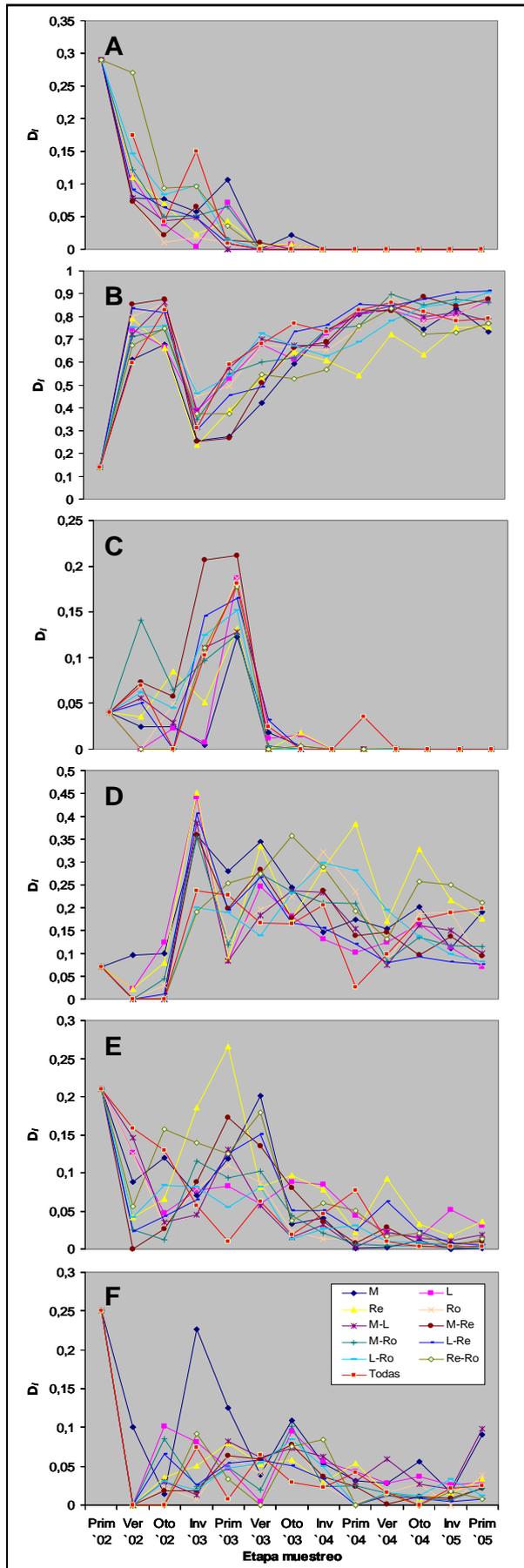


Figura 46. Evolución de la densidad específica (D_i) de seis especies de hongos micorrícico-arbusculares por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. (A) Evolución de D_i para *G. clarum* BEG 125. (B) Evolución de D_i para *G. constrictum* EEZ 22. (C) Evolución de D_i para *G. coronatum*?. (D) Evolución de D_i para *G. intraradices* BEG 121. (E) Evolución de D_i para *G. mosseae* BEG 122. (F) Evolución de D_i para *G. viscosum* BEG 126.

Tabla 10. Medias repetitivas para densidad específica (Di) y para el tamaño de la población de esporas (n° esp 100 g⁻¹) de cada una de las especies de HMA inoculadas de acuerdo a la asociación vegetal.

Asoc.	<i>G.clarum</i>		<i>G.constrictum</i>		<i>G.coronatum</i>		<i>G.intraradices</i>		<i>G.mosseae</i>		<i>G.viscosum</i>	
	Di	n° esp ¹	Di	n° esp	Di	n° esp	Di	n° esp	Di	n° esp	Di	n° esp
	0,03 ab	10,2 a	0,63 b	436 ab	0,02 b	8,9 ab	0,19 abc	115,0 a	0,06 bc	30,0 ab	0,07 a	41,3 a
L	0,02 bc	4,0 cde	0,70 a	315 c	0,02 b	7,9 ab	0,15 bc	60,7 b	0,06 bc	17,8 ab	0,05 bc	16,1 bc
Re	0,02 bc	2,4 def	0,60 b	205 d	0,03 ab	5,1 b	0,23 a	75,7 b	0,08 a	21,4 a	0,04 bcd	10,6 c
Ro	0,01 c	1,7 f	0,72 a	334 c	0,03 ab	13,0 a	0,17 bc	74,3 b	0,04 c	14,3 bc	0,03 cd	11,0 c
ML	0,01 bc	2,0 f	0,72 a	352 bc	0,03 ab	11,8 ab	0,15 bc	68,0 b	0,04 c	16,1 ab	0,05 b	23,0 b
MRe	0,02 bc	2,1 ef	0,70 a	339 c	0,05 a	7,9 ab	0,16 bc	61,9 b	0,05 bc	14,3 bc	0,03 bcd	9,4 c
MRo	0,02 abc	2,4 def	0,71 a	457 a	0,04 ab	5,5 b	0,16 bc	76,8 b	0,04 c	9,0 cd	0,03 bcd	12,5 c
LRe	0,02 bc	2,6 def	0,73 a	366 abc	0,03 ab	13,2 a	0,14 c	60,1 b	0,05 bc	21,1 ab	0,03 cd	9,2 c
LRo	0,03 ab	4,3 cd	0,72 a	292 c	0,03 ab	8,8 ab	0,15 bc	59,6 b	0,04 c	8,9 cd	0,03 bcd	11,0 c
ReRo	0,04 a	6,3 b	0,64 b	335 c	0,02 b	10,9 ab	0,20 ab	107,5 a	0,07 ab	20,7 ab	0,03 cd	13,2 c
odas	0,03 ab	5,2 bc	0,72 a	370 abc	0,03 ab	11,5 ab	0,14 c	76,4 b	0,05 bc	6,8 d	0,03 d	11,6 c

*Letras distintas en las columnas representan diferencia estadística de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$; $n=5$).

¹n° esp= número de esporas de hongos micorrícicos en 100 gramos de sustrato.

4.2.1 Glomus clarum.

La evolución de la densidad específica de las poblaciones de *G. clarum* en las comunidades formadas se presenta en la Figura 46A. Como se puede observar, en esta especie se presentó una disminución constante de su Di, aunque esta población en el consorcio de hongos utilizado como inoculante, representaba aproximadamente un 30% de la comunidad de esporas totales. Ya en la primera etapa de muestreo solamente representaba una parte significativa de la comunidad en el tratamiento Retama+Romero (27%), y para el año siguiente, en verano de 2003, había desaparecido de todos los tratamientos, excepto de Retama y la asociación Mejorana+Retama (en las cuales representaba alrededor del 1%), produciéndose la desaparición total de esta especie de la comunidad luego del otoño de 2003. No obstante esto, el tamaño de sus poblaciones registró un aumento entre las temporadas de invierno y primavera de 2003, llegando a encontrarse hasta unas 54 esporas 100 g⁻¹ de *G. clarum* en el tratamiento Retama+Romero en invierno de 2003, y hasta 80 en Mejorana sola en la siguiente etapa (ver Figura 47).

De forma global, los tratamientos en los que se presentó un mayor valor de Di para *G. clarum* fueron Retama+Romero y Mejorana, en el primer caso debido especialmente a la significativa importancia de esta población durante la primera etapa de muestreo, y en la segunda por su importante esporulación detectada en primavera de 2003, situación esta última que determinó que este tratamiento fuera el que presentara los valores globales más altos de espora en esta especie, con unas 10.2 esporas en 100 g⁻¹ (ver Tabla 10). Por el contrario, los tratamientos Romero y la Asociación

Mejorana+Lavanda fueron los que presentaron los valores más bajos en los dos parámetros, siendo su Di de alrededor de 1%, y el tamaño medio de sus poblaciones de menos de 2 esporas 100 g⁻¹ (ver Tabla 10).

4.2.2 Glomus constrictum.

La evolución de la densidad específica de las poblaciones de *G. constrictum* en las comunidades formadas se presenta en la Figura 46B. En esta especie se presenta una situación bastante distinta a la descrita con anterioridad para *G. clarum*. Se puede observar, por ejemplo, un fuerte incremento de Di para todos los tratamientos en la primera etapa de estudio, y también un fuerte descenso en invierno de 2003, coincidiendo con el aumento de Di en otras especies de HMA (ver Figura 46C, D y E). No obstante lo anterior, se produjo con posterioridad un aumento sostenido de las proporciones de *G. constrictum* en la comunidad, hasta llegar a representar entre el 70 y el 90% al final del estudio. Por otra parte, es destacable que este aumento que se registró en la Di de *G. constrictum* se acompañó con un aumento significativo del tamaño de sus poblaciones (ver Figura 48), llegándose a alcanzar hasta 1403 esporas 100 g⁻¹ en el tratamiento Mejorana+Romero en invierno de 2005 y valores de alrededor de 1000 esporas 100 g⁻¹ en los tratamientos Mejorana+Retama y Mejorana sola en la misma ocasión. El proceso de aumento de la población de *G. constrictum* se observa especialmente con posterioridad a invierno de 2004, luego que han desaparecido otras poblaciones de hongo, tales como las de *G. clarum* y *G. coronatum* (ver Figuras 47 y 49).

Considerando las distintas asociaciones vegetales de forma global, podemos señalar que, en general, la población de *G. constrictum* representó una mayor proporción en las distintas comunidades en su conjunto, representando en casi todos los casos un 70-73% del total de las comunidades de esporas de HMA en el sustrato (ver Tabla 10). Sólo en los tratamientos Mejorana y Retama solas, y en la asociación Retama+Romero representó una proporción menor (entre 60 y 64% del total). Por su parte, dados los diferentes tamaños de las comunidades establecidas (ver Figura 37), sí se han presentado importantes diferencias en el tamaño de las diferentes poblaciones de *G. constrictum*, y dada su presencia relativamente homogénea, se presenta una tendencia bastante similar a la presentada por el tamaño de las distintas comunidades establecidas, siendo los tratamientos Mejorana sola y Mejorana+Romero donde se presentaron los mayores tamaños poblacionales con valores medios superiores a 400 esporas 100 g⁻¹. Por el contrario, los tratamientos con los menores tamaños poblacionales medios de *G. constrictum* han sido Retama sola y Lavanda+Romero (ver Tabla 10).

4.2.3 *Glomus coronatum.*

La evolución de la densidad específica de las poblaciones de *G. coronatum* en las comunidades formadas se presenta en la Figura 46C. Se observa un aumento de la Di hasta alcanzar a representar, en la gran mayoría de los tratamientos, entre un 10-20% del total de la comunidad entre invierno 2003 y primavera 2004, posterior a lo cual disminuye drásticamente hasta llegar prácticamente a desaparecer de la comunidad en otoño 2003-invierno 2004, al igual que ocurría con *G. clarum*. Esto concuerda con lo observado con el tamaño de las poblaciones de esporas (ver Figura 49), las cuales aumentaron en las temporadas de invierno y primavera de 2003, con valores entre unas 36-93 esporas 100 g⁻¹ en esta última etapa. Posterior a esto, se presentó un brusco descenso de las densidades de esporas en el sustrato, llegando a desaparecer en varios tratamientos en verano de 2003, y no sobrepasando una densidad de más de 4 esporas 100 g⁻¹ en ninguna etapa posterior.

Los tratamientos en que se presentó valores medios globales más altos para las Di de *G. coronatum* han sido varias asociaciones vegetales, entre las que destaca Mejorana+Retama y Mejorana+Romero, siendo los tratamientos con Di más bajas Mejorana y Lavanda solas (Ver Tabla 10). Esto no se relacionó directamente con los tamaños de las poblaciones de *G. coronatum* en estos tratamientos, puesto que Mejorana+Retama y Mejorana+Romero presentaron de las poblaciones más reducidas (la menor población global se presentó en Retama sola con alrededor de 5 esporas 100 g⁻¹). Por su parte, los mayores valores poblacionales de *G. coronatum* se obtuvieron en los tratamientos Romero solo y Lavanda+Romero (ver Tabla 10).

4.2.4 *Glomus intraradices.*

La evolución de la densidad específica de las poblaciones de *G. intraradices* en las comunidades formadas se presenta en la Figura 46D. En el caso de *G. intraradices*, se observó un aumento marcado de su Di en invierno de 2003, coincidiendo con la aparición de una significativa cantidad de esporas extraradicales en esa etapa de estudio (ver Figura 50), llegando a representar en aquella ocasión entre el 20 y el 45% del total de la comunidad de las esporas en el sustrato de los distintos tratamientos. Con posterioridad a este hecho se observó una estabilización global de la Di en los distintos tratamientos, con valores entre 10-36% del total de las comunidades, situación que se mantuvo hasta primavera de 2004, donde se registró una leve disminución de los valores, a niveles entre 10-25%, coincidiendo con aumentos de la proporción de *G. constrictum* en

el total de la comunidad en todas las asociaciones. Cabe señalar que se registró este comportamiento aún cuando los tamaños de las poblaciones de *G. intraradices* presentaron un aumento desde primavera 2004 en la mayoría de los tratamientos, aunque no al nivel de lo registrado en el caso de *G. constrictum*, alcanzándose como máximo unas 255 esporas 100 g^{-1} en el tratamiento Retama+Romero en invierno de 2005 (ver Figuras 48 y 49).

En términos globales, los tratamientos en los que se presentó una mayor Di fueron Mejorana y Retama solas, y la asociación Retama+Romero, representando entre un 19-23% del total de la comunidad de esporas. Por el contrario, los tratamientos donde los valores de Di han sido menores son la asociación Lavanda+Retama y la asociación múltiple (14% de la comunidad en ambos casos) (ver Tabla 10). Por su parte, los tratamientos en que mayor fue el tamaño global de la población de *G. intraradices* fueron Mejorana sola (115 esporas 100 g^{-1}) y la asociación Retama+Romero (107 esporas 100 g^{-1}). Los demás tratamientos presentaron poblaciones globales bastantes homogéneas para esta especie de hongo, de entre 60 y 77 esporas 100 g^{-1} (ver Tabla 10).

4.2.5 *Glomus mosseae*.

La evolución de la densidad específica de las poblaciones de *G. mosseae* en las comunidades formadas se presenta en la Figura 46E. Como se observa, se produjo una disminución de la proporción de las poblaciones, aunque durante las primeras etapas del estudio (hasta verano de 2003) éstas llegaron a representar hasta un 15-20% de la comunidad en tratamientos como Mejorana y Mejorana+Retama. Con posterioridad a esto se registró un fuerte descenso de Di, que fue asociado a un significativo descenso del tamaño de las poblaciones de esporas de esta especie desde verano de 2003 (ver Figura 51), manteniéndose con posterioridad el tamaño de estas poblaciones a niveles bastante bajos (hasta 20 esporas 100 g^{-1}) y constantes hasta el final del estudio, lo que concuerda con la evolución registrada en la Di, que presentó valores de alrededor de 5%.

Los tratamientos en los que se presentó de forma global los mayores valores de Di para *G. mosseae* fueron Retama sola y la asociación Retama+Romero, llegando a representar 7-8% del total de las comunidades formadas. Por el contrario, los tratamientos Romero solo, y las asociaciones Mejorana+Lavanda, Mejorana+Romero y Lavanda+Romero han presentado los valores más reducidos, tan sólo un 4% de la comunidad de esporas en suelo (ver Tabla 10). No obstante, dadas las diferencias en el tamaño de la comunidad total en los distintos tratamientos, este resultado no está

asociado a los tamaños de las diferentes poblaciones, siendo en los tratamientos Retama y Mejorana solas, y las asociaciones Lavanda+Retama y Retama+Romero donde se presentaron las poblaciones globales más grandes de *G. mosseae* (entre 20 y 22 esporas 100 g^{-1}). Las poblaciones más pequeñas a su vez, se presentaron en las asociaciones Mejorana+Romero, Lavanda+Romero y la asociación múltiple (entre 7 y 9 esporas 100 g^{-1} , ver Tabla 10).

4.2.6 *Glomus viscosum*.

La evolución de la densidad específica de las poblaciones de *G. viscosum* en las comunidades formadas se presenta en la Figura 46F. En este caso se presentó un comportamiento similar en muchos aspectos al observado en *G. mosseae*. En primera instancia, se produjo un descenso generalizado de las Di en verano de 2002, debido a la ausencia de esporas de *G. viscosum* en todos los tratamientos a excepción del tratamiento Mejorana sola, en donde representó un 10% de la comunidad. Con posterioridad se produjo un aumento de las proporciones relativas en todos los tratamientos, aunque se mantuvo en niveles bajos a lo largo de todo el estudio, no llegando a representar en ningún caso más del 10% en alguna comunidad y en algún momento particular del estudio, a excepción de Mejorana sola, que representó un 23% en invierno de 2003, un 12% en primavera de 2003 y un 11% en otoño de 2003. Un comportamiento similar se puede observar en el tamaño de las poblaciones de esporas de *G. viscosum* (ver Figura 52) ya que éstas se presentaron estables a lo largo de todo el estudio en niveles en general no superiores a 40 esporas 100 g^{-1} , a excepción de Mejorana sola, en que se han llegado a alcanzar las 110 esporas 100 g^{-1} en invierno de 2003, las 94 en primavera de 2003 y las 88 en primavera de 2005.

Por lo anteriormente descrito, de forma global se obtiene que el tratamiento Mejorana sola presentó los mayores valores tanto de Di como de tamaño poblacional, llegando a representar en término medio un 7% del total de la comunidad, con alrededor de 41 esporas 100 g^{-1} (ver Tabla 10). Todos los demás tratamientos representaron entre el 3 y el 5% de las comunidades formadas, aportando entre 9 y 23 esporas 100 g^{-1} de forma global.

4.3 Presencia de hongos micorrícicos en raíces y su relación con las poblaciones en suelo.

La optimización de la técnica de detección de hongos colonizadores de las raíces de las plantas mediante TTGE ha permitido observar la existencia o ausencia de relación entre la presencia in planta de HMA y las poblaciones predominantes de hongos en el suelo. Se ha podido observar que, en términos generales, hay una alta concordancia entre las especies que es posible detectar como colonizadoras del sistema radical, en especial en aquellos tratamientos donde las poblaciones de esporas de una determinada especie fueron significativamente distintas del resto. Además, la ausencia de detección de los hongos en la raíz coincidió con una posterior desaparición de las esporas en el suelo.

Como se puede observar en la Figura 47, para *G. clarum* existe concordancia temporal en la detección de las poblaciones tanto al interior de la raíz como en el suelo. En el primer caso, se pudo detectar la presencia en raíces de *G. clarum* en los tratamientos Mejorana sola y la asociación múltiple tanto en otoño de 2002 (la primera ocasión en que fue posible coleccionar raíz suficiente para la realización de pruebas moleculares y colonización de raíz) e invierno de 2003, en la asociación Retama+Romero en otoño de 2002, y en Romero solo y la asociación Mejorana+Lavanda en invierno de 2003. Con posterioridad no fue posible la detección de *G. clarum* en ningún tratamiento ni en ninguna época. Algo similar ocurrió con las poblaciones de esporas en suelo que, como se describió con anterioridad, desaparecen casi en su totalidad de las comunidades de esporas de HMA en el suelo en verano de 2003, luego de haber alcanzado los mayores tamaños poblacionales en invierno y primavera de 2003. Por otra parte, coincide que en los tratamientos en que mayores poblaciones se registraron, tales como Mejorana sola, Retama+Romero y la asociación múltiple, es donde se realiza preferentemente la detección *in planta*.

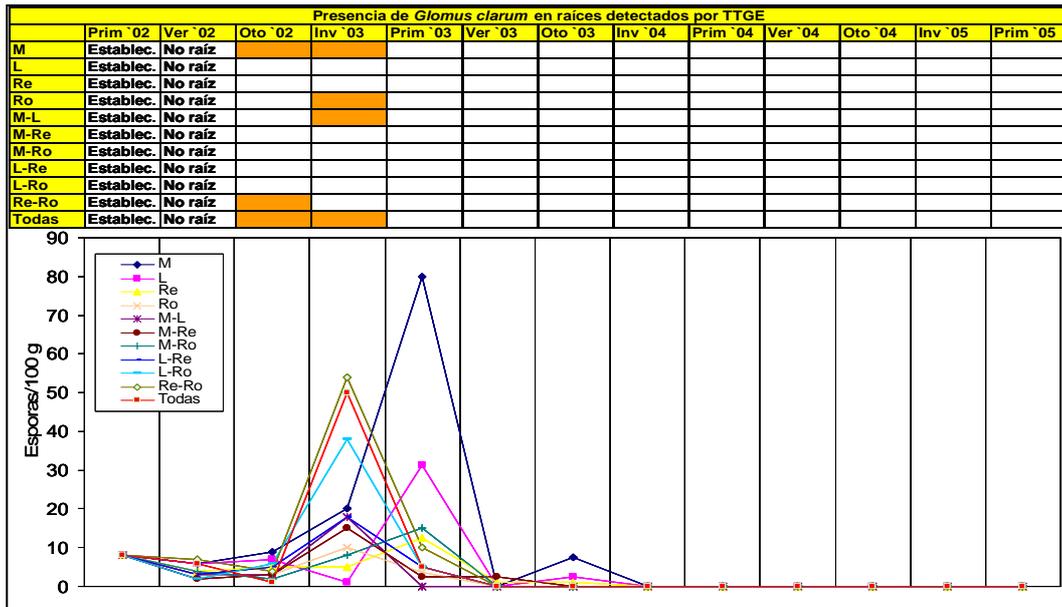


Figura 47. Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrícico-arbuscular *G. clarum* BEG 125, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. El color naranja en la zona superior de esta figura representa detección positiva.

En el caso de *G. constrictum* (Figura 48) se observa una situación diferente, ya que fue posible realizar la detección de su presencia *in planta* en la gran mayoría de los tratamientos, y a lo largo de todas las etapas del estudio, concordando perfectamente con el gran tamaño de las poblaciones de sus esporas en suelo.

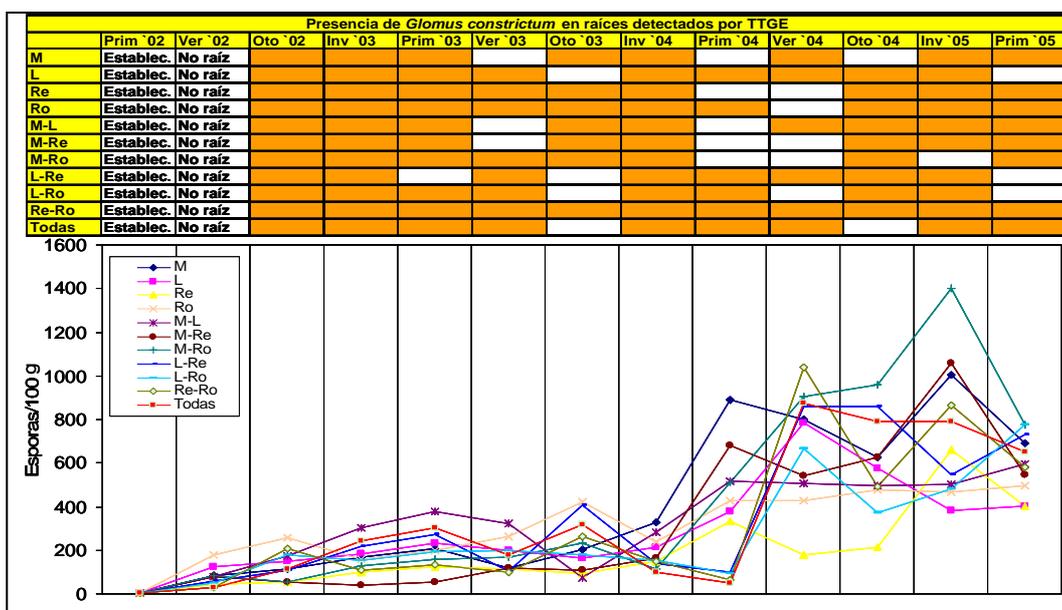


Figura 48. Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrícico-arbuscular *G. constrictum* EEZ 22, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. El color naranja en la zona superior de esta figura representa detección positiva.

G. coronatum, por su parte, presentó una pauta de colonización intra- extraradical muy similar a la que se describió anteriormente para *G. clarum*. Como se puede observar en la Figura 49, fue posible la detección de *G. coronatum* en algunos tratamientos durante las primeras etapas del estudio, específicamente en Mejorana en primavera de 2003, en Romero solo y en la asociación Lavanda+Retama en invierno de 2003, la asociación Retama+Romero en otoño de 2002 y las asociaciones Mejorana+Lavanda y múltiple en otoño de 2002 e invierno de 2003. Con posterioridad a estas etapas de muestreo no fue posible la detección de esta especie de hongo en ninguno de los tratamientos analizados, mostrándose en este punto una alta concordancia con las distintas poblaciones de esporas en suelo, puesto que para verano de 2003, en todos los tratamientos se produce la casi total desaparición de éstas. También se observa esa correspondencia, en términos generales, entre los tratamientos en que pudo ser detectada la colonización y aquellos que mayores poblaciones de *G. coronatum* mostraron (ver Tabla 10).

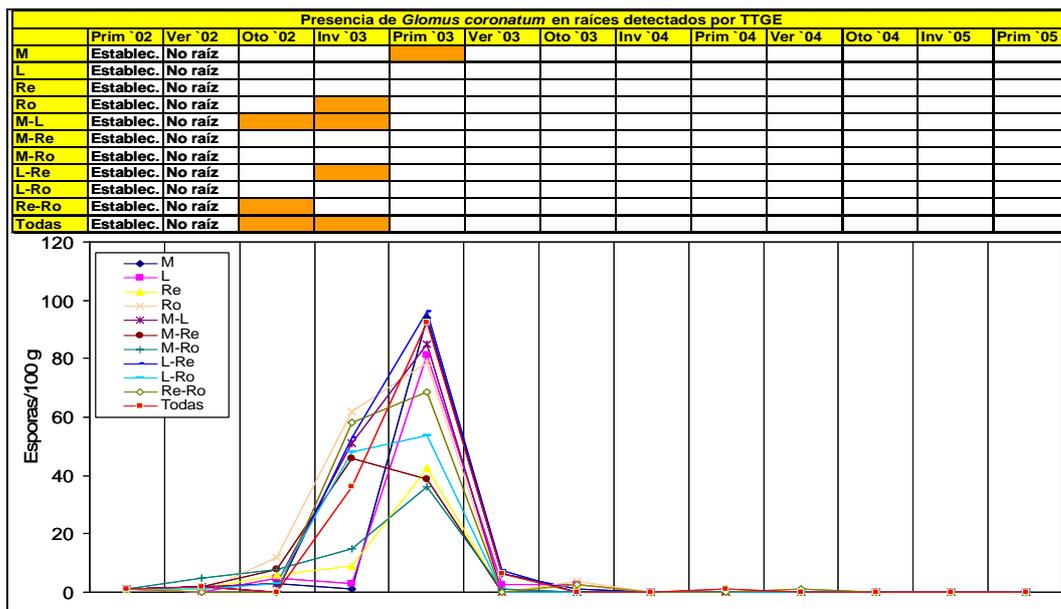


Figura 49. Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrízico-arbuscular *G. coronatum*?, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. El color naranja en la zona superior de esta figura representa detección positiva.

El caso de *G. intraradices* es distinto, ya que fue factible detectar su presencia intraradical en todo momento en la gran mayoría de las distintas asociaciones vegetales (ver Figura 50). Incluso se detectó su presencia en otoño de 2002, ocasión en que las poblaciones de este hongo en el sustrato eran exiguas, lo cual pudo deberse a una importante esporulación intraradical. Este hecho también puede ser el motivo de la

permanente detección. Por otra parte, esto último se relaciona bastante bien con los tamaños de las poblaciones de *G. intraradices*, las que se encuentran en niveles significativos de población desde que son detectados en las comunidades de esporas en los distintos tratamientos (ver Tabla 10).

En *G. mosseae* y *G. viscosum* se observa otra situación, pero similar para las dos especies. Como se puede observar en las Figuras 50 y 51, es posible observar la presencia de colonización intraradical en algunos tratamientos, no siempre los mismos, a lo largo de todo el estudio. Por otra parte, esto puede estar relacionado con los bajos niveles permanentes (a excepción de *G. mosseae* en primavera de 2003) de las poblaciones de estas dos especies.

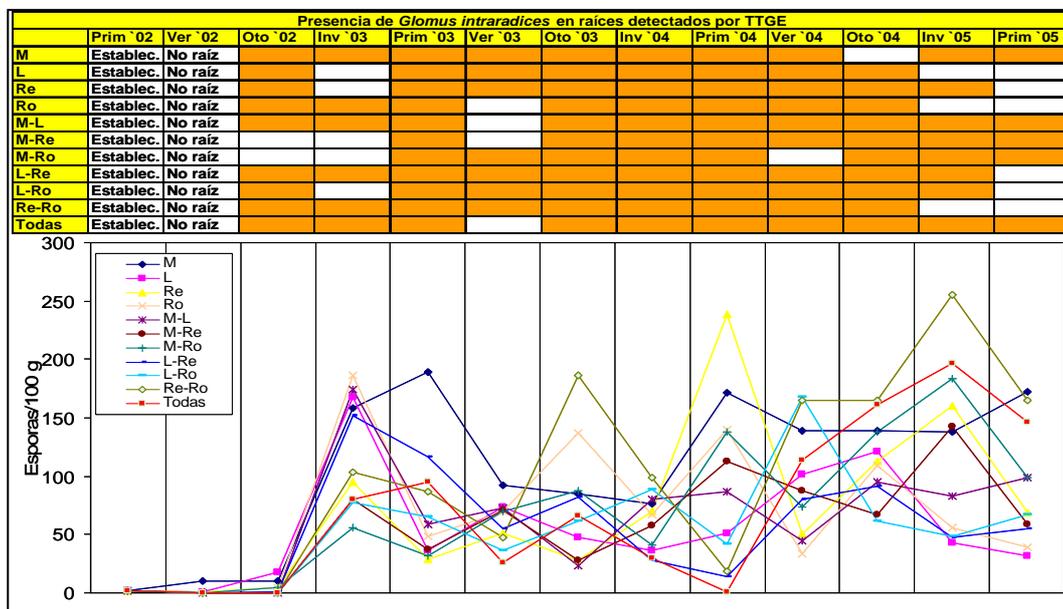


Figura 50. Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrícico-arbuscular *G. intraradices* BEG 121, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. El color naranja en la zona superior de esta figura representa detección positiva.

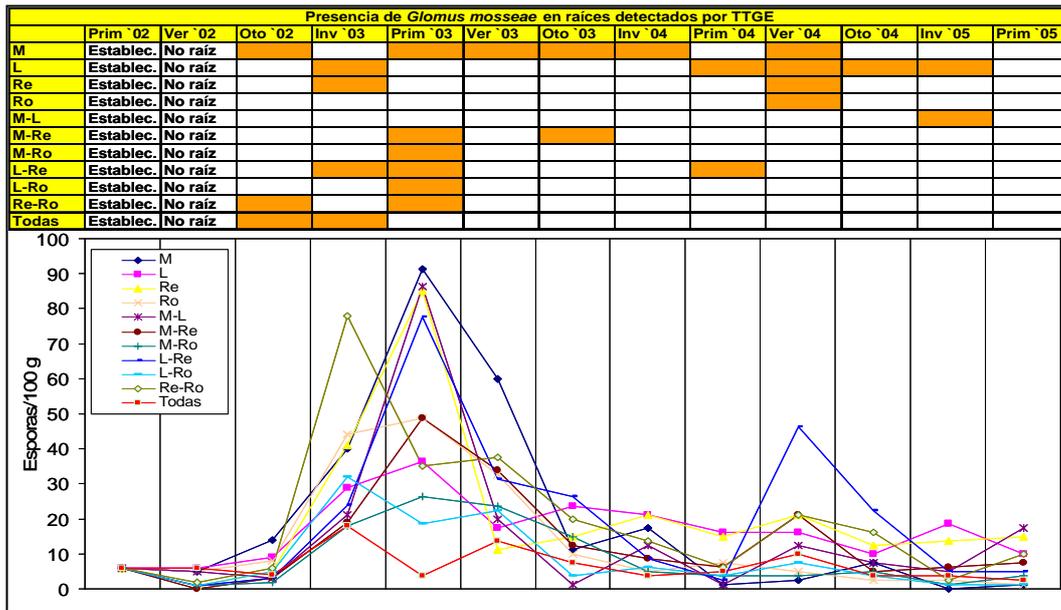


Figura 51. Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrízico-arbuscular *G. mosseae* BEG 122, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. El color naranja en la zona superior de esta figura representa detección positiva.

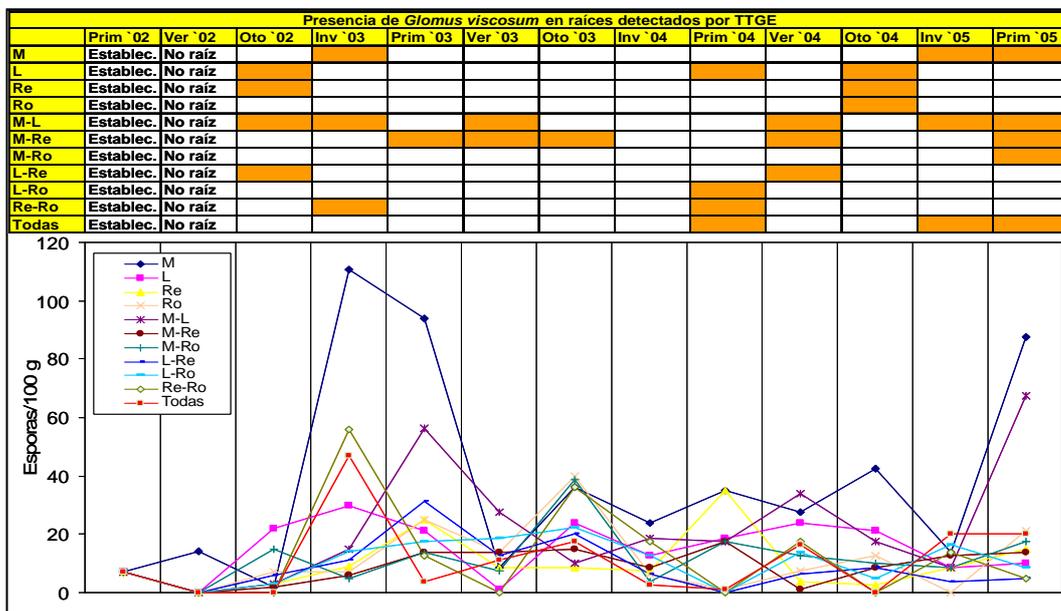


Figura 52. Evolución de la densidad de esporas del hongo micorrízico-arbuscular *G. viscosum* BEG 126, y su presencia detectada colonizando las raíces de las distintas asociaciones vegetales por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. El color naranja en la zona superior de esta figura representa detección positiva.

4.4 Índices de biodiversidad de las comunidades de HMA.

Se han utilizado tres índices con el fin de caracterizar y comparar la diversidad y la estructura de las comunidades de HMA en función de las distintas asociaciones vegetales establecidas. Estos han sido la riqueza de especies (S'), el índice de equidad de especies, conocido como índice de Shannon-Wiener (H'), y el índice de dominancia proporcional, o de Simpson (λ). Estas determinaciones se realizaron tomando en consideración el número de individuos (esporas) de cada especie de HMA en la comunidad formada en las distintas asociaciones vegetales, así como su abundancia proporcional. La evolución estacional de estos parámetros se puede observar en la Figura 53. Por otra parte, el efecto global de las distintas asociaciones vegetales sobre los índices de biodiversidad estudiados se muestra en la Figura 54.

4.4.1 Riqueza de especies.

La evolución del índice de riqueza (S') se muestra en la Figura 53A. Como se puede apreciar, en las primeras etapas del estudio no fue posible la determinación de todas las especies inoculadas. Con posterioridad fue posible detectar un mayor número de especies, a la vez que también se observó un importante aumento de las poblaciones de todas las especies (ver Figuras 47 a 52), hasta hacerse máximos en las temporadas de invierno y primavera de 2003, alcanzándose en algunos tratamientos el máximo valor de 6, en los tratamientos inoculados. Seguido de esto, las especies de HMA encontradas disminuyeron en número, también en el momento en que se observó los descensos poblacionales de algunas especies, como *G. clarum* y *G. coronatum*, como se describió anteriormente. Finalmente se produce la estabilización de S' en todos los tratamientos entre 3 y 4, a la vez que los tamaños poblacionales de las distintas especies presentan una tendencia a la estabilización.

El efecto global de las distintas asociaciones vegetales analizadas sobre el valor de S' se presenta en la Figura 54A. Se observan algunas diferencias, en todo caso moderadas, entre las distintas asociaciones vegetales, presentando los mayores valores globales los tratamientos Mejorana, Lavanda y Retama solas, con índices levemente superiores a 4 en todos los casos. Todas las demás asociaciones vegetales en sustrato inoculado presentaron valores de S' entre 3.5 y 3.8, siendo la asociación múltiple en suelo natural el tratamiento que presentó el menor valor (3.0), significativamente distinto del resto.

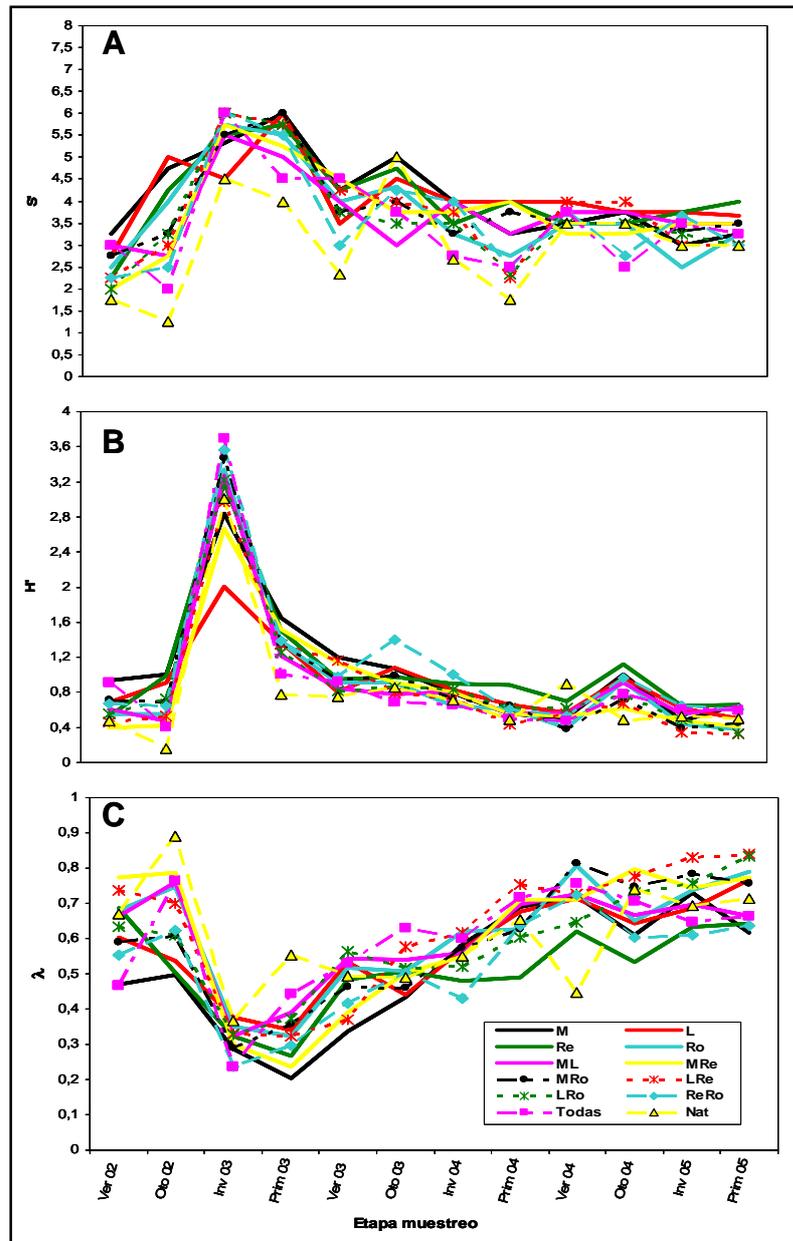


Figura 53. Evolución de los índices de biodiversidad de las comunidades de hongos micorrízico-arbusculares formadas por tratamiento en función de la asociación de especies vegetales durante tres años de estudio. (A) Evolución de la riqueza de especies (S'). (B) Evolución del índice de equidad de Shannon-Wiener (H'). (C) Evolución del índice de dominancia de Simpson (λ).

