

T-16/55

T  
16  
37

**FACULTAD DE CIENCIAS**

***Exploración de la biodiversidad microbiana (Hongos de la micorriza arbuscular-Rhizobium-Rizobacterias) en un ecosistema mediterráneo desertificado dirigida a una estrategia de revegetación***

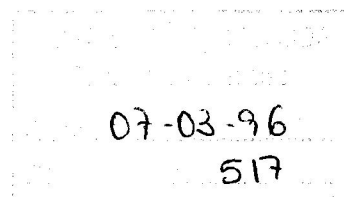
**Natalia Requena Sánchez**

**Tesis Doctoral**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>
<b>GRANADA</b>
Nº Documento <u>019680843</u>
Nº Copia <u>121230195</u>

**FACULTAD DE CIENCIAS**



***Exploración de la biodiversidad microbiana (Hongos de la micorriza arbuscular-Rhizobium-Rizobacterias) en un ecosistema mediterráneo desertificado dirigida a una estrategia de revegetación***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

Granada, Febrero 1996

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Natalia Requena Sánchez".

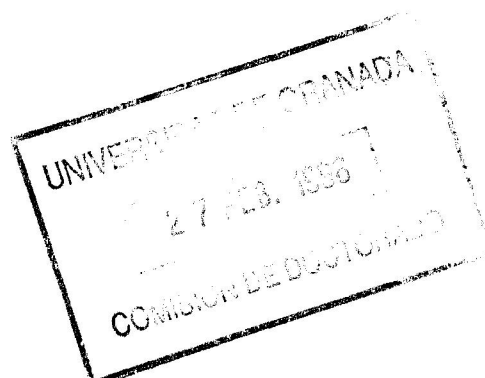
Fdo. Natalia Requena Sánchez

Lda. en Ciencias Biológicas

Director de la Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José Miguel Barea".

Fdo. José Miguel Barea



*Indice*

# INDICE

## *I. Interes Del Trabajo*

## *II. Introduccion*

### **II.1. Desertificación y Mediterráneo**

1.1. Un poco de Historia...

1.2. Factores y Condiciones Ambientales Mediterráneas

### **II.2. La Revegetación frente al Avance de la Erosión**

2.1. Consideraciones Generales

2.2. El Plan Forestal Andaluz: Propuestas de Revegetación

### **II.3. Importancia de los Microorganismos Rizosféricos en Programas de Revegetación**

3.1. Simbiontes Mutualistas

3.2.1. Hongos de la Micorriza

3.2.1.1. Generalidades

3.2.1.2. Micorrizas arbusculares en condiciones naturales

3.2.1.3. Micorrizas arbusculares y revegetación

3.2.1. Bacterias Fijadoras de N<sub>2</sub> Simbióticas

3.2. Saprofitos

3.3. Interacciones Microbianas en la Rizosfera

## *III. Objetivos Del Estudio*

*Eleccion y Descripcion de la Parcela Experimental*

*Determinacion del Potencial Microbiano del Ecosistema*

*Aislamiento de Microorganismos de Interés. Procesos de Selección y Caracterización.*

*Inoculación Cruzada de Microorganismos de Interés:  
Compatibilidad Funcional y Selección para Uso en Campo.*

*Producción de Plantas con Rizosfera Optimizada y Transplante a  
Unidades Piloto Seleccionadas. Evolución Temporal.*

*Desarrollo de Metodologías de Caracterización y Seguimiento de  
los Microorganismos Inoculados.*

*Síntesis y Discusión General*

*Conclusiones*

*Referencias Bibliográficas y Apéndices*



*Introducción*

## *Introducción*

### *I. Interés del Trabajo*

La degradación del paisaje y del suelo en el área mediterránea es un hecho constatable, determinado por múltiples y complejos factores que, sin embargo, se está viendo exacerbada en los últimos cuarenta años debido al auge socioeconómico del entorno norte-mediterráneo y a las consecuencias derivadas de este hecho. Las características geomorfológicas y climáticas del área mediterránea, principalmente un relieve variado y accidentado junto a precipitaciones estacionales y torrenciales, desfasadas con las épocas de máximas temperaturas, condicionan la inestabilidad del suelo y lo hacen muy susceptible a la erosión. Ello unido a la escasa cobertura vegetal existente, que ofrece, por tanto, un bajo nivel de protección del suelo frente a la torrencialidad de las lluvias y a la aridez y termicidad del clima, determina la escasa capacidad de regeneración de los suelos mediterráneos.