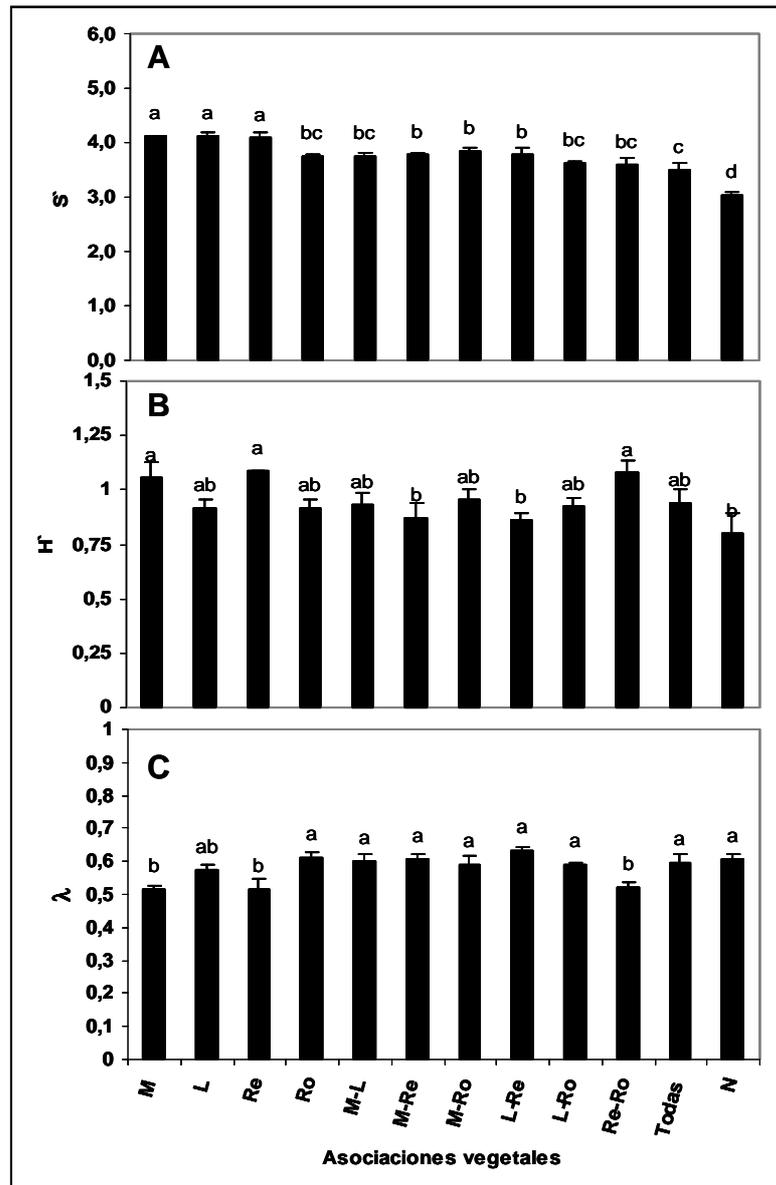


Figura 54. Valores medios para índices de biodiversidad de las comunidades de hongos micorrízico-arbusculares formadas por tratamiento en función de la asociación vegetal. (A) Riqueza de especies (S'). (B) Equidad de especies de Shannon-Wiener (H'). (C) Dominancia de Simpson (λ). Las barras representan el error standard. Letras distintas en las gráficas son significativamente distintas según el test de rango múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$; $n=5$).

4.4.2 Equidad.

La evolución del índice de equidad (H') se muestra en la Figura 53B. Este parámetro, como se ha descrito anteriormente, relaciona el número de individuos de una especie en particular respecto del total de individuos en una comunidad. En tal caso, se puede observar que los bajos valores iniciales estarían relacionados, además de con la reducida detección de especies de HMA presentes como se describió en el punto previo, con la desigualdad en el tamaño de las poblaciones de las distintas especies encontradas. Con posterioridad, se produjo un significativo aumento de los valores de H' en todos los tratamientos en invierno de 2003, debido a la mayor abundancia proporcional de otras especies previamente no encontradas, en especial la aparición en el suelo de una apreciable población de esporas de *G. intraradices* (ver Figura 50). Posteriormente se produjo un brusco descenso de H' , alcanzándose valores de entre 1 y 1.7 en primavera de 2003, e inferiores a 1 durante el resto del estudio.

El efecto global de las distintas asociaciones vegetales analizadas sobre el valor de H' se presenta en la Figura V-35B. Se observan diferencias significativas, aunque no de gran magnitud, entre las distintas asociaciones vegetales, siendo Mejorana y Retama solas, y la asociación Retama+Romero los tratamientos con mayor valor de H' (1.06-1.08). Por el contrario, las asociaciones Mejorana+Retama, Lavanda+Retama y la asociación múltiple en suelo natural, fueron los tratamientos con menores valores de H' (0.87, 0.86 y 0.80 respectivamente).

4.4.3 Dominancia.

La evolución del índice de dominancia proporcional (λ) se muestra en la Figura 53C. Este parámetro de abundancia proporcional representa la mayor probabilidad de que los individuos que componen una comunidad pertenezcan a una misma especie, por lo que resulta de funcionalidad inversa al índice H' . Como se puede observar, Los mayores valores de λ se presentaron al comienzo del estudio (valores entre 0.5 y 0.8), bajando posteriormente hacia invierno-primavera de 2003 hasta valores cercanos a 0.2, posterior a lo cual comenzó un aumento sostenido, haciéndose máximo en las últimas etapas de este estudio. Como la especie dominante en la comunidad fue *G. constrictum*, el esquema que sigue este parámetro es bastante similar al que presentó la densidad específica de esta especie.

El efecto global de las distintas asociaciones vegetales analizadas sobre el valor de S' se presenta en la Figura 54C. Como se puede observar, tampoco se presentaron

diferencias importantes entre las distintas asociaciones vegetales, y dado el carácter inverso de este parámetro respecto de H' , resulta que los tratamientos con mayores valores de λ son aquellos que presentaban los menores valores de H' . En este caso, Mejorana y Retama solas, y la asociación Retama+Romero son los tratamientos que presentan los menores valores, de entre 0.51 y 0.52, estadísticamente diferentes. Todos los demás tratamientos forman un grupo bastante homogéneo, con valores de λ de entre 0.57 y 0.63.

5 RELACIONES ENTRE MEJORA DEL SUELO, COBERTURA VEGETAL, DESARROLLO Y DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍCICOS

Para complementar el estudio realizado, comprender de mejor forma el comportamiento de los distintos parámetros y grupos de variables, y analizar el comportamiento conjunto de las distintas asociaciones vegetales sobre el conjunto de las variables analizadas, se realizó análisis de correlación lineal múltiple (bivariada), y análisis multivariante sobre las medias globales de cada individuo (Pérez 2001). En el segundo caso, las variables se agruparon de acuerdo a si caracterizaban la mejora de las características físico-químicas del sustrato, el desarrollo del hongo, el crecimiento y desarrollo de la planta o la biodiversidad de las comunidades de HMA en el sustrato.

5.1 Relaciones bivariadas entre los distintos parámetros estudiados.

En la Tabla 11 se presentan los resultados del análisis de correlación lineal múltiple mediante los coeficientes de Pearson, así como su significancia estadística.

Tabla 11. Relaciones bivariadas (correlación lineal de Pearson) establecidas entre las distintas variables de respuesta analizadas.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
(1) ^a	1,000	-0,079	-,489**	-,469**	-,628**	-,582**	-,703**	,246	-,679**	-,242	-,216	,016	-,065	-,713**
(2)		1,000	-,158	,112	-,180	-,136	,202	,011	,314*	-,040	-,113	-,109	,011	-,016
(3)			1,000	,374**	,417**	,354*	,539**	-,263	,511**	,145	,014	-,286*	,412**	,692**
(4)				1,000	,500**	,489**	,356*	-,096	,343*	,275	,420**	,121	,118	,455**
(5)					1,000	,934**	,549**	-,253	,525**	,458**	,640**	,133	-,044	,550**
(6)						1,000	,443**	-,274	,411**	,518**	,622**	,182	-,070	,454**
(7)							1,000	-,466**	,914**	,285	,198	-,220	,247	,810**
(8)								1,000	-,170	-,444**	,137	,086	-,188	-,467**
(9)									1,000	,190	,209	-,300*	,273	,718**
(10)										1,000	,364*	,208	-,019	,280
(11)											1,000	,431**	-,404**	,137
(12)												1,000	-,621**	-,351*
(13)													1,000	,445**
(14)														1,000

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

**La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

^a(1)=pHw; (2)=P disponible Olsen ($\mu\text{g g}^{-1}$); (3)=Glomalina fácilmente extractable (mg g^{-1}); (4)=Agregados hidroestables (%); (5)=Micelio total (m g^{-1}); (6)=Micelio vivo (m g^{-1}); (7)=Densidad de raíz total ($\text{m } 100 \text{ g}^{-1}$); (8)=Colonización micorrícica (%); (9)=Densidad de raíz colonizada ($\text{m } 100 \text{ g}^{-1}$); (10)=Densidad esporas totales ($\text{esporas } 100 \text{ g}^{-1}$); (11)=Índice de riqueza de especies (S'); (12)=Índice de equidad de Shannon-Wiener (H'); (13)=Índice de dominancia de Simpson (λ); (14)=Superficie de cobertura total (cm^2).

Se puede observar un gran número de variables que guardaron una relación estadística lineal. Entre los más interesantes, se observó una relación altamente significativa e inversa entre los valores globales de pHw y otras variables del suelo, como la cantidad de glomalina FE en éste y la formación de agregados hidroestables, además de con algunas variables representativas del desarrollo del hongo en el suelo, como las distintas fracciones de micelio, y también con variables de crecimiento vegetal, como fueron la densidad radical (tanto total como micorrizada) y la superficie de cobertura. Por su parte, el contenido de P disponible en el sustrato no presentó relación directa con ningún otro parámetro. El contenido de glomalina FE relacionó, como era de esperar, con la densidad de distintos componentes del HMA, como el micelio y la raíz colonizada, además de con variables del crecimiento vegetal, tales como su superficie de cobertura y densidad radical. También resultó interesante su asociación significativa con la formación de agregados hidroestables en suelo y con un parámetro de diversidad, como es el índice de dominancia. La formación de agregados estables, como cabía esperar, presentó a su vez correlación con parámetros de desarrollo del hongo en el suelo como la densidad de micelio (tanto vivo como total), además de con la riqueza de especies de HMA en suelo y con el crecimiento vegetal, expresado como superficie de cobertura total.

El componente micorrícico también presentó relaciones significativas entre las distintas variables que lo conformaron, además de con el crecimiento vegetal. En este caso, las relaciones positivas que destacaron, entre otras, son la lógica relación entre densidad de micelio total y vivo, la relación entre micelio vivo con la densidad radical, tanto total como de raíz colonizada, además de con la densidad de esporas en el sustrato. Por otra parte, la densidad de micelio también correlacionó significativamente con la riqueza de especies, además de con el crecimiento aéreo de las plantas, expresado como superficie de cobertura. La proporción de raíz micorrizada presentó una relación negativa, patente sobre todo al relacionarla con la densidad de raíz total, y con la esporulación, aunque también con la superficie de cobertura, dado la relación entre este parámetro respecto de la densidad radical, tanto total como de raíz colonizada.

Los índices utilizados para caracterizar la diversidad de HMA en el suelo, por su parte, se relacionaron entre ellos de la siguiente manera: la riqueza de especies (S') relacionó positivamente con la equidad de las comunidades (H'), y éstas dos se relacionaron negativamente con el índice de dominancia (λ). Finalmente, sólo λ relaciona con la cobertura aérea total de manera directa.

5.2 Análisis multivariante de los grupos formados sobre las variables de respuesta.

Para realizar el análisis multivariante, luego de definir los diferentes grupos de variables, se procedió a la realización de un análisis de regresión lineal múltiple, con método de selección de subconjuntos de variables independientes mediante pasos sucesivos (Pérez 2001). Para este procedimiento se utilizó como variable dependiente cada una de las variables y se estudió las variables que se incluían en cada caso. Con las variables incorporadas para cada grupo, se procedió a la realización del análisis factorial, para obtener nuevos factores que explicasen el comportamiento global de las variables incluidas (Pérez 2001). Se utilizó el método de extracción de las componentes principales para este fin, obteniéndose de manera ventajosa una única componente por cada grupo de variables. Los resultados para las variables estudiadas mediante regresión lineal múltiple, así como los autovalores de las componentes principales obtenidas y la varianza total explicada en cada caso se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Grupos formados de acuerdo al tipo de variable, variables incluidas en el análisis factorial y estadísticos del análisis.

Tipo grupo	Variables estudiadas	Variables seleccionadas	KMO, Chi cuad. y sig. de Chi	Autovalor y var. explicada
Mejora del suelo	pHw	pHw	0.66	1.89
	P disponible	Agregados	25.16	62.98%
	Agregados	Glomalina FE	0.00	
	Glomalina FE			
Crecimiento del hongo	Mic. Total	Mic. Total	0.61	2.59
	Mic. Vivo	Mic. Vivo	123.86	64.70%
	Raíz colonizada	Raíz colonizada	0.00	
	Colonización	Esporulación		
	Esporulación			
Crecimiento vegetal	Raíz total	Raíz total	0.67	2.63
	Raíz colonizada	Raíz colonizada	130.37	87.71%
	Cobertura	Cobertura	0.00	
Diversidad	Esporulación	Riqueza	0.65	1.98
	Riqueza	Equidad	32.97	65.92%
	Equidad	Dominancia	0.00	
	Dominancia			

Finalmente, los sujetos estudiados (las unidades experimentales, de acuerdo a sus valores factoriales) fueron agrupados mediante la utilización de conglomerados o análisis cluster. Los análisis realizados fueron de tipo no jerárquico, y el método de agrupación utilizado fue el del vecino más lejano. Esto permitió la representación gráfica mediante dispersión de los sujetos y agrupación de sujetos similares en gráficos que utilizaron como ejes los valores factoriales de las componentes obtenidas (ver Figuras 55 a 60).

5.2.1 Relación entre características edáficas y de crecimiento vegetal.

Los resultados del análisis multivariante para la relación entre mejora del suelo y crecimiento vegetal se presentan en la Figura 55. Se puede observar por una parte una clara tendencia lineal entre las componentes obtenidas para mejora de características del suelo y crecimiento vegetal, siendo el coeficiente de relación entre estos factores de 0.75 ($p < 0.001$).

En el primer grupo, se encuentra las unidades experimentales que han presentado los menores efectos sobre la mejora de las características del suelo, a la vez que han presentado el menor crecimiento vegetal, y que incluye todos los individuos estudiados de los tratamientos Retama sola y asociación múltiple en suelo natural. A continuación se presentó un grupo con bajo efecto en la mejora de las condiciones del suelo y bajo crecimiento vegetal, aunque superiores al grupo anterior, y que incluyó algunos sujetos de asociaciones tales como Mejorana+Retama, Retama+Romero y Mejorana+Romero. El grupo inmediatamente superior incluyó el resto de individuos de las anteriores asociaciones y casi por completo tratamientos tales como Mejorana y Romero solos. Finalmente, el grupo que mejores efectos ejerció sobre la mejora de las características del suelo y mayor crecimiento vegetal presentó incluye tratamientos con presencia de Lavanda, tales como Lavanda sola, y las asociaciones Mejorana+Lavanda y Lavanda+Retama.

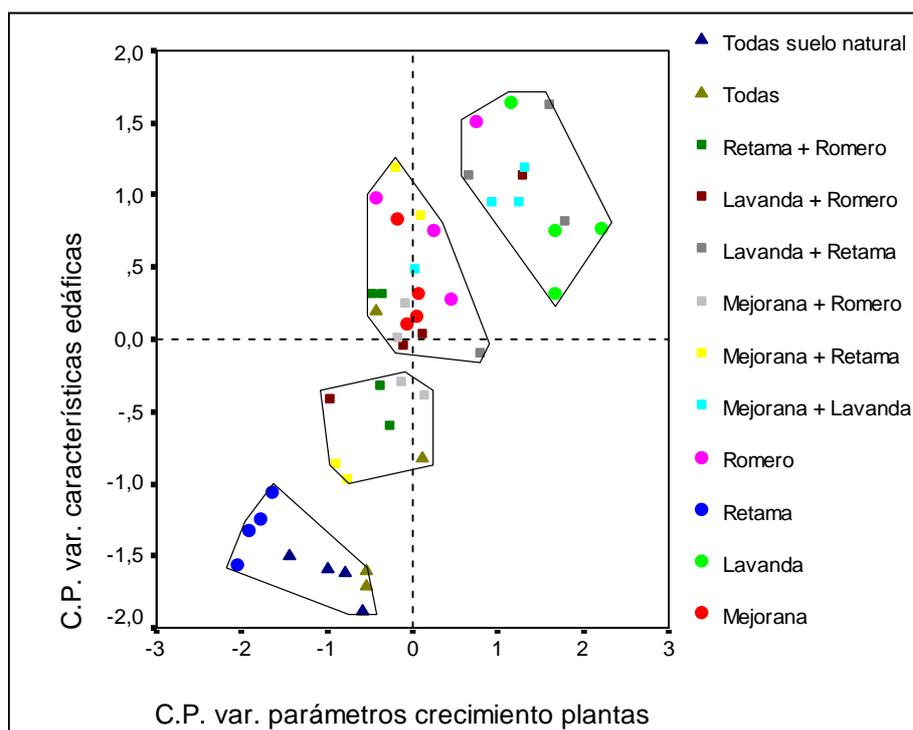


Figura 55. Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento vegetal (88% de la varianza total explicada) y las variables de características edáficas (63% de la varianza total explicada). Los polígonos engloban individuos de las distintas asociaciones vegetales con alto grado de similitud de acuerdo con el análisis de conglomerados, y debe ser entendido como una ayuda visual para la discriminación de grupos.

5.2.2 Relación entre características edáficas y de desarrollo del hongo.

Los resultados del análisis multivariante para la relación entre mejora del suelo y crecimiento del hongo micorrícico se presentan en la Figura 56. También se presentó una relación lineal entre las componentes que agrupan variables de mejora del suelo y desarrollo de los HMA ($r=0.68$, $p<0.001$).

Nuevamente, el grupo de menor efecto en los parámetros estudiados fue el que incluyó los tratamientos Retama sola y la asociación múltiple en suelo natural. Los siguientes dos grupos mostraron un efecto medio sobre el conjunto de las variables analizadas, e incluyó tratamientos como Mejorana sola y asociaciones de Romero como Retama+Romero, Mejorana+Romero y Lavanda+Romero. Otro grupo que presentó un alto efecto sobre la mejora de las características edáficas, e igualmente un alto desarrollo del hongo se conformó por tratamientos tales como Romero solo, Mejorana+Lavanda y Lavanda+Retama. El grupo que presentó un mayor efecto sobre los factores estudiados incluyó sólo un individuo de Mejorana sola y dos de Lavanda sola.

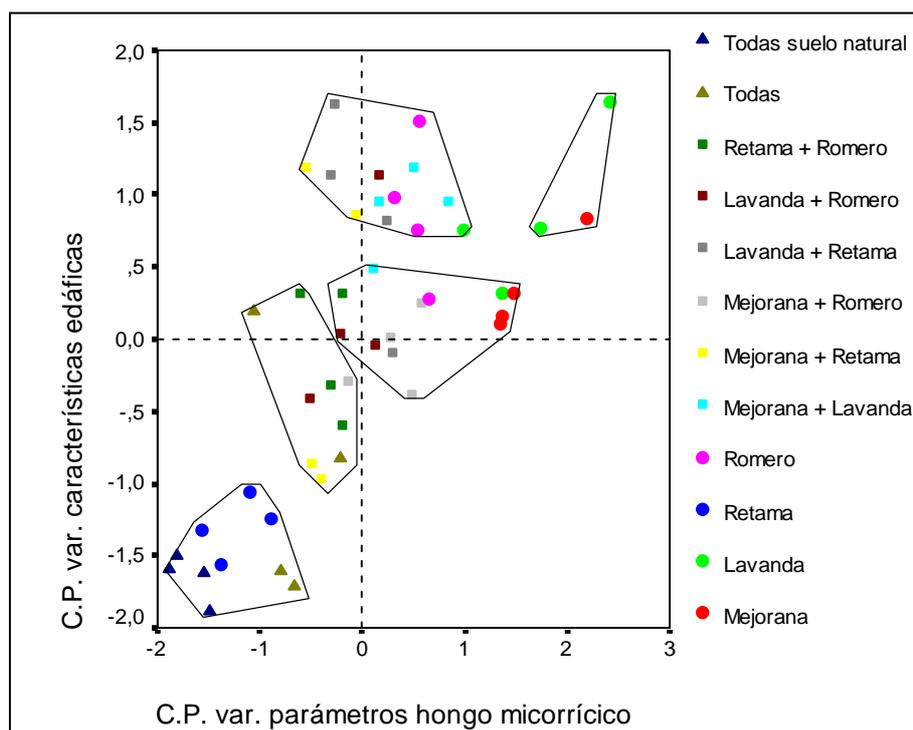


Figura 56. Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento del hongo micorrícico en suelo (65% de la varianza total explicada) y las variables de características edáficas (63% de la varianza total explicada). Los polígonos engloban individuos de las distintas asociaciones vegetales con alto grado de similitud de acuerdo con el análisis de conglomerados, y debe ser entendido como una ayuda visual para la discriminación de grupos.

5.2.3 Relación entre características edáficas y diversidad.

Los resultados del análisis multivariante para la relación entre mejora del suelo y diversidad de hongos micorrícicos se presentan en la Figura 57. Como se observa, no se presentó una relación lineal entre las componentes obtenidas ($r=-0.039$, $P=0.795$).

El grupo en que menores efectos se observaron sobre la mejora del suelo en conjunto a una menor diversidad fúngica incluyó a la asociación múltiple en suelo natural y sujetos de otros tratamientos como la asociación múltiple en sustrato inoculado. Aún sin presentar una mejora del suelo, el tratamiento Retama sola (y algunos sujetos de otros 4 tratamientos) fue el que presentó los mayores efectos en el aumento de la diversidad. Otro grupo formado incluyó buena parte de los restantes tratamientos, caracterizándose por un importante efecto sobre la mejora de las características del suelo y un nivel medio-alto de diversidad. Entre otros, incluyó los tratamientos Lavanda y Romero solos, y las asociaciones Mejorana+Lavanda, Lavanda+Retama y Retama+Romero. El tratamiento Mejorana sola, por su parte, representó por sí solo un grupo aparte, pues presentó mayores niveles de biodiversidad de HMA de forma global.

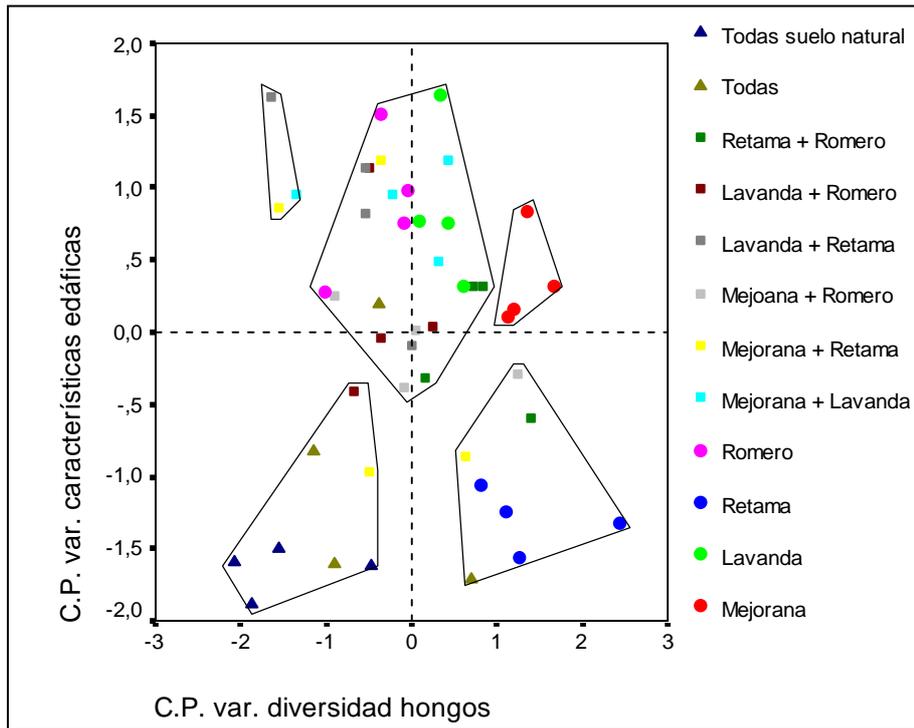


Figura 57. Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para los índices de biodiversidad de hongos micorrícicos (66 % de la varianza total explicada) y las variables de características edáficas (63 % de la varianza total explicada). Los polígonos engloban individuos de las distintas asociaciones vegetales con alto grado de similitud de acuerdo con el análisis de conglomerados, y debe ser entendido como una ayuda visual para la discriminación de grupos.

5.2.4 Relación entre crecimiento vegetal y desarrollo del hongo.

Los resultados del análisis multivariante para la relación entre crecimiento vegetal y crecimiento del hongo micorrícico se presentan en la Figura 58. También entre los factores que reúnen las variables de éstos grupos se observó una dependencia lineal ($r=0.68$, $p<0.001$).

El grupo que presentó los menores niveles en ambas componentes estudiadas incluyó nuevamente de forma íntegra los tratamientos Retama sola y la asociación múltiple en suelo Natural. Con un efecto mayor para ambas componentes, se formó un grupo bastante grande, englobando un gran número de los tratamientos, tales como Romero solo, las asociaciones Mejoana+Romero, Retama+Romero, Mejoana+Retama, Lavanda+Retama, Mejoana+Lavanda y la asociación múltiple en sustrato inoculado. El tratamiento Mejoana sola formó por sí solo un grupo aparte, que presentó los mayores valores de desarrollo del hongo, aunque no los mayores valores en crecimiento vegetal, que sí presentó el tratamiento Lavanda sola, en otro grupo.

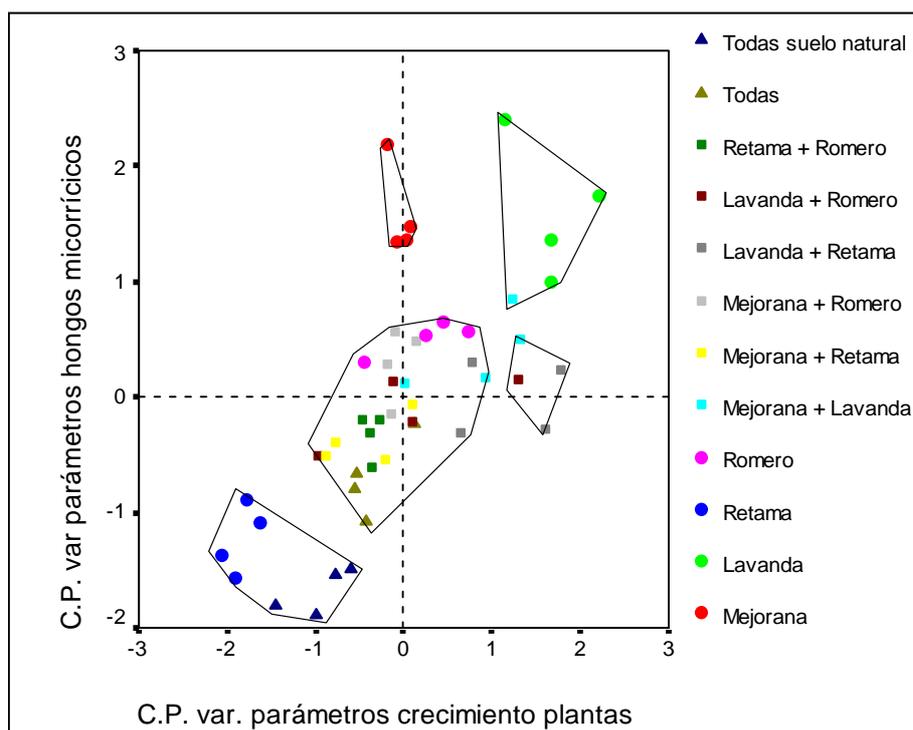


Figura 58. Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento vegetal (88% de la varianza total explicada) y las variables de crecimiento del hongo micorrícico en suelo (65% de la varianza total explicada). Los polígonos engloban individuos de las distintas asociaciones vegetales con alto grado de similitud de acuerdo con el análisis de conglomerados, y debe ser entendido como una ayuda visual para la discriminación de grupos.

5.2.5 Relación entre crecimiento vegetal y diversidad.

Los resultados del análisis multivariante para la relación entre crecimiento vegetal y diversidad de hongos MA se presentan en la Figura 59. Entre estas componentes tampoco se observó relación lineal ($r=-0.207$, $p=0.16$).

El grupo que presentó bajos niveles en ambas componentes se conformó básicamente de los tratamientos que utilizaron las asociaciones vegetales múltiples, además de algunos individuos de la asociación Mejorana+Retama. Otro grupo, que presentó un valor de diversidad de hongos bastante mayor, aunque no tan diferente respecto del crecimiento vegetal incluyó tratamientos tales como Mejorana y Romero solos, y asociaciones como Retama+Romero y los individuos restantes de la asociación Mejorana+Retama. Lavanda sola y sus asociaciones (con Retama y con Mejorana) formaron un grupo que presentó un apreciable mayor efecto sobre el crecimiento vegetal, aunque un término medio en cuanto a su nivel de biodiversidad. Finalmente, el tratamiento Retama sola formó por sí solo un grupo caracterizado por una elevada diversidad, a la vez de los menores efectos sobre el crecimiento vegetal

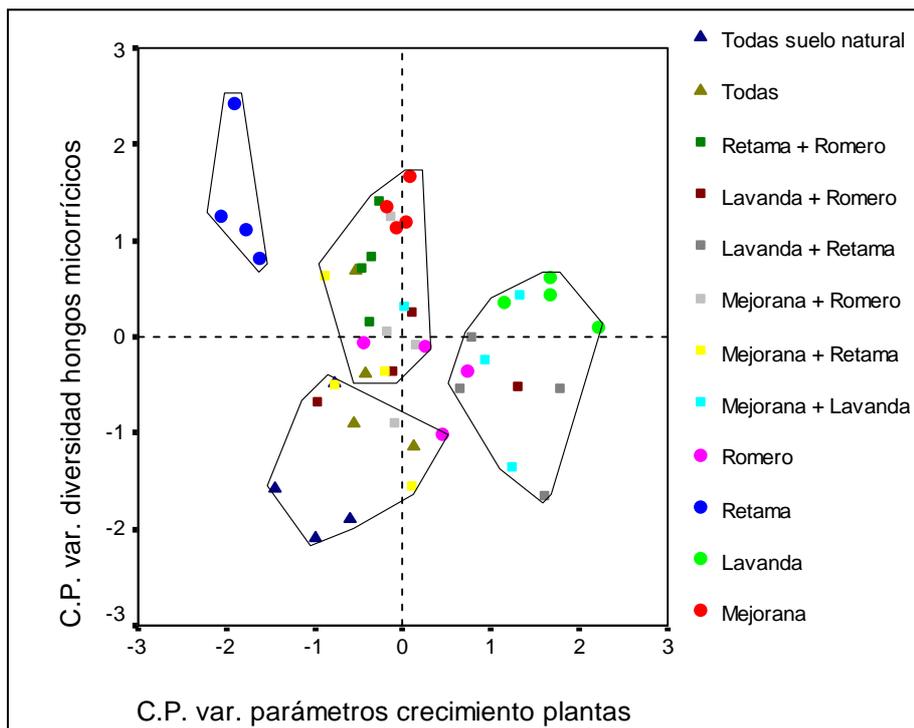


Figura 59. Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para las variables de crecimiento vegetal (88% de la varianza total explicada) y los índices de biodiversidad de hongos micorrícicos (66% de la varianza total explicada). Los polígonos engloban individuos de las distintas asociaciones vegetales con alto grado de similitud de acuerdo con el análisis de conglomerados, y debe ser entendido como una ayuda visual para la discriminación de grupos.

5.2.6 Relación entre desarrollo del hongo y diversidad.

Los resultados del análisis multivariante para la relación entre crecimiento del hongo micorrícico y su diversidad se presentan en la Figura 60. Las componentes obtenidas del análisis factorial tampoco presentaron relación para los grupos estudiados ($r=0.253$, $p=0.083$).

El grupo que menos influyó sobre ambas componentes incluyó ambas asociaciones múltiples y algunos sujetos de la asociación Mejorana+Retama. Un grupo de niveles medios en ambas componentes englobó los tratamientos Romero solo y las asociaciones Lavanda+Romero, Mejorana+Lavanda y Mejorana+Romero. Los tratamientos Retama sola y Retama+Romero formaron un grupo con un alto nivel de diversidad, aun cuando el desarrollo de los HMA fuera de los más reducidos. Finalmente, los tratamientos donde más se desarrolló el hongo, y con igualmente altos niveles de diversidad incluyó íntegramente a los tratamientos Mejorana y Lavanda solas.

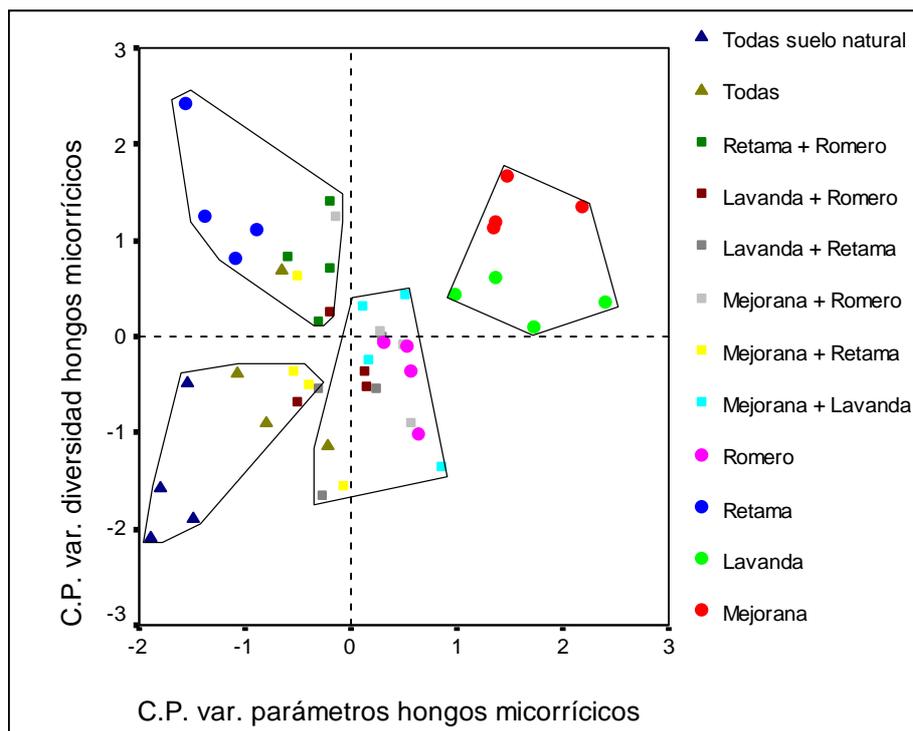


Figura 60. Diagrama de dispersión de los sujetos según las componentes principales obtenidas por análisis factorial para los índices de biodiversidad de hongos micorrícicos (66% de la varianza total explicada) y las variables de crecimiento del hongo micorrícico en suelo (65% de la varianza total explicada). Los polígonos engloban individuos de las distintas asociaciones vegetales con alto grado de similitud de acuerdo con el análisis de conglomerados, y debe ser entendido como una ayuda visual para la discriminación de grupos.



La degradación de la cubierta vegetal y la consecuente pérdida de diversidad y estructura de las comunidades, particularmente en ambientes Mediterráneos áridos y semiáridos, se producen en una espiral en la que confluyen la fragilidad del ecosistema por razones climáticas, edáficas y la acción humana. Debido a esto, la pérdida de la estructura y equilibrio de la cubierta vegetal es sólo una de las componentes del deterioro global del ecosistema, haciéndose necesario frenar este bucle de degradación de los ecosistemas en áreas frágiles. Las actuaciones tendientes a revertir esta espiral deben comprender no sólo la reposición de las especies vegetales idóneas, sino también los componentes microbianos propios y adecuados al mejor desarrollo de la cubierta vegetal, puesto que es bien conocido que la degradación de la cubierta vegetal va asociada a la degradación de los componentes biológicos y físico-químicos del suelo subyacente (Barea et al. 1996; Requena et al. 1996; Requena 1997; Pérez-Solís 2001; Wu et al. 2002).

Es por esto que, en este estudio se planteó como principal objetivo el análisis de la influencia de la cobertura vegetal, considerando su diversidad y estructura, sobre las poblaciones de HMA presentes tanto en el suelo como en el sistema radical, y cómo estas se asociaban entre sí, influenciando la formación de distintas comunidades de HMA. La variación en la diversidad y en la estructura de estas comunidades de hongos,

por efecto de las distintas características de la cubierta vegetal, puede llegar a ser de primordial importancia, puesto que los efectos de los distintos hongos sobre las plantas pueden llegar a de gran magnitud dependiendo de la especificidad de la simbiosis establecida, así como en el efecto de selección que cada planta pueda tener sobre las distintas especies de HMA en la comunidad, (Bever 2002a; b), y el tamaño final y potencial micorrícico que presente el ecosistema, repercutiendo en la capacidad infectiva-colonizadora que puedan presentar las comunidades resultantes, sobre todo en ecosistemas degradados (Wu et al. 2002).

Por lo anterior se decidió utilizar, como se justificó en el capítulo III de esta Tesis Doctoral, especies vegetales que fuese posible encontrar de forma natural en las comunidades vegetales propias de ecosistemas mediterráneos desarrollados bajo condiciones áridas/semiáridas, y que pudiesen ser objeto de utilización biotecnológica en procesos de recuperación de la cubierta vegetal en ambientes degradados y/o desertificados de la Cuenca Mediterránea. Ya se mencionó en el capítulo introductorio de esta tesis, las ventajas que presenta el hecho de utilizar este tipo de especies vegetales con fines de recuperación de ecosistemas mediterráneos degradados. Entre estas razones se cuenta el que la cobertura y consecuente protección del suelo que presentan especies arbustivas y matorrales, respecto de especies arbóreas es similar (Carreras 1992; Herrera et al. 1993; Barea et al. 1996; Requena 1997); además, al tratarse de especies nativas, su adaptación al clima y a las condiciones edáficas particulares es mayor respecto a especies alóctonas (Herrera et al. 1993; Requena 1997).

Considerando además las posibles utilidades y aplicaciones prácticas de los estudios aquí realizado, se ha evaluado en mesocosmos (debido a las limitaciones mencionadas en el capítulo III de esta tesis) la evolución de parámetros edáficos sobre un sustrato (suelo) representativo de la hoya Guadiciano-Baztetana, que presentaba una casi nula cobertura vegetal, bajo nivel de agregación del suelo, reducido contenido de materia orgánica, escaso potencial micorrícico inicial, fuerte erosión en cárcavas, y una muy baja tolerancia a la erosión (de unas $4 \text{ ton ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, según Pujalte y Prieto 1980). La simulación realizada ha intentado representar los procesos que podrían haberse visto afectados en un hipotético proceso de recuperación del ecosistema degradado y, en buena medida, los resultados aquí obtenidos podrían ser extrapolables al comportamiento que se presentaría en un sistema en condiciones naturales. Por esto, se decidió comprender en este estudio un número considerable de variables que podrían verse influenciadas por las diferentes asociaciones vegetales, tanto a nivel de desarrollo del hongo, de mejora de las características del suelo, de la evolución de la diversidad y

estructura de las comunidades de hongos micorrícicos, así como también del propio efecto de las distintas asociaciones vegetales sobre el crecimiento de las plantas utilizadas en conjunto, y como a causa de esto se estructuran las comunidades vegetales. Además, y considerando que estos parámetros varían a través del tiempo, se consideró el estudio a mediano-largo plazo, a fin de que se reflejasen las variaciones por efecto de las condiciones del tiempo ambiente, y se reflejasen los posibles efectos producto de los diferentes estados fenológicos que presentan las especies utilizadas a lo largo del año.

Por su parte, las especies de HMA que se utilizaron para formar el consorcio inicial, comunidad de HMA que de forma dirigida se formuló y aplicó homogéneamente en todas las asociaciones vegetales analizadas, se eligieron basados en la presencia común de estas especies en ambientes/ecosistemas mediterráneos. Otro aspecto de suma relevancia por las implicancias básicas que puede presentar este trabajo es que eran fácilmente distinguibles por la morfología de sus estructuras de resistencia (esporas). De esta forma, los datos obtenidos para las comunidades de HMA, principalmente en suelo, resultaron de mayor fiabilidad que si se hubiesen utilizado especies que compartieran caracteres morfológicos, al menos durante alguna de las etapas de su desarrollo ontogénico. Respecto de esto, cabe señalar además la necesidad de que las distintas especies de HMA utilizadas presentasen perfiles genéticos que los pudieran diferenciar en una comunidad compleja (como puede ser una raíz colonizada) por medios moleculares, puesto que es posible la superposición tanto morfológica como en las secuencias de los genes factibles de utilizar para su identificación.

Como ejemplo de lo anterior, Rodríguez y colaboradores (2005) realizaron estudios morfológicos y moleculares de diferentes aislados de *Glomus claroideum* y *G. etunicatum* basados en el dominio D2 de la subunidad 25S del gen DNAr, utilizando PCR-SSCP-secuenciación, encontrando que se producía una aparente superposición de las características morfológicas entre el universo de esporas de las dos especies, hecho que también fue observado a nivel de las secuencias obtenidas, siendo 4 de un total de 11 secuencias comunes a las dos especies (que representaba el 32% de 564 clones analizados). Algo similar encontraron Vandenkoornhuyse y Leyval (1998) analizando la subunidad 18S del gen ADNr de diversos aislados de *G. mosseae* de colección. Este hecho también podría explicar la divergencia filogenética que se ha encontrado para el aislado de *G. clarum* utilizado en este estudio, puesto que las divergencias morfológicas en esta especie, descritas en estudios previos (Schübler et al. 2001; Calvente 2003), podrían poseer una base en la superposición de sus secuencias, que hacen que distintos

aislados de esta especie aparezcan en numerosas ocasiones en ramas filogenéticas diferentes, más emparentadas con otras especies de *Glomus* que entre ellas. No obstante lo anterior, Stukenbrock y Rosendahl (2005a; b), estudiando mediante PCR multiplex y SSCP la diversidad clonal y la estructura de las comunidades de HMA del género *Glomus* en parcelas cultivadas mediante cultivo convencional y orgánico, encontraron genotipos únicos, sugiriendo que no había recombinación. La misma metodología fue usada para estudiar esporas individuales de tres especies de HMA, *Glomus mosseae*, *G. caledonium* y *G. geosporum*, usando cebadores específicos para el dominio D2 de LSU rDNA, encontrando una copia de cada gen estudiado, por lo que se supone un estado homocariótico.

Entrando de lleno en la temática de esta investigación, debe ser considerado, no obstante, que el estudio de la diversidad biológica resulta complejo debido a muchas razones, entre las que destacan el tratarse de un concepto relativamente reciente. Además, debido a la ingente cantidad de parámetros que se han intentado utilizar para su expresión, no existe aún paridad de criterios ni homogeneidad en su expresión y posterior interpretación (Magurran 1988). En el caso particular de los HMA, estas complicaciones se ven incrementadas por las dificultades que todavía se presentan para su conceptualización adecuada como especie, así como la delimitación de la unidad fundamental utilizada en el estudio de la diversidad taxonómica, el individuo.

Tradicionalmente, ha sido la espora la unidad fundamental de estudio en este grupo de hongos, tanto para su caracterización morfológica, su identificación taxonómica y el estudio de densidades poblacionales y estructura de comunidades en suelo. Sin embargo, esta unidad morfológica puede poseer, como se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis, varios cientos o algunos miles de núcleos, los que pueden poseer incluso diferentes orígenes, hecho que se ha podido relacionar a la existencia de anastomosis vegetativas (Gianinazzi-Pearson et al. 2001). Como se mencionaba con anterioridad, esta "promiscuidad" nuclear podría ser la causa de que se encuentre una alta variabilidad entre las copias de ADNr, incluso las presentes en una sola espora (Sanders et al. 1995; Hijri et al. 1999; Sanders et al. 1999; Clapp et al. 2001), así como la superposición de secuencias entre especies consideradas diferentes (Rodríguez et al. 2005). No obstante, esta alta variabilidad genética y fenotípica representa una variabilidad global baja, que puede deberse al hecho de que los HMA, al ser multigenómicos, buena parte de esa redundancia puede tener un efecto tampón (Koch et al. 2004).

Por lo anterior, resulta necesaria la aplicación de técnicas moleculares que complementen el estudio de la diversidad en este grupo de hongos, y que de alguna manera confieran la seguridad de realizar una correcta diferenciación taxonómica de los distintos niveles de HMA que pudieran incluirse en una comunidad. A pesar de que la caracterización molecular de HMA ha sido hasta no hace mucho una labor bastante complicada, por las limitaciones descritas anteriormente, en la actualidad es una tarea realizada de forma casi rutinaria, habiéndose llevado a cabo muchos trabajos destinados a caracterizar diferentes especies de HMA, tanto en suelo como en raíz (Simon et al. 1992; 1993; Clapp et al. 1995; Vandenkoornhuysen y Leyval 1998; van Tuinen et al. 1998; Chelius y Triplett 1999; van Elsas et al. 2000; Turnau et al. 2001; Vandenkoornhuysen et al. Saito et al. 2004), así como también en un amplio rango de situaciones, que va desde la detección monoespecífica en raíces colonizadas (Fillion et al. 2002; Isayenkov et al. 2003) a la caracterización de las especies componentes de una comunidad compleja, tanto en comunidades de HMA controladas, como en este estudio, así como también en condiciones naturales (Clapp et al. 1995; Jacquot et al. 2000; Daniell et al. 2001; Jacquot-Plumey et al. 2001).

En todo caso, se ha utilizado con los fines antes descritos, distintas zonas del gen ribosomal, dadas las características de conservación que posee (ver Introducción). De todas las regiones, las que más se han utilizado son las codificantes, en especial la subunidad 18S, puesto que muestra el menor grado de variación. No obstante, en otros estudios se ha utilizado justamente la mayor variabilidad de las regiones espaciadoras (en especial ITS) para diferenciar entre distintas taxa de HMA (Redecker et al. 1997; 1999; Redecker 2000; Renker et al. 2005). En el presente estudio se optó por la utilización de la subunidad 18S ADNr, puesto que permitía un mayor grado de especificidad, sobre todo considerando que todos los hongos utilizados en el consorcio inicial pertenecían al mismo género, previniendo así que se incluyese otro tipo de organismos eucariotas, particularmente las plantas hospedadoras, puesto que en el caso de las raíces colonizadas la separación física de los distintos componentes de la simbiosis es impracticable. Y por otra parte, la existencia de un cebador “específico”, AM1 (Helgason et al. 1998), que era capaz de amplificar por PCR todos los HMA presentes en el estudio. Por otra parte, se optó por el sistema de TTGE para la confirmación de la presencia/ausencia de un determinado HMA en la raíz, puesto que los sistemas de geles desnaturizantes han resultado de un incalculable valor en el estudio de las comunidades microbianas (Muyzer y Smalla 1998; Muyzer 1999; Heuer et al. 2001), permitiendo la diferenciación de distintas especies basados en pequeñas diferencias en las secuencias de sus genes ribosómicos.

Además, ha sido utilizado exitosamente en la caracterización de otros grupos microbianos procariontes complejos (Vázquez et al. 2001; Ogier et al. 2002).

La optimización realizada para la detección de los HMA utilizados en este estudio por TTGE se basó inicialmente en el estudio realizado por Kowalchuk y colaboradores (2002), utilizando un cebador universal (NS31) con un extremo GC y el primer “específico de glomerales” AM1. El primer enfoque adoptado para la caracterización de los HMA consistió en la aplicación directa en TTGE de los productos de PCR obtenidos para las 6 especies utilizadas con los cebadores antes mencionados. Como se puede observar en la Figura V-20, la separación de los productos de PCR de los distintos hongos utilizados no resultó posible en todos los casos, aún menos cuando se trataba de una mezcla, que podría teóricamente representar una comunidad natural. Dado que la separación de las distintas bandas por el sistema de TTGE se basa en la variación en la secuencia, la alta homología presente entre las regiones NS31/AM1 de *G. coronatum* y de *G. mosseae*, y de *G. constrictum* y *G. viscosum* podría explicar por qué estas especies no se distinguieron en el gel desnaturizante. Por otra parte, la separación parcial de la doble cadena de ADN se inicia desde el dominio donde la temperatura de fusión es la más baja, determinando de esta manera la detención parcial o total de la migración en el gel (Muyzer y Smalla 1998; Muyzer 1999). Como se puede apreciar en la Figura V-21A, la zona con la temperatura de fusión de la doble cadena más baja comprende un segmento prolongado de la secuencia, que comienza aproximadamente a los 240 pb y que se mantiene homogéneo hasta los 590 pb (en sentido 5'-3'), lo que podría explicar el hecho de que la detención de la migración se produzca para todas las especies analizadas en una región próxima en el gel desnaturizante.

En el estudio realizado por Kowalchuk y colaboradores (2002), la misma región de *G. mosseae*, *G. clarum* y *Glomus* sp. por DGGE, una técnica que trabaja con el mismo principio que TTGE, demostraba que estas especies presentaban un perfil distinguible de DGGE, aunque las diferencias observadas en la migración de las bandas eran muy pequeñas, observándose estas diferencias en mayor medida entre géneros y levemente entre las diferentes especies estudiadas del género *Glomus*. En un estudio posterior, Öpic y colaboradores (2003) también observaron que el análisis por DGGE de la región ribosomal NS31/AM1 permitió la discriminación de géneros de HMA, pero no siempre de especies.

Esto hizo necesaria la búsqueda de un dominio que presentara mayor variación en la secuencia y que produjera, por tanto, mayores diferencias en las temperaturas mínimas de fusión. Posterior al alineamiento de un elevado número de secuencias de la zona NS31/AM1, tanto propias de este estudio como de la base de datos, se encontró una zona conservada que permitió el diseño de un nuevo cebador, Glo1 (Figura V-22), que amplificaba una región de aproximadamente 270 pb cuando era usado con el cebador NS31-GC, y que sí presentaba mayores diferencias en las temperaturas de fusión en el dominio final de la secuencia para los distintos HMA (Figura V-21B), ya la vez que permitía una clara diferenciación ente los perfiles de los HMA utilizados (Figura V-23). Para esto, se hizo necesaria la optimización de PCR-nidada, que tal como se ha utilizado aquí, combina la especificidad (relativa) para HMA del cebador AM1 (Helgason et al. 1998) con el poder de resolución en los geles desnaturalizantes del sistema GC-NS31/Glo1. Sin embargo, debe ser tenido en cuenta que aunque el cebador AM1 permitiría la discriminación de HMA respecto de otros tipos de hongos, las secuencias de varios HMA o emparentados a éstos, tales como *Acaulospora gerdemannii*, *Geosiphon* y *Paraglomus* no se amplifican con este cebador (Schüßler et al. 2001). Por lo tanto, el enfoque presentado puede no ser útil para la identificación de estos particulares y ancestrales HMA.

Por otra parte, algunos estudios recientes demuestran que el cebador AM1 no amplifica estrictamente sólo la subunidad 18S ADNr de HMA. Como ejemplo de esto, Douhan y colaboradores (2005), realizando un estudio con los cebadores NS31-AM1 y posterior secuenciación para la identificación de HMA in planta en tres comunidades vegetales, encontraron que en raíces de *Quercus douglasii* la mayoría de los clones obtenidos eran de hongos no micorrícicos. En un estudio BLAST de la secuencia del cebador AM1 con otras especies de distintos ordenes de hongos, encontraron sólo leves diferencias respecto a HMA en la zona de unión del oligonucleótico a la subunidad 18S DNAr. Heinemeyer y colaboradores (2003), por su parte, utilizando el mismo par de cebadores, obtuvieron 10 secuencias correspondientes a *Glomaceae* y *Gigasporaceae*, además de otras tres secuencias correspondientes a la subunidad 18S del gen DNAr de hongos ascomicetos. En el presente estudio, en determinadas ocasiones se pudo encontrar dos bandas al realizar el análisis de TTGE para *G. intraradices*, encontrándose alta homología de una de ellas con *Capnobotryella* sp., un hongo ascomiceto (dato no mostrado).

EL perfil obtenido para *G. viscosum* (Figura V-23, línea 6), por otra parte, presenta 4 bandas, lo que podría representar algún tipo de contaminación por otro hongo

(micorrízico o no). No obstante, la secuenciación de cada una de las bandas obtenidas mostraba una alta homología con la secuencia presente para este aislado en particular en la base de datos, con valores superiores al 98% en todos los casos (datos no mostrados). Esto sugiere que las diversas bandas presentadas por *G. viscosum* representan la variabilidad genética entre las copias del gen de DNAr descritas en ciertos HMA (Sanders et al. 1995).

El umbral de detección de esta técnica, aplicada a la diferenciación de diversos HMA, fue determinado en una primera aproximación partiendo de un número variable de esporas de HMA de *G. clarum* y *G. coronatum*, y posteriormente a partir de cantidades variables de ADN genómico de los hongos mencionados (Figura V-24). Por las dificultades que tiene encontrar una relativa homogeneidad entre los contenidos de material genético entre esporas, por la propia viabilidad de cada espora, por su número variable de núcleos (Bécard y Pfeffer 1993; Giovanetti y Gianinazzi-Pearson 1994; Hosny et al. 1998a), y finalmente por su contenido variable de ADN (Hosny et al. 1998a), la aproximación realizada utilizando diferentes cantidades de ADN genómico resulta más acertada. Además, puede presentar una mayor uniformidad al comparar la cantidad relativa de HMA en una comunidad, como puede ser el interior de una raíz, en la que generalmente no se encuentran las estructuras de resistencia. En este sentido, se mostró que cuando una especie representaba el 1% o menos del ADN genómico total, se registraba la ausencia de detección por TTGE.

Aplicado a este estudio, como se puede apreciar en las Figuras V-28 y V-30, sólo fue posible la detección mediante TTGE de *G. clarum* y *G. coronatum* en las raíces durante las primeras etapas. En general, coincidió que aquellas asociaciones vegetales en que fue posible la detección de estas especies era donde se presentaba una mayor densidad de esporas de éstas especies en el suelo. Además, la no detección posterior a primavera de 2003 se asoció con un descenso brusco y generalizado de las densidades de esporas de estas especies.

Respecto de las densidades específicas que presentaban las antes mencionadas especies de HMA (Figura V-27), es posible observar que en todo momento fue muy baja, por debajo de 10% en el caso de *G. clarum* en la temporada desde otoño de 2002 a primavera de 2003, y menos de 20% en *G. coronatum* en igual período. Posteriormente, sus densidades se redujeron, hasta desaparecer de las comunidades de HMA en el suelo. Es posible por tanto que aún representando un nivel mayor al 1% de la comunidad de esporas, su contribución al conjunto génico de HMA en la raíz no alcanzase ese nivel. Algo parecido se podría haber presentado en el caso de *G. mosseae* y *G. viscosum*,

especies que fueron detectadas a lo largo de todo el estudio, pero de forma desigual y en pocas asociaciones cada vez. En el caso de *G. constrictum* es posible realizar su detección en todo momento y casi en la totalidad de tratamientos, hecho que concuerda con sus altas densidades de esporas en el suelo, así como sus crecientes densidades específicas (D_i). Algo similar ocurre con *G. intraradices*, aunque en este caso los niveles poblacionales en suelo (densidad de esporas) son varias veces menores a los presentados por *G. constrictum*. Su recurrente detección podría verse justificada por el hábito de crecimiento que presenta esta especie en particular, capaz de formar estructuras de resistencia al interior de la raíz en un alto número. Estas estructuras habrían servido de reservorio de material genético, lo que podría haber ocasionado que al realizarse la extracción de ADN genómico desde la raíz, la proporción relativa de las demás especies en el extracto crudo (a excepción de *G. constrictum*) se encontrase por debajo del umbral de detección por TTGE.

La cuantificación de cada hongo, y su contribución proporcional a la comunidad de HMA al interior de la raíz, podría en teoría realizarse mediante la aplicación de PCR cuantitativa, aunque pocos estudios referidos a este tipo de hongos y su diversidad han sido realizados hasta el momento. Por otra parte, los estudios que se han realizado no comprenden el estudio de comunidades complejas de HMA. Como ejemplo de esto, Fillion y colaboradores (2003), utilizando cebadores específicos de los hongos del suelo *Fusarium solani* y *G. intraradices*, fueron capaces de detectar y cuantificar su presencia utilizando un fragmento de SSU rDNA. Los cebadores utilizados para *G. intraradices* fueron G_{lfor} y G_{lrev}, que producen un fragmento de 362 pb cercano al extremo 3' de SSU rRNA. En el intento de encontrar cebadores específicos de las especies utilizadas en este estudio para su cuantificación en raíz, los cebadores antes mencionados fueron alineados conjuntamente con numerosas secuencias de diferentes especies de HMA, encontrándose que eran complementarios no sólo a las secuencias de *G. intraradices*, sino de muchas otras especies del género *Glomus* (datos no mostrados).

Otra aproximación en el intento de diseñar cebadores específicos para los HMA utilizados en este estudio comprendió el análisis de secuencias completas de la SSU rDNA, encontrándose sólo leves diferencias en las secuencias nucleotídicas que dificultó su diseño. Isayenkov y colaboradores (2004) también utilizaron RT-PCR para la cuantificación de *G. intraradices* colonizando raíces de *Medicago truncatula*. Encontraron que existía una alta relación entre los niveles de colonización micorrícica y las cantidades relativas de rRNA/rDNA. Utilizaron para la amplificación del hongo los cebadores GLOM-RNSF/GLOM-RNSR, que amplifican una zona diferente del gen ribosómico, que incluye

regiones de la subunidad 5.8S y de ITS. En este sentido, el diseño de cebadores específicos puede requerir el análisis de regiones más variables de rDNA, como en la subunidad 25S rDNA o ITS. No obstante, la secuenciación de la zona LR1/LSU0805 de la subunidad 25S del gen DNAr de los hongos utilizados en este estudio demostró la presencia de polimorfismos que dificultaron el diseño de cebadores específicos, aunque actualmente se continúa por esa línea. Este enfoque sí podría ser útil para la resolución de diversos aislados de una misma especie de HMA (Kowalchuk et al. 2002; van Tuinen et al. 1998; Kjoller y Rosendahl 2000), puesto que como se observa en la Figura V-25, diferentes aislados de una misma especie de HMA analizados mediante la utilización de la zona NS31/Glo1 por TTGE, no presentaron perfiles que permitieran su diferenciación.

Por otra parte, el nivel de diversidad reproducido en este estudio, podría ser considerado bajo si lo comparamos con la diversidad descrita en algunos estudios, en general en agroecosistemas como praderas o bosques tropicales. Como ejemplo de esto Eom y colaboradores (2000), trabajando con cinco especies herbáceas, encontraron hasta un total de 16 morfotipos de esporas de HMA, y Mangan y colaboradores (2004), estudiando sistemas de bosques tropicales, tanto en islas como en suelos continentales en Panamá, encontraron hasta un total de 27 morfotipos de esporas de HMA. No obstante, en otro tipo de ecosistemas, los niveles de diversidad (medido como riqueza de especies o morfotipos) puede llegar a ser considerablemente menor. En suelos contaminados con productos químicos provenientes de una planta de fertilizantes, por ejemplo, Renker y colaboradores (2005) encontraron un total de 6 especies, todas pertenecientes al género *Glomus*. Carvalho y colaboradores (AÑO), estudiando suelos pantanosos del estuario del Tajo, encontraron una riqueza de 4 especies. En ambientes mediterráneos, como el aquí simulado, la diversidad natural encontrada puede ser todavía menor, encontrándose comunidades que normalmente se componen de unas 5-6 especies (Atkinson et al. 2002; Calvente 2003; Ferrol et al 2003), o incluso menos en suelos afectados con procesos de desertificación, como el caso del trabajo realizado por Palenzuela y colaboradores (2002), quienes encontraron sólo 3 especies de HMA en un ecosistema semiárido del sureste de España (Murcia).

En tal contexto, el nivel de diversidad de la comunidad inicial de MA utilizada aquí concuerda con los niveles descritos en ecosistemas similares. Además, el hecho de que las comunidades estén compuestas en este tipo de ambientes básicamente por especies del género *Glomus* se explicaría por la menor capacidad de adaptación que presentan otros géneros de HMA, tales como *Gigaspora* o *Scutellospora* (Morton et al. 1995; Clapp

et al. 2002). A pesar de esta aparente baja diversidad taxonómica, Munkvold y colaboradores (2004), estudiando la diversidad funcional inter e intraespecífica de cuatro especies de HMA del género *Glomus* (*G. mosseae*, *G. claroideum*, *G. caledonium* y *G. geosporum*), encontraron que la gran diversidad intraespecífica en el crecimiento del micelio en las distintas especies, y la mejora en la captación de P observada puede significar que, aun cuando exista una comunidad de HMA con una baja diversidad de especies, esta puede representar una importante heterogeneidad funcional.

A pesar de encontrarse diferencias estadísticas significativas entre los distintos tratamientos, tanto a nivel puntual durante una etapa en particular del estudio, así como de forma global, los estudios realizados respecto de la influencia de la utilización de distintas especies de plantas naturales de la región Mediterránea, así como las distintas asociaciones posibles de éstas, no produjeron cambios de gran magnitud, primero en la composición, y luego en la estructura de las comunidades de HMA (ver Figura XXXX), tanto en las raíces como en el suelo. Esto es considerando que en todas las asociaciones la especie dominante resultó ser *G. constrictum*, que se encontraban poblaciones de *G. intraradices* en cantidades significativas, que tanto *G. mosseae* como *G. viscosum* representaban una pequeña proporción de la comunidad de HMA formada, y que en todos los casos, y aproximadamente al mismo tiempo, desaparecían las poblaciones tanto de *G. clarum* como de *G. coronatum* (Figura V-18).

Respecto de este comportamiento observado, numerosos trabajos previos han evaluado el efecto de las comunidades vegetales sobre las comunidades de HMA, tanto en suelo como en planta, bajo distintas ubicaciones espaciales y usos del suelo, demostrando que al parecer estas variables poseen una mayor injerencia en la diversidad de HMA, los tamaños de sus poblaciones, y la forma en que se estructuran sus comunidades (Carvalho et al. 2001; 2003; Husband et al. 2002; Jansa et al. 2002; Cousins et al. 2003; Mangan et al. 2004; Oehl et al. 2004; 2005; Cázares et al. 2005). Dado que en este estudio las condiciones del suelo eran homogéneas en todos los casos, y que las propias características intrínsecas de los distintos HMA pueden determinar su mayor o menor adecuación a éste, antes que una mayor especificidad respecto de las diferentes plantas estudiadas, se podría explicar el hecho de que en todos los tratamientos analizados se encontrasen comunidades relativamente similares.

No obstante, a pesar de lo anterior, numerosos estudios han demostrado una fuerte influencia de las distintas especies de plantas, así como de distintos niveles de

diversidad vegetal sobre la composición y la estructuración de las comunidades de HMA (Eom et al. 2000; Burrows y Pflieger 2002; Liu y Wang 2003; Gollote et al. 2004; Scheublin et al. 2004; Mummey et al. 2005), para lo cual se sugieren como mecanismos de cambio los diferenciales grados de especificidad entre las distintas especies de plantas y HMA en el ecosistema, así como la modificación de las comunidades de HMA presentes en una planta por la presencia de una planta ajena.

Es de considerar que este último mecanismo puede ser una estrategia de colonización de un nuevo ambiente por una planta alóctona (Mummey et al. 2005). De cualquier forma, en este estudio, la comprobación de las comunidades particulares de HMA formadas al interior de las raíces de las distintas plantas en asociación, por los objetivos propuestos y la metodología definida para conseguirlos, no ha sido posible, puesto que la identificación específica de la raíz obtenida sólo era posible en los tratamientos no asociados, siendo en tales casos, bastante similares las diferentes comunidades formadas, tanto en la raíz como en el suelo. Por otra parte, tampoco se encontró una relación directa (ni positiva ni negativa) entre el nivel de diversidad de HMA, ni en raíz ni en suelo, al aumentar la diversidad de la cubierta vegetal. Es de resaltar, sin embargo, que el máximo nivel de riqueza de especies en la cubierta vegetal en este estudio es 4, y que los demás niveles son 2 y 1, muy reducido comparado, por ejemplo, con los niveles de diversidad vegetal que analizaron Burrows y Pflieger (2002), quienes alcanzaron niveles de riqueza de especies en la cubierta vegetal de hasta 16, lo que les permitió encontrar una dependencia lineal de la diversidad de HMA por efecto de una mayor diversidad en la cubierta vegetal.

En esta temática, interesantes estudios se han llevado a cabo para analizar el efecto de la diversidad de las comunidades de HMA sobre la diversidad y estructura de la cubierta vegetal, entre los que destacan los estudios de van der Heijden et al. (1998a; b). En estos estudios, se puso de manifiesto que la diversidad de HMA en suelo y la composición de sus comunidades era un factor que podía influir significativamente sobre la diversidad y estructura de las comunidades vegetales. Esto se apreciaba a nivel de plantas individuales, registrándose importantes especificidades entre hongo y hospedero. Además, Se observó que el aumento de la diversidad de HMA en el suelo influía positivamente sobre la diversidad de plantas, la captación de nutrientes y la productividad del ecosistema. En tal caso, se podría considerar que el objetivo general propuesto en el presente estudio, es en el sentido contrario al propuesto en los estudios anteriores, puesto que lo que se analizó fue justamente el efecto de una comunidad vegetal de composición fija y estable en el tiempo, sobre las comunidades de HMA que

previsiblemente variarían por efecto del tiempo transcurrido, como por efecto de las distintas composiciones de la cubierta vegetal.

A pesar de no encontrarse una especificidad cerrada, entre una(s) determinada(s) especie(s) de planta y otra (s) de HMA, sí se ha encontrado una especificidad entre las plantas y sus asociaciones, con una comunidad de HMA en particular, la que se encontró de forma general en todos los tratamientos (quizá con la excepción de Retama no asociada). En otros estudios similares se ha hecho referencia a la especificidad existente entre distintas especies de plantas y determinados HMA, observándose que las distintas asociaciones planta-HMA establecidas podían cambiar la composición fúngica y, de esta manera, producir distintos efectos (feed back) sobre el crecimiento de las distintas especies vegetales (Bever 2002a; b). Se demostró que cada especie de planta modificaba la composición inicial de la comunidad fúngica, efecto que era resaltado en una segunda generación utilizando como inóculo la misma comunidad establecida al final del primer ciclo, demostrando que la composición de las comunidades de esporas remanentes refleja la especificidad respecto a las plantas utilizadas. Tal cual se ha observado en este estudio, la composición de la comunidad de HMA inicial era cambiada, lo que sugiere que las especies de HMA de las cuales se compuso al final de cada ciclo, son las que presentan una mayor especificidad con el o los hospederos utilizados. Por otra parte, las comunidades de HMA formadas en los tratamientos inoculados en este estudio parecieron acrecentar ese efecto de retroalimentación positiva sobre el crecimiento, si se lo compara con el alcanzado por las plantas en el suelo natural no inoculado.

Por otra parte, en el caso de Retama sola se observaron diferencias en la estructura de la comunidad de HMA obtenida, que se presentaron por las diferenciales densidades poblacionales de las distintas especies de hongos, sobre todo en suelo (Figura V-18 y Tabla V-2). Estas diferencias se debieron básicamente al menor tamaño poblacional de *G. constrictum* asociada a esta especie vegetal, probablemente relacionado a los menores crecimientos presentados por esta especie. No obstante, los tamaños de las demás especies de HMA se mantuvieron constantes, o incluso fueron significativamente mayores que en el resto de asociaciones vegetales, como el caso de *G. intraradices* y *G. mosseae*, que repercutieron en que las comunidades de HMA formados en este tratamiento en particular tuviesen mayores niveles de estructura, presentando mayores índices de estructura, al igual que altos índices de riqueza de especies, y bajos niveles de dominancia (Figura V-35). No obstante, en las asociaciones que incluían Retama las comunidades presentaban estructuras similares a las que

presentaban las plantas acompañantes (a la Retama) cuando se presentaban solas, lo que demostraría la mayor influencia de éstas sobre la selección de los HMA que componen la comunidad, probablemente dado por las mayores densidades radicales en suelo, comparado a la presentada por Retama. Por lo anterior, es probable que en el caso particular de este estudio, la especificidad hongo-hospedero se hubiese presentado a nivel de familia botánica. Probablemente, las propias adaptaciones de las distintas especies de HMA al sistema simulado, la selección por especificidad discutida con anterioridad, o la homogeneidad botánica de las plantas estudiadas condicionaron un estatus homogéneo en la composición de las comunidades micorrícicas, aún a niveles crecientes de diversidad vegetal. En este sentido, Landis y colaboradores (2005a; b), encontraron que la principal componente que determina la estructura de las comunidades vegetales está más relacionada con la propia competencia que puedan presentar las especies vegetales al estar combinadas, que por la composición de la comunidad de HMA. Rosendahl y Stukenbrock (2004), estudiando por secuenciación los productos obtenidos por PCR-nidada de la región LSU rDNA desde raíces de un pastizal no modificado, encontraron hasta un total de 11 conglomerados conteniendo individuos relacionados al género *Glomus*, de los que cuatro contenían especies conocidas. El estudio se realizó periódicamente desde mayo a noviembre, no registrándose diferencias en las comunidades atribuibles al cambio temporal, encontrándose además en una raíz individual buena parte de la diversidad total de una zona de estudio. Este comportamiento también se observa una composición homogénea de las comunidades independientes del tiempo desde el segundo ciclo anual, momento en el que desaparecen *G. clarum* y *G. coronatum*. Este efecto de exclusión por competencia puede haber sido determinante de la homogeneidad de las comunidades, la que no se presentó durante el primer ciclo anual, cuando las proporciones relativas de estas especies de hongos llegó a ser significativamente alta en determinados momentos, especialmente invierno y primavera de 2003.

Como se puede desprender de los resultados obtenidos, parece haber tenido mayor injerencia en la conformación de las comunidades de HMA definitivas la propia capacidad adaptativa del hongo, o su capacidad competitiva interespecífica. Sobre todo este último aspecto parece ser el principal responsable de la estructuración de las comunidades de HMA, ya que, como se puede observar en la Figura V-27 y en las Figuras V-28 a V-33, el aumento poblacional que presenta *G. constrictum* se asocia temporalmente con la variación de las poblaciones de *G. clarum* y *G. coronatum*,

presentando un crecimiento sostenido a tasas reducidas hasta otoño de 2003, etapa en la que desaparecen de la comunidad de HMA en el suelo tanto *G. clarum* como *G. coronatum*. Con posterioridad a esto, las poblaciones de *G. constrictum* aumentan significativamente, alcanzando niveles 2-3 veces superiores a los presentados durante la primera mitad de este estudio. Los niveles de las demás especies estudiadas no se vieron afectados significativamente por los cambios en las poblaciones de las tres especies antes mencionadas. En otros dos estudios, realizados en condiciones naturales en ecosistemas degradados de la Cuenca Mediterránea similares al sistema de mesocosmos aquí simulado, también se encontró que la principal especie constituyente de las comunidades de HMA era *G. constrictum* (Palenzuela et al. 2002; Azcón-Aguilar et al. 2003). Esto podría deberse a dos motivos distintos y bastante contrapuestos. El primero sería una lógica mejor adaptación a este tipo particular de ambientes por parte de esta especie de hongo, así como una mayor especificidad con las especies de plantas estudiadas, representantes comunes de este tipo de ecosistemas. Otras especies de HMA adaptados a ambientes estresados, como suelos salinos (Landwerh et al. 2002) y suelos contaminados con metales pesados (del Val 1999) han sido reportados. El otro motivo podría justificarse por la falta de especificidad de este HMA por un hospedero en particular. Similares resultados obtuvieron Stukenbrock y Rosendahl (2005c), quienes utilizando PCR-nidada en la subunidad 25S del gen rDNA, estudiaron la ocurrencia de HMA pertenecientes al género *Glomus* en raíces de 5 especies vegetales, encontrando que las secuencias obtenidas para un conglomerado mayoritario eran detectadas colonizando mayoritariamente todas las especies vegetales, demostrando que esta especie demuestra una clara ausencia de especificidad.

Probablemente la habilidad adaptativa y competitiva de *G. constrictum*, o su falta de especificidad, contribuyeron a que no se presentara un cambio estacional significativo en la estructura de las comunidades de HMA (Figura V-34). Sólo se presenta una variación apreciable en la temporada invierno-primavera de 2003, ocasión en que aumentó significativamente la densidad poblacional de casi todas las especies de HMA en suelo, que repercutió en que se pudiese encontrar consistentemente el máximo de riqueza de especies de HMA (6), al igual que altos valores de equidad y bajos niveles de dominancia, debido a la proporción equilibrada de las diferentes poblaciones. Con posterioridad a esto, los valores de los índices se estabilizaron, a excepción de la dominancia, que siguió aumentando sus valores a consecuencia de los incrementos en la densidad de esporas en suelo de *G. constrictum*.

Estos resultados, referidos solamente al comportamiento de los distintos hongos en la comunidad (suelo), permitieron definir al menos tres tipos de pautas y/o estrategias en la colonización del medio por las distintas especies de HMA; *i*) especies que presentan una colonización mayoritaria, tanto en el medio intra- como extrarradical, *ii*) especies que presentan una colonización minoritaria, pero que son constituyentes permanentes de las comunidades, y *iii*) especies efímeras, colonizadoras temporalmente restringidas, que pueden presentar una importancia relativa en la comunidad en un momento determinado, pero que finalmente son desplazadas. En la primera pauta se encontrarían aquellas especies con mayores ventajas adaptativas al medio físico, que según algunos estudios previos, podría ser el principal factor determinante de la composición de las comunidades (Mangan et al. 2004). En este caso particular, además de la adaptación propia de *G. constrictum* observada en este estudio y en estudios anteriores en ecosistemas similares al aquí simulado (Palenzuela et al. 2002; Azcón-Aguilar et al. 2003), *G. intraradices* contaría con la ventaja adaptativa de la formación de estructuras de resistencia intrarradicales, protegidas en gran medida de las fluctuaciones ambientales, además de convertirse en una importante fuente de inóculo espacialmente cercana a las raíces sobre las cuales realizar una nueva colonización. En la segunda pauta se encontrarían aquellas especies de HMA menos adaptadas al medio, pero que poseen un grado significativo de especificidad con el hospedero, por lo que pueden realizar la colonización intrarradical de forma permanente, acoplados a los distintos estados fenológicos de éste. En este estudio este comportamiento fue observado en *G. mosseae* y *G. viscosum*. Y en la tercera pauta, se podrían encontrar especies con una menor adaptabilidad al medio y/o con un menor grado de especificidad con el hospedero.

Esto último podría tener bastante lógica si se observa que en esta tercera pauta encontraríamos a los hongos *G. clarum* y *G. coronatum*, el primero de los cuales fue aislado de la rizosfera de plantas de *Olea europea*, y que el segundo fue aislado de un ecosistema desertificado del sudeste de España dominado por la presencia de plantas terófitas. En este caso, la anualidad de las plantas determinaría el cese de las funciones de intercambio propias de la simbiosis, obligando al hongo a desarrollar parte de su ciclo vital totalmente desconectado del sistema radical (en estado latente como estructuras de resistencia). La adaptación a este tipo de comportamiento por parte del hongo podría explicar el cese de su colonización aproximadamente al año del establecimiento, aún habiendo llegado a colonizar, de manera importante en algunos casos, tanto el medio intra- como extrarradical.