Estas limitaciones de partida justifican que determinadas actividades antrópicas tengan una importancia vital sobre la degradación de la cubierta vegetal y la erosión del suelo, dando lugar a procesos de desertificación. Prácticas de agricultura intensiva, sobre-explotación de recursos hídricos, abandono de antiguos campos de cultivo, pastoreo indiscriminado, tala de bosques y clareo de superficies arboladas, fuegos intencionados y naturales, así como un desarrollo

cada vez mayor de la red viaria, son algunas de las actividades humanas de mayor impacto sobre los ecosistemas naturales. España ha sido considerada por el Plan de Naciones Unidas por el Medioambiente (PNUMA) y por el Plan Azul para el Mediterráneo como el único país europeo con muy alto riesgo de desertificación.

Ante estas desfavorables circunstancias se plantea la necesidad imperiosa de la introducción de cambios drásticos del estilo de vida y del manejo de los recursos existentes, así como la puesta en marcha de planes de recuperación del medio ambiente que aseguren un uso sostenible del suelo y de la vegetación. Existen mecanismos que en ocasiones permiten regenerar la calidad del suelo y controlar la erosión. Así, los resultados obtenidos en los diversos estudios comprendidos dentro del programa LUCDEME (LUcha Contra la DEsertificación del MEditerráneo) sugieren como objetivo prioritario frente a la desertificación la restitución de una cobertura vegetal apropiada que frene el avance de la erosión. Sin embargo, es esencial realizar, antes de llevar a cabo una estrategia de revegetación, un estudio previo de las causas que motivaron el proceso degradativo en dicha zona y los objetivos concretos a alcanzar con la restauración. El grado de desertificación determinará cuales son las posibilidades reales de éxito así como que especies vegetales son las más indicadas para la revegetación.

En el caso concreto del Sureste Ibérico, estudios previos parecen apuntar hacia el uso de especies arbustivas, subarbustivas y en algunos casos herbáceas más que arbóreas en programas de revegetación, por su rapidez de crecimiento y



gran capacidad de cobertura del suelo. Entre las especies recomendadas, las leguminosas leñosas juegan un papel esencial por su capacidad para formar simbiosis tanto con hongos de la micorriza arbuscular como con bacterias del género *Rhizobium*. A pesar de que en los proyectos políticos y de gestión sobre la conservación del suelo y la flora mediante programas de revegetación la composición microbiana del suelos es a menudo ignorada, el papel que juegan los microorganismos en el establecimiento de la cobertura vegetal es clave. Así, la doble asociación microbiana con las leguminosas, permite a las especies implicadas sobrevivir en ambientes xéricos y degradados con bajo nivel de nutrientes esenciales como P ó N, así como soportar desequilibrios de elementos traza. Otras interacciones microbio-planta, además de estas de carácter simbiótico, son así mismo importantes en el mantenimiento de una cobertura vegetal apropiada. Así, la asociación entre las llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y las raíces de las plantas se ha visto que están implicadas en procesos que mejoran el establecimiento y desarrollo de las plantas asociadas.

De acuerdo con estas premisas se inició un programa de investigación encaminado a determinar la importancia de las asociaciones microbio-planta en la regeneración de una cobertura vegetal apropiada basada en principios ecológicos. Para ello, se eligió una zona piloto situada en la Sierra de los Filabres (Almería) cuya vegetación arbustiva se compone fundamentalmente de tres especies vegetales: *Stipa tenacissima*, *Anthyllis cytisoides* y *Retama sphaerocarpa*.

## **II. *Introducción***

### **II.1. *Desertificación y mediterráneo***

#### **1.1. *Un poco de historia...***

Ante el desolador aspecto de nuestro paisaje uno siempre recuerda la mítica frase atribuida a Estrabón que describía cómo una ardilla podía cruzar la Península Ibérica desde los Pirineos a Gibraltar sin bajarse de la copa de los árboles. Es obvio que hoy día no sólo no podría hacerlo sino que incluso le sería difícil sobrevivir en zonas tan áridas y desoladas como algunas de las que ahora caracterizan nuestro territorio. Analizando las causas que han motivado este cambio, parece evidente que el clima actual no se parece en nada al de épocas pasadas que debió ser bastante más húmedo y lluvioso. Puigdefábregas (1992) describe al paisaje mediterráneo como un paisaje joven generado en la transición climática de gran magnitud acaecida a finales del Terciario y principios del Pleistoceno. Sin embargo, no parece ser ésta la única razón que motivó semejante cambio, pues la diversidad de vegetación remanente en la Península da idea de la diversidad y capacidad de adaptación de la vegetación a condiciones de humedad menos propicias (Ferrerías y Arozena, 1987). Por otro lado los datos paleobotánicos existentes muestran el origen reciente de los taxones que conforman el actual matorral esclerófilo mediterráneo. Estos datos parecen