Es probable que el descenso de las poblaciones de esporas en suelo posteriores, que se observa de manera acelerada (¡sus poblaciones se reducen casi a cero en una sola estación!) se deba a la germinación generalizada de las estructuras de resistencia y no directamente a la degradación de éstas. Por tanto, el desplazamiento de estas poblaciones se observaría, tal cual se registró en este estudio, en el segundo ciclo anual de crecimiento, y podría deberse a la fuerte competencia espacial que le significa el tener que encontrar un nicho ecológico, que no es el propio, dentro de otros hongos que han estado permanentemente colonizando, y que están más adaptados a este tipo de plantas perennes. Por otra parte, el caso de *G. clarum* podría quedar explicado de igual forma si se considera que el ecotipo fue aislado desde suelo rizosférico de cultivos de olivos en condiciones naturales, y no directamente desde raíces colonizadas de plantas de olivo, por lo que perfectamente puede ser una especie asociada a plantas terófitas acompañantes del cultivo (malas hierbas). Además, para aumentar las poblaciones de los HMA presentes en el suelo natural mediante cultivos trampa, se utilizaron como plantas hospederas *Sorghum bicolor* y *Allium porrum* (Calvente 2003), ambas especies herbáceas anuales. Tampoco es probable que se deba a un aporte diferencial de propágulos infectivos iniciales, puesto que del total de propágulos aportados, *G. coronatum* representa el 46% del total (Tabla IV-5).

A mayor escala, probablemente se hubiese podido encontrar indicios de una separación espacial de las distintas especies de HMA. No obstante, estas diferencias espaciales en colonización se han visto básicamente a nivel de distintas familias de HMA, siendo los miembros de la familia Glomaceae los más rápidos en colonizar las raíces y el suelo, y en el extremo opuesto se encuentran miembros de la familia Gigasporaceae y Acaulosporaceae (Hart y Reader 2002a; b; Klironomos y Hart 2002; Cano y Bago 2005).

Otro tipo de estrategia, que podría haber permitido la aparición de las especies que presentaron un menor tamaño poblacional, o que desaparecieron podría haber sido la separación temporal del crecimiento en el suelo de ellas. Como ejemplo de esto, Pringle y Bever (2002), estudiando el comportamiento de dos especies de HMA en una empastada, *Acaulospora colossica* y *Gigaspora gigantea*, encontraron que presentaban una separación espacial y temporal, formando agregados de pequeño volumen por una parte, y siendo *A. colossica* preferentemente esporuladora en la estación cálida, al contrario de *G. gigantea*, que esporulaba en la estación fría. Esto podría promover la diversidad en las comunidades de plantas, debido a las asociaciones específicas establecidas entre distintos hongos con determinadas plantas, que presentan un desarrollo fenológico diferencial. En el presente estudio, sin embargo, no se registró la

separación temporal, aún cuando algunos aspectos fenológicos de las plantas eran variables según la especie, como fue el caso de la floración (Figuras V-7 a V-10). Según los resultados obtenidos, y en base a lo discutido con anterioridad, las especies dominantes no presentaron una estacionalidad en cuanto a su expresión intra- y extrarradical, presentándose en todo momento en densidades considerables en el suelo, y colonizando las raíces en todas las asociaciones estudiadas. El efecto competitivo pudo haber sido el desencadenante final de que no se realizase un segundo ciclo de colonización por parte de las especies de HMA que desaparecen de la comunidad, aún cuando en el primero sí parece haberse mostrado esta característica (mayores densidades poblacionales en suelo en primavera, tanto en *G. clarum* como en *G. coronatum*).

A pesar de no encontrarse una tendencia clara en la estacionalidad por parte de las comunidades de HMA formados, sí se encontraron tendencias estacionales respecto de la expresión de los distintos componentes fúngicos tanto en suelo como en raíz (ver Figuras V-13 y V-15). Se pudo encontrar que aunque el micelio total de HMA en suelo no sufría cambios bruscos, y su crecimiento se producía a tasa decrecientes en el suelo, el micelio vivo sí presentaba una marcada estacionalidad, aumentando sus tasas de crecimiento en las temporadas de primavera y otoño. Por su parte, en términos generales, la proporción de raíz colonizada por HMA, así como la densidad resultante, presentaban mayores incrementos hacia las temporadas de invierno y verano. En estudios previos también se ha encontrado estacionalidad respecto de las densidades de los diversos componentes fúngicos de la simbiosis. Por ejemplo, Kabir y colaboradores (1997), estudiando el efecto de distintos tipos de labranza de suelo (labranza convencional, labranza reducida y cero labranza) y la estacionalidad climática sobre la densidad de hifas fúngicas extrarradicales y la colonización intrarradical, encontraron fuertes variaciones estacionales, presentándose los mayores niveles de colonización intrarradical y densidad de micelio total y activo durante la estación estival, y los menores niveles en primavera y otoño. Bohrer y colaboradores (2004), trabajando con diferentes especies de zonas pantanosas a lo largo de siete meses, encontraron que los niveles de colonización en este tipo de plantas eran dependientes de la época en que se analizaba, siendo mayores los niveles de colonización en la temporada de primavera, y menores hacia finales del verano. Además, al ser independiente de los diversos factores abióticos analizados, concluyeron que las variaciones de los niveles de colonización son dependientes de la fenología de las plantas, siendo mayores en temporadas de mayor

crecimiento radical y de crecimiento vegetativo. Carvalho y colaboradores (2001), también encontraron una variación temporal de la micorrización, relacionándola con el estado fenológico de las plantas, siendo las colonizaciones mayores hacia finales de otoño, y la esporulación mayor en invierno. Routsalainen y colaboradores (2002), analizando la estacionalidad de la colonización micorrícica y por DSE en seis especies de plantas herbáceas de prados bajo-alpinos, encontraron que la variación en la colonización micorrícica era dependiente de la especie vegetal, presentando algunas especies altas colonizaciones en épocas específicas (eg. *Ranunculus acris* en verano), en tanto otras presentaban bajos niveles en la misma época (eg. *Trollius europaeus* también en verano). Heinemeyer y colaboradores (2003) encontraron que en verano se producían los mayores niveles de colonización micorrícica, mientras que los mayores niveles de colonización no micorrícica se registraban en otoño. Por otra parte, el análisis molecular, utilizando NS31/AM1, reveló cambios estacionales de las comunidades de HMA.

Como se puede observar, no existe concordancia respecto de la época del año en que se producen los mayores niveles de expresión de la colonización por parte del hongo, tanto del medio intra- como extrarradical. En este estudio, sin embargo, el estudio fue a largo plazo, y permitió corroborar las observaciones realizadas en tres años consecutivos, sobre plantas perennes. Quizá por esto, el estado fenológico de las plantas tiene efectos menores sobre los parámetros de crecimiento del HMA. En todo caso, resulta lógico el comportamiento observado, en que bajo condiciones térmicas más adecuadas al desarrollo y funcionamiento de la simbiosis, el componente extrarradical presente un incremento, sobre todo en su fracción metabólicamente activa. Por el contrario, las mayores proporciones y longitudes de raíz colonizada en los períodos invernal y estival, puede resultar en una ventaja adaptativa, quedando el micosimbionte más protegido en la matriz radical en épocas con condiciones, sobre todo térmicas, más severas.

El comportamiento observado en la estructura de las asociaciones vegetales por parte de las distintas especies vegetales utilizadas parece ser debido a causas ajenas a la conformación de las comunidades de HMA. Entre estas causas podemos contar, además de la probablemente diferencial adecuación al medio edáfico utilizado, las propias interacciones de las especies entre sí, y las interacciones con la flora microbiana no micorrícica, parámetro este último no evaluado. Como se puede observar en las Figuras V-5 y V-6, se produjo una fuerte influencia de la asociación vegetal sobre el

crecimiento de cada una de las plantas en la asociación (medido como la superficie de suelo cubierta). Estos efectos fueron tanto de tipo sinérgico como deletéreo. En general, se observa que todas las plantas cuando se encontraron asociadas a Romero sufrieron una considerable reducción en su crecimiento. En numerosos estudios se ha puesto de manifiesto la elevada concentración de aceites esenciales en esta especie (Angelini et al. 2003; del Baño et al. 2003, 2004; Angioni et al. 2004; Moreno et al. 2005; Peng et al. 2005), muchos de cuyos componentes presentan actividad de diversos tipos, principalmente antioxidante (del Baño et al. 2003, 2004; Moreno et al. 2005; Peng et al. 2005), alelopáticos, inhibiendo la germinación de numerosas especies de plantas (y tal vez su crecimiento posterior, como en este caso) (Angelini et al. 2003), y antimicrobianas, inhibiendo el crecimiento de numerosos grupos bacterianos (Santoyo et al. 2004; Moreno et al. 2005). Es necesario considerar la actividad como PGPR y como PS que presentarían muchas de las especies afectadas por la actividad antimicrobiana de los componentes de los aceites esenciales de Romero. Estos efectos podrían ser causa, directa o indirecta, del efecto deletéreo en la cobertura expresada por las plantas acompañantes en las asociaciones que contienen romero.

Por el contrario, se observaron efectos sinérgicos en la asociación de Lavanda y Mejorana, (Figura V-6A y V-6B). Este efecto podría también estar mediado por un incremento en las poblaciones de microorganismos beneficiosos en el sustrato. Respecto de esto, Vokou y colaboradores (2000), encontraron que los aceites esenciales de *Lavandula stoechas*, así como su principal componente por separado, fenchona (49%), eran capaces de aumentar considerablemente la respiración del suelo (al triple), así como el tamaño de las poblaciones de microorganismos del suelo (tres órdenes de magnitud). A pesar de esto, la especie particular de HMA pareciera ser preponderante antes que la especie vegetal en la composición de las comunidades bacterianas asociadas tanto a las esporas, como a los demás componentes de la fase extrarradical del HMA (Marschner et al. 2001; 2003; Frank et al. 2003; Roesti et al. 2005; Toljander et al. 2006).

Las asociaciones con Retama, en el caso de Lavanda y Mejorana, produjeron un aumento de la superficie de cobertura por parte de estas plantas. Moro y colaboradores (1997), analizando el efecto de la cobertura vegetal de retama sobre el establecimiento y crecimiento de plantas de cebada en diferentes posiciones bajo los arbustos, encontraron que los mayores beneficios en crecimiento se encontraban a un punto medio entre la zona más próxima a retama y la zona más alejada, que pudo ser debido al mayor aporte de residuos y nutrientes (como puede ser el N fijado, producto de la simbiosis con *Rhizobium*). Por estas razones se define a este tipo de arbustos como "isla de fertilidad",

puesto que puede promover el establecimiento y desarrollo de otras plantas, generando de esta manera una mayor protección de suelo, incrementando sus tasas de recuperación y facilitando la sucesión vegetal consecuente. Por estas razones, su utilidad en programas de recuperación de ecosistemas degradados puede tener un significativo impacto positivo, asociada a otras plantas propias de la sucesión vegetal, ya que potenciará su crecimiento. En este estudio, los valores de cobertura de suelo presentados por Retama no fueron especialmente altos (Figuras V-5 y V-6C), pero las superficies de cobertura unitarias presentadas tanto por Lavanda como por Mejorana asociadas a Retama prácticamente se duplicó (Figuras V-6A y V-6B), duplicándose también el efecto protector unitario por parte de estas especies vegetales. No obstante, Retama no presenta esa elevada capacidad de protección de suelo, lo que puede estar fuertemente condicionado por su arquitectura, con ramas largas y angostas, y muchas veces carentes de estructuras foliares verdaderas. Aún así, el efecto promotor del crecimiento en sus especies asociadas justifica con creces su utilización.

Las demás componentes de crecimiento analizadas presentaron un comportamiento similar al presentado por la cobertura (Figuras V-7 a V-10 y Tabla V-1). En las cuatro especies, la longitud de las plantas siguió el mismo patrón presentado por la evolución de la cobertura específica. En Retama resulta claro el efecto deletéreo de la asociación con las especies de plantas utilizadas, reflejado en un brusco descenso, desde el primer momento, tanto de su longitud total como del número de sus ramificaciones, produciéndose incluso su desaparición en la asociación con Romero. Aún así, el efecto beneficioso otorgado a las plantas con las que se asoció, en particular Lavanda y Mejorana, justifica su incorporación en los sistemas, sobre todo si se considera que las primeras etapas del establecimiento de las plantas, sobre todo en este tipo de ecosistemas inestables, pueden ser las que definan su posterior éxito e incorporación en la comunidad vegetal. Por otra parte, se presentaron importantes diferencias en el número de flores/inflorescencias en las especies en las que se presentaron, siendo tanto en el caso de Lavanda como de Mejorana, muy influido por la planta con la que se asocia. La asociación con Retama en ambas especies incrementó significativamente el número de inflorescencias, lo que representa una ventaja ecológica importante de tener en cuenta, porque se estaría viendo incrementado el potencial de dispersión de estas especies, con todas las ventajas que podría presentar este aumento de la densidad vegetal en ecosistemas degradados y/o desertificados.

Como se puede observar de las relaciones establecidas entre los distintos componentes analizados del hongo y las características del suelo (Tabla V-3 y Figura V-37), de forma global se establecen una serie de relaciones, que pueden reflejar la injerencia que ha tenido en este estudio el desarrollo de la comunidad de HMA en el suelo y en las raíces de las plantas. Entre esos efectos beneficiosos, atribuibles al crecimiento fúngico tenemos el descenso del pH, la producción de glomalina, y la formación de agregados estables. Es de destacar, no obstante, que el crecimiento vegetal se relaciona significativamente, y de la misma forma que el desarrollo fúngico, con la mejora global de las condiciones del sustrato (Tabla V-3; Figura V-36), por lo que estos tres conjuntos de variables relacionan globalmente de forma altamente significativa. En primer lugar, podemos observar que aquellos tratamientos en los que más crecieron las plantas son también aquellos en que más se desarrolló el micelio fúngico, y donde menores valores de pH se alcanzan (Mejorana, Romero, Lavanda y asociaciones de ésta. Esto refleja que el descenso de pH es producto de una mayor actividad global del sistema micorriza-planta por efecto del crecimiento de ambos componentes. Es bien sabido que la función de absorción de la raíz es electroneutra, y que dependiendo de la naturaleza catiónica o aniónica del nutriente absorbido el pH de la rizosfera se acidifica o alcaliniza. También es conocida la habilidad de los HMA de modificar el pH del medio de acuerdo a la absorción de nutrientes que realice.

Como ejemplo de lo anterior, Bago y Azcón-Aguilar (1996) encontraron que la formación de la micorriza arbuscular era capaz de producir importantes cambios de pH rizosféricos, mucho más intensos que en plantas no micorrizadas. En este estudio, se observa que aunque debido a diferentes fuentes de N utilizadas (NO_3^- o NH_4^+) el efecto sobre el pH rizosférico es distinto, pero que plantas micorrizadas producen una mayor acidificación terminal (no en etapas prematuras de desarrollo de la raíz) incluso cuando la fuente de N utilizada es NH_4^+ , demostrando que la micorriza es el órgano más activo que la propia raíz en los procesos rizosféricos que inducen los cambios de pH. Además, Bago y colaboradores (2004) demostraron en condiciones monoxénicas que el crecimiento y la morfogénesis del componente extraradical del hongo *G. intraradices* demuestra una alta plasticidad de acuerdo a las condiciones nutritivas del medio (falta o presencia de determinados nutrientes), presentando economías en el desarrollo de algunas estructuras en ambientes con mayores carencias, y un mayor incremento en el desarrollo de estructuras, a la vez que un mayor efecto en el cambio de las condiciones de pH del medio por efecto de la fuente de N utilizada, produciéndose una fuerte alcalinización (de 5.9 a 6.9) cuando el medio fue suplido con NO_3^- . En presencia de NH_4^+ la morfogénesis y desarrollo extraradical del hongo fue fuertemente reducido. Este efecto no se observó en

hongos no asociados, que se desarrollaban a partir de esporas germinadas, lo que sugiere la necesidad del normal funcionamiento simbiótico, con los flujos bidireccionales de nutrientes propios de ésta, para que se produzcan las modificaciones en el pH del sustrato.

Tampoco se observó una relación del descenso del pH con diferencias en cuanto a la esporulación y a la diversidad de HMA. A diferencia de este resultado, Coughlan y colaboradores (2000), encontraron que la acidificación de suelos donde se desarrollaba *Acer saccharum* (maple) producía una mayor esporulación inicial, pero una reducida diversidad taxonómica, aunque el encalado producía una mayor esporulación total de un mayor número de taxa, que incluso podían aparecer estando inicialmente ausentes en el suelo.

Aunque es bien conocido el efecto que tiene la MA sobre la absorción de P en el suelo, en este estudio no se observó una correlación entre el contenido de P disponible en el sustrato y el desarrollo del hongo en el suelo. Presumiblemente, a mayor densidad de hifas se podría haber realizado una mayor movilización de este elemento hacia la planta, y por ende, un mayor descenso de sus niveles en el suelo. No obstante, el descenso fue generalizado y fuerte en todos los tratamientos, que resulta lógico si se piensa que el diseño y funcionamiento del sistema establecido es totalmente cerrado, por lo que los únicos aportes de P al sistema podrían haberse producido desde algún pool menos lábil, como por ejemplo la descomposición de los elementos aéreos, o mineralización.

No obstante lo anterior, quizá el efecto más importante encontrado sea el significativo aumento de la proporción de agregados estables de suelo (en el sustrato), puesto que el suelo original poseía un 25% de agregados hidroestables (ver Tabla 3), y se logró alcanzar al final del estudio entre 58 y 75%. Por otra parte, se presentaron importantes y significativas relaciones entre esta característica edáfica y la densidad del micelio extrarradical del HMA, así como con el crecimiento vegetal, tanto del sistema radical como de la parte aérea de las plantas (Tabla V-3 y Figuras V-36 y V-37). Bethlenfalvay y colaboradores (1996) encontraron que a mayor desarrollo de hifas micorrícicas en el suelo se presentaba una mayor cantidad de agregados estables al agua, en conjunto con menores valores de pH en suelo. Miller y Jastrow (1992) sugirieron que el efecto de los HMA en la agregación del suelo puede ser explicado por tres procesos distintos, pero simultáneos: *i*) crecimiento de las hifas en la matriz del suelo, donde crean el “esqueleto estructural” que enreda físicamente partículas de suelo, *ii*) las raíces e hifas crean condiciones que posibilitan la formación de microagregados de suelo,

y *iii*) las raíces e hifas sujetan como una red los microagregados y pequeños macroagregados, formando agregados mayores. El hecho de haber encontrado relaciones significativas entre este parámetro y la densidad de micelio extrarradical podría estar corroborando estos puntos.

Además de este efecto de entrelazamiento, existen otros mecanismos por los cuales los HMA pueden favorecer la formación de agregados en el suelo, que es mediante la secreción de glomalina. Wright y colaboradores (1996) y Wright y Upadhyaya (1996), fueron capaces de extraer y caracterizar parcialmente esta proteína desde hifas activas de HMA, la cual es producida en cantidades significativas, encontrándola también en grandes cantidades en el suelo, siendo esto último determinado por métodos indirectos, mediante la utilización del anticuerpo monoclonal utilizado para detectar la proteína en las hifas. Entre otras características, esta proteína presenta una alta estabilidad térmica, insolubilidad, y resistencia a la proteólisis, lo que puede ser debido a la glicosilación (es una glico-proteína), por lo que podría ser encontrada en suelo con bastante posterioridad al cese de la actividad de la simbiosis micorrízica (Wright et al. 1996; Wright 2000). Estas características pueden conferir un papel importante a la glomalina como material cementante de las partículas de suelo (Wright y Upadhyaya 1998), siendo otro proceso a tener en cuenta en el papel de los HMA en la estabilización del suelo. Presenta además la capacidad de absorber y estabilizar una serie de compuestos tóxicos y metales pesados, por lo que puede ser utilizada como herramienta para la recuperación de ecosistemas contaminados (González-Chávez et al. 2004). Otros estudios han demostrado también que la relación existente entre el carbono orgánico del suelo y la glomalina es altamente significativa (Borie et al. 2000; Bird et al. 2002), sugiriendo que puede representar una fracción importante de la materia orgánica edáfica. Wright y Upadhyaya (1998) encontraron que todas las fracciones de glomalina obtenidas desde un gran número de suelos de origen y uso distinto (total, fácilmente extractable e inmunorreactiva para las dos fracciones anteriores) correlacionaban de manera altamente significativa y lineal con la formación de agregados estables en suelo, en especial la fracción fácilmente extractable e inmunorreactiva fácilmente extractable.

Por lo anterior, en este estudio se escogió la fracción de glomalina fácilmente extractable (GFE) para analizar el efecto de la densidad del hongo extrarradical sobre la mejora de la estructura del suelo. En términos generales, en este estudio se pudo apreciar que los contenidos de GFE del suelo correlacionaban significativamente con las densidades de micelio extrarradical total, además de con parámetros de crecimiento de la planta. Aunque no en la magnitud esperable, esta variable también correlacionó positiva y

significativamente con la proporción de agregados estables en suelo (Tabla V-3). Cabría esperar que en mayor medida, estos resultados se deban al efecto de las mayores densidades de componentes fúngicos en el sustrato (tanto micelio como GFE), y que el efecto de la planta sea principalmente indirecto, debido a que un mayor crecimiento vegetal puede haber repercutido en un mayor crecimiento fúngico, como lo demuestran las correlaciones obtenidas, así como los resultados del análisis multivariado sobre estos grupos de variables (ver Figura V-39). No obstante, Borie y colaboradores (2000), encontraron que aumentaban los valores de P disponible y total, pH y C orgánico conforme aumentaban los años de cero labranza. También encontraron correlaciones positivas entre carbono orgánico y glomalina total, aunque no se encontró relación entre glomalina y densidad de micelio, así como tampoco con estabilidad de agregados de suelo, sugiriendo que la agregación y estabilización en los suelos estudiados podría estar gobernada por otro tipo de interacciones.

Por otra parte, considerando que la técnica espectrofotométrica utilizada para la cuantificación de glomalina no es específica de este compuesto, importantes interferencias pueden haber propiciado que las relaciones encontradas sean de baja magnitud, pudiendo haberse considerado en la cuantificación buena parte de la proteína microbiana o presente en detritus y exudados radicales. Por otra parte, estudios recientes de Wright y colaboradores (2006), utilizando diferentes métodos de extracción de glomalina total de suelo, encontraron que la glomalina residual en el suelo era dependiente del extractante, siendo pirofosfato el extractante que menor cantidad de glomalina remanente dejaba en suelo, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los distintos extractantes respecto del total de glomalina recuperada. Por esto, puede hacerse necesaria una optimización más profunda, con otros tipos de métodos de extracción y cuantificación de este componente, más selectivos, y que permitan conocer de mejor forma cuáles son sus verdaderas implicancias en procesos de recuperación de ecosistemas degradados.

En relación a la cobertura vegetal, y su relación con los contenidos de glomalina en el suelo, Knorr y colaboradores (2003) encontraron una correlación entre la densidad/diversidad de plantas herbáceas y los contenidos de glomalina en suelo. En este estudio, por el contrario, se registraron los menores niveles de GFE en aquellos tratamientos que presentaban un mayor nivel de densidad/diversidad vegetal, quizá por el mencionado efecto deletéreo que significó la asociación a Romero y la consiguiente menor cobertura vegetal. Respecto a este último punto, Eviner y Chapin III (2002), trabajando con 5 diferentes especies vegetales y una comunidad, encontraron que la

comunidad vegetal (mayor diversidad) no representaba un incremento en la agregación de suelo. La biomasa bacteriana activa si estuvo relacionada con la agregación, no así la longitud radical ni el tamaño de las poblaciones de hongos. Bearden y Petersen (2000) encontraron que la inoculación con HMA en un Vertisol semi-árido, promovió la formación de agregados de suelo estables por efecto del crecimiento radical y las hifas micorrícicas en comparación al mismo suelo pasteurizado, pero no con respecto al suelo no pasteurizado y no inoculado con HMA. En este caso, la comparación puntual entre los tratamientos que soportaron las asociaciones múltiples de plantas (dado que en este caso lo único que cambia es la inoculación con HMA), sí se registró una diferencia significativa entre el nivel de formación de agregados estables, poniendo de manifiesto el efecto beneficioso de la inoculación con HMA del consorcio utilizado. No obstante, cabe señalar que estos dos tratamientos son los que menores niveles de agregación global presentan, por lo que, considerando la relativa homogeneidad de las comunidades de HMA formadas, la formulación de las asociaciones vegetales puede ser un factor de mayor importancia, pudiendo las diferentes relaciones de sinergia/competición afectar la formación de agregados estables de partículas de suelo por diferentes mecanismos, como puede ser un efecto directo del diferencial crecimiento hipógeo o de la posible modificación de las comunidades microbianas.

Comentarios Finales

Como se mencionó con anterioridad, esta tesis posee un carácter finalista, dado su orientación aplicada, esperándose que la simulación realizada pudiese otorgar bases para la incorporación de especies de plantas y de HMA en programas de revegetación en la región Mediterránea. Este aspecto cobra mayor importancia ante los efectos esperables del proceso de cambio climático global sobre los diversos ecosistemas de esta región. En este sentido, las variaciones tanto térmicas como de humedad ambiental condicionarán fuertemente la composición de las comunidades vegetales, siendo a gran escala justamente esas zonas (de transición entre las regiones mediterráneas y eurosiberianas) las más afectadas (Thuiller et al. 2005). Las comunidades de HMA, por su parte, parecen poseer una capacidad adaptativa considerable a cambios graduales en la concentración de CO₂ ambiente, otro de los factores que más influencia presenta en este proceso global (Klironomos et al. 2005). Considerando que las zonas áridas y semiáridas de la Cuenca Mediterránea española se verán muy influenciadas por este

proceso, el estudio del efecto que puedan presentar las distintas asociaciones vegetales factibles de utilizar como herramienta biotecnológica en la recuperación de ecosistemas, tanto en el presente como en el futuro, toma una mayor importancia, puesto que posiblemente afecte de forma diferencial a las comunidades de microorganismos asociados a estas comunidades vegetales, y produzcan también diferenciales efectos sobre las características físico-químicas del suelo. Cabe señalar, que este estudio es uno de los primeros en estudiar, en condiciones piloto, distintas asociaciones vegetales propias de áreas mediterráneas, y su utilización con vistas a estabilización de ecosistemas degradados por medio de la utilización de otra herramientas biotecnológicas como la inoculación con HMA.

En este sentido, la utilización tanto de HMA como de otros inoculantes microbianos se ha estudiado en una amplia serie de ecosistemas, encontrándose en la casi totalidad de los casos efectos positivos, tanto para el establecimiento y posterior crecimiento de las plantas, como para el suelo circundante y las poblaciones de los demás microorganismos. Dadas las limitaciones inherentes a ecosistemas como el simulado en este estudio, la inoculación con HMA resulta una alternativa deseable, puesto que puede significar buena parte de la función de adquisición de nutrientes en las primeras etapas del establecimiento de las plantas en procesos de revegetación.

Una aplicación tecnológica, estudiada en los últimos tiempos con la finalidad de promover la recuperación de este tipo de ecosistemas estresados, es la utilización de residuos orgánicos (Caravaca et al. 2002; Palenzuela et al. 2002; Medina 2005). En este sentido, se podría incrementar la velocidad de recuperación de un ecosistema degradado/desertificado, realizando la correcta elección de la o las plantas idóneas. Idealmente, estas plantas debieran mostrar efectos sinérgicos en su asociación, como se ha mostrado en este estudio, y ser inoculadas desde su producción en vivero con HMA o inoculantes de segunda generación. Finalmente, la adición de material orgánico estabilizado, que actuará como es bien sabido, como material cementante de las micropartículas de suelo, como fuente de energía para microorganismos heterótrofos, y finalmente como fuente de nutrientes para la planta, entre otros muchos beneficios posibles.

Otro beneficio de la utilización de plantas inoculada/micorrizada desde vivero puede ser su función como "isla de fertilidad" en su aplicación posterior en condiciones naturales (Azcón-Aguilar et al. 2003), desde las cuales se puede extender la presencia de propágulos de HMAs al suelo adyacente. Por otra parte, la inoculación, además del

efecto obvio sobre el crecimiento de la planta, permitirá que la mayor cobertura que éstas alcancen proteja de mejor manera el suelo contra la erosión (Estaún et al. 1997).

La utilización de inoculantes más completos, que consideren no solamente los simbiontes micorrizógenos, sino además otros grupos microbianos rizosféricos adecuados a las plantas que se desee establecer con fines de recuperación de la cubierta vegetal, denominados inoculantes de segunda generación (Barea et al. 1996; Barea 1997), puede ser una alternativa biotecnológica relativamente y económica, de la cual se podrían obtener grandes beneficios. En especial si se considera la incorporación de plantas leguminosas, la posibilidad de desarrollar este tipo de inoculantes puede significar un rápido aumento del índice de protección del suelo, puesto que como se ha demostrado en estudios previos, existe una alta promiscuidad y efectividad entre distintos aislados de *Bradirhizobium* obtenidos desde diferentes especies de leguminosas propias del matorral mediterráneo en ecosistemas semiáridos del sureste español (Valladares et al. 2002; Rodríguez-Echeverría et al. 2003).

Por otra parte, como se desprende de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, aún cuando la presencia de una leguminosa (como Retama en este caso) sea efímera, su función como planta facilitadora del establecimiento de la planta asociada, y los índices de crecimiento y cobertura que estas alcanzan justifican su incorporación en una asociación vegetal destinada a la recuperación de un ecosistema degradado. Un modelo para la creación de inoculantes duales, conteniendo tanto *Rhizobium* como HMA, podría considerar pasos tales como *i*) creación de una colección de muestras de microsimbiontes, a partir de nódulos y de suelo (para *Rhizobium* y HMA respectivamente), *ii*) identificación en condiciones controladas de los aislados más efectivos, *iii*) creación del inóculo en medio sólido para su aplicación en campo (o en planta de forma viverística), y *iv*) seguimiento del impacto de la inoculación en el crecimiento de la planta (y evaluación del efecto de la inoculación dual sobre la mejora del medio edáfico) (Leseur et al. 2001). En ensayos de larga duración, realizados en suelos de ecosistemas mediterráneos desertificados, como el simulado en este estudio, Requena y colaboradores (2001) demostraron que la inoculación con HMA y *Rhizobium* nativos no sólo mejoraba el establecimiento de plantas de *Anthyllis cytisoides* y *Lavandula multifida*, sino que también mejoraba la fertilidad y calidad del suelo revegetado. Entre los parámetros que mayor efecto positivo presentaron se encuentra el potencial micorrícico, la agregación de las partículas de suelo, el contenido total de N en el suelo y el contenido en materia orgánica (MO).

Finalmente, cabe mencionar que como consecuencia de este estudio se pretendió incrementar, en primera instancia, el conocimiento de la simbiosis micorrícica, con especial referencia a ambientes degradados de la cuenca mediterránea. Entre los aspectos analizados, se pudo observar el efecto preponderante de la asociación vegetal sobre el propio comportamiento de la estructuración de la comunidad vegetal y el crecimiento de cada planta en la asociación, por sobre el efecto de la comunidad de HMA. No obstante, se pudo observar el importante beneficio de la inoculación con este tipo de microorganismos sobre la mejora del suelo, en conjunto con el crecimiento mejorado de las plantas.

Por su parte, las herramientas moleculares desarrolladas para la identificación y caracterización de hongos micorrícicos, permitieron el caracterizar cuales eran las especies de HMA que realmente se encontraban colonizando las plantas utilizadas, así como realizar su posterior seguimiento, tanto a nivel de raíz como de suelo. Este es uno de los primeros estudios que han permitido de una manera sencilla cumplir este objetivo. Esta herramienta podría ser utilizada en condiciones naturales y estudiar de esta manera la efectividad de la inoculación realizada, ya sea en campo o en vivero, y evaluar así el éxito de determinado ecotipo. En este estudio, se pudo comprobar que el éxito de diferentes especies de MA en una comunidad compleja es desigual, y que por diferentes motivos, como pueden ser la especificidad cerrada con algún taxon botánico particular o la falta total de especificidad, las ventajas que poseen determinados ecotipos y su posterior efecto beneficioso en la planta utilizada en un proceso de revegetación los hacen más deseables para su utilización como inoculante, un hecho importante que debe ser tenido en cuenta cada vez con mayor interés en procesos de recuperación de ecosistemas degradados.

*“...Porque de la tierra
no salen sólo minerales
ni brotan sólo plantas;
salen ideas y brotan sentimientos...”*

(Angel Ganivet)



1. El mayor crecimiento de las plantas, tanto en cobertura como en longitud de raíces condicionó una mejora significativa de las condiciones del suelo. Entre los parámetros que mejor representaron el efecto del crecimiento vegetal sobre la mejora del sustrato, se encontraron el descenso en el valor de pH y la formación de agregados hidroestables.
2. El desarrollo del hongo en el suelo, particularmente hifas, se relacionó a la vez que con un mayor crecimiento vegetal, con una mejora del nivel de agregados estables en el suelo, y con una mayor actividad biológica general, representado por un mayor descenso en los valores de pH.
3. Aún cuando la presencia proporcional de Retama en las distintas asociaciones vegetales de las que formó parte se redujo significativamente desde el comienzo del estudio, la promoción del crecimiento y la consecuente mejora de las condiciones del suelo justifica su inclusión como planta promotora o facilitadora del establecimiento de la(s) especie(s) asociada(s), incluso cuando llega a ser desplazada de la comunidad vegetal.
4. Las asociaciones que mayor efecto ejercen sobre la mejora de las características del suelo son aquellas que incluyen Lavanda, puesto que esta especie presentó los mayores índices de crecimiento vegetal, a la vez que promovió asociaciones sinérgicas con las demás especies vegetales.

5. Las diferencias presentes en las secuencias nucleotídicas en la zona NS31/Glo1 de los distintos HMA utilizados han permitido la obtención de perfiles genéticos distinguibles por medio de PCR-nidada-TTGE, que posibilitó su seguimiento a través del tiempo.
6. Las especies de HMA que se encontraron persistentemente colonizando la raíz fueron aquellas que mantuvieron a lo largo del tiempo mayores poblaciones de esporas en el sustrato, encontrándose eventualmente especies con poblaciones reducidas en el suelo colonizando raíces, y sólo durante las primeras etapas de estudio aquellas especies que desaparecen de la comunidad con posterioridad.
7. La competencia interespecífica entre las diferentes especies de HMA parece haber sido la causa de la preponderancia de especies como *G. constrictum*, la que puede haber estado mediada por una mayor especificidad de este hongo en particular con las distintas especies vegetales estudiadas, o muy por el contrario, por la total falta de especificidad.
8. Tanto *G. constrictum* como *G. intraradices* se presentaron de forma permanente y en una alta proporción en las comunidades de HMA, tanto a nivel intra- como extrarradical, a la vez que *G. mosseae* y *G. viscosum* presentaron una proporción baja del total de la comunidad, pero estable en el tiempo, en tanto que *G. clarum* y *G. coronatum* se presentaron en la comunidad de HMA sólo durante el primer ciclo anual.
9. El aumento de diversidad de la cubierta vegetal no se relacionó con un aumento en los niveles de diversidad de HMA resultante tanto en suelo como en la raíz. Además, la diversidad de HMA no presentó relación con la mejora de las características del suelo, con el crecimiento vegetal, ni con el aumento de los propágulos de HMA en el sustrato.
10. “Los cambios en la diversidad y estructura vegetal no han producido un cambio importante en la composición y estructura de las comunidades de HMA, pareciendo este parámetro ser más dependiente de características intrínsecas de cada hongo y/o de las características del suelo”.



VIII BIBLIOGRAFÍA

- Abbott LK (1982) Comparative anatomy of vesicular arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Aust J Bot* 30: 785-499
- Abbot LK, Gazey C (1994) An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. *Plant Soil* 159: 69-78
- Abbott LK, Robson AD, De Boer G (1984) The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *New Phytol* 97: 437-446
- Ahmadsad I (1984) A method for the quantitative determination of the extraradical mycelium of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Angew Bot* 58: 359-364
- Albaladejo J, Castillo V, Roldán A (1996) Rehabilitation of degraded soils by water erosion in semiarid environments. En: Rubio JL, Calvo A (eds) *Soil degradation and desertification in mediterranean environments*. Geofoma, Logroño, pp 265-278
- Albaladejo J, Chisci G, Gabriels D, Rubio JL, Stocking MA (1998) Soil degradation and its impact on desertification: A research design for Mediterranean environments. *Soil Technology* 1(2): 169-174
- Alexander T, Meier R, Toth E, Weber HC (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol* 110: 363-370

- Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant Soil* 170: 47-62
- Allen EB, Rincon E, Allen MF, Pérez-Jiménez A, Huante P (1998) Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in México. *Biotropica* 30: 261-274
- Allen MF (1991) *The Ecology of Mycorrhizae*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 184p
- Allen MF (1996) The ecology of arbuscular mycorrhizas: A look back into the 20th century and a peek into the 21st. *Mycol Res* 100: 769-782
- Allen MF, Clouse SD, Weinbaum BS, Jenkins S, Friese CF, Allen EB (1992) Mycorrhizae and the integration of scales: from molecules to ecosystems. En: Allen MF (ed) *Mycorrhizal Functioning*. New York, Chapman and Hall, pp 488-516
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment research tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Anderson IC, Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* 6: 769-779
- Anderson RC, Liberta AE (1985) VAM spore abundance and diversity in an Illinois corn field and adjacent tallgrass prairie. En: Molina R (ed) *Proceedings of the 6th North American conference on Mycorrhizae*, Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, Ore, p 281
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1998) Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant Soil* 202: 89-96
- Angelini LG, Carpanese G, Cioni PL, Morelli I, Macchia M, Flamini G (2003) Essential oils from mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *J Agric Food Chem* 51(21): 6158-6164
- Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P (2004) Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem* 52(11): 3530-3535
- Aono T, Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ, Saito M (2004) Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* 162: 525-534
- Atkinson D, Baddeley JA, Goicoechea N, Green J, Sánchez-Díaz M, Watson CA (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi in low input agriculture. En: Gianinazzi S (Ed) *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, Birkhäuser-Verlag, pp 211-222
- Azcón R (1987) Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* in vitro: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biol Biochem* 19: 417-419
- Azcón R. 2000. Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. En: Alarcón A, Ferrera-Cerrato R (eds) *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Colegio de Postgraduados, Ediciones Mundi Prensa, Montecillo, México, pp 1-15

- Azcón R, Barea JM (1997) Mycorrhizal dependency of a representative plant species in Mediterranean shrublands (*Lavandula spica* L.) as a key factor to its use for revegetation strategies in desertification-threatened areas. *Appl Soil Ecol* 7: 83-92
- Azcón R, Barea JM, Hayman DS (1976) Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plant inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol Biochem* 8: 135-138
- Azcón R, Ocampo J (1981) Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency in thirteen weath cultivars. *New Phytol* 87: 677-685
- Azcón-Aguilar C, Bago B, Barea JM (1998) Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Heidelberg, pp 391-408
- Azcón-Aguilar C, Barea JM (1992) Interactions between Mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: Allen MF (ed) *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process*. Chapman & Hall, New York, pp 163-198
- Azcón-Aguilar C, Barea JM (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464
- Azcón-Aguilar C, Díaz-Rodríguez RM, Barea JM (1986) Effect of free-living fungi on the germination of *G. mosseae* on soil extract. En: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 515-519
- Azcón-Aguilar C, García-García F, Barea JM (1991) Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. En: Olivares J, Barea JM (eds) *Fijación y movilización biológica de nutrientes, Vol II. Nuevas tendencias*, CSIC, Madrid, pp 129-147
- Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega MC, Calvet C (2002) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. En: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhiza Technology in Agriculture, from Genes to Bioproducts*. Heidelberg, Germany, ALS Birkhäuser Verlag, pp 187-197
- Azcón-Aguilar C; Palenzuela EJ, Barea JM (1999) Sustrato para la producción de inóculos de hongos formadores de micorrizas. Patente nº 9901814. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Azcón-Aguilar C, Palenzuela J, Roldán A, Bautista S, Vallejo R, Barea JM (2003) Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Appl Soil Ecol* 22: 29-37
- Bago B, Azcón-Aguilar C (1997) Changes in the rhizospheric pH induced by arbuscular mycorrhiza formation in onion (*Allium cepa* L.). *Z Pflanzenernähr Bodenk* 160: 333-339
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y (1998a) Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 139: 375-388
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y (1998b) Architecture and development dynamics of the external mycelium at the arbuscular mycorrhizal *Glomus intradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* 90: 52-62

- Bago B, Azcón-Aguilar C, Shachar-Hill Y, Pfeffer P (2000) El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. En: Alarcón A, Ferrera-Cerrato R (eds) Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Colegio de Postgraduados, Ediciones Mundi Prensa, Montecillo, México, pp 78-92
- Bago B, Bécard G (2002) Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts. Berlin, Birkhäuser, pp. 33-48
- Bago B, Bentivenga SP, Brenac V, Dodd JC, Piché Y, Simon L (1998) Molecular analysis of *Gigaspora* (Glomales, Gigasporaceae). *New Phytol* 139: 581-588
- Bago B, Cano C, Azcón-Aguilar C, Samson J, Coughlan AP, Piché Y (2004) Differential morphogenesis of the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus grown monoxenically on spatially heterogeneous culture media. *Mycologia* 96(3): 452-462
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* 121: 263-271
- Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytol* 149: 4-8
- Bago B, Pfeffer PE, Zipfel W, Lammers P, Shachar-Hill Y (2002) Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244: 189-197
- Bago B, Vierheilig H, Piché Y, Azcón-Aguilar C (1996) Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytol* 133: 73-280
- Balestrini R, Romera C, Puigdomenech P, Bonfante P (1994) Location of a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and β -1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta* 195: 201-209
- Baligar V, Fageria N (1997) Nutrient use efficiency in acid soils: nutrient management and plant use efficiency. En: Moniz A, Furlani A, Schaffert R, Fageria N, Rosolem C, Cantarella H (eds) Plant-soil interactions at low pH: Sustainable agriculture and forestry production. Brazilian Soil Science Society, Campinas, SP, Brazil, pp 75-95
- Barea JM (1991) Vesicular arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. En: Stewart BA (ed) *Advances in Soil Science*, vol 15. Springer-Verlag, New York, pp 1-39
- Barea JM (1986) Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. En: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizal*. INRA, Paris, pp 77-87
- Barea JM (1997) Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. En: Ogoshi A, Kobayashi L, Homma Y, Kodama F, Kondon N, Akino S (eds) *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Present Status and Future Prospects*. OCDE, Paris, pp 150-158
- Barea JM (1998) *Biología de la rizosfera*. *Investigación y Ciencia* 256: 74-81
- Barea JM (2000) Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. En: Toutant J, Balazs E, Galante E, Lynch J, Schepers J, Werner D, Werry P (eds) *Biol. Resource Management: Connecting Science and Policy* (OECD). INRA, Springer, Heidelberg-Alemania, pp 110-125

- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C (1992) The use of ^{15}N to assess the role of VA mycorrhiza on plant N nutrition and its applications to evaluate the role of mycorrhiza in restoring Mediterranean ecosystems. En: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds) *Mycorrhizas in ecosystems: Structure and function*. CAB International, Wallingford, UK, pp 190-197
- Barea JM, Azcon-Aguilar C, Azcon R (1997) Interactions between Mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of a sustainable soil plant systems. En: Gange AC, Brown VK (eds) *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Blackwell Science, Cambridge, pp 65-77
- Barea JM, El-Atrach F, Azcón R (1991) The role of VA mycorrhizas in improving plant N acquisition from soil as assessed with ^{15}N . En: Flitton C (ed) *The use of stable isotopes in plant nutrition. Soil Fertility and Environmental Studies*, Joint IAEA/FAO Division, Vienna, pp 677-808
- Barea JM, Honrubia M (1993) Micorrizas y revegetación. *Ecosistemas* 4: 46-47
- Barea JM, Jeffries P (1995) Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. En: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 521-559
- Barea JM, Olivares J (1998) Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: Jiménez-Díaz RM, Lamo de Espinosa J (eds) *Agricultura Sostenible*. Editorial Mundi Prensa, Madrid, pp 173-193
- Barea JM, Pérez-Solís E, del Val C, Azcón-Aguilar C (1999) Importancia de las micorrizas en el establecimiento y protección de las plantas en suelos degradados. *Phytoma* 111: 18-30
- Barea JM, Requena N, Jimenez I (1996) A revegetation strategy based on the management of arbuscular mycorrhizas, *Rhizobium* and rhizobacterias for the reclamation of desertified mediterranean shrubland ecosystems. En: Lasram M (ed) *Cahier options méditerranéennes. Vol 20. Mycorrhization of forest plants under arid and semi-arid conditions and desertification control in the mediterranean basin*. CIHEAM, IAMZ, Zaragoza, pp 75-86
- Bartnicki-Garcia S (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann Rev Microbiology* 22: 87-108
- Bearden BN, Petersen L (2000) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. *Plant Soil* 218: 173-183
- Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE (1991) Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *in vivo* ^{13}C NMR and HPLC analyses. *New Phytol* 118: 547-552
- Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-218
- Bécard G, Pfeffer PE (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* 174: 62-68
- Bécard G, Piché Y (1989) Fungal growth-stimulation by CO_2 and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55: 2320-2325

- Belmonte-Serrato F, Romero-Díaz A, López-Bermúdez F, Hernández-Laguna E (1999) Optimo de cobertura vegetal en relación a las pérdidas de suelo por erosión hídrica y las pérdidas de lluvia por interceptación. *Papeles de Geografía* 30: 5-15
- Bergero R, Girlanda M, Bello F, Luppi A, Perotto S (2003) Soil persistence and biodiversity of ericoid mycorrhizal fungi in the absence of the host plant in a Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza* 13(2): 69-75
- Bethlenfalvay GL, Ames RN (1987) Comparison of 2 methods for quantifying extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci Soc Amer J* 51: 834-837
- Bethlenfalvay GJ, Cantrell IC, Mihara KL, Schreiner RP (1999) Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biology Fertil Soil* 28: 356-363
- Bethlenfalvay GJ, Linderman RG (1992) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA, Special publication, Madison, WI
- Bever JD (2002) Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. *Plant Soil* 244: 281-290
- Bever JD (2002) Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proc R Soc Lond B* 269: 2595-2601
- Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1996) Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J Ecol* 84: 71-82
- Bieleski RL (1973) Phosphates pools, phosphates transports and phosphates availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24: 225-252
- Bio-Rad Laboratories. *Bio-Rad Silver Stain. Handbook*, 11p
- Bio-Rad Laboratories. *The Dcode™ Universal Mutation Detection System. Handbook*, 79 p
- Bio-Rad Laboratories. *WinMelt™ and MacMelt™: DNA Melting Profile Analysis Software, Versión 2.0. Handbook*, 26 p
- Bird SB, Herrick JE, Wander MM, Wright SF (2002) Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. *Environmental Pollution* 116(3): 445-455
- Blanca G, Morales C (1991) *Flora del Parque Nacional de la Sierra de Baza (Servicio de publicaciones de la Universidad de Granada ed.)* Universidad de Granada, 381 p
- Bohrer KE, Friese CF, Amon JP (2004) Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza* 14(5): 329-337
- Bonfante P (2001) At the interface between Mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. En: Hock (ed) *The Mycota IX, Fungal Associations*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 45-61
- Bonfante-Fasolo P (1984) Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. En: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) *VA mycorrhiza*, CRC Press, Boca Raton, pp 5-33

- Bonfante-Fasolo P, Peretto R, Perotto S (1992) Cell surface interaction in endomycorrhizal symbiosis. En: Callow JA, Green JR (eds) Perspectives in plant cell recognition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 239-255
- Bonfante-Fasolo P, Testa B, Perotto S, Martinelli M (1986) Ultrastructural localisation of sugar residues in mycorrhizal ericoid fungi. *G Bot Ital* 120: 78-79
- Borie F, Rubio R, Morales A, Castillo C (2000) Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos bajo cero labranza. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 663-670
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brockwell, J, Bottomley PJ, Thies JE (1995) Manipulation of rhizobia microflora for improving crop productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil* 174: 143-180
- Brundrett M 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv Ecol Res* 21: 171-291
- Bruns TD, Gardes M (1993) Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Mol Ecol* 2: 233-242
- Budi SW, van Tuinen D, Martinotti G, Gianinazzi S (1999) Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soil-borne fungal pathogens. *Appl Environ Microbiol* 65: 5148-5150
- Burke DJ, Hamerlynck EP, Hahn D (2002) Effect of arbuscular mycorrhizae on soil microbial population and associated plant performance of the salt marsh grass *Spartina patens*. *Plant Soil* 239: 141-154
- Burrows RL, Pflieger FL (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Can J Bot* 80: 120-130
- Calvente R (2003) inoculación de hongos micorrícicos en variedades comerciales del olivo (*Olea europea* L.): efectos sobre el crecimiento, nutrición e inducción de enzimas hidrolíticas relacionadas con el establecimiento de la simbiosis y/o protección frente a enfermedades. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Cano C, Bago B (2005) Competition and substrate colonization strategies of three polixenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 97(6): 1214-1227
- Caravaca F, Barea JM, Figueroa D, Roldán A (2002) Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. *Appl Soil Ecol* 20: 107-118
- Caravaca F, Figueroa D, Alguacil MM, Roldan A (2003) Application of composted urban residue enhanced the performance of afforested shrub species in a degraded semiarid land. *Bioresource Technology* 90(1): 65-70
- Caron M (1989) Potential use of mycorrhizae in control of soilborne diseases. *Can J Plant Pathol* 11: 177-179
- Carreras JA (1992) El proyecto LUCDEME, estado actual de su desarrollo. *Ecosistemas* 3: 31-37

- Carvalho LM, Caçador I, Martins-Loução MA (2001) Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the taugas estuary (Portugal). *Mycorrhiza* 11: 303-309
- Carvalho LM, Correia PM, Martins-Loução MA (2004) Arbuscular mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh. *Mycorrhiza* 14: 165-170
- Carvalho LM, Correia PM, Ryel RJ, Martins-Loução MA (2003) Spatial variability of arbuscular mycorrhizal fungal spores in two natural plant communities. *Plant Soil* 251: 227-236
- Casana MC, Bonfante-Fasolo P (1988) Intercellular hyphae and arbuscules of *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerd. et Trappe isolated after enzymic digestion. *Allionia* 25: 17-25
- Cázares E, Trappe JM, Jumpponen Ari (2005) Mycorrhiza-plant colonization patterns on a subalpine glacier forefront as a model system of primary succession. *Mycorrhiza* 15(6): 405-416
- Cerdá A (1995) Spatial distribution of infiltration on the matorral slopes in a Mediterranean environment. En: Fantechi R, Peter D, Balabanis P, Rubio JL (eds) Desertification in a European context. Genoves, Spain, European Commission
- Chelius MK, Triplett EW (1999) Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA. *Mycorrhiza* 9: 61-64
- Claassen VP, Zasoki RJ, Tyler BM (1996) A method for direct soil extraction and PCR amplification of endomycorrhizal fungal DNA. *Mycorrhiza* 6: 447-450
- Clapp JP, Rodriguez A, Dodd JC (2001) Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytol* 149: 539-554
- Clapp JP, Rodriguez A, Dodd J (2002) Glomales rRNA gene diversity – all that glistens is not necessarily glomalean? *Mycorrhiza* 12: 269-270
- Clapp JP, Young J, Merryweather J, Fitter H (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol* 130: 259-265
- Clark R, Zobel R, Zeto S (1999) Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by *Panicum virgatum* in acidic soil. *Mycorrhiza* 9: 167-176
- Clark RB, Zeto SK (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J Plant Nutr* 23: 867-902
- Cornejo P, Azcón-Aguilar C, Barea JM, Ferrol N (2004) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 241: 265-270
- Correal E, Sánchez-Gómez P, Alcaraz F (1987) Woody species (trees and shrubs) of multiple value for the arid and semiarid zones of northern Mediterranean EC countries. En: Les especes ligneuses a usages multiples des zones arides mediterraneennes. I. AMZ, Spain.
- Coughlan AP, Dalpé Y, Lapointe L, Piché Y (2000) Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forest. *Can J For Res* 30: 1543-1554

- Cousins JR, Hope D, Gries C, Stutz JC (2003) Preliminary assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community structure in an urban ecosystem. *Mycorrhiza* 13(6): 319-326
- Cress WA, Throneberry GO, Lindsey DL (1979) Kinetics of phosphorus adsorption by mycorrhizal and nonmycorrhizal tomato roots. *Plant Physiol* 64: 484-487
- Daniell TJ, Hodge A, Young JPW, Fitter A (1999) How many fungi does it take to change a plant community? *Trends Plant Sci* 4: 81-82
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Letters* 36: 203-209
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernandez F, Delmas NS, Declerck S. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* 165: 261-271
- de Souza FA, Kowalchuk GA, Leeflang P, van Veen JA, Smit E (2004) PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Appl Environ Microbiol* 70: 1413-1424
- del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-Garcia O, del Rio JA, Ortuno A, Quirin KW, Gerard D (2003) Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. *Antioxidant Activity. J Agric Food Chem* 51(15): 4247-4253
- del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-Garcia O, Marin MP, del Rio JA, Ortuno A, Ibarra I (2004) Flavonoid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a Biosynthetic Pathway. *J Agric Food Chem* 52(16): 4987-4992
- del Val C, Barea JM, Azcón-Aguilar C (1999) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 65: 718-723
- Delta-T Devices (1991) Delta-T image analysis system DIAS II v 1.10. User Manual. Burwell, Cambridge, UK, 95 p
- Di Bonito R, Elliot ML, des Jardin EA (1995) Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Appl Environ Microbiol* 61: 2809-2810
- Dick RP (1994) Soil enzyme activities as indicators of soil quality. En: Doran JW, Coleman DC, Bezdicek DF, Stewart BA (eds) *Defining soil quality for a sustainable environment*, American Society of Agronomy, Madison, EE.UU., pp 107-124
- Dodd JC, Boddington CL, Rodriguez A, Gonzalez-Chavez C, Mansur I (2000) Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant Soil* 226: 131-151
- Dodd JC, Burton CC, Burns RG, Jeffries PJ (1987) Phosphatase activity associated to the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 107: 163-172
- Dodd JC, Rosendhal S, Giovannetti M, Broome A, Lanfranco L, Walker C (1996) Inter- and intraspecific variation within the morphologically similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. *New Phytol* 133: 113-122

- Dodd JC, Thompson BD (1994) The screening and selection of inoculant arbuscular-vesicular and ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 159: 149-170
- Donnelly PK, Entry JA (1999) Bioremediation of soil with mycorrhizal fungi. En: *Bioremediation of contaminated soils*. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp 417-435
- Douds Jr. DD, Millner PD (1999) Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 77-93
- Douham GW, Petersen C, Bledsoe CS, Rizzo DM (2005) Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza* 15: 365-372
- Drew EA, Murray RS, Smith SE, Jakobsen I (2003) Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. *Plant Soil* 251: 105-114
- Dumas-Gaudot E, Golotte A, Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2000) Modulation of host defence systems. En: Kapulnik Y, Douds Jr. DD (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, Kluwer Academic Publishers, pp 173-200
- EBI. <http://www.ebi.ac.uk>
- Edwards SG, Fitter AH, Young JPW (1997) Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. *Mycol Res* 101: 1440-1444
- Enkthuya B, Rydlova J, Vosatka M (2000) Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhiza fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. *Ecological Applications* 10: 484-496
- Eom AH, Hartnett DC, Wilson GWT (2000) Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* 122: 435-444
- Espinosa-Victoria D (2000) Diálogo molecular: hongo micorrízico arbuscular-raíz. En: Alarcón A, Ferrera-Cerrato R (eds) *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. IRENAT, Colegio de postgraduados, Montecillo, Mundi Prensa, México, pp 93-116
- Estaun V, Calvet C, Hayman DS (1987) Influence of plant genotype on mycorrhizal infection: Response of three pea cultivars. *Plant Soil* 103: 295-298
- Estaun V, Save R, Biel C (1997) AM inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions. *Appl Soil Ecol* 6: 223-229
- 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 Phytol* 114: 65-71
- Eviner VT, Chapin III FS (2002) The influence of plant species, fertilization and elevated CO₂ on soil aggregate stability. *Plant Soil* 246: 211-219
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R (2004) Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytol* 161: 387-392

- Ferrol N, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2002) Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 244: 231-237
- Ferrol N, Calvente R, Cano C, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2004) Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource-islands from a desertification-threatened semiarid mediterranean ecosystem. *App Soil Ecol* 25: 123-133
- Fillion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH (2003) Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 53(1): 67-76
- Filippi C, Bagnoli G, Citernes AS, Giovannetti M (1998) Ultrastructural spatial distribution of bacteria associated with sporocarps of *Glomus mosseae*. *Symbiosis* 24: 1–12
- Fitter AH, Graves JD, Self GK, Brown TK, Bogie D, Taylor K (1998) Root production, turnover and respiration under two grassland types along an altitudinal gradient: influence of temperature and solar radiation. *Oecologia* 114: 20–30
- Francis R, Read DJ (1994) The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant Soil* 159: 11-25
- Frank AB (1885) Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch Unterirdische Pilze. *Ber Deutsch Bot Ges* 3: 128-145
- Frank DA, Gehring CA, Machut L, Phillips M (2003) Soil community composition and the regulation of grazed temperate grassland. *Oecologia* 137(4): 603-609
- Gange AC, Brown VK, Farmer LM (1990) A test of mycorrhizal benefit in an early successional plant community. *New Phytologist* 115: 85–91
- Garber RC, Turgeon GB, Selker EU, Yoder OC (1988) Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr Genet* 14: 573-582
- García-Garrido JM, Ocampo JA (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot* 53: 1377-1386
- García-Romera I, García-Garrido JM, Martínez-Molina E, Ocampo JA (1990) Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections of alfalfa. *Soil Biol Biochem* 22: 149-152
- García-Romera I, García-Garrido JM, Ocampo JA (1991) Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *FEMS Microbiology Letters* 78: 343–346
- Gaston KJ (1996) Species richness: measure and measurement. En: Gaston KJ (ed) *Biodiversity, a biology of numbers and difference*. Blackwell Science, Cambridge, pp 77-113
- Gavito ME, Miller MH (1998) Early phosphorus nutrition, micorrhizae development, dry matter partitioning and yield of maize. *Plant and Soil* 199: 177-186
- Gazey C, Abbott LK, Robson AD (2004) Indigenous and introduced arbuscular mycorrhizal fungi contribute to plant growth in two agricultural soils from south-western Australia. *Mycorrhiza* 14(6): 355-362
- George E, Marschner H, Jakobsen I (1995) Role of arbuscular-mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Crit Rev Biotechnol* 15: 257-270

- Gerdemann J, Nicholson T (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving. *Transactions British Mycology Society* 46: 234-235
- Gerdemann JW, Trappe JM (1974) The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycol Memoir* 5: 1-76
- Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Tahiri-Alaoui A, Gianinazzi S (1996) Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133: 45-57
- Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1978) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol Plant Pathol* 12: 45-53
- Gianinazzi-Pearson V, Gollote A, Dumas-Gaudot E, Franken P, Gianinazzi S (1994) Gene expression and molecular modifications associated with plant responses to infection by arbuscular mycorrhizal fungi. En: Daniels MJ et al. (eds) *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, Academic Publishers, Netherlands, pp 179-186
- Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D, Dumas-Gaudot E, Dulieu H (2001) Exploring the genome of glomalean fungi. En: Hock (ed) *The mycota IX: fungal associations*. Springer-Verlag, Berlin-Deutschland, pp 3-17
- Giovannetti, M (2000) Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. En: Kapulnik Y, Douds DD (eds) *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 47-68
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citernes AS (1993) Factors affecting appressorium development in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol and Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytol* 123: 115-122
- Giovanetti M, Fortuna P, Citernes A, Morini S (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol* 151: 717-724
- Giovanetti M, Gianinazzi-Pearson V (1994) Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 98: 705-715
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L (2002) Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. En: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhauser, pp 49-58
- Goberna M, Insam H, Klammer S, Pascual J, Sánchez J (2006) Microbial Community Structure at Different Depths in Disturbed and Undisturbed Semiarid Mediterranean Forest Soils. *Microbial Ecology* 0: 1-12
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14: 111-117
- González SB (1988) *Ecología y biotecnología de micorrizas en leguminosas (soja y alfalfa)*. Tesis Doctoral de la Universidad de Granada, Facultad de Ciencias
- González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wrigth SF, Nichols KA (2004) The role of glomalina, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130: 317-323

- Gould AB, Hendrix JW (1998) Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. II. Mycorrhizal fungal communities. *Can J Bot* 76: 204–212
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin HR, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435 (7043): 819-823
- Graham PH, Sadowsky MJ, Tighe SW, Thompson JA, Date RA, Howieson JG, Thomas R (1995) Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid-methyl ester analysis. *Can J Microbiol* 41: 1038-1042
- Graw D (1979) The influence of soil pH on the efficiency of vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 82: 687-695
- Green DC, Vilariño A, Newsam R, Jeffries P, Dodd JC (1994) Quantification of mycelial development of arbuscular mycorrhizal fungi using image analysis. *Mycorrhiza* 5: 105-113
- Gryndler M (2000) Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms En: Kapulnick Y, Douds DD (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Functions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp 239-262
- Gryndler M, Hršelová H, Vosátka M, Votruba J, Klír J (2001) Organic fertilization changes the response of mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi and their sporulation to mineral NPK supply. *Folia Microbiologica* 46: 540-542
- Halffter G (1998) A strategy for measuring landscape biodiversity. *Biology International* 36: 3-17
- Hamel C, Dalp Y, Furlan V, Parent S (1997) Indigenous populations of arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregate stability are major determinants of leek (*Allium porrum* L.) response to inoculation with *Glomus intraradices* Schenck & Smith or *Glomus versiforme* (Karsten) Berch. *Mycorrhiza* 7: 187-196
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hardie K (1985) The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol* 101: 677-684
- Harley JL, Smith SE (1983) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Londres, 483 p
- Harrison M, Dewbre G, Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429
- Harrison MJ, van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629
- Hart MM, Reader RJ (2002) Does percent root length colonization and soil hyphal length reflect the extent of colonization for all AMF?. *Mycorrhiza* 12: 297-301
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 153: 335-344
- Haselwandter K, Downen GD (1996) Mycorrhizal relations in trees for agroforestry and land rehabilitation. *Forest Ecol Manag* 81: 1-17

- Hawkins HJ, George E (1999) Effect of plant nitrogen status on the contribution of arbuscular mycorrhizal hyphae to plant nitrogen uptake. *Physiologia Plantarum* 105: 694-700
- Hawkins HJ, Johansen A, George E (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 275-285
- Hedlund K, Gormsen D (2002) Mycorrhizal colonization of plants in set-aside agricultural land. *Appl Soil Ecol* 19: 71-78
- Heinemeyer A, Ridgway KP, Edwards EJ, Benham DG, Young PW, Fitter AH (2003) Impact of soil warming and shading colonization and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of a native grassland community. *Global Change Biology* 10: 52-64
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the woodwide web? *Nature* 394: 431
- Helgason T, Fitter AH, Young JPW (1999) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Mol Ecol* 8: 659-666
- Hepper CM (1981) Techniques for studying the infection of plants by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol* 88: 641-647
- Hepper CM, Azcón-Aguilar C, Rosendhal S, Sen R (1988) Competition between 3 species of *Glomus* used as spatially separated introduced in indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). *New Phytol* 110: 297-215
- Herrera MA, Salamanca CP, Barea JM (1993) Inoculation of Woody Legumes with Selected Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia To Recover Desertified Mediterranean Ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 59(1): 129-133
- Hetrick BAD, Bloom J (1983) Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with native tall grass prairie and cultivated winter wheat. *Canadian Journal of Botany* 61: 2140-2146
- Heuer H, Wieland G, Schönfeld J, Schönwälder A, Gomes NCM, Smalla K (2001) Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. En: Rochelle PA (ed) *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp 177-190
- Hijri M, Hosny M, van Tuinen D, Dulieu H (1999) Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. *Fungal Genetics and Biology* 26: 141-151
- Hijri M, Sanders IR (2004) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* 41: 253-261
- Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H (2002) Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Appl Environ Microbiol* 68: 1919-1924
- Ho I, Trappe JM (1973) Translocation of ¹⁴C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244: 30-31
- Hodge A (2000) Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 91-96

- Hooker JE, Jaizme-Vega M, Atkinson D (1994) Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. En: Gianinazzi S, Schüepp H (eds) Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Birkhauser-Verlag, Basel, Switzerland, pp 191-200
- Hooper DU, Vitousek PM (1997) The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* 277: 1302-1305
- Hosny M, de Barros JPP, Gianinazzi-Pearson V, Duliieu H (1997) Base composition of DNA from Glomalean fungi: High amounts of methylated cyto-sine. *Fungal Genetics and Biology* 22: 103-111
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Duliieu H (1998a) Nuclear contents of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41: 422-428
- Hosny M, Pais de Barros, Gianinazzi-Pearson V, Duliieu H (1998b) Base composition of DNA from glomalean fungi: high amounts of methylated cytosine. *Fungal Gen Biol* 22: 103-111
- Hunter Jr. ML, Sulzer A (1996) Genetic diversity. En: Hunter Jr. ML, Sulzer A (eds) Fundamentals of conservation biology. Blackwell Science, Cambridge, MA, pp 79-103
- Husband R, Herre A, Turner SL, Gallery R, Young JPW (2002) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Mol Ecol* 11: 2669-2678
- Iestwaart JH, Griffioen WAJ, Ernst WHO (1992) Seasonality of VAM infection in three populations of *Agrostis capillaris* (Gramineae) on soil with or without heavy metal enrichment. *Plant Soil* 39: 67-73
- Insam H (2001) Developments in soil microbiology since the mid 1960. *Geoderma* 100: 389-402
- INVAM. <http://invam.caf.wvu.edu/>
- INVITROGEN. TA Cloning® Kit, version V. Instruction manual, 23 p
- Isayenkov S, Fester T, Hause B (2004) Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *Journal of Plant Physiology* 161: 1379-1383
- Ishii S, Loynachan TE (2004) Rapid and reliable DNA extraction techniques from trypan-blue-stained mycorrhizal roots: comparison of two methods. *Mycorrhiza* 14: 271-275
- Jacobson KM (1997) Moisture and substrate stability determine VA-mycorrhizal fungal community distribution and structure in an arid grassland. *Journal of Arid Environments* 35: 59-75
- Jacquot E, van Tuinen D, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2000) Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant Soil* 226: 179-188
- Jacquot-Plumey E, van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2001) 25S rDNA-based molecular monitoring of glomalean fungi in sewage sludge-treated field plots. *Environmental Microbiology* 3(8): 525-531
- Jakobsen I (1995) Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. En: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, pp 297-323

- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD (1992) External Hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. I. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol* 120: 371-380
- Jansa J, Gryndler M, Matucha M (1999) Comparison of the lipid profiles of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and soil saprophytic fungi. *Symbiosis* 26: 247-264
- 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(5): 225-234
- Jarstfer AG, Sylvia DM (1992) Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: Metting B (ed) *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*, Marcel Dekker, Inc., New-York, pp 349-377
- Jasper DA (1994) Management of mycorrhiza in revegetation. En: Robson AD, Abbott LK, Malajczuk N (eds) *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 211-219
- Jastrow JD, Miller RM, Lussenhop J (1998) Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. *Soil Biol Biochem* 30: 905-916
- Jeffries P, Barea JM (1994) Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainable of plant soil systems. En: Gianinazzi S, Schüepp H (eds) *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 101-115
- Jeffries P, Barea JM (2001) Arbuscular Mycorrhiza-a key component of sustainable plant-soil ecosystems. En: Hock (ed) *The Mycota IX. Fungal Associations*. Springer-Verlag, Berlin, pp 95-113
- Jeffries P, Craven-Griffiths A, Barea JM, Levy Y, Dodd JC (2002) Application of arbuscular mycorrhizal fungi in the revegetation of desertified Mediterranean ecosystem. En: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhiza Technology in Agriculture, from Genes to Bioproducts*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp 151-174
- Jia Y, Gray VM, Straker CJ (2004) The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann Bot* 94: 251-258
- Johansen A (1999) Depletion of soil mineral N by roots of *Cucumis sativus* L. colonized or not by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 209: 119-127
- Johansen A, Finlay RD, Olsson PA (1996) Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 133: 705-712
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen SE (1992) Hyphal transport of ¹⁵N-labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytol* 122: 281-288
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen SE (1993) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 3. Hyphal transport of ³²P and ¹⁵N. *New Phytol* 124: 61-68
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1994) Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. *Plant and Soil* 160: 1-9

- Johnson D, IJdo M, GR, Anderson IC, Alexander IJ (2005) How do plants regulate the function, community structure, and diversity of mycorrhizal fungi? *J Exp Bot* 56(417): 1751-1760
- Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth RE, Grime JP, Young JPW, Read DJ (2003) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosm. *New Phytol* 161: 503-515
- Kabir Z, O'Halloran IP, Fyles JW, Hamel C (1997) Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant Soil* 192: 285-293
- Kabir Z, O'Halloran IP, Hamel C (1997) Overwinter survival of arbuscular mycorrhizal hyphae is favored by attachment to roots but diminished by disturbance. *Mycorrhiza* 7: 197-200
- Kemper WD, Rosenau RC (1986) Aggregate stability and size distribution. En: Klute A (ed) *Methods of soil Analysis, Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Agronomy Monograph No. 9, 2nd edn, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp 425-444
- Kennedy AC (1998) The rhizosphere and spermosphere. En: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (eds) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall, UpperSaddle, River, New Jersey, pp 389-407
- Kennedy AC, Smith KL (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170: 75-86
- Kjøller R, Rosendahl S (2000) Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant Soil* 226: 189-196
- Klironomos JN, Allen MF, Rillig MC, Piotrowski J, Makvandi-Nejad S, Wolfe BE, Powell JR (2005) Abrupt rise in atmospheric CO₂ overestimates community response in a model plant-soil system. *Nature* 433: 621-624
- Klironomos J, Hart M (2002) Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12(4): 181-184
- Klironomos JN, McCune J, Hart M, Neville J (2000) The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecol Lett* 3: 137-141
- Kloepper JW, Zablotowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En: Keister DL, Cregan PB (eds) *The rhizosphere and plant growth*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 315-326
- Knorr MA, Boerner REJ, Rillig MC (2003) Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. *Mycorrhiza* 13: 205-210
- Koch AM, Kuhn G, Fontanillas P, Fumagalli L, Goudet J, Sanders IR (2004) High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States Of America* 101: 2369-2374
- Koide RT, Dickie IA (2002) Effects of mycorrhizal fungi on plant populations. *Plant Soil* 244: 307-317

- Koske RE, Gemma JN (1990) Fungal reactions to plants prior to mycorrhizal formation. En: Allen MJ (ed) *Mycorrhizal Functioning, an Integrative Plant Fungal Process*. Chapman & Hall, New York, pp 3-36
- Kough J, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1987) Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytol* 106: 707-715
- Kowalchuk GA, de Souza FA, van Veen JA (2002) Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol Ecol* 11: 571-581
- Kozdrój J, van Elsas JD (2000) Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biol Fertil Soils* 31: 372-378
- Kozdrój J, van Elsas JD (2001) Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Appl Soil Ecol* 17: 31-42
- Landis FC, Gargas A, Givnish TJ (2005) The influence of arbuscular Mycorrhizae and light on Wisconsin (USA) sand savanna understories 1: Plant community composition. *Mycorrhiza* 15: 547-553
- Landis FC, Gargas A, Givnish TJ (2005) The influence of arbuscular Mycorrhizae and light on Wisconsin (USA) sand savanna understories 2: Plant competition. *Mycorrhiza* 15: 555-562
- Lanfranco L, Perotto S, Bonfante P (1998) Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal Fungi. En: Bridge P, Arora D, Reddy C, Elander R (eds) *Applications of PCR in mycology*. CAB International, pp 107-124
- Landwehr M, Hildebrandt U, Wilde P, Nawrath K, Tóth T, Biró B, Bothe H (2002) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza* 12: 199-211
- Lapopin L, Franken P (2000) Modification of plant gene expression: targeted and non-targeted approaches for the identification of mycorrhiza-regulated genes. En: Kapulnik Y, Douds D (eds) *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 69-84
- Larsen J, Bødker L (2001) Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytol* 149: 487-493
- Lasanta T, Garcia-Ruiz JM, Perez-Rontome C, Sancho-Marcen C (2000) Runoff and sediment yield in a semi-arid environment: the effect of land management after farmland abandonment. *CATENA* 38(4): 265-278
- Law R, Lewis DH (1983) Biotic environments and the maintenance of sex – some evidence from mutualistic symbioses. *Biol J Linn Soc* 20: 249–276
- Le Houérou HN (1987) Indigenous shrubs and trees in the silvopastoral systems of Africa. En: Stepler HA, Nair PKR (eds) *Agroforestry, a decade of development*. ICRAF, Nairobi, pp 139-147
- Lee SB, Taylor JW (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: Innis MA, Gelfand DH, Sininskyj, White TJ (eds) *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. San Diego, pp 282-287

- Lekberg Y, Koide R T (2003) Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist* 168(1): 189-204
- Lesueur D, Ingleby K, Odee D, Chamberlain J, Wilson J, Manga TT, Sarrailh JM, Pottinger A (2001) Improvement of forage production in *Calliandra calothyrsus*: methodology for the identification of an effective inoculum containing *Rhizobium* strains and arbuscular mycorrhizal isolates. *Journal of Biotechnology* 91: 269-282
- Leyval C, Joner EJ, del Val C, Haselvandter K (2002) Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. En: Gianinazzi S (ed) *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhäuser-Verlag, pp 175-186
- Linderman RG (1988) Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371
- Linderman RG (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. En: Bethlenfalvay GJ, Linderman RG (eds) *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA Special Publication, Madison, pp 65-77
- Lipsky RH, Mazzanti CM, Rudolph JG, Xu K, Vyas G, Bozak D, Radel MQ, Goldman D (2001) DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. *Clinical Chemistry* 47: 635-644
- Liu R, Wang F (2003) Selection of appropriate host plants used in trap culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 13(3): 123-127.
- Lloyd-MacGilp SA, Chambers SM, Dodd JC, Fitter AH, Walker C, Young JPW (1996) Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133: 103-111
- Longato S, Bonfante P (1997) Molecular identification of Mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol Res* 101: 425-432
- López-Bermúdez F (1996) La degradación de tierras en ambientes áridos y semiáridos. Causas y consecuencias. En: Lasanta T, Martínez M (eds) *Erosión y recuperación de tierras en áreas marginales*. Instituto de estudios Riojanos, Sociedad Española de Geomorfología, Logroño, pp 51-78
- López-Bermúdez F, Albaladejo J (1990) Factores ambientales de la degradación del suelo en el área Mediterránea. En: Albaladejo J, Stocking MA, Díaz E (eds) *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*. CSIC, Murcia, pp 15-45
- López-Bermúdez F, Romero-Díaz MA (1992) Génesis y consecuencias erosivas de las lluvias de alta intensidad en la región mediterránea. *Cuadernos I Geográfica* 18-19: 7-28
- López-Bermúdez F, Romero-Díaz MA, Ruiz-García A, Fisher GC, Francis C, Thornes JB (1984) *Erosión y ecología en la España semiárida (Cuenca de Mula, Murcia)*.
- López-González GA (2001) Los árboles y arbustos de la península ibérica y baleares (especies silvestres y las principales cultivadas). Tomos I, II. Edic. Mundi-Prensa. España, 1727 p
- López-Sánchez ME, Honrrubia M (1992) Seasonal variation of vesicular-arbuscular mycorrhizae in eroded soils from southern Spain. *Mycorrhiza* 2: 33-39

- Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, Hooper DU, Huston MA, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle DA (2001) Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science* 294: 804-808.
- Madan R, Pankhurst C, Hawke B, Smith S (2002) Use of fatty acid for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in Soil. *Soil Biol Biochem* 34: 125-128
- Magurran AE (1988) *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179 p
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 1140-1148
- Mallet J (1996) The genetics of biological diversity: from varieties to species. En: Gaston KJ (ed) *Biodiversity, a biology of numbers and difference*. Blackwell Science, Cambridge, pp 41-57
- Mallock DW, Pirozynski KA, Raven PH (1980) Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proc Natl Acad Sci USA* 77(4): 2123-2118
- Mangan SA, Eom AH, Adler GH, Yavitt JB, Herre EA (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi across a fragmented forest in Panama: insular spore communities differ from mainland communities. *Oecologia* 141(4): 687-700
- Mansfeld-Giese K, Larsen J, Bødker L (2002) Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 133-140
- Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159: 89-102
- Marschner P, Baumann K (2003) Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. *Plant Soil* 251: 279-289
- Marschner P, Crowley DE, Lieberei R (2001) Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. *Mycorrhiza* 11: 297-302
- Marschner P, Neumann G, Kania A, Weiskopf L, Lieberei R (2002) Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Soil* 246: 167-174
- Martinez F, Cuevas G, Calvo R, Walter I (2003) Biowaste Effects on Soil and Native Plants in a Semiarid Ecosystem. *J Environ Qual* 32(2): 472-479
- Martínez M (1997) Sistemática molecular; comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Española de México* 60: 123-136
- Marulanda A, Azcón R, Ruiz-Lozano JM (2003) Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119: 526-533
- Mayo K, Davis RW, Motta J (1986) Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore associated bacteria. *Mycologia* 78: 426-431

- McGonigle TP, Fitter AH (1990) Ecological specificity of vesicular arbuscular mycorrhizal associations. *Mycol Res* 94: 120-122
- McGonigle TP, Miller MH (1999) Winter survival of extraradical hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *Appl Soil Ecol* 12: 41-50
- McGonigle TP, Miller MH (2000) The inconsistent effect of soil disturbance on colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi: a test of the inoculum density hypothesis. *Appl Soil Ecol* 14: 147-155
- Meharg AA, Cairney JWG (2000) Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Advances in Ecological Research* 30: 70-115
- Merryweather J (1997) Function and diversity of the arbuscular mycorrhiza in bluebell *Hyacinthoides non-scripta* L. Chouard ex Rothm. *New Phytol* 129: 619-627
- Merryweather J, Fitter A (1995) Phosphorus and carbon budgets: mycorrhizal contribution in the obligately mycorrhizal *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm. under natural conditions. *New Phytol* 129: 619-627
- Merryweather J, Fitter A (1998) The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta* L. Diversity of fungal taxa. *New Phytol* 138: 117-129
- Meyer FH (1973) Distribution of ectomycorrhiza in native and man-made forests. En: Marks GC, Kozłowski TT (eds) *Ectomycorrhizae*. Academic Press, New York, USA, pp 79-105
- Miller RM, Jastrow JD (1990) Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biol Biochem* 22: 579-584
- Miller RM, Jastrow JD (1992) The role of Mycorrhizal fungi in soil conservation. En: Bethlenfalvay GJ Linderman R (eds) *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. American Society of Agronomy, Madison-Wisconsin, USA, Special Publication N° 54: 29-44
- Miller RM, Jastrow JD (2000) Mycorrhizal fungi influence soil structure En: Kapulnick Y, Douds DD (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Functions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 3-18
- Miller RM, Lodge DJ (1997) Fungal responses to disturbance: agriculture and forestry. En: Wicklow DT, Söderström BE (eds) *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 65-84
- Millner PD, Mulbry WW, Reynolds SL (2001) Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of *Glomus etunicatum*. *Mycorrhiza* 10:259-265
- Minerdi D, Bianciotto V, Bonfante P (2002) Endosymbiotic bacteria in mycorrhizal fungi: from their morphology to genomic sequences. *Plant Soil* 244: 211-219
- Montalvo, J (1992) Interpretación ecológica de la erosión y desertificación. *Ecosistemas* 3: 14-17
- Moreno CE (2001) Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza, 84 pp
- Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA (2005) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res* 40(2): 223-31