desmitificar la idea de un paisaje mediterráneo estable, y a considerarlo más como originado en medio de grandes fluctuaciones ambientales que perduran aún en nuestros días (Puigdefábregas, 1992). Sin embargo, la intervención humana ha sido y es, quizás, el factor más importante en los procesos de transformación del paisaje. La deforestación no es un proceso reciente, pues no hay que olvidar que el hombre paleolítico ya conocía el fuego y podía hacer uso de él como arma de caza devastando sin control grandes extensiones de terreno. El desarrollo de la agricultura y la ganadería en el Neolítico se tradujo en una serie de cambios del paisaje que fue evolucionando a la medida del hombre. Los comienzos de las roturaciones para el cultivo y la dedicación de terrenos al pastoreo parecen ser el origen de una deforestación estable y en algunos casos definitiva. Más tarde, la tala exhaustiva de árboles en la Edad Media con destino a la armada, y la distribución feudal del territorio favoreció el incremento de zonas desarboladas. Sin embargo, ha sido en los dos últimos siglos cuando los bosques de la Península han sido devastados con mayor intensidad. Así, como recoge Roquero (1994) los cambios en la forma y distribución de la propiedad territorial han repercutido seriamente en el desarrollo de la agricultura. Especialmente desastrosas fueron las desmortizaciones de los bienes comunales y de manos muertas que desprotegeron a determinadas zonas de monte de su obligación de ser preservados como tal dando lugar a amplias roturaciones para la amortización de las adquisiciones (Ferrerías y Arozena, 1987). Existen autores como Puigdefábregas (1992) y Montalvo (1992) que intentan desmitificar la actividad destructiva del hombre como la causa de la destrucción del bosque mediterráneo

original. Afirman, que la actividad del hombre ha contribuido, por contra, a la expansión del bosque original desde sus localizaciones primitivas en ambientes edáficos favorables y dispersos. Puigdefábregas (1992) matiza que, sin embargo, tampoco se debe generalizar el papel conservador del hombre y puesto que su actividad a lo largo del tiempo ha pasado por épocas más estables, con predominio de actividades más conservadoras, y otras épocas más convulsas con fases destructivas del paisaje.

De una manera u otra, se puede afirmar, que en los últimos años y debido a una disminución de la tasa de crecimiento de la población en el área mediterránea se ha producido el abandono progresivo de los campos de cultivo menos productivos, o de aquellos recomendados por los programas de Política Agrícola Comunitaria. Esta actividad que en zonas de clima húmedo no presenta ningún problema pues el suelo se recubre rápidamente y de forma natural por un tapiz herbáceo, representa en nuestra área una de las causas más importantes de erosión al dejar al suelo desprotegido por completo de una cobertura vegetal (Bienes Allas, 1994). Adicionalmente, la actividad ganadera, en algunas zonas muy intensa, no ha ido de forma paralela a un desarrollo agrario por lo que extensas zonas de arbolado han sido sacrificadas para dejar sitio al pastoreo. El sobrepastoreo además produce que ante la escasez de plantas herbáceas por efecto mismo de la explotación o por la falta de lluvias, brotes tiernos de plantas leñosas arbustivas sean sacrificadas impidiendo la revegetación natural del suelo (Blanca y Morales, 1991). Otros procesos erosivos derivados de la actividad humana son

también muy importantes. El fuego, que en los últimos años esta arrasando cada vez mayor número de hectáreas arboladas, deja al suelo desprovisto de vegetación y actúa además destruyendo la materia orgánica existente así como la microbiota y microfauna del suelo (Díaz-Fierros *et al.*, 1994). El desarrollo tecnológico alcanzado en la construcción de carreteras ha permitido un desarrollo vial muy importante en los últimos años. Ello ha tenido como consecuencia inmediata la erosión del terreno en zonas de orografía movida ocasionada por la creación de grandes terraplenes y desmontes, a diferencia de los caminos primitivos los cuales eran trazados buscando un movimiento de tierras mínimo (MOPU, 1990).

Como vemos pues, la actividad humana ha sido fundamental en la evolución del paisaje y en la conformación del ecosistema mediterráneo actual. Sin embargo, las características geomorfológicas y climáticas de nuestra Península han jugado también un papel esencial en los procesos de desertificación.