- Morton JB, Benny J (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an amediation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491
- Morton JB, Bentivenga SP, Bever JD (1995) Discovery, measurement and interpretation of diversity in symbiotic endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can J Botany* 73: S25-S32
- Morton JB, Franke M, Bentivenga SP (1998) Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in Glomales (Zygomycetes). En: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza*, 2nd edn. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, pp 617-631
- 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
- Mummey DL, Rillig MC, Holben WE (2005) Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. *Plant and Soil* 271: 83-90
- Mummey DL, Stahl PD, Buyer JS (2002) Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Appl Soil Ecol* 21: 251-259
- Munkvold L, Kjølner R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I (2004) High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 164: 357-364
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141
- Navarro-Reyes F (1995) Parque natural "Sierra de Baza". Universidad de Granada, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, 77 p
- NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Neergaard B, Petersen L (2000) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. *Plant and Soil* 218: 173-183
- Neumann E, George E (2005) Extraction of extraradical arbuscular mycorrhizal mycelium from compartments filled with soil and glass beads. *Mycorrhiza* 15: 533-537
- Newman E (1966) A method of estimating the total length of root sample. *J Appl Ecol* 3: 139-145
- Newsham KK, Fitter AH, Watkinson AR (1995) Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends Ecol Evolut* 10: 407-411
- Nicolson TH, Gerdemann JW (1968) Mycorrhizal Endogone species. *Mycologia* 60: 313-325
- Nicolson TH, Schenck NC (1979) Endogonaceous mycorrhizal endorhytes in Florida. *Mycologia* 71: 178-198

- Nielsen KB, Kjølner R, Olsson PA, Schweiger PF, Andersen FO, Rosendhal S (2004) Colonisation and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in southern Sweden. *Mycol Res* 108: 616-625
- Oehl F, Sieverding E (2004) *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* 78: 72-82
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris EA, Boller T, Wiemken A (2005) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist* 165(1): 273-283
- Oehl F, Sieverding E, Mäder P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A (2004) Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138(4): 574-583
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris EA, Boller T, Wiemken A (2005) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytol* 165: 273-283
- Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A (2002) Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 68: 3691-3701
- Olsen SR, Dean LA (1965) Phosphorus. En: Black CA, Evans DD, White JL, Ensminger LE, Clark FE, Dinauer RC (eds) *Methods of Soil Chemical Analysis, Part 2*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 1035-1049
- Olsson PA, van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H (2002) Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiol* 130: 1162-1171
- Õpik M, Moora M, Liira J, Koljalg U, Zobel M, Sen R (2003) Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytol* 160: 581-593
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Figueroa D, Caravaca F, Roldán A, Barea JM (2002) Effects of mycorrhizal inoculation of shrubs from Mediterranean ecosystems and composted residue application on transplant performance and mycorrhizal developments in a desertified soil. *Biol Fertil Soil* 36: 170-175
- Pardini G, Gispert M, Dunjo G (2003) Runoff erosion and nutrient depletion in five Mediterranean soils of NE Spain under different land use. *The Science of The Total Environment* 309(1-3): 213-224
- Pardini G, Gispert M, Dunjo G (2004) Relative influence of wildfire on soil properties and erosion processes in different Mediterranean environments in NE Spain. *Science of The Total Environment* 328(1-3): 237-246
- Parr JF, Papendick RI, Hornick SB, Meyer RE (1992) Soil quality: attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 7: 5-11
- Pawlowska TE, Taylor JW (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427: 733-737
- Pearson V, Read DJ (1975) The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trans Br Mycol Soc* 64: 1-7

- Peng Y, Yuan J, Liu F, Ye J (2005) Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39(3-4): 431-437
- Pérez C (2001) *Técnicas estadísticas con SPSS*. Ed. Prentice Hall, 592 p
- Pérez-Solís Estefanía (2001) *Prospección y aplicación de Micorrizas en especies vegetales autoctonas del matorral, para favorecer la revegetación de ecosistemas mediterráneos degradados*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Pfeffer PE, Doudds DD, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 120: 587-598
- Philips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55: 158-161
- 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(9): 1439-1446
- PROMEGA. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Technical Manual No. 042. 28 p
- Prosser JI (2002) Molecular and functional diversity of soil micro-organisms. *Plant Soil* 244: 9-17
- Puigdefabregás J (1994) Desertificación: una perspectiva sobre la cuenca mediterránea. *Fronteras de la Ciencia y Tecnología, CSIC* 3: 15-19
- Pujalte AP, Prieto P (1980) Memoria del mapa de suelos y vegetación de la provincia de Granada. En: *Catálogo de suelos de Andalucía; Serie: Monografías del medio ambiente, Nº 3*. Junta de Andalucía, Agencia de Medio Ambiente. Sevilla, España, pp 127-129
- QUIAGEN. Dneasy® plant mini kit and Dneasy plant maxi kit handbook. 26 p
- QUIAGEN. QUIAEX® II Handbook. 23 p
- QUIAGEN. QIAprep® Miniprep Handbook. 46 p
- Radman M (1991) Avoidance of inter-repeat recombination by sequence divergence and a mechanism of neutral evolution. *Biochimie* 73: 357-361
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693
- Rasmussen N, Lloyd DC, Ratcliffe G, Hansen PE, Jakobsen I (2000) ^{31}P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 245-253
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414: 462-466
- Redecker D (2000a) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized root. *Mycorrhiza* 10: 73-80
- Redecker D (2002) Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244: 67-73

- Redecker D, Hijri I, Wiemken A (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobotanica* 38: 113-124
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000b) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000c) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 276-284
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C, Werner D (1997) Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species of the order Glomales. *Appl Environ Microbiol* 63: 1756-1761
- Renken C, Heinrichs J, Kaldorf M, Buscot F (2003) Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 13: 191-198
- Renker C, Blanke V, Buscot F (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution* 135(2): 255-266
- Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M, Buscot F (2003) Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 13(4): 191-198
- Requena N (1996) Exploración de la biodiversidad microbiana (hongos de la micorrizas arbuscular-Rhizobium-Rizobacterias) en un ecosistema mediterráneo desertificado, dirigida a una estrategia de revegetación. Tesis doctoral de la Universidad de Granada, Facultad de ciencias
- Requena N (1997) Mycorrhizal symbiosis and management of the mycorrhizosphere as a tool for the restoration of degraded semi-arid ecosystems. *Recent Res Devel Microbiol* 1: 267-276
- Requena N, Breuninger M, Franken P, Ocon A (2003) Symbiotic status, phosphate and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol* 132: 1540-1549
- Requena N, Jeffries P, Barea JM (1996) Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem *Appl Environ Microbiol* 62: 842-847
- Requena N, Jiménez I, Toro M, Barea JM (1997) Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytologist* 136(4): 667-677
- Requena N, Pérez-Solis E, Azcón-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM (2001) Management of Indigenous Plant-Microbe Symbioses Aids Restoration of Desertified Ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 67(2): 495-498
- Rivas-Martínez S (1976) Memoria del mapa de series de vegetación de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA. Madrid.
- Rodriguez A, Clapp JP, Robinson L, Dodd JC (2005) Studies on the diversity of the distinct phylogenetic lineage encompassing *Glomus claroideum* and *Glomus etunicatum*. *Mycorrhiza* 15(1): 33-46

- Rodríguez RL, Tait RC (1983) Recombinant DNA techniques: An introduction. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA
- Roesti D, Ineichen K, Braissant O, Redecker D, Wiemken A, Aragno M (2005) Bacteria Associated with Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Appl Environ Microbiol* 71(11): 6673-6679
- Rösch C, Eilmus S, Bothe H (2006) Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. *Biochem Soc Trans* 34: 169-173
- Rosendahl S, Sen R (1992) Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza. En: Norris JR, Read DJ, Varma AK (eds) *Methods in microbiology*, vol. 24, Academic Press, New York, pp 169-194
- Rosendahl S, Sen R, Hepper CM, Azcón-Aguilar C (1989) Quantification of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) in roots of leek (*Allium porrum*) on the basis of activity of diagnostic enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. *Soil Biol Biochem* 21: 519-522
- Rosendahl S, Stukenbrock EH (2004) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Mol Ecol* 13: 3179-3186
- Rosendahl S, Taylor JW (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. *Mol Ecol* 9: 821-829
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R (1993) Specificity and functional compatibility of VA mycorrhizal endophytes in association with *Bradhyrhizobium* strains in *Cicer arietinum*. *Symbiosis* 15: 217-226
- Ruotsalainen AL, Väre H, Vestberg M (2002) Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs. *Mycorrhiza* 12: 29-36
- Russell PJ, Rodland KD, Rachlin EM, McCloskey JA (1987) Differential DNA methylation during the vegetative life cycle of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 169: 2902-2905
- Ryan MH, van Herwaarden AF, Angus JF, Kirkegaard JA (2005) Reduced growth of autumn-sown wheat in a low-P soil is associated with high colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 270: 275-286
- Saito K, Suyama Y, Sato S, Sugawara K (2004) Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14(6): 363-373
- Salamanca P (1991) Estudio sobre la simbiosis microbio-planta (micorrizas y Rhizobium-leguminosas) en la revegetación de suelos en zonas áridas. Tesis doctoral de la Universidad de Granada, Facultad de Ciencias
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Sánchez-Díaz M, Honrubia M (1994) Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. En: Gianinazzi S, Schüepp H (eds) *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*, Birkhäuser Verlag, Basel, pp 167-178
- Sanders IR (1999) No sex please, we are fungi. *Nature* 399: 737-738

- Sanders IR, Alt M, Groppe K, Boller T, Wiemken A (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* 130: 419-427
- Sanders IR, Clapp JP, Wiemken A (1996) The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems: A key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 133: 123-134
- Sanders IR, Koide RT (1994) Nutrient acquisition and community structure in co-occurring mycotrophic and non-mycotrophic old-field annuals. *Functional Ecology* 8: 77-84
- Sanders FE, Tinker PB (1973) Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pest Sci* 4: 385-395
- Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibañez E, Senorans FJ, Reglero G (2004) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J Food Prot* 68(4): 790-795
- Scannerini S, Bonfante-Fasolo P (1983) Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Can J Bot* 61: 917-943
- Schafer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, Pukall R, Stackebrandt E, Troussellier M, Guindulain T, Vives-Rego J, Muyzer G (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology* 34(3): 243-253
- Schenck NC, Pérez Y (1990) Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3rd edition. INVAM, University of Florida, Gainesville, Florida-USA, 286 p
- Schenck NC, Smith GS (1982) Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia* 74: 77-92
- Schreiner PR, Bethlenfalvay GJ (1997) Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. *Appl Soil Ecol* 7: 93-102
- Schubert A, Marzachi C, Mazzitel M, Cravero MC, Bonfante-Fasolo P (1987) Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol. And Schenk. *New Phytol* 107: 191-202
- Schüßler A (2000) *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* 10: 15-21
- Schüßler A (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 244: 75-83
- Schüßler A, Gehrig H, Schwarzott D, Walker C (2001) Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny *Mycological Research* 105: 5-15.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal Phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 103: 1413-1421
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2003) Glomeromycota rRNA genes-the diversity of myths? *Mycorrhiza* 13: 233-236

- Schwarzott D, Schüßler A (2001) A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203-207
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190-197
- Shachar-Hill Y, Pfeffer P, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiol* 108: 7-15
- Sharrock RA, Sinclair FL, Gliddon C, Rao IM, Barrios E, Mustonen PJ, Smithson P, Jones DL, Godbold DL (2004) A global assessment using PCR techniques of mycorrhizal fungal populations colonising *Tithonia diversifolia*. *Mycorrhiza* 14: 103-109
- Siciliano SD, Theoret CM, de Freitas JR, Hucl PJ, Germida JJ (1998) Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can J Microbiol* 44: 844-851
- Sieverding E (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. GTZ, Eschborn, Germany, 371 p
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993a) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD (1992a) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonising roots. *Appl Environ Microbiol* 58: 291-295
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M (1992b) Rapid quantitation by PCR of endomycorrhizal fungi colonizing roots. *PCR Methods and Applications* 2: 76-80
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M (1993b) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 59: 4211-4215
- Siqueira J, Moreira F (1997) Microbial populations and activities in highly-weathered acidic soils: highlights of the Brazilian research. En: Moniz A, Furlani A, Schaffert R, Fageria N, Rosolem C, Cantarella H (eds) *Plant-soil interactions at low pH: Sustainable agriculture and forestry production*. Brazilian Soil Science Society, Campinas, SP, Brazil, pp 139-156
- Skujin J, Allen MF (1986) Use of mycorrhizae for land rehabilitation. *Mircen J* 2: 161-176
- Slezack S, Dumas-Gaudot E, Paynot M, Gianinazzi S (2000) Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 238-241
- Smit E, Leeflang P, Glandorf B, van Elsas JD, Wernars K (1999) Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloner PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65: 2614-2621
- Smith FA, Smith SE (1997) Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 137: 373-388

- Smith SE (1966) Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol* 65: 488-499
- Smith SE, Gianninazzi-Pearson V (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 221-244
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1990) Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. Effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aust J Plant Physiol* 17: 177-188
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V, Koide R, Cairney JWG (1994) Nutrient Transport in Mycorrhizas: Structure, Physiology and Consequences for Efficiency of the Symbiosis. *Plant and Soil* 159: 103-113
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. San Diego, USA.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162: 511-524
- Smith TF (1980) The effect of season and crop rotation on the abundance of spores of vesicular arbuscular VA mycorrhizal endophytes. *Plant Soil* 57: 475-479
- Sogin ML (1990) Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. En: Innis MA, Gelfand DH, Sininskyj, White TJ (eds) *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. San Diego, pp 307-314
- Solbrig OT (1991) *From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity*. IUBS-SCOPE-UNESCO, Cambridge, 124 p
- St-John BJ, Smith SE, Nicholas DJD, Smith FA (1985) Enzymes of ammonium assimilation in *Pezizella ericae* Read. *New Phytol* 100: 579-584
- Stukenbrock EH, Rosendahl S (2005a) Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. *Molecular Ecology* 14: 743-752
- Stukenbrock EH, Rosendahl S (2005b) Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genetics and Biology* 42(1): 73-80
- Stukenbrock EH, Rosendahl S (2005c) Distribution of dominant arbuscular mycorrhizal fungi among five plant species in undisturbed vegetation of a coastal grassland. *Mycorrhiza* 15: 497-503
- Sueoka N (1988) Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2653-2657
- Swaminathan V (1979) Nature of the inorganic fraction of soil phosphate fed on by vesicular-arbuscular mycorrhizae of potatoes. *Proc Ind Acad Sci* 88B: 423-433
- Sylvia D M 1992. Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: Norris JR, Read DJ, Varma AK (eds) *Methods in Microbiology, Volume 24. Techniques for the study of mycorrhiza*. Academic Press, London UK, pp 53-65
- Tarafdar JC, Kumar P (1996) The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on crop, tree and grasses grown in an arid environment. *Journal of Arid Environments* 34: 197-203

- Tarafdar JC, Marschner H (1994) Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biol Biochem* 26: 3873-395
- Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H (1995) Fossil arbuscular mycorrhizae from the early devonian. *Mycologia* 87: 560-573
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680
- Thuiller W, Lavorel S, Araujo MB, Sykes MT, Prentice IC (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *PNAS* 102(23): 8245-8250
- Tisdall JM (1991) Fungal hyphae and structural stability of soil. *Aust J Soil Res* 29: 729-743
- Tisdall JM (1994) Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant Soil* 159: 115-121
- Tisdall JM, Smith SE, Rengasamy P (1997) Aggregation of soil by fungal hyphae. *Aust J Soil Res* 35(1): 55-60
- Tobar RM, Azcón R, Barea JM (1994) The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza* 4: 105-108
- Toljander JF, Artursson V, Paul LR, Jansson JK, Finlay RD (2006) Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters* 254(1): 34-40
- Tonin C, Vandenkoornhuise P, Joner EJ, Straczek J, Leyval C (2001) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* 10: 161-168
- Toro M, Azcón R, Barea JM (1997) Improvement of arbuscular mycorrhizal development by inoculation with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. *Appl Environ Microbiol* 63: 4408-4412
- Toro M, Azcón R, Barea JM (1998) The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. *New Phytol* 138: 265-273
- Torsvik VL, Goksoyr J, Daae FL (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56: 782-787
- Trappe JM (1977) Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocystis clavispora*, and *Acaulospora scrobiculata*. *Mycotaxon* 6: 359-366
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8: 203-206
- Turco RF; Kennedy AC, Jawson MD (1994) Microbial indicators of soil quality. En: Doran JW, Coleman DC, Bezdicsek DF, Stewart BA (eds) *Defining soil quality for a sustainable environment*, American Society of Agronomy, Madison, EE.UU., pp 73-90

- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2001) Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10: 169-174
- Uetake Y, Kojima T, Ezawa T, Saito M (2002) Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol* 154: 761-768
- UNEP (1992) Convention on biological diversity. United Nations Environmental Program, Environmental Law and Institutions Program Activity Centre. Nairobi.
- Valladares F, Villar-Salvador P, Domínguez S, Fernández-Pascual M, Peñuelas JL, Pugnaire FI (2002) Enhancing the early performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.: fertilisation versus *Rhizobium* inoculation. *Plant and Soil* 240(2): 253-262
- Valle F (ed) (2003) Mapa de series de vegetación de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Editorial Rueda, Madrid, España, 131 p
- Vandenkoornhuysen P, Husband R, Daniell TJ, Watson J, Duck JM, Fitter AH, Young PW (2002) Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* 11: 1555-1564
- Vandenkoornhuysen P, Leylav C (1998) SSU rDNA sequencing and PCR-fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia* 90: 791-797
- Vandenkoornhuysen P, Leyval C, Bonnin I (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* 87: 243-253
- Vandenkoornhuysen P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPW (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12(11): 3085-3095
- van der Heijden MGA, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082-2091
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou 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, Wiemken A, Sanders IR (2003) Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plants. *New Phytol* 157: 569-578
- van Elsas JD, Duarte GF, Keijzer-Wolters A, Smit E (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43: 133-151
- van Elsas JD, Duarte GF, Rosado AS, Smalla K (1998) Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J Microbiol Meth* 32: 133-154
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollote A, Gianinazzi-Pearson V (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-target nested PCR. *Mol Ecol* 7: 879-887

- Vásquez A, Ahrné S, Petersson B, Molin G (2001) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* and *Lactobacillus rhamnosus*. 32: 215-219
- Verdú JR, Crespo MB, Galante E (2000) Conservation strategy of a nature reserve in mediterranean ecosystems: the effects of protection from grazing on biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 9: 1707-1721
- Vierheilig H, Piché Y (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. En: Buslig B, Manthey J (eds) *Flavonoids in cell functions*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp 23-29
- Visser S, Parkinson D (1992) Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7: 33-37
- Vokou D, Chalkos D, Karamanlidou G, Yiangou M (2002) Activation of Soil Respiration and Shift of the Microbial Population Balance in Soil as a Response to *Lavandula stoechas* Essential Oil. *Journal of Chemical Ecology* 28(4): 755-768
- Walker C, Schüßler A (2004) Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research* 108: 981-982
- Walker C, Trappe JM (1993) Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycological Research* 97: 339-344
- Weinbaum BS, Allen MF, Allen EB (1996) Survival of arbuscular mycorrhizal fungi following reciprocal transplanting across the great basin, USA. *Ecol Appl* 6: 1365-1372
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sininskyj, White TJ (eds) *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. San Diego, pp 315-322
- Whittaker RH (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21(2-3): 213-251
- Wright SF (2000) A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226: 171-177
- Wright SF, Franke-Snyder M, Morton JB, Upadhyaya A (1996) Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil* 181: 193-203
- Wright SF, Nichols KA, Schmidt WF (2006) Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. *Chemosphere*. In Press, Corrected Proof
- Wright SF, Upadhyaya A (1996) Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161: 575-586
- Wright SF, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198: 97-107
- Wright SF, Upadhyaya A (1999) Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza* 283-285
- Wu T, Hao W, Lin X, Shi Y (2002) Screening of arbuscular mycorrhizal fungi for the revegetation of eroded red soil in subtropical China. *Plant Soil* 239: 225-235

- Yu T, Egger KN, Peterson RL (2001) Ectendomycorrhizal associations -characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11: 167-177
- Zézé A, Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H (1996) Characterization of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in planta. *Appl Environ Microbiol* 62: 2443-2448
- Zézé A, Sulistyowati E, Ophel-Keller K, Barker S, Smith S (1997) Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR. *Appl Environ Microbiol* 63: 676-67
- Zhao ZW, Xia YM, Qin XZ, Li XW, Cheng LZ, Sha T, Wang GH (2001) Arbuscular mycorrhizal status of plants and the spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in the tropical rain forest of Xishuangbanna, southwest China. *Mycorrhiza* 11: 159–162

IX ANEXOS

Anexo 1. Valoración de pH por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	8,89 ab	8,68 cd	8,45 ab	7,97 e	8,31 abc	8,41 bcd	8,29 abc	8,08 ab	7,99 abc	8,32 c	8,51 ab	7,98 c	8,32 cde
L	8,92 ab	8,62 d	8,35 c	8,02 d	8,15 d	8,38 cde	8,32 abc	8,02 ab	7,85 ef	8,40 abc	8,51 ab	7,92 c	8,29 e
Re	8,93 ab	8,86 a	8,45 ab	8,07 bcd	8,36 ab	8,54 a	8,43 a	8,10 ab	8,07 a	8,32 c	8,58 a	8,17 ab	8,41 a
Ro	9,02 a	8,74 abcd	8,50 a	8,07 abcd	8,26 bcd	8,34 cde	8,27 bc	8,01 ab	7,83 ef	8,46 ab	8,41 b	8,09 b	8,33 bcd
ML	8,78 ab	8,69 bcd	8,46 ab	8,06 cd	8,22 cd	8,29 e	8,24 bc	8,00 ab	7,91 cde	8,49 ab	8,49 ab	8,12 ab	8,31 cd
MRe	8,89 ab	8,82 abc	8,42 ab	8,06 cd	8,33 abc	8,44 bc	8,22 bc	8,07 ab	7,96 bcd	8,53 a	8,55 a	8,18 ab	8,37 ab
MRo	8,99 a	8,84 abc	8,49 a	8,05 cd	8,39 a	8,38 cde	8,35 abc	7,99 b	7,90 def	8,44 abc	8,43 b	8,14 ab	8,36 abc
LRe	8,70 b	8,68 cd	8,44 ab	8,10 abc	8,22 cd	8,41 bcd	8,34 abc	7,97 b	7,84 ef	8,47 ab	8,55 a	8,18 ab	8,32 cde
LRo	8,76 ab	8,80 abc	8,48 a	8,12 ab	8,36 ab	8,32 de	8,22 c	8,00 ab	7,89 def	8,46 ab	8,50 ab	8,14 ab	8,34 bcd
ReRo	8,88 ab	8,84 ab	8,39 bc	8,13 a	8,36 ab	8,39 cde	8,33 abc	7,99 b	7,81 f	8,38 bc	8,49 ab	8,17 ab	8,35 bcd
Todas	8,85 ab	8,78 abc	8,46 ab	8,12 ab	8,36 ab	8,50 ab	8,36 ab	8,03 ab	7,85 ef	8,52 ab	8,50 ab	8,11 ab	8,37 ab
Nat	8,83 ab	8,83 abc	8,33 c	8,13 a	8,41 a	8,44 abc	8,29 abc	8,13 a	8,02 ab	8,51 a	8,59 a	8,21 a	8,39 a

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 2. P disponible en el sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	17,3 bcd	14,3 abcd	11,4 b	5,7 bc	5,1 cd	6,77 a	3,60 e	6,69 ab	5,96 ab	4,39 c	4,39 a	10,66 a	8,18 ab
L	17,4 bcd	12,5 bcd	9,9 bc	4,7 bc	5,6 bcd	7,30 a	5,92 abc	7,90 a	4,14 c	4,33 c	4,33 a	4,53 ab	7,52 bcd
Re	16,6 d	11,2 d	6,6 d	6,7 bc	8,0 abc	7,11 a	4,70 bcde	6,65 ab	5,78 b	4,98 bc	4,98 a	3,75 ab	7,03 cd
Ro	16,8 cd	11,6 cd	5,6 d	5,3 bc	10,0 a	6,89 a	5,44 abcd	6,38 ab	4,60 bc	4,33 c	4,33 a	1,96 b	6,70 d
ML	18,3 abcd	12,2 bcd	8,0 cd	4,0 bc	6,4 abcd	6,81 a	4,32 bcd	5,97 b	4,93 bc	5,62 ab	5,62 a	5,32 ab	7,09 cd
MRe	17,9 bcd	13,5 abcd	6,4 d	7,3 ab	6,7 abcd	7,37 a	6,30 ab	6,38 ab	6,23 ab	4,30 c	4,30 a	4,81 ab	7,58 bcd
MRo	17,7 bcd	11,2 d	6,7 d	7,3 ab	5,8 bcd	7,36 a	4,94 bcde	6,02 b	6,10 ab	5,39 abc	5,39 a	3,89 ab	7,05 cd
LRe	19,6 a	14,8 ab	12,2 b	10,3 a	8,2 abc	7,26 a	6,74 a	6,25 ab	7,42 a	5,56 ab	5,56 a	4,69 ab	8,90 a
LRo	18,9 ab	15,2 ab	18,4 a	3,3 c	4,1 d	6,29 ab	4,43 bcd	5,69 b	5,96 ab	5,57 ab	5,57 a	5,92 ab	8,36 ab
ReRo	18,5 abc	14,7 abc	11,4 b	3,3 c	9,1 ab	6,77 a	3,85 de	6,21 ab	6,18 ab	5,89 ab	5,89 a	6,57 ab	7,87 bc
Todas	18,2 abcd	15,1 ab	12,8 b	5,0 bc	7,6 abcd	6,91 a	4,23 bcd	6,65 ab	4,77 bc	5,66 ab	5,66 a	3,62 ab	7,80 bc
Nat	17,7 bcd	16,4 a	12,0 b	4,2 bc	7,2 abcd	5,57 b	4,34 bcd	5,18 b	4,68 bc	6,32 a	6,32 a	6,89 ab	7,93 bc

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 3. Contenido de Glomalina FE por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	5,54 cd	6,71 ab	5,26 abc	5,37 a	6,91 ab	5,93 abcd	5,86 abcd	6,77 ab	6,70 abc	8,17 bcd	7,97 bcd	6,25 ab	6,45 bc
L	5,44 d	7,14 ab	5,27 abc	4,55 bc	6,78 abc	5,92 abcd	6,18 abc	6,80 ab	6,87 ab	9,06 a	8,81 ab	6,92 a	6,64 ab
Re	5,71 bcd	6,63 ab	4,99 bc	4,01 c	6,10 bcd	4,98 d	5,49 de	6,52 ab	5,51 d	7,62 cd	7,93 bcde	5,11 b	5,88 d
Ro	6,24 abcd	7,32 ab	5,96 ab	4,85 ab	7,15 a	6,57 abc	6,16 abc	7,42 ab	7,05 a	9,11 a	8,56 abc	6,30 ab	6,89 a
ML	6,48 abc	6,97 ab	6,18 a	4,89 ab	6,81 abc	6,40 abc	6,29 ab	7,45 a	6,79 ab	9,10 a	8,88 a	6,76 a	6,92 a
MRe	6,17 abcd	6,88 ab	6,28 a	5,08 ab	7,16 a	6,54 abc	6,13 abc	7,27 ab	6,08 bcd	8,63 ab	8,13 abcd	5,57 ab	6,66 ab
MRo	6,60 ab	6,90 ab	5,33 abc	5,34 a	6,04 cd	5,54 cd	4,96 e	7,39 ab	6,08 bcd	8,30 abc	8,82 ab	6,11 ab	6,45 bc
LRe	6,85 a	6,87 ab	4,83 c	4,68 abc	6,77 abc	6,71 ab	6,15 abc	7,45 a	6,32 abcd	8,54 ab	8,74 ab	5,98 ab	6,66 ab
LRo	6,08 abcd	6,54 b	5,60 abc	4,31 bc	6,14 bcd	6,81 a	5,75 bcd	7,13 ab	5,54 d	7,97 bcd	7,59 de	5,48 ab	6,25 c
ReRo	6,42 abc	6,98 ab	5,45 abc	4,41 bc	6,40 abcd	5,75 bcd	5,63 bc	6,44 bc	5,90 cd	7,64 cd	8,37 abcd	5,46 ab	6,24 c
Todas	6,12 abcd	6,93 ab	5,28 abc	4,50 bc	5,74 d	5,97 abcd	6,17 abc	6,75 ab	6,24 abcd	8,07 bcd	7,19 e	6,04 ab	6,25 c
Nat	6,07 abcd	7,72 a	5,45 abc	4,36 bc	6,90 ab	5,86 abcd	6,40 a	5,59 c	5,83 d	7,35 d	7,79 cde	6,02 ab	6,28 c

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 4. Proporción de agregados hidroestables por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	41,14 ab	37,58 de	60,51abcd	65,97 ab	67,11 a	65,91 abc	72,48 ab	76,16 a	75,88abcd	51,80 b	66,69 a	69,75 ab	62,58 abc
L	44,84 ab	44,93 bcd	57,64 bcd	66,91 ab	73,61 a	72,53 a	62,67 abc	75,28 ab	82,86 a	50,18 b	58,49 abc	57,82 c	62,31 abc
Re	41,85 ab	42,09 cde	53,94 cde	59,68 b	70,86 a	65,67 abc	64,77 abc	73,98 ab	70,16 cd	51,43 b	63,34 a	63,70 abc	60,12 cd
Ro	43,62 ab	45,76 bcd	64,46 ab	65,59 ab	69,34 a	68,08 ab	68,89 abc	75,39 ab	77,82 abc	55,58 ab	59,29 abc	70,82 ab	63,72 abc
ML	38,13 b	47,97 bc	64,93 ab	63,36 ab	67,43 a	65,55 abc	68,83 abc	66,57 bc	74,10 bcd	57,57 ab	57,28 abc	62,19 bc	61,16 bc
MRe	43,86 ab	53,64 ab	59,01 bcd	64,42 ab	71,54 a	63,92 bc	69,09 abc	72,36 ab	71,41 cd	54,94 ab	62,63 ab	67,73 abc	62,88 abc
MRo	41,65 ab	46,07 bcd	51,98 de	62,51 b	68,56 a	65,96 abc	65,47 abc	73,65 ab	74,26 bcd	56,20 ab	63,07 a	74,61 a	62,00 abc
LRe	48,63 a	61,26 a	55,62 bcd	70,77 a	73,01 a	68,57 ab	59,33 bc	79,57 a	81,15 ab	56,41 ab	60,43 ab	66,90 abc	65,14 ab
LRo	43,25 ab	53,60 ab	68,96 a	64,03 ab	70,95 a	72,60 a	76,07 a	73,94 ab	74,72abcd	56,97 ab	59,31 abc	74,49 a	65,74 a
ReRo	41,55 ab	43,13 cde	62,48 abc	66,62 ab	67,81 a	60,63 cd	63,24 abc	74,54 ab	71,60 cd	66,44 a	62,36 ab	70,68 abc	62,60 abc
Todas	37,14 b	39,31 cde	59,12 bcd	59,25 b	63,09 ab	54,89 d	57,18 c	70,49 ab	68,63 d	55,89 ab	50,33 bc	64,78 abc	56,67 d
Nat	26,78 c	35,34 e	45,35 e	64,85 ab	54,72 b	45,76 e	65,48 abc	58,84 c	55,05 e	49,67 b	47,66 c	66,07 abc	51,30 e

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 5. Superficie de cobertura vegetal total por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	51,6bcde	150,9 ab	122,2 de	332,9 ab	211,7 cd	174,9 def	215,6 c	350,6 ab	226,5 cd	191,8 de	162,5 cd	156,7 cd	195,7 de
L	90,9 ab	208,8 a	241,6 a	280,1 ab	320,9 ab	356,2 ab	264,8 abc	406,2 a	403,9 ab	344,9 b	260,4 ab	231,8 ab	284,2 ab
Re	14,1 e	58,7 d	77,3 e	98,6 d	135,4 de	120,3 f	130,7 d	141,7 f	109,4 e	117,1 e	96,7 e	104,6 e	100,4 f
Ro	107,3 a	175,9 ab	225,9 ab	345,9 ab	340,2 a	329,4 b	322,5 a	303,8 bc	276,3 cd	332,7 b	284,6 a	253,2 ab	274,8 abc
ML	91,1 ab	157,6 ab	199,5 abc	350,8 a	326,9 ab	398,0 a	293,1 ab	350,1 ab	388,6 ab	440,6 a	261,6 ab	249,7 ab	292,3 a
MRe	50,3 cde	138,4 bc	147,2 cd	315,1 ab	244,3 bc	201,8 cde	263,1 bc	325,8 bc	218,8 d	325,0 d	254,7 ab	258,3 ab	228,6 cde
MRo	65,8 bc	167,0 ab	196,6 abc	171,4 cd	185,4 cde	205,2 cde	222,1 bc	217,6 def	272,0 cd	223,0 d	267,6 ab	199,9 bc	199,5 de
LRe	76,7 abc	211,5 a	214,3 abc	272,1 b	307,1 ab	349,3 ab	240,8 bc	274,6 bcd	430,8 a	338,9 b	281,8 a	271,1 a	272,4 abc
LRo	74,9 abc	196,1 ab	206,4 abc	200,8 c	258,9 abc	248,4 cd	248,1 bc	246,8 cde	358,4 b	309,7 bc	274,0 a	231,1 ab	237,8 bcd
ReRo	54,1 bcd	136,4 bc	167,9 bcd	169,8 cd	202,9 cd	197,9 cde	226,1 bc	202,4 def	254,6 cd	204,7 d	203,2 bc	158,4 cd	181,5 e
Todas	73,3 abc	134,4 bc	207,2 abc	183,7 c	217,8 cd	234,3 bc	235,2 bc	222,6 def	293,3 c	244,9 cd	199,8 bc	167,9 c	201,2 de
Nat	22,2 de	90,5 cd	105,9 de	125,9 cd	119,2 e	137,2 ef	150,3 d	179,6 ef	215,3 d	179,1 de	132,6 de	142,4 cd	133,4 f

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 6. Superficie de cobertura individual por plantas de Lavanda según asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
L	22,74 ab	52,19 b	60,41 b	70,03 b	80,23 a	89,06 b	66,20 b	101,56 a	100,97 c	86,22 b	65,11 bc	57,94 bc	71,05 b
ML	32,87 a	47,43 b	61,87 b	78,17 ab	110,94 a	148,15 a	92,42 a	113,43 a	152,92 b	160,73 a	86,79 b	78,99 b	97,06 a
LRe	33,85 a	82,08 a	94,34 a	92,95 a	109,60 a	142,02 a	92,56 a	119,99 a	199,52 a	154,15 a	125,52 a	124,47 a	114,25 a
LRo	10,37 bc	29,54 bc	28,24 c	21,22 c	29,04 b	37,37 cd	27,57 c	29,89 b	59,32 c	46,75 b	33,55 d	35,42 c	32,36 c
Todas	21,79 ab	38,56 bc	54,10 b	33,62 c	47,78 b	67,14 bc	52,54 bc	57,00 b	98,30 c	80,44 b	46,59 cd	47,71 c	53,80 bc
Nat	4,09 c	22,59 c	21,19 c	23,40 c	22,63 b	33,10 d	30,94 c	35,61 b	61,48 c	50,86 b	27,26 d	38,93 c	31,01 c

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 7. Longitud de plantas de Lavanda por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
L	6,85 ab	6,85 ab	9,82 ab	12,78 ab	14,08 b	15,93 b	16,15 ab	18,20 b	18,90 abc	19,30 a	18,15 ab	18,45 a	14,62 ab
ML	7,67 ab	7,67 ab	11,00 a	14,33 a	19,28 a	20,83 a	20,28 a	23,33 a	22,33 a	23,67 a	19,67 a	21,11 a	17,60 a
LRe	8,80 a	8,80 a	11,73 a	14,65 a	14,75 b	15,00 b	16,20 ab	18,50 b	20,60 ab	21,00 a	20,60 a	21,00 a	15,97 ab
LRO	5,89 b	5,89 b	7,48 b	9,06 b	10,94 bc	11,39 bc	11,22 cd	12,78 cd	14,89 bc	13,33 bc	12,78 bc	12,89 b	10,71 cd
Todas	7,30 ab	7,30 ab	9,80 ab	12,30 ab	12,90 b	13,80 b	14,44 bc	15,60 bc	17,80 abc	18,40 ab	16,60 ab	17,60 a	13,65 bc
Nat	3,38 c	3,38 c	10,31 ab	17,25 a	8,25 c	8,75 c	9,50 d	10,50 d	14,00 c	10,75 c	9,75 c	11,00 b	9,73 d

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 8. Número de inflorescencias en plantas de Lavanda por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
L	-	-	-	-	0,30 ab	0,30 ab	-	2,25 bc	3,20 b	0,05 a	-	0,90 a	0,58 bc
ML	-	-	-	-	0,50 ab	0,10 b	-	3,40 ab	4,00 b	0,00 a	-	1,60 a	0,80 ab
LRe	-	-	-	-	1,50 a	1,20 a	-	4,60 a	6,60 a	0,00 a	-	1,90 a	1,32 a
LRO	-	-	-	-	0,00 b	0,00 b	-	0,10 c	0,30 c	0,00 a	-	0,30 a	0,06 c
Todas	-	-	-	-	0,20 ab	0,00 b	-	1,60 bc	2,00 bc	0,00 a	-	1,60 a	0,45 bc
Nat	-	-	-	-	0,00 b	0,00 b	-	0,80 c	0,00 c	0,00 a	-	0,80 a	0,13 c

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 9. Superficie de cobertura individual por plantas de Mejorana según asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	12,90 abc	37,72 b	30,55 bc	83,22 b	52,91 bc	43,73 b	53,90 b	87,64 b	56,62 b	47,96 bc	40,63 bc	39,17 bc	48,91 bc
ML	15,97 ab	36,13 b	44,08 ab	105,03 ab	63,58 ab	65,67 a	63,38 b	72,98 bc	56,66 b	75,62 b	52,68 b	53,78 b	58,80 b
MRe	20,25 a	55,85 a	59,66 a	119,97 a	82,23 a	73,83 a	100,63 a	143,92 a	98,06 a	146,54 a	114,00 a	118,09 a	94,42 a
MRO	6,48 c	17,32 c	21,43 c	19,65 c	16,30 d	20,33 b	20,00 c	25,21 d	30,05 b	26,04 c	24,79 c	22,60 c	20,85 d
Todas	11,76 bc	11,70 c	31,14 bc	36,64 c	32,10 cd	32,32 b	41,28 bc	37,92 cd	44,73 b	34,94 c	31,25 bc	27,51 bc	31,11 cd
Nat	6,98 c	8,72 c	35,15 bc	38,53 c	29,03 cd	30,43 b	41,85 bc	58,69bcd	47,34 b	39,66 c	30,69 bc	30,03 bc	33,09 cd

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 10. Longitud de plantas de Mejorana por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	12,23 a	12,23 a	8,95 ab	24,75 abc	23,33 ab	23,03 ab	24,25 ab	32,85 ab	25,00 b	25,10 b	24,55 b	24,45 b	21,73 b
ML	9,20 a	9,20 a	11,10 a	28,85 ab	24,30 ab	24,60 ab	24,85 ab	31,00 ab	24,20 b	25,60 b	25,20 b	26,50 b	22,05 b
MRe	10,40 a	10,40 a	10,20 a	32,95 a	28,10 a	29,30 a	30,20 a	39,30 a	33,40 a	33,60 a	34,60 a	37,10 a	27,46 a
MRO	7,75 a	7,75 a	5,50 b	19,55 bc	18,15 b	18,35 b	17,60 b	20,80 c	18,00 b	18,80 bc	18,80 b	19,40 b	15,87 c
Todas	9,25 a	9,25 a	8,50 ab	24,88 abc	28,75 a	22,25 ab	23,25 ab	25,75 bc	20,50 b	15,75 c	8,50 c	20,75 b	18,02 bc
Nat	7,50 a	7,50 a	8,00 ab	15,67 c	29,33 a	21,17 b	23,00 ab	30,67 ab	23,00 b	21,00 bc	19,00 b	24,00 b	18,63 bc

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 11. Número de inflorescencias en plantas de Mejorana por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	-	-	-	-	-	-	-	7,65 ab	-	-	-	0,60 b	0,69 b
ML	-	-	-	-	-	-	-	2,90 bc	-	-	-	0,90 b	0,32 b
MRe	-	-	-	-	-	-	-	10,10 a	-	-	-	6,10 a	1,35 a
MRo	-	-	-	-	-	-	-	0,20 c	-	-	-	0,20 b	0,03 b
Todas	-	-	-	-	-	-	-	1,80 bc	-	-	-	0,40 b	0,18 b
Nat	-	-	-	-	-	-	-	1,40 bc	-	-	-	0,20 b	0,13 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 12. Superficie de cobertura individual por plantas de Retama según asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
Re	3,53 abc	14,67 b	19,33 a	24,65 b	33,84 ab	30,08 a	32,68 a	35,42 a	27,34 a	29,27 a	24,18 a	26,15 a	25,10 a
MRe	4,49 a	23,68 a	12,79 b	43,10 a	43,95 a	32,62 a	27,85 a	17,31 bc	15,89 b	15,29 b	15,36 ab	11,10 b	21,95 a
LRe	4,89 a	13,35 bc	13,95 ab	37,57 a	39,91 a	27,08 a	30,92 a	18,99 b	11,34 bc	15,98 b	13,35 b	11,08 b	19,87 a
ReRo	2,44 bc	5,56 c	6,78 cd	16,63 b	23,21 bc	14,29 b	10,48 b	9,25 bc	5,05 c	4,64 b	0,31 c	0,00 c	8,22 b
Todas	4,23 ab	21,83 ab	10,87 bc	23,81 b	25,07 bc	21,60 ab	14,53 b	12,08 bc	9,74 bc	7,24 b	6,19 bc	0,86 bc	13,17 b
Nat	1,77 c	21,37 ab	4,87 d	19,44 b	19,10 c	21,72 ab	9,40 b	7,93 c	7,17 bc	6,58 b	1,36 c	3,01 bc	10,31 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 13. Longitud de plantas de Retama por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
Re	37,53 ab	37,53 ab	36,35 a	42,15 ab	41,48 ab	41,24 ab	40,20 a	38,95 a	40,15 a	40,85 a	37,40 a	37,00 a	39,23 a
MRe	44,50 a	44,50 a	45,50 a	45,00 a	43,60 a	45,70 a	31,80 ab	29,90 ab	29,10 abc	27,90 ab	17,70 b	14,60 b	34,98 a
LRe	37,45 ab	37,45 ab	42,80 a	42,50 ab	39,70 abc	38,00 abc	37,30 a	37,60 a	32,00 ab	29,90 ab	14,10 bc	13,00 bc	33,48 a
ReRo	30,67 b	30,67 b	31,89 a	31,67 bc	27,94 cd	28,11 c	20,44 b	20,22 b	16,78 bc	16,56 b	2,33 c	0,00 c	21,44 b
Todas	33,00 ab	33,00 ab	31,75 a	30,88 bc	20,50 d	32,50 bc	18,00 b	20,75 b	14,75 c	21,25 b	21,50 b	2,25 bc	22,98 b
Nat	28,00 b	28,00 b	33,50 a	28,50 c	28,50 bcd	33,00 bc	30,50 ab	31,00 ab	15,50 c	24,5 b	23,00 b	4,50 bc	24,59 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 14. Número de ramificaciones en plantas de Retama por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
Re	5,70 ab	5,70 ab	10,35 a	21,95 a	26,75 a	25,35 a	21,25 a	25,40 a	26,30 a	28,70 a	27,10 a	34,85 a	21,62 a
MRe	7,40 ab	7,40 ab	12,20 a	11,30 b	13,40 b	11,70 b	9,50 b	10,30 b	8,50 b	9,10 b	6,80 b	3,30 b	9,24 b
LRe	6,70 ab	6,70 ab	10,70 a	13,00 b	14,40 b	13,00 b	10,70 b	9,80 b	8,10 b	8,40 b	6,10 b	2,50 b	9,18 b
ReRo	5,00 b	5,00 b	7,60 a	7,90 b	11,90 b	7,80 b	5,20 b	5,00 b	3,40 b	3,90 b	0,50 b	0,00 b	5,27 b
Todas	8,80 a	8,80 a	11,40 a	11,60 b	12,80 b	10,00 b	6,80 b	6,80 b	5,00 b	4,40 b	1,60 b	0,40 b	7,37 b
Nat	4,50 b	4,50 b	7,00 a	7,75 b	9,50 b	9,75 b	6,00 b	6,75 b	5,00 b	5,25 b	2,25 b	1,75 b	5,83 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 15. Superficie de cobertura individual por plantas de Romero según asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
Ro	26,82 a	43,97 ab	56,48 bc	86,48 a	85,04 ab	82,34 ab	80,62 b	75,95 b	69,08 b	83,21 ab	71,14 b	63,29 a	68,70 b
MRo	27,07 a	68,49 a	74,96 b	79,19 a	100,39 ab	86,84 ab	96,48 ab	93,53 ab	119,87 a	108,11 ab	103,45 ab	80,14 a	86,54 ab
LRO	26,43 a	66,16 a	76,84 b	66,05 ab	76,38 bc	82,29 ab	91,06 b	83,59 b	105,93 ab	85,47 ab	108,99 ab	77,34 a	78,88 ab
ReRo	24,62 a	62,63 ab	77,14 b	68,29 ab	78,26 bc	84,66 ab	102,58 ab	91,96 ab	122,23 a	97,72 ab	101,31 ab	79,18 a	82,55 ab
Todas	35,56 a	62,30 ab	111,08 a	89,66 a	112,88 a	113,27 a	126,90 a	115,63 a	140,47 a	122,23 a	115,76 a	91,87 a	103,13 a
Nat	9,32 b	37,81 b	44,67 c	44,57 b	48,45 c	51,99 b	68,09 b	77,43 b	99,29 ab	81,97 b	73,32 b	70,40 a	58,94 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 16. Longitud de plantas de Romero por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
Ro	11,60 a	11,60 a	25,00 a	29,73 a	30,00 a	29,17 a	31,35 a	32,35 a	30,60 a	31,45 a	30,75 a	31,20 a	27,07 a
MRO	11,95 a	11,95 a	23,00 a	26,80 a	27,35 a	27,85 a	28,70 a	29,05 a	29,30 a	29,30 a	29,50 a	29,10 a	25,32 a
LRO	11,30 a	11,30 a	21,80 a	27,00 a	28,05 a	27,85 a	29,20 a	29,30 a	29,30 a	29,20 a	29,20 a	29,40 a	25,24 a
ReRo	10,80 a	10,80 a	21,20 a	25,40 a	25,85 a	25,95 a	27,10 a	27,30 a	27,20 ab	27,70 a	27,70 a	27,80 a	23,73 a
Todas	12,90 a	12,90 a	25,60 a	29,40 a	30,00 a	29,90 a	31,60 a	32,00 a	32,20 a	33,20 a	33,40 a	32,20 a	27,94 a
Nat	5,00 b	5,00 b	10,60 b	11,60 b	16,20 b	16,10 b	17,60 b	18,80 b	22,00 b	20,40 b	18,60 b	19,00 b	15,07 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 17. Número de flores en plantas de Romero por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
Ro	-	-	-	-	-	0,00 b	11,50 a	-	0,00 b	0,50 a	6,65 b	-	1,55 ab
MRO	-	-	-	-	-	0,90 a	13,80 a	-	0,20 b	0,40 a	8,30 b	-	1,97 ab
LRO	-	-	-	-	-	0,10 ab	14,22 a	-	0,00 b	0,00 a	8,60 b	-	1,91 ab
ReRo	-	-	-	-	-	0,20 ab	11,70 a	-	0,00 b	1,00 a	11,70 ab	-	2,05 ab
Todas	-	-	-	-	-	0,20 ab	11,20 a	-	0,40 ab	0,60 a	16,40 a	-	2,40 a
Nat	-	-	-	-	-	0,20 ab	6,80 a	-	0,80 a	0,00 a	4,60 a	-	1,03 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 18. Número de ramificaciones en plantas de Romero por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
Ro	2,80 ab	2,80 ab	4,25 a	4,05 b	4,95 a	4,70 a	5,15 a	5,45 a	5,50 a	5,60 a	5,55 a	5,35 b	4,68 a
MRO	3,00 ab	3,00 ab	4,60 a	4,40 ab	5,00 a	5,20 a	5,20 a	5,90 a	5,80 a	6,20 a	6,20 a	6,20 ab	5,06 a
LRO	2,70 ab	2,70 ab	5,10 a	5,20 ab	5,60 a	5,20 a	5,90 a	6,40 a	6,40 a	6,80 a	6,30 a	6,20 ab	5,38 a
ReRo	3,00 ab	3,00 ab	4,50 a	4,60 ab	5,20 a	5,10 a	5,60 a	5,90 a	6,10 a	6,10 a	6,00 a	6,10 ab	5,10 a
Todas	3,40 a	3,40 a	5,00 a	5,00 ab	5,40 a	5,40 a	5,80 a	6,20 a	6,40 a	6,40 a	6,20 a	6,40 ab	5,42 a
Nat	1,40 b	1,40 b	5,80 a	5,80 a	5,20 a	5,60 a	5,20 a	6,80 a	6,80 a	7,00 a	7,20 a	7,40 a	5,47 a

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 19. Densidad de micelio micorrícico total por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,39 ab	0,83 cdef	2,49 a	2,44 ab	2,44 ab	2,30 bcd	2,21 cd	2,40 a	2,33 b	2,19 a	1,62 ab	1,80 a	1,95 b
L	0,45 a	1,14 ab	1,61 cd	2,16 bc	2,66 a	3,01 a	3,15 a	2,64 a	2,76 a	1,96 ab	1,65 a	1,62 abc	2,01 a
Re	0,34 abc	0,86bcdef	1,75 bc	2,09 c	2,19 bcd	1,61 g	1,58 fg	1,95 bc	1,70 de	1,45 de	1,27 de	1,23 e	1,50 g
Ro	0,21 c	0,99abcde	2,05 b	2,71 a	2,33 ab	1,92 ef	2,02 de	2,55 a	1,98 c	1,73 bcd	1,52 abcd	1,75 ab	1,81 c
ML	0,25 bc	1,01 abcd	2,58 a	1,94 c	2,34 ab	1,90 ef	1,88 ef	2,12 b	2,09 c	1,64 de	1,40 abcd	1,70 abc	1,74 cd
MRe	0,19 c	0,90 bcde	1,35 de	1,88 c	2,28 abc	2,11 cde	2,07 de	1,76 cd	1,97 c	1,92 bc	1,30 d	1,49 cd	1,60 ef
MRo	0,29 abc	1,21 a	1,76 bc	1,53 d	1,91 cde	2,52 b	2,46 bc	1,70 cd	1,87 cd	1,56 de	1,36 bcd	1,61 abc	1,65 de
LRe	0,23 bc	1,10 abc	1,33 de	2,08 c	2,05 bcde	2,02 def	2,06 de	1,79 cd	1,47 ef	1,66 cde	1,36 bcd	1,34 de	1,54 fg
LRo	0,39 ab	0,93abcde	1,33 de	2,41 ab	1,83 de	2,52 b	2,55 b	1,98 bc	1,42 f	1,37 e	1,59 abc	1,53 bcd	1,66 de
ReRo	0,31 abc	0,74 def	0,89 f	1,91 c	1,93 cde	2,34 bc	2,36 bc	1,72 cd	2,07 c	1,47 de	1,31 cd	1,51 cd	1,55 fg
Todas	0,25 bc	0,70 ef	1,09 ef	1,82 cd	2,05 bcde	2,01 def	1,98 def	1,51 d	1,85 cd	1,43 e	1,29 d	1,50 cd	1,46 g
Nat	0,22 c	0,60 f	0,78 f	2,03 c	1,68 e	1,80 fg	1,73 g	1,56 d	1,44 f	1,40 e	1,03 e	1,19 e	1,29 h

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 20. Densidad de micelio micorrícico vivo por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,24 a	0,28 ab	0,31 b	0,58 a	0,45 ab	0,69 bc	0,66 bc	1,16 a	0,78 b	0,84 a	0,68 a	0,85 a	0,63 a
L	0,08 bc	0,22 abc	0,11 cd	0,56 ab	0,50 a	0,85 a	0,89 a	1,08 ab	0,96 a	0,77 a	0,56 abcd	0,75 ab	0,61 a
Re	0,08 bc	0,34 a	0,13 cd	0,59 a	0,40 abcd	0,38 ef	0,37 f	0,83 bc	0,58 def	0,54 d	0,46 cd	0,58 cde	0,44 e
Ro	0,07 bc	0,30 a	0,46 a	0,54 ab	0,38 bcd	0,50 def	0,51 de	1,21 a	0,73 bcd	0,70 abc	0,60 abc	0,74 ab	0,56 b
ML	0,16 ab	0,17 bc	0,46 a	0,35 c	0,49 ab	0,52 de	0,51 de	1,07 ab	0,72 bcd	0,58 bcd	0,54 abcd	0,76 ab	0,53 bc
MRe	0,05 c	0,13 c	0,10 cd	0,45 abc	0,44 abc	0,58 cd	0,57 cd	0,80 c	0,71 bcde	0,72 ab	0,49 bcd	0,66 bcd	0,48 cde
MRo	0,11 bc	0,22 abc	0,22 bc	0,41 bc	0,39 abcd	0,77 ab	0,75 b	0,79 c	0,60 cdef	0,53 d	0,62 ab	0,75 ab	0,51 bcd
LRe	0,09 bc	0,24 abc	0,23 bc	0,46 abc	0,39 abcd	0,49 def	0,50 de	0,84 bc	0,51 f	0,62 bcd	0,51 bcd	0,50 e	0,45 e
LRo	0,12 bc	0,25 abc	0,10 cd	0,57 a	0,33 cd	0,76 ab	0,77 b	0,86 bc	0,54 ef	0,48 d	0,69 a	0,66 bcd	0,51 bcd
ReRo	0,08 bc	0,16 bc	0,07 d	0,41 bc	0,37 bcd	0,57 de	0,57 cd	0,87 bc	0,77 bc	0,52 d	0,55 abcd	0,71 bc	0,47 de
Todas	0,04 c	0,21 abc	0,09 cd	0,36 c	0,40 abcd	0,56 de	0,55 cde	0,65 c	0,66bcdef	0,56 cd	0,49 bcd	0,67 bc	0,44 e
Nat	0,03 c	0,13 c	0,05 d	0,33 c	0,28 d	0,45 f	0,44 ef	0,76 c	0,53 f	0,50 d	0,42 d	0,53 de	0,37 f

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 21. Densidad radical total por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	-	0,78 a	1,54 abcd	2,16 cde	2,21 cde	5,19 ab	5,99 bc	7,37 de	10,60 bcd	9,34 bcd	9,44 a	7,26 cde	5,63 cd
L	-	0,65 abc	1,82 ab	3,09 ab	2,73 bc	3,91 cde	11,12 a	19,54 a	21,73 a	14,83 a	9,71 a	13,73 a	9,35 a
Re	-	0,27 f	0,78 e	1,25 f	1,41 f	3,29 e	1,91 d	4,28 e	2,17 e	2,54 e	1,63 e	2,03 f	1,96 f
Ro	-	0,46 cdef	1,31abcde	1,60 def	2,68 bc	3,66 cde	6,70 bc	11,48 cd	14,05 bc	11,02 abc	8,37 ab	9,22 bcd	6,41 bc
ML	-	0,63 abcd	1,71 abc	2,63 abc	2,02 cdef	3,20 e	9,22 ab	17,72 ab	15,03 b	11,07 abc	7,36 abc	8,27 cd	7,17 bc
MRe	-	0,41 def	1,14 cde	2,28 cde	1,49 ef	4,73 abc	4,54 cd	6,90 de	9,01 d	7,98 cd	7,43 abc	4,04 ef	4,54 de
MRo	-	0,51 bcde	1,12 cde	1,54 ef	1,91 def	3,84 cde	6,41 bc	14,01 bc	8,98 d	10,51 abc	7,32 abc	10,50 abc	6,06 bc
LRe	-	0,64 abc	1,87 a	3,29 a	1,82 def	4,34 bcde	9,65 ab	17,62 ab	10,28 cd	13,52 ab	8,55 ab	9,81 bc	7,40 b
LRo	-	0,59 abcd	1,67 abc	2,20 cde	3,49 a	4,48 abcd	6,81 bc	8,41 de	10,24 cd	11,31 abc	8,44 ab	12,34 ab	6,36 bc
ReRo	-	0,50 cde	1,19 bcde	2,37 bcd	2,97 ab	3,60 cde	5,34 cd	9,69 cde	11,40 bcd	11,71 abc	6,18 abc	7,79 cde	5,70 cd
Todas	-	0,73 ab	1,29abcde	1,61 def	3,17 ab	5,48 a	9,16 ab	11,13 cd	11,97 bcd	10,81 abc	5,16 bc	8,80 bcd	6,30 bc
Nat	-	0,31 ef	1,02 de	1,37 f	2,45 bcd	3,46 de	4,87 cd	4,76 e	7,71 d	5,31 de	3,99 cd	5,29 def	3,69 e

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 22. Proporción de raíz micorrizada por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	-	35,1 bcde	39,4 d	64,9 ab	63,5 abc	65,2 a	73,4 b	45,6 cde	47,3 bc	25,6 e	54,7 bc	45,0 defg	50,86 bc
L	-	39,8 abc	64,8 abc	51,8 bc	56,8 bc	46,6 bc	61,9 bcd	45,1 cdef	48,4 bc	23,2 e	40,8 d	45,8 def	47,72 cd
Re	-	52,3 a	79,5 a	72,6 a	64,6 abc	54,4 ab	85,5 a	78,4 a	69,6 a	70,9 a	66,0 a	67,9 a	69,25 a
Ro	-	42,5 ab	65,9 abc	52,1 bc	53,5 c	44,0 bcd	60,1 cde	45,9 cde	35,6 de	30,9 de	48,4 cd	37,2 g	46,92 cd
ML	-	40,0 abc	57,6 bcd	55,9 abc	62,1 abc	39,8 cde	62,9 bcd	42,2 cdef	34,9 de	29,8 de	39,5 d	52,0 bcd	46,95 cd
MRe	-	24,5 cde	62,0 abc	53,9 bc	59,6 abc	46,9 bc	57,5 cde	46,7 cde	39,9 cd	37,9 cd	59,3 ab	39,8 fg	48,00 cd
MRO	-	19,4 e	51,4 bcd	58,7 abc	72,0 ab	28,3 e	49,0 ef	37,8 ef	40,0 cd	30,6 de	48,4 cd	49,2 cde	44,07 de
LRe	-	32,6 bcde	63,5 abc	64,3 ab	73,5 a	50,2 bc	69,0 bc	51,1 c	45,8 cd	45,0 bc	53,2 bc	53,7 bc	54,71 b
LRO	-	20,3 de	62,5 abc	44,7 c	65,1 abc	30,8 de	51,7 def	39,2 def	42,0 cd	39,9 cd	46,8 cd	43,5 efg	44,23 de
ReRo	-	36,5 bcd	68,3 ab	67,6 ab	62,6 abc	39,7 cde	48,3 ef	48,6 cd	37,6 cde	29,7 de	48,1 cd	39,2 fg	47,85 cd
Todas	-	23,9 cde	47,7 cd	54,5 abc	59,4 abc	26,0 e	44,2 f	35,6 f	28,5 e	29,2 de	46,2 cd	44,5 defg	39,98 e
Nat	-	22,4 de	41,0 d	59,1 abc	68,9 ab	47,2 bc	73,9 b	62,5 b	57,3 b	53,3 b	65,5 a	58,3 b	55,40 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 23. Densidad de raíz micorrizada por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	-	0,14 a	0,25 cd	0,49 bc	0,31 bc	3,32 a	4,36 bc	1,69 c	5,04 b	2,34 c	5,14 a	3,27 cde	2,39 bc
L	-	0,13 ab	0,46 a	0,53 b	0,34 b	1,82 bcd	6,92 a	4,44 a	10,38 a	3,55 bc	3,98 abc	6,27 a	3,53 a
Re	-	0,08 bcd	0,25 cd	0,30 d	0,20 c	1,80 bcd	1,63 d	1,68 c	1,60 c	1,79 c	1,08 d	1,36 e	1,07 d
Ro	-	0,09 abcd	0,32 abcd	0,27 d	0,32 bc	1,60 bcd	4,01 bc	2,67 bc	5,01 b	3,15 bc	3,88 abc	3,43 cd	2,25 bc
ML	-	0,13 ab	0,39 abc	0,49 bc	0,28 bc	1,30 d	5,74 ab	3,68 ab	5,31 b	3,32 bc	2,90 bc	4,20 bc	2,52 b
MRe	-	0,06 cd	0,27 bcd	0,37 bcd	0,19 c	2,26 b	2,56 cd	1,59 c	3,64 bc	3,04 bc	4,36 ab	1,60 de	1,81 c
MRO	-	0,05 cd	0,23 cd	0,30 d	0,30 bc	1,11 d	3,27 cd	2,52 c	3,59 bc	3,19 bc	3,56 abc	5,10 abc	2,11 bc
LRe	-	0,11 abc	0,47 a	0,72 a	0,30 bc	2,19 bc	6,65 a	4,50 a	4,73 b	5,58 a	4,10 abc	4,97 abc	3,12 a
LRO	-	0,06 cd	0,42 ab	0,33 cd	0,51 a	1,37 d	3,42 cd	1,67 c	4,31 b	4,70 ab	3,94 abc	5,66 ab	2,40 bc
ReRo	-	0,10 abcd	0,31 abcd	0,53 b	0,41 ab	1,42 cd	2,57 cd	2,33 c	3,92 b	3,42 bc	2,99 bc	3,06 cde	1,91 bc
Todas	-	0,09 abcd	0,23 cd	0,29 d	0,41 ab	1,43 cd	3,98 bc	2,08 c	3,42 bc	3,16 bc	2,40 cd	3,94 bc	1,95 bc
Nat	-	0,04 d	0,17 d	0,26 d	0,38 b	1,66 bcd	3,60 bcd	1,46 c	4,09 b	2,82 bc	2,64 bcd	3,12 cde	1,84 c

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 24. Número total de esporas en 100 g de sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	100 a	136 b	497 ab	794 a	307 abc	375 de	474 a	1160 a	1025 ab	944 abc	1268 ab	1004 a	673,71 a
L	52 b	219 a	416 b	473 de	310 abc	278 def	327 bcd	507 c	1063 ab	892 abcd	497 c	499 e	461,12 cd
Re	32 bcd	77 bcd	232 c	349 efg	198 cd	157 f	268 cdef	667 bc	265 de	380 d	908 bc	525 de	338,14 e
Ro	45 b	235 a	598 a	419 def	411 ab	680 a	349 abc	618 bc	519 cde	710 bcd	580 bc	588 cde	479,29 cd
ML	39 bc	102 bcd	498 ab	705 ab	476 a	119 f	437 ab	660 bc	657 bcde	735 abcd	664 bc	813abcde	492,06 cd
MRe	38 bc	107 bc	237 c	203 e	258 bcd	173 f	253 cdef	873 b	695 bcd	809 abcd	1298 ab	657 bcde	466,78 cd
MRO	42 bc	127 bc	169 c	297 fg	288 abc	397 cde	177 ef	718 bc	1065 ab	1255 a	1746 a	931 ab	600,94 ab
LRe	40 bc	94 bcd	401 b	632 bc	218 bcd	574 ab	200 def	121 d	1133 ab	1173 ab	659 bc	851 abcd	507,99 bc
LRO	19 cd	80 bcd	410 b	367 ef	292 abc	288 def	290 cdef	153 d	930 abc	519 cd	591 bc	894 abc	402,72 de
ReRo	31 bcd	43 cd	589 a	367 ef	198 cd	549 abc	303 bcde	92 d	1345 a	769 abcd	1220 abc	808 bcde	526,13 bc
Todas	37 bcd	42 cd	369 b	523 cd	252 bcd	432 bcd	145 f	63 d	1097 ab	1122 ab	1110 abc	870 abc	505,20bcd
Nat	13 e	14 d	182 c	315 fg	80 e	256 ef	145 f	13 d	198 e	1242 a	686 bc	806abcde	329,03 e

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 25. Número de esporas de *G.clarum* en 100 g de sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	6,00 a	9,00 a	20,00 b	80,00 a	0,00 b	7,50 a	-	-	-	-	-	-	10,21 a
L	6,00 a	7,00 ab	1,00 b	31,25 b	0,00 b	2,50 b	-	-	-	-	-	-	4,00 cde
Re	4,00 a	5,00 ab	5,00 b	12,50 cd	1,25 ab	1,25 b	-	-	-	-	-	-	2,42 def
Ro	3,00 a	3,00 ab	10,00 b	3,75 cd	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	1,65 f
ML	3,00 a	3,00 ab	18,00 b	0,00 d	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	2,00 f
MRe	2,00 a	3,00 ab	15,00 b	2,50 cd	2,50 a	0,00 b	-	-	-	-	-	-	2,08 ef
MRo	4,00 a	2,00 ab	8,00 b	15,00 c	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	2,42 def
LRe	3,00 a	5,00 ab	18,00 b	5,00 cd	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	2,58 def
LRo	2,00 a	6,00 ab	38,00 a	5,00 cd	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	4,25 cd
ReRo	7,00 a	4,00 ab	54,00 a	10,00 cd	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	6,25 b
Todas	6,00 a	1,00 b	50,00 a	5,00 cd	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	5,17 bc

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie.

Anexo 26. Densidad específica de *G.clarum* por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,08 b	0,08 a	0,06 bc	0,11 a	0,00 b	0,02 a	-	-	-	-	-	-	0,03 ab
L	0,11 ab	0,04 a	0,00 d	0,07 ab	0,00 b	0,01 b	-	-	-	-	-	-	0,02 bc
Re	0,11 ab	0,07 a	0,02 cd	0,04 bc	0,01 ab	0,01 b	-	-	-	-	-	-	0,02 bc
Ro	0,08 b	0,01 a	0,02 cd	0,01 c	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,01 c
ML	0,08 b	0,04 a	0,05 cd	0,00 c	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,01 bc
MRe	0,07 b	0,02 a	0,07 bc	0,01 c	0,01 a	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,02 bc
MRo	0,12 ab	0,05 a	0,05 bc	0,06 b	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,02 abc
LRe	0,09 b	0,06 a	0,0 cd	0,01 c	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,02 bc
LRo	0,15 ab	0,08 a	0,10 b	0,02 c	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,03 ab
ReRo	0,27 a	0,09 a	0,10 b	0,04 bc	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,04 a
Todas	0,18 ab	0,04 a	0,15 a	0,01 c	0,00 b	0,00 b	-	-	-	-	-	-	0,03 ab

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 27. Número de esporas de *G.constrictum* en 100 g de sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	82,0 bc	116,0 cd	168,0 bcd	210,0 bcd	118,8 b	205,0bcde	326,3 a	890,0 a	798,8abc	626,3abcd	1001,3 ab	691,3 ab	436,1 ab
L	126,0 ab	147,0 bcd	185,0 bcd	231,3 bcd	200,0 ab	163,8 cde	213,8 bcd	378,8 c	783,8abc	575,0 bcd	382,5 b	403,3 b	315,8 c
Re	43,0 c	55,0 d	99,0 de	123,8 de	116,3 b	93,8 de	147,5 cde	335,0 c	180,0 d	211,3 e	661,3 b	401,3 b	205,6 d
Ro	177,0 a	257,0 a	158,0 bcd	197,5 bcd	263,8 ab	423,3 a	236,3 abc	426,3 c	425,0 cd	478,8 cde	466,3 b	498,8 ab	334,0 c
ML	78,0 bc	173,0 abc	304,0 a	380,0 a	321,3 a	76,3 e	283,8 ab	517,5 bc	506,3bcd	496,3 cde	502,5 b	595,0 ab	352,8 bc
MRe	81,0 bc	57,0 d	42,0 e	52,5 e	121,3 b	107,5 de	162,5 cde	680,0 ab	54,5 bcd	623,8abcd	1057,5 ab	547,5 ab	339,6 c
MRo	82,0 bc	56,0 d	129,0 cde	161,3 cde	167,5 ab	231,3 bcd	115,0 de	511,3 bc	905,0 ab	958,8 a	1403,3 a	775,0 a	457,9 a
LRe	62,0 c	109,0 cd	217,0 bc	271,3 bc	102,5 b	405,0 a	138,8 cde	100,0 d	860,0 ab	860,0 ab	546,3 b	730,0 ab	366,8 abc
LRo	52,0 c	178,0 abc	156,0 bcd	195,0 bcd	197,5 ab	181,3bcde	156,3 cde	96,7 d	666,3abc	372,5 de	480,0 b	775,0 a	292,2 c
ReRo	28,0 c	210,0 ab	109,0 de	136,3 de	98,8 b	263,8 bc	147,5 cde	62,5 d	1036,3 a	491,3 cde	865,0 ab	580,0 ab	335,7 c
Todas	32,0 c	114,0 cd	243,0 ab	303,8 ab	181,3 ab	317,5 ab	97,5 e	48,8 d	873,8 ab	788,8 abc	792,5 ab	651,3 ab	370,3 abc

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie.

Anexo 28. Densidad específica de *G.constrictum* por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,61 a	0,68 a	0,26 abc	0,27 d	0,42 c	0,59 ab	0,74 ab	0,81 a	0,83 ab	0,74 bc	0,84 ab	0,73 b	0,63 b
L	0,74 a	0,67 a	0,39 abc	0,53 ab	0,68 ab	0,61 ab	0,73 ab	0,81 a	0,83 ab	0,78 abc	0,81 ab	0,87 ab	0,70 a
Re	0,79 a	0,66 a	0,24 c	0,39 cd	0,53 abc	0,64 ab	0,61 bc	0,54 b	0,72 b	0,63 d	0,75 b	0,75 ab	0,60 b
Ro	0,80 a	0,86 a	0,45 ab	0,49 abc	0,68 ab	0,66 ab	0,65 abc	0,75 a	0,89 a	0,78 abc	0,80 ab	0,88 ab	0,72 a
ML	0,72 a	0,86 a	0,38 abc	0,58 ab	0,70 ab	0,67 ab	0,67 abc	0,81 a	0,84 ab	0,80 abc	0,82 ab	0,78 ab	0,72 a
MRe	0,85 a	0,88 a	0,25 bc	0,27 d	0,51 bc	0,66 ab	0,69 abc	0,83 a	0,83 ab	0,89 a	0,85 ab	0,87 ab	0,70 a
MRo	0,71 a	0,74 a	0,35 abc	0,55 ab	0,60 abc	0,62 ab	0,74 ab	0,76 a	0,90 a	0,85 ab	0,88 ab	0,86 ab	0,71 a
LRe	0,84 a	0,82 a	0,31 abc	0,45 bc	0,49 bc	0,73 a	0,76 a	0,86 a	0,85 ab	0,88 a	0,91 a	0,91 a	0,73 a
LRo	0,75 a	0,76 a	0,46 a	0,54 ab	0,73 a	0,67 ab	0,63 abc	0,69 a	0,78 ab	0,84 ab	0,86 ab	0,91 a	0,72 a
ReRo	0,67 a	0,75 a	0,37 abc	0,37 cd	0,55 abc	0,53 b	0,57 c	0,76 a	0,84 ab	0,72 b	0,73 b	0,77 ab	0,64 b
Todas	0,60 a	0,83 a	0,31 abc	0,59 a	0,68 ab	0,77 a	0,73 ab	0,83 a	0,86 ab	0,82 ab	0,78 ab	0,80 ab	0,72 a

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 29. Número de esporas de *G.coronatum* en 100 g de sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	2,0 ab	3,0 ab	1,0 d	93,8 a	6,3 a	1,3 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	8,9 ab
L	0,0 b	5,0 ab	3,0 d	81,3 a	2,5 a	2,5 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	7,9 ab
Re	1,0 ab	6,0 ab	9,0 cd	42,5 a	0,0 a	2,5 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	5,1 b
Ro	0,0 b	12,0 a	62,0 a	78,8 a	0,0 a	3,8 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	13,0 a
ML	2,0 ab	3,0 ab	51,0 ab	85,0 a	0,0 a	0,0 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	11,8 ab
MRe	2,0 ab	8,0 ab	46,0 abc	38,8 a	0,0 a	0,0 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	7,9 ab
MRo	5,0 a	8,0 ab	15,0 bcd	36,3 a	1,3 a	0,0 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	5,5 b
LRe	2,0 ab	0,0 b	53,0 ab	96,3 a	7,5 a	0,0 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	13,2 a
LRo	1,0 ab	3,0 ab	48,0 ab	53,8 a	0,0 a	0,0 a	-	0,0 a	0,0 a	-	-	-	8,8 ab
ReRo	0,0 b	0,0 b	58,0 a	68,8 a	0,0 a	2,5 a	-	0,0 a	1,3 a	-	-	-	10,9 ab
Todas	2,0 ab	0,0 b	36,0 abcd	92,5 a	6,3 a	0,0 a	-	1,3 a	0,0 a	-	-	-	11,5 ab

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie.

Anexo 30. Densidad específica de *G.coronatum* por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,03 ab	0,02 ab	0,00 c	0,12 a	0,02 ab	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,02 b
L	0,00 b	0,02 ab	0,01 c	0,19 a	0,01 ab	0,02 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,02 b
Re	0,04 ab	0,08 a	0,05 bc	0,13 a	0,00 b	0,02 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,03 ab
Ro	0,00 b	0,05 ab	0,10 b	0,19 a	0,00 b	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,03 ab
ML	0,06 ab	0,03 ab	0,11 b	0,13 a	0,00 b	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,03 ab
MRe	0,07 ab	0,06 ab	0,21 a	0,21 a	0,00 b	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,05 a
MRo	0,14 a	0,06 ab	0,10 bc	0,13 a	0,00 b	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,04 ab
LRe	0,05 ab	0,00 b	0,15 ab	0,16 a	0,03 a	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,03 ab
LRo	0,06 ab	0,04 ab	0,12 ab	0,15 a	0,00 b	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,03 ab
ReRo	0,00 b	0,00 b	0,11 b	0,18 a	0,00 b	0,00 a	-	0,00 b	0,00 a	-	-	-	0,02 b
Todas	0,07 ab	0,00 b	0,10 b	0,18 a	0,02 ab	0,00 a	-	0,04 a	0,00 a	-	-	-	0,03 ab

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 31. Número de esporas de *G.intraradices* en 100 g de sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	10,0 a	10,0 ab	158,7 ab	188,8 a	92,5 a	85,0 bc	76,3 ab	171,3 ab	138,8 ab	138,8 ab	137,5 bc	172,5 a	115,0 a
L	1,0 b	18,0 a	168,0 a	36,3 de	73,8 ab	47,5 c	36,3 ab	51,3 cde	101,3 abc	121,3 abc	42,5 d	31,7 c	60,7 b
Re	1,0 b	5,0 ab	95,0 cd	28,8 e	51,3 bc	27,5 c	70,0 ab	238,8 a	50,0 c	112,5 abc	160,0 b	68,8 bc	75,7 b
Ro	0,0 b	5,0 ab	186,0 a	48,8 cde	70,0 ab	136,7 ab	67,5 ab	140,0 bc	33,8 c	108,8 abc	56,3 d	38,8 c	74,3 b
ML	0,0 b	0,0 b	174,0 a	58,8 cde	72,5 ab	23,7 c	80,0 ab	86,3bcde	45,0 c	95,0 bc	82,5 cd	98,3 abc	68,0 b
MRe	0,0 b	0,0 b	80,0 d	37,5 de	71,3 ab	27,5 c	57,5 ab	112,5 bcd	87,5 abc	67,5 c	142,5 bc	58,8 bc	61,9 b
MRo	0,0 b	5,0 ab	56,0 d	31,3 de	70,0 ab	87,5 bc	41,3 ab	137,5 bc	73,8 bc	137,5 ab	183,3 b	98,8 abc	76,8 b
LRe	0,0 b	1,0 b	152,0 abc	116,3 b	55,0 bc	81,7 bc	27,5 b	13,8 e	80,0 bc	91,3 bc	47,5 d	55,0 c	60,1 b
LRo	0,0 b	0,0 b	77,0 d	65,0 cde	36,3 bc	61,3 c	88,8 ab	41,7 de	167,5 a	61,3 c	48,8 d	67,5 bc	59,6 b
ReRo	0,0 b	0,0 b	103,0 bcd	86,3 bcd	47,5 bc	186,3 a	98,8 a	18,8 e	165,0 a	165,0 a	255,0 a	165,0 a	107,5 a
Todas	0,0 b	0,0 b	80,0 d	95,0 bc	26,3 c	66,3 bc	30,0 b	1,3 e	113,8 abc	161,3 a	196,3 ab	146,3 ab	76,4 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie.