## **1.2. Factores y Condiciones Ambientales Mediterráneas**

Ante todo, y tal como recogen López-Bermúdez y Albadalejo (1990), no es fácil definir qué es lo mediterráneo. **Geográficamente**, el area mediterránea no está limitada al entorno del mar Mediterráneo, sino que abarca zonas tan diversas como el chaparral californiano, la región de El Cabo, suroeste

australiano o el matorral chileno. Sin embargo, desde el **punto de vista climático** la característica común de todos es la alternancia regular de una estación cálida y seca con una estación más fresca y húmeda.

La posición geográfica de la Península Ibérica, entre los 36 y 44 grados de latitud norte, en el extremo suroccidental del continente euroasiático, y entre el océano Atlántico y el mar Mediterráneo, determina el flujo de corrientes de aire que la atraviesan y que caracterizan su clima. Así, el predominio de los vientos del oeste unido a las influencias de las altas presiones subtropicales, y el hecho de encontrarse durante gran parte del año en la confluencia de las masas de aire polar y subtropical, condicionan la existencia de dos zonas climáticas en la Península. La primera, con clima oceánico y lluvias frecuentes todo el año se encuentra limitada a las zonas norteñas. La segunda, y de mayor extensión, es la mediterránea, caracterizada por la existencia de un verano más prolongado y seco debido a su proximidad latitudinal a las zonas de altas presiones subtropicales del anticiclón de las Azores (Ferrerías y Arozena, 1987). Sin embargo, los rasgos climáticos generales se ven muy afectados por el **relieve variado** y accidentado de la Península. La mayoría de los sistemas orográficos mediterráneos son recientes, formados por levantamientos de finales del Terciario y principio del Cuaternario, con tectónicas todavía activas en algunas zonas (Puigdefábregas, 1992). El relieve es un factor de gran importancia para la vegetación. Una de las variaciones más importantes se refiere a la disminución de la temperatura con la altitud dando así lugar a los pisos de vegetación. Es así mismo importante

destacar los contrastes térmicos que se observan entre las zonas de solana y umbría, cuya vegetación varía por completo incluso encontrándose a escasos metros una zona de la otra. Pero quizás, lo más llamativo sea la continentalidad del clima mediterráneo. Cuando una masa de aire marino penetra en el interior de la Península puede ser eficazmente detenida si encuentra una barrera montañosa continua y elevada, dando lugar así a una acentuación de los contrastes térmicos tanto entre invierno y verano como entre noche y día. Esta continentalidad explica la sequedad del clima mediterráneo aunque la procedencia de las masas de aire sea oceánica (Ferrerías y Arozena, 1987).

Pero si importantes son la temperatura y el relieve en la configuración del paisaje mediterráneo, no lo son menos las **escasas e irregulares lluvias**. Según Aguilar (1994) la característica más importante del clima mediterráneo es el desfase de la época de lluvias con la de altas temperaturas, registrándose los máximos pluviométricos en la época otoñal. Este desfase provoca déficits hídricos intermitentes de intensidad y duración variables que son claves en el desarrollo de la vegetación existente (Montalvo, 1992). La alternancia de largos periodos de sequía con cortos aguaceros de alta intensidad hacen del agua el principal agente de erosión y transporte (López-Bermúdez y Albadalejo, 1990; López-Bermúdez, 1992). La capacidad erosiva de la lluvia no se limita exclusivamente al impacto con el que cae sino que, una vez en el suelo, si la intensidad de la lluvia supera la capacidad de infiltración del terreno se produce una escorrentía superficial. Esta escorrentía, cuya velocidad es directamente

dependiente de factores como la inclinación del terreno, naturaleza del suelo y tipo de vegetación existente, produce una remoción más o menos uniforme del horizonte superficial conduciendo a una erosión de tipo laminar que puede desembocar en erosiones más profundas en surcos o finalmente en cárcavas . Este fenómeno conlleva el lavado de los nutrientes del suelo, la dispersión de los coloides, así como un arrastre de la materia orgánica dejando a los suelos desnudos y desprotegidos ante nuevos ataques erosivos (del Val, 1989; Ortiz Silla, 1990).