Anexo 32. Densidad específica de *G.intraradices* por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,10 a	0,10 a	0,36 abc	0,28 a	0,34 a	0,24 ab	0,15 b	0,17 bcd	0,15 ab	0,20 bc	0,11 ab	0,19 ab	0,19 abc
L	0,02 b	0,12 a	0,44 a	0,08 d	0,25 ab	0,18 ab	0,13 b	0,10 cd	0,12 ab	0,17 bc	0,11 ab	0,07 b	0,15 bc
Re	0,02 b	0,08 a	0,45 a	0,09 d	0,34 a	0,18 ab	0,29 a	0,38 a	0,17 ab	0,33 a	0,22 ab	0,18 ab	0,23 a
Ro	0,00 b	0,03 a	0,36 abcd	0,14 bcd	0,20 ab	0,22 ab	0,32 a	0,24 bc	0,08 ab	0,19 bc	0,19 ab	0,08 b	0,17 bc
ML	0,00 b	0,00 a	0,38 ab	0,08 d	0,18 ab	0,24 ab	0,23 ab	0,15 bcd	0,07 b	0,16 bc	0,15 ab	0,10 ab	0,15 bc
MRe	0,00 b	0,00 a	0,36 abc	0,20 abcd	0,28 ab	0,18 ab	0,24 ab	0,14 bcd	0,15 ab	0,10 c	0,14 ab	0,09 ab	0,16 bc
MRo	0,00 b	0,05 a	0,35 abc	0,12 cd	0,27 ab	0,24 ab	0,21 ab	0,21 bc	0,08 ab	0,14 c	0,12 ab	0,11 ab	0,16 bc
LRe	0,00 b	0,01 a	0,41 a	0,19 abcd	0,27 ab	0,17 b	0,16 b	0,12 cd	0,08 ab	0,09 c	0,08 b	0,08 b	0,14 c
LRo	0,00 b	0,00 a	0,20 cd	0,19 abcd	0,14 b	0,23 ab	0,30 a	0,28 ab	0,19 a	0,14 c	0,10 b	0,08 b	0,15 bc
ReRo	0,00 b	0,00 a	0,19 d	0,25 ab	0,27 ab	0,36 a	0,29 a	0,19 bc	0,13 ab	0,26 ab	0,25 a	0,21 a	0,20 ab
Todas	0,00 b	0,00 a	0,24 bcd	0,23 abc	0,17 b	0,16 b	0,21 ab	0,02 d	0,10 ab	0,17 bc	0,19 ab	0,20 ab	0,14 c

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 33. Número de esporas de *G.mosseae* en 100 g de sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	5,0 a	14,0 a	40,0 b	91,3 a	60,0 a	11,3 a	17,5 ab	1,3 c	2,5 b	7,5 ab	0,0 b	1,3 a	30,0 ab
L	6,0 a	9,0 ab	29,0 b	36,3 bc	17,5 b	23,8 a	21,3 a	16,3 a	16,3 b	10,0 ab	18,8 a	10,0 a	17,8 ab
Re	1,0 a	5,0 b	41,0 b	85,0 a	11,3 b	15,0 a	21,3 a	15,0 ab	21,3 ab	12,5 ab	13,8 ab	15,0 a	21,4 a
Ro	5,0 a	8,0 ab	44,0 b	48,8 abc	32,5 ab	10,0 a	5,0 bc	7,5 abc	5,0 b	2,5 b	2,5 b	1,3 a	14,3 bc
ML	5,0 a	3,0 b	21,0 b	86,3 a	20,0 b	1,3 a	12,5 abc	1,3 c	12,5 b	7,5 ab	5,0 ab	17,5 a	16,1 ab
MRe	0,0 a	3,0 b	19,0 b	48,8 abc	33,8 ab	12,5 a	8,8 abc	6,3 abc	21,3 ab	5,0 b	6,3 ab	7,5 a	14,3 bc
MRo	1,0 a	2,0 b	18,0 b	26,3 c	23,8 b	15,0 a	5,0 bc	3,8 c	3,8 b	5,0 b	1,3 b	3,8 a	9,0 cd
LRe	1,0 a	3,0 b	24,0 b	77,5 ab	31,3 ab	26,3 a	8,8 abc	2,5 c	46,3 a	22,5 a	5,0 ab	5,0 a	21,1 ab
LRo	1,0 a	5,0 b	32,0 b	18,8 c	22,5 b	3,8 a	6,3 bc	3,8 c	7,5 b	3,8 b	1,3 b	1,3 a	8,9 cd
ReRo	2,0 a	6,0 b	78,0 a	35,0 bc	37,5 ab	20,0 a	13,8 abc	6,3 abc	21,3 ab	16,3 ab	2,5 b	10,0 a	20,7 ab
Todas	6,0 a	4,0 b	18,0 b	3,8 c	13,8 b	7,5 a	3,8 c	5,0 c	10,0 b	3,8 b	3,8 ab	2,5 a	6,8 d

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie.

Anexo 34. Densidad específica de *G.mosseae* por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,09 a	0,12 ab	0,07 bc	0,12 bc	0,20 a	0,03 bcd	0,04 abc	0,00 b	0,00 c	0,01 b	0,00 b	0,00 c	0,06 bc
L	0,13 a	0,05 bc	0,08 bc	0,08 bc	0,06 c	0,09 ab	0,09 a	0,04 ab	0,02 bc	0,01 ab	0,05 a	0,03 ab	0,06 bc
Re	0,04 a	0,07 abc	0,19 a	0,27 a	0,08 bc	0,10 a	0,08 ab	0,02 ab	0,09 a	0,03 a	0,02 b	0,04 a	0,08 a
Ro	0,13 a	0,03 bc	0,08 bc	0,11 bc	0,09 bc	0,02 cd	0,01 c	0,01 ab	0,01 c	0,00 b	0,01 b	0,00 c	0,04 c
ML	0,15 a	0,04 bc	0,04 c	0,13 b	0,06 c	0,02 d	0,03 abc	0,00 ab	0,02 bc	0,01 ab	0,01 b	0,02 abc	0,04 c
MRe	0,00 a	0,03 bc	0,09 bc	0,17 ab	0,14 abc	0,08 abc	0,04 abc	0,01 ab	0,03 bc	0,01 b	0,01 b	0,01 bc	0,05 bc
MRo	0,03 a	0,01 c	0,12 abc	0,09 bc	0,10 abc	0,04 abcd	0,02 bc	0,00 ab	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,04 c
LRe	0,02 a	0,04 bc	0,07 bc	0,13 bc	0,15 abc	0,05 abcd	0,05 abc	0,02 ab	0,06 ab	0,02 ab	0,01 b	0,01 bc	0,05 bc
LRo	0,04 a	0,08 abc	0,08 bc	0,06 bc	0,08 bc	0,01 d	0,03 bc	0,03 ab	0,01 c	0,01 b	0,00 b	0,00 c	0,04 c
ReRo	0,05 a	0,16 a	0,14 ab	0,13 bc	0,18 ab	0,04 bcd	0,06 abc	0,05 ab	0,02 bc	0,02 ab	0,00 b	0,01 abc	0,07 ab
Todas	0,16 a	0,13 ab	0,06 bc	0,01 c	0,06 c	0,02 d	0,05 abc	0,08 a	0,01 c	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,05 bc

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 35. Número de esporas de *G.viscosum* en 100 g de sustrato por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	14,0 a	2,0 ab	110,8 a	93,8 a	8,8 ab	36,3 a	23,8 a	35,0 a	27,5 ab	42,5 a	13,8 ab	87,5 a	41,3 a
L	0,0 a	22,0 a	30,0 bc	21,3 cd	1,3 b	23,8 ab	12,5 bcd	18,8 b	23,8 ab	21,3 b	8,8 abc	10,0 b	16,1 bc
Re	0,0 a	3,0 ab	9,0 bc	25,0 cd	8,8 ab	8,8 b	7,5 cd	35,0 a	3,8 cd	2,5 cd	8,8 abc	15,0 b	10,6 c
Ro	0,0 a	7,0 ab	7,0 c	25,0 cd	13,8 ab	40,0 a	6,3 cd	1,3 c	7,5 cd	12,5 bcd	0,0 c	21,3 b	11,0 c
ML	0,0 a	3,0 ab	15,0 bc	56,3 b	27,5 a	10,0 b	18,8 ab	17,5 bc	33,8 a	17,5 bc	8,8 abc	67,5 ab	23,0 b
MRe	0,0 a	2,0 ab	6,0 c	13,8 cd	13,8 ab	15,0 ab	8,8 bcd	17,5 bc	1,3 d	8,8 bcd	12,5 abc	13,8 b	9,4 c
MRo	0,0 a	15,0 ab	5,0 c	13,8 cd	7,5 ab	38,8 a	3,8 d	17,5 bc	12,5 bcd	10,0 bcd	8,8 abc	17,5 b	12,5 c
LRe	0,0 a	6,0 ab	11,0 bc	31,3 c	12,5 ab	20,0 ab	6,3 cd	0,0 c	6,3 cd	8,8 bcd	3,8 bc	5,0 b	9,2 c
LRo	0,0 a	3,0 ab	14,0 bc	17,5 cd	18,8 ab	22,5 ab	12,5 bcd	0,0 c	13,8 bcd	5,0 cd	16,3 ab	8,8 b	11,0 c
ReRo	0,0 a	0,0 b	56,0 b	12,5 cd	0,0 b	36,3 a	17,5 abc	0,0 c	17,5 bc	0,0 d	13,8 ab	5,0 b	13,2 c
Todas	0,0 a	0,0 b	47,0 bc	3,8 d	11,3 ab	17,5 ab	2,5 d	1,3 c	16,3 bcd	0,0 d	20,0 a	20,0 b	11,6 c

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie.

Anexo 36. Densidad específica de *G.viscosum* por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,10 a	0,01 a	0,23 a	0,12 a	0,04 a	0,11 a	0,05 ab	0,03 ab	0,03 b	0,06 a	0,02 bcd	0,10 ab	0,07 a
L	0,00 a	0,10 a	0,08 b	0,05 bc	0,00 a	0,09 ab	0,06 ab	0,04 ab	0,03 b	0,04 ab	0,03 ab	0,03 abc	0,05 bc
Re	0,00 a	0,04 a	0,05 b	0,08 b	0,05 a	0,06 ab	0,03 b	0,05 a	0,02 bc	0,01 cd	0,02 bcd	0,03 abc	0,04 bcd
Ro	0,00 a	0,02 a	0,01 b	0,06 b	0,04 a	0,08 ab	0,03 b	0,00 b	0,02 bc	0,03 bc	0,00 e	0,04 abc	0,03 cd
ML	0,00 a	0,03 a	0,01 b	0,08 ab	0,06 a	0,07 ab	0,06 ab	0,03 ab	0,06 a	0,03 bc	0,02 abcd	0,10 a	0,05 b
MRe	0,00 a	0,02 a	0,02 b	0,06 b	0,06 a	0,08 ab	0,04 b	0,02 ab	0,00 c	0,01 cd	0,01 bcde	0,02 bc	0,03 bcd
MRo	0,00 a	0,09 a	0,02 b	0,05 bc	0,02 a	0,10 ab	0,02 b	0,02 ab	0,01 bc	0,01 cd	0,01 cde	0,02 bc	0,03 bcd
LRe	0,00 a	0,07 a	0,03 b	0,05 bc	0,06 a	0,05 ab	0,03 b	0,00 b	0,01 bc	0,01 cd	0,00 de	0,01 c	0,03 cd
LRo	0,00 a	0,03 a	0,02 b	0,05 bc	0,05 a	0,08 ab	0,05 ab	0,00 b	0,0 bc	0,01 cd	0,03 a	0,01 c	0,03 bcd
ReRo	0,00 a	0,00 a	0,09 b	0,03 bc	0,00 a	0,08 ab	0,08 a	0,00 b	0,01 bc	0,00 d	0,02 bcde	0,01 c	0,03 cd
Todas	0,00 a	0,00 a	0,07 b	0,01 c	0,06 a	0,03 b	0,02 b	0,04 ab	0,02 bc	0,00 d	0,02 abc	0,02 bc	0,03 d

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 37. Índice de riqueza de especies de HMA por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	3,25 a	4,75 a	5,33 ab	6,00 a	4,25 ab	5,00 a	4,00 a	3,25 ab	3,50 a	3,75 a	3,00 ab	3,25 ab	4,11 a
L	2,75 abc	5,00 a	4,50 b	6,00 a	3,50 bc	4,50 abc	4,00 a	4,00 a	4,00 a	3,75 a	3,75 a	3,67 ab	4,12 a
Re	2,25 abc	4,25 ab	5,50 ab	5,75 ab	4,25 ab	4,75 ab	3,50 ab	4,00 a	3,50 a	3,50 ab	3,75 a	4,00 a	4,08 a
Ro	2,50 abc	4,00 a	5,75 a	5,50 ab	4,00 ab	4,33 abcd	3,25 ab	2,75 bc	3,50 a	3,50 ab	2,50 b	3,25 ab	3,74 bc
ML	3,00 ab	2,75 ab	5,50 ab	5,00 bc	4,00 ab	3,00 e	4,00 a	3,25 ab	3,75 a	3,75 a	3,50 a	3,50 ab	3,75 bc
MRe	2,00 bc	2,75 a	5,75 a	5,25 abc	4,50 a	3,75 cde	3,75 a	4,00 a	3,25 a	3,25 abc	3,50 a	3,50 ab	3,77 b
MRo	2,75 abc	3,25 ab	5,50 ab	6,00 a	3,75 abc	4,00 bcd	3,25 ab	3,75 a	3,50 a	3,50 ab	3,33 ab	3,50 ab	3,84 b
LRe	2,25 abc	3,00 a	6,00 a	5,75 ab	4,25 ab	4,00 bcd	3,75 a	2,25 cd	4,00 a	4,00 a	3,00 ab	3,00 b	3,77 b
LRo	2,00 bc	3,25 a	6,00 a	5,75 ab	3,75 abc	3,50 de	3,50 ab	2,33 cd	3,50 a	3,50 ab	3,25 ab	3,00 b	3,61 bc
ReRo	2,25 abc	2,50 a	6,00 a	5,50 ab	3,00 cd	4,25 abcd	4,00 a	2,50 bcd	3,75 a	2,75 bc	3,67 a	3,00 b	3,60 bc
Todas	3,00 ab	2,00 a	6,00 a	4,50 cb	4,50 a	3,75 cde	2,75 b	2,50 bcd	3,75 a	2,50 c	3,50 a	3,25 ab	3,50 c
Nat	1,75 c	1,25 a	4,50 b	4,00 d	2,33 d	5,00 a	2,67 b	1,75 d	3,50 a	3,50 a	3,00 ab	3,00 b	3,02 d

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 38. Índice de equidad de especies de HMA por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,94 a	1,01 a	2,84 a	1,65 a	1,20 a	1,07 ab	0,80 abc	0,56 b	0,52 bc	1,01 a	0,48 ab	0,66 a	1,06 a
L	0,69 ab	0,91 abc	2,00 a	1,37 bc	0,81 c	1,09 ab	0,84 abc	0,65 ab	0,56 bc	0,96 ab	0,62 a	0,50 ab	0,92 ab
Re	0,53 ab	0,99 ab	3,19 a	1,50 ab	0,95 bc	0,97 ab	0,90 ab	0,88 a	0,70 ab	1,12 a	0,64 a	0,66 a	1,09 a
Ro	0,56 ab	0,55abcde	3,33 a	1,35 bc	0,90 bc	0,91 ab	0,65 c	0,60 ab	0,40 c	0,92 abc	0,43 ab	0,38 ab	0,92 ab
ML	0,61 ab	0,47 cde	3,27 a	1,22 c	0,85 c	0,78 b	0,81 abc	0,55 b	0,56 bc	0,91 abc	0,56 ab	0,64 a	0,94 ab
MRe	0,40 b	0,42 de	2,67 a	1,52 ab	1,13 ab	0,91 ab	0,80 abc	0,55 b	0,53 bc	0,62 de	0,47 ab	0,41 ab	0,87 b
MRo	0,71 ab	0,69 abcd	3,47 a	1,35 bc	0,94 bc	0,98 ab	0,73 bc	0,65 ab	0,38 c	0,73 cd	0,40 ab	0,45 ab	0,96 ab
LRe	0,46 ab	0,52 bcde	2,97 a	1,34 bc	1,16 ab	0,80 b	0,73 bc	0,44 b	0,56 bc	0,68 de	0,34 b	0,33 b	0,86 b
LRo	0,55 ab	0,72 abcd	3,23 a	1,25 c	0,82 c	0,85 b	0,83 abc	0,63 ab	0,61 bc	0,77 bcd	0,49 ab	0,33 b	0,92 ab
ReRo	0,68 ab	0,65 abcd	3,57 a	1,38 bc	0,97 abc	1,40 a	1,00 a	0,61 ab	0,53 bc	0,96 ab	0,65 a	0,61 ab	1,08 a
Todas	0,91 ab	0,41 de	3,70 a	1,00 d	0,93 bc	0,69 b	0,66 c	0,51 b	0,47 bc	0,78 bcd	0,61 a	0,59 ab	0,94 ab
Nat	0,47 ab	0,16 e	3,01 a	0,78 e	0,75 c	0,86 b	0,71 bc	0,49 b	0,90 a	0,49 e	0,53 ab	0,51 ab	0,80 b

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 39. Dominancia de especies de HMA por asociación vegetal y etapa de muestreo, y media global por asociación vegetal.

Plantas	Ver 02	Oto 02	Inv 03	Prim 03	Ver 03	Oto 03	Inv 04	Prim 04	Ver 04	Oto 04	Inv 05	Prim 05	X repet.
M	0,47 a	0,50 c	0,29 ab	0,20 g	0,34 e	0,43 b	0,58 ab	0,69 a	0,72 ab	0,61 de	0,73 abc	0,62 b	0,52 b
L	0,60 a	0,54 bc	0,38 a	0,34 cde	0,53 abc	0,44 b	0,57 ab	0,68 ab	0,71 ab	0,64 cde	0,69 abc	0,77 ab	0,57 ab
Re	0,69 a	0,50 c	0,32 ab	0,27 efg	0,48 abcd	0,51 ab	0,48 bc	0,49 b	0,62 b	0,53 e	0,63 bc	0,64 b	0,51 b
Ro	0,68 a	0,75 abc	0,35 a	0,32 cde	0,52 abc	0,51 ab	0,62 a	0,63 ab	0,81 a	0,65 cd	0,74 abc	0,79 ab	0,61 a
ML	0,66 a	0,76 abc	0,32 ab	0,39 bc	0,54 ab	0,54 ab	0,56 abc	0,70 a	0,73 ab	0,67 bcd	0,70 abc	0,66 ab	0,60 a
MRe	0,77 a	0,79 ab	0,30 ab	0,24 fg	0,39 cde	0,50 ab	0,55 abc	0,71 a	0,71 ab	0,80 a	0,74 abc	0,77 ab	0,61 a
MRo	0,59 a	0,61 bc	0,29 ab	0,36 cd	0,46abcde	0,46 b	0,57 ab	0,63 ab	0,81 a	0,75 abc	0,78 ab	0,76 ab	0,59 a
LRe	0,74 a	0,70 abc	0,33 a	0,32 cde	0,37 de	0,58 ab	0,62 ab	0,75 a	0,73 ab	0,78 ab	0,83 a	0,84 a	0,63 a
LRo	0,63 a	0,61 bc	0,33 ab	0,37 bcd	0,56 a	0,52 ab	0,52 abc	0,60 ab	0,65 ab	0,73 abc	0,76 abc	0,83 a	0,59 a
ReRo	0,55 a	0,62 abc	0,24 b	0,30 def	0,42 bcde	0,50 ab	0,43 c	0,64 ab	0,72 ab	0,60 de	0,61 c	0,64 b	0,52 b
Todas	0,47 a	0,76 abc	0,24 b	0,44 b	0,53 abc	0,63 a	0,60 ab	0,72 a	0,76 ab	0,71 abcd	0,65 bc	0,66 ab	0,60 a
Nat	0,67 a	0,89 a	0,37 a	0,55 a	0,49 abcd	0,49 ab	0,55 abc	0,65 ab	0,45 c	0,74 abc	0,69 abc	0,71 ab	0,60 a

Letras distintas en una columna demuestran diferencia estadística significativa de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). M=Mejorana; L=Lavanda; Re=Retama; Ro=Romero; Todas=una planta de cada especie; Nat=Una planta de cada especie en suelo natural.

Anexo 40. Análisis factorial de los parámetros edáficos, prueba de Bartlett, componentes principales, varianza explicada y matriz de componentes.

KMO y prueba de Bartlett

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		,661
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	25,162
	gl	3
	Sig.	,000

Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	1,889	62,983	62,983	1,889	62,983	62,983
2	,627	20,893	83,876			
3	,484	16,124	100,000			

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Matriz de componentes^a

	Componente
	1
MRPHW	-,833
MRGLOFE	,780
MRAGRE	,767

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

a. 1 componentes extraídos

Anexo 41. Análisis factorial de los parámetros de crecimiento vegetal, prueba de Bartlett, componentes principales, varianza explicada y matriz de componentes.

KMO y prueba de Bartlett

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		,674
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	130,367
	gl	3
	Sig.	,000

Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,631	87,709	87,709	2,631	87,709	87,709
2	,297	9,915	97,625			
3	7,126E-02	2,375	100,000			

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Matriz de componentes^a

	Compone nte
	1
MRRATOT	,972
MRRACOL	,940
MRCOBERT	,896

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

a. 1 componentes extraídos

Anexo 42. Análisis factorial de los parámetros de desarrollo del hongo, prueba de Bartlett, componentes principales, varianza explicada y matriz de componentes.

KMO y prueba de Bartlett

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		,613
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	123,860
	gl	6
	Sig.	,000

Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,588	64,699	64,699	2,588	64,699	64,699
2	,820	20,508	85,207			
3	,536	13,407	98,614			
4	5,544E-02	1,386	100,000			

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Matriz de componentes^a

	Componente
	1
MRMICTOT	,945
MRMICVIV	,932
MRRACOL	,632
MRESPTOT	,653

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

a. 1 componentes extraídos

Anexo 43. Análisis factorial de los parámetros de biodiversidad del hongo, prueba de Bartlett, componentes principales, varianza explicada y matriz de componentes.

KMO y prueba de Bartlett

Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		,651
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	32,969
	gl	3
	Sig.	,000

Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	1,978	65,919	65,919	1,978	65,919	65,919
2	,644	21,468	87,387			
3	,378	12,613	100,000			

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

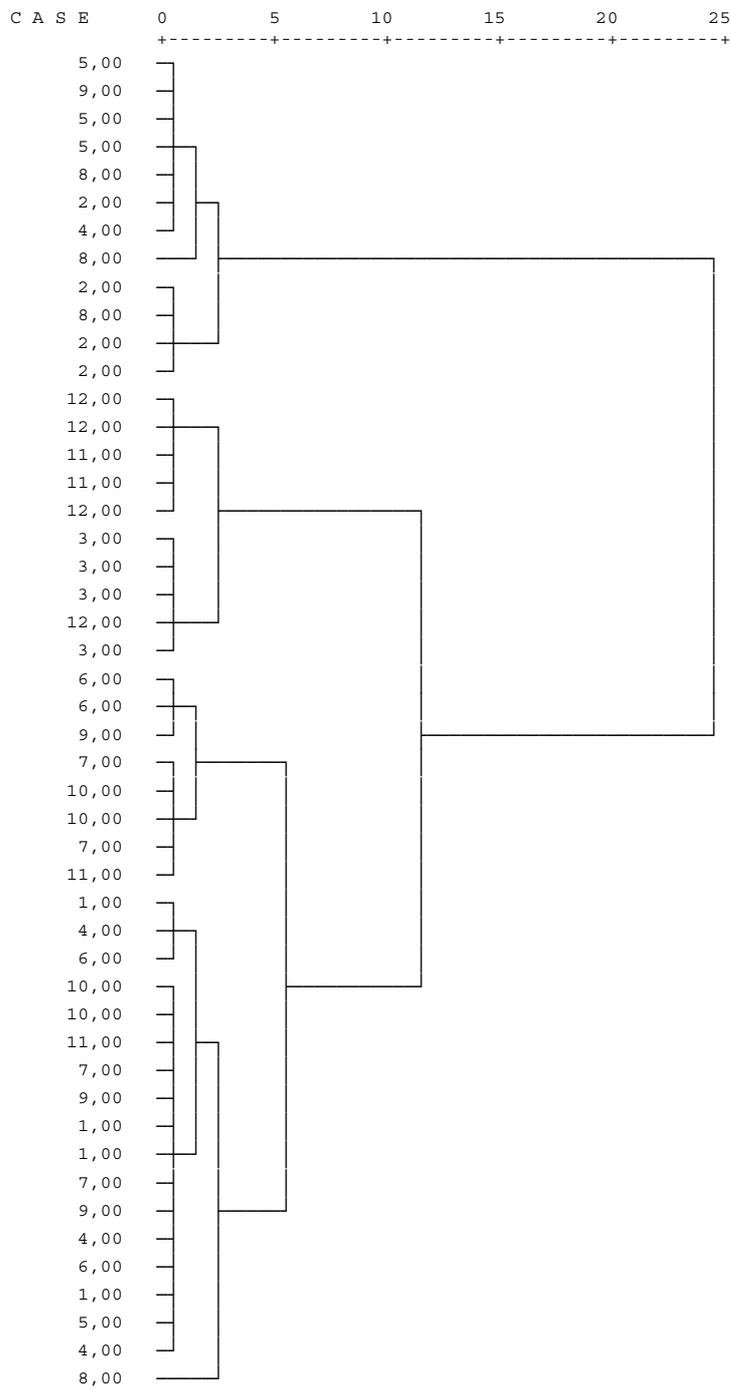
Matriz de componentes^a

	Componente
	1
MRS	,727
MRH	,857
MRSIMPSO	-,845

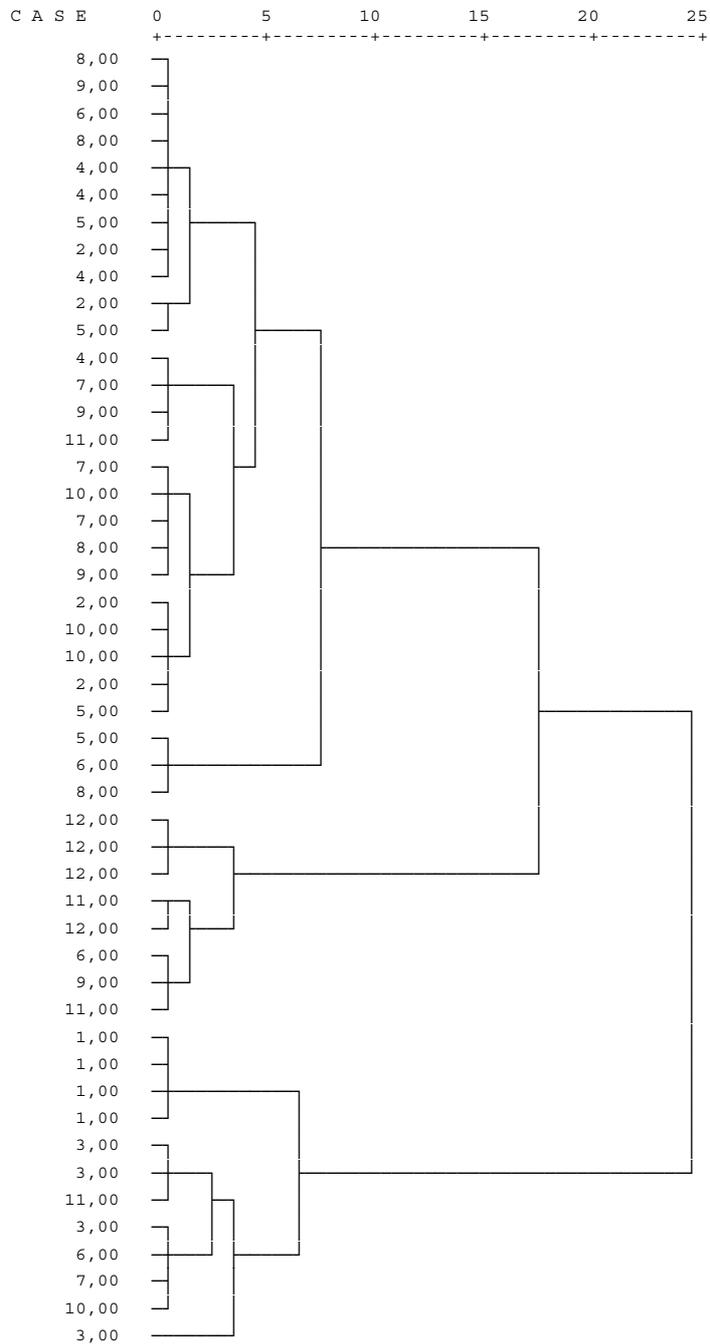
Método de extracción: Análisis de componentes principales.

a. 1 componentes extraídos

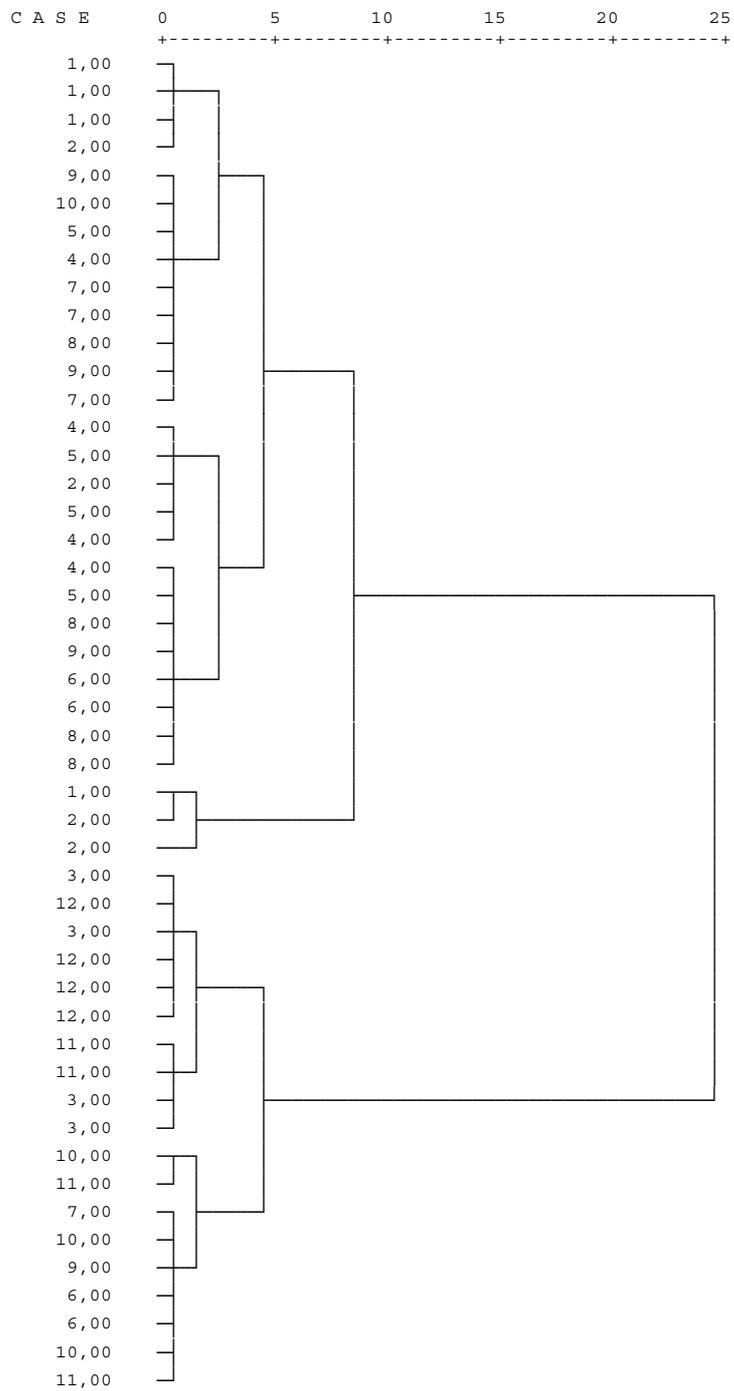
Anexo 44. Dendograma del análisis de conglomerados para la relación bivariada ente las componentes principales resultantes del análisis factorial para parámetros edáficos y crecimiento vegetal.



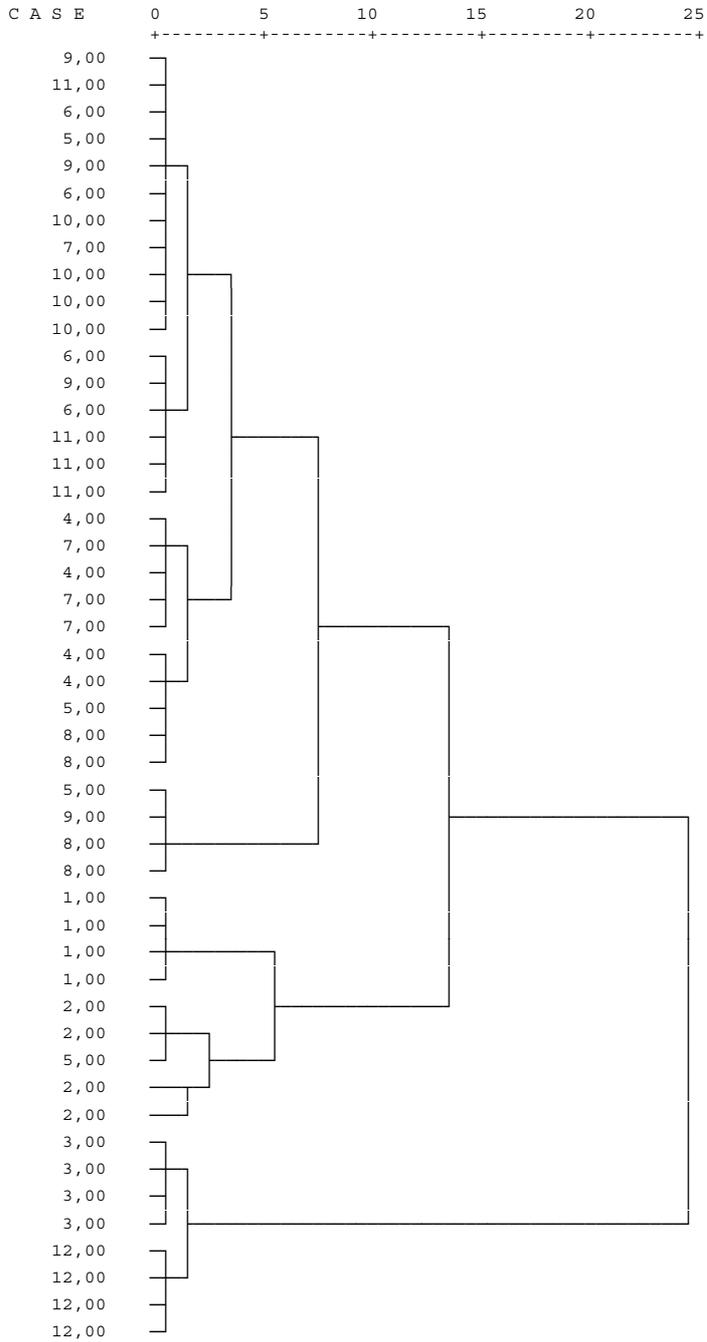
Anexo 45. Dendrograma del análisis de conglomerados para la relación bivariada ente las componentes principales resultantes del análisis factorial para parámetros edáficos y biodiversidad de hongos.



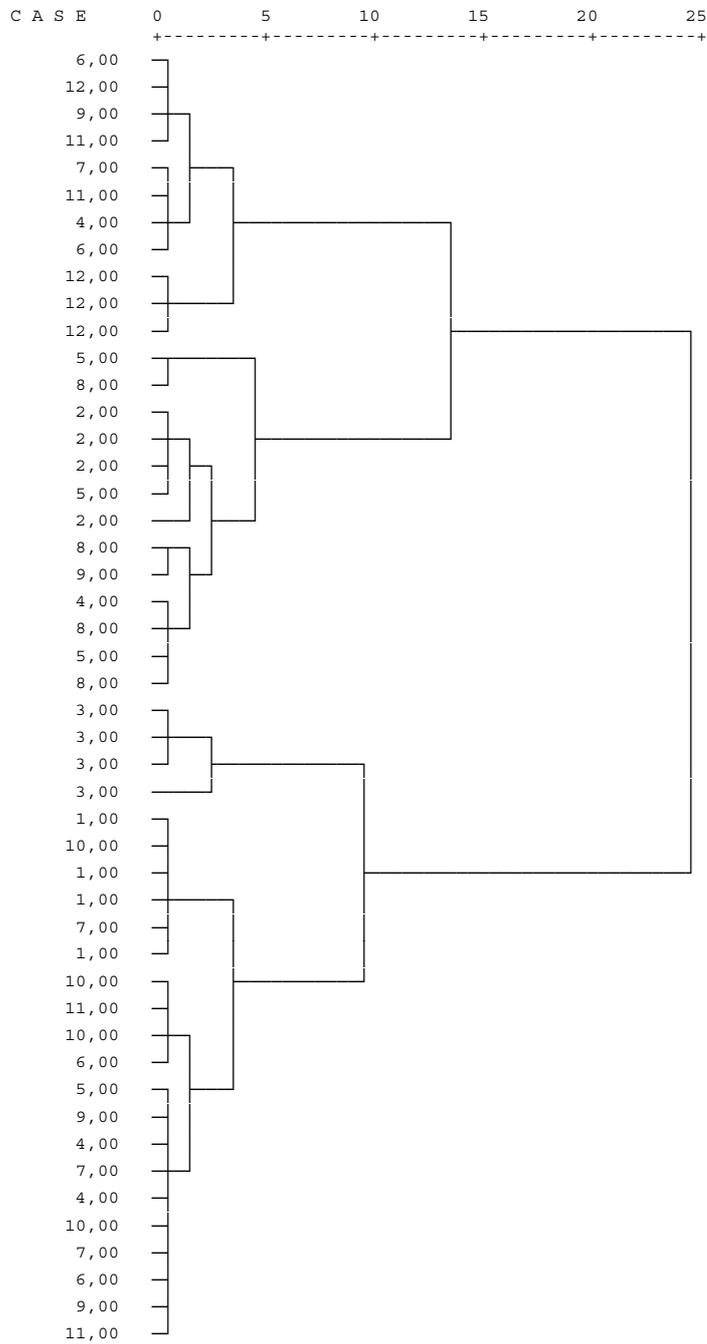
Anexo 46. Dendrograma del análisis de conglomerados para la relación bivariada ente las componentes principales resultantes del análisis factorial para parámetros edáficos y desarrollo del hongo.



Anexo 47. Dendrograma del análisis de conglomerados para la relación bivariada ente las componentes principales resultantes del análisis factorial para parámetros de crecimiento vegetal y desarrollo del hongo.



Anexo 48. Dendrograma del análisis de conglomerados para la relación bivariada ente las componentes principales resultantes del análisis factorial para parámetros de crecimiento vegetal y diversidad de hongos.



Anexo 49. Dendograma del análisis de conglomerados para la relación bivariada ente las componentes principales resultantes del análisis factorial para parámetros de desarrollo del hongo y biodiversidad de hongos.