**El sustrato geológico** es un factor clave sobre la vegetación y así mismo sobre los procesos de erosión, tanto a través de las características del relieve como por las propiedades fisicoquímicas del suelo (Ferrerías y Arozena, 1987; López-Bermúdez y Albadalejo, 1990). A pesar de que el papel del sustrato litológico es fundamental en las primeras etapas de la edafogénesis, en suelos maduros las propiedades del suelo son casi indiferentes a la naturaleza del sustrato, siendo la vegetación y el clima los factores más importantes. No obstante, cuando la erosión avanza y la cubierta vegetal va desapareciendo, como es el caso de las formaciones seriales de etapas de matorral y pastizal, es indudable la influencia de la litología en los procesos de erosión. López-Bermúdez y Albadalejo (1990) describen tres tipos de sustratos litológicos importantes, así como sus formas de erosión. Encontramos así, las **rocas carbonatadas consolidadas** cuya alta solubilidad produce la aparición de simas y cavernas típicas; **sedimentos cuaternarios** procedentes de la erosión de áreas más elevadas susceptibles a



erosión física o en algunos casos a degradación por salinización; y **formaciones de margas** así como suelos derivados, que por su escaso contenido en materia orgánica, alto concentración de sodio y pobreza de estructura son los más susceptibles de erosión. Estos suelos de muy baja productividad están asociados a la formación de cárcavas y barrancos.

Las dos zonas climáticas de la Península Ibérica, la templado-cálida, subtropical, de verano seco o mediterránea, y la templado-húmeda a la que pertenece la franja septentrional de España determinan las dos franjas de vegetación existentes, las cuales, al no tratarse de climas áridos ni fríos, tendrán como vegetación climax la forestal (Ferrerías y Arozena, 1987). Al clima mediterráneo le corresponde el **bosque esclerófilo o durisilva**. Este bosque se hallaría constituido mayoritariamente por formaciones leñosas de hoja perenne y coriácea adaptadas a climas con largos periodos de sequía estival (López-Bermudez y Albadalejo, 1990). Sin embargo, la altitud, el relieve y los episodios de degradación antrópica que se han sucedido durante la historia de la Península han configurado al paisaje mediterráneo como un mosaico de vegetación derivada de la etapa climática de bosque esclerófilo. Así, nos encontramos con la aparición de diversos estadios de sucesión compuestos por comunidades vegetales de menor categoría ecológica. La etapa de bosque, de máxima complejidad estructural, posee un funcionamiento interrelacionado en el que el papel principal corresponde a los árboles cuyas copas y follaje retienen gran parte de la luz solar y detienen la velocidad de los vientos, creando así un microclima para las plantas

de sotobosque. Los árboles producen además abundantes restos vegetales que se incorporan como materia orgánica al suelo del bosque (Ferrerías y Arozena, 1987). Posteriormente aparecería un estadio de bosque aclarado o prebosque conteniendo gran cantidad de arbustos, también llamado matorral preforestal. Las características de los suelos de estas formaciones son muy parecidas a las de la etapa de bosque y siguen siendo buenos protectores del suelo frente a la degradación (López-Bermúdez y Albadalejo, 1990). Estas formaciones se hallan principalmente compuestas por piornales, zarzales, espinales, coscojares, madroñales etc.. La siguiente etapa se caracteriza por la predominancia del matorral heliófilo, jarales, romerales, albadales, esplegares, brezales, tomillares, etc., junto con relictos de la vegetación climática. En ocasiones estas zonas se hallan artificialmente repobladas con pinos o elementos del matorral heliófilo como ericáceas o cistáceas. Es ya claramente una etapa de degradación donde el suelo se halla muy desprotegido. A continuación suelen aparecer los llamados pastizales vivaces, condicionados por el pastoreo, y de carácter perenne con arbustos altos: espartales, albardinales, lastonares, brezales, romerales etc. Finalmente, una etapa de plantas anuales, generalmente de rápido desarrollo sin ninguna capacidad de cobertura alternando con tomillares de manera muy laxa. Estas son equivalentes a las comunidades que se encuentran en campos abandonados o barbechos, aunque estas últimas suelen ser más nitrófilas por la mayor riqueza del suelo (Ferrerías y Arozena, 1987).

En las regiones áridas y semiaridas es habitual encontrar la formación de matorral mediterráneo, en la que destacan especies leñosas típicas como las correspondientes a los géneros *Thymus*, *Lavándula*, *Salvia*, *Sideritis*, *Teucrium*, *Rosmarinus*, etc., así como leguminosas arbustivas tales como *Anthyllis*, *Retama*, *Coronilla* etc. (López-Bermúdez y Albadalejo, 1990). La biomasa aérea de estos ecosistemas es muy pequeña en comparación con la biomasa subterránea como señala Montalvo (1992), y por tanto, el grado de protección al suelo de estos matorrales depende de su densidad y estado de conservación. En zonas de alto riesgo de desertificación la conservación y empleo de estas especies se platea, sin embargo, como la alternativa más factible frente a la desertificación. Francis y Thornes (1990) estudiando la capacidad protectora del matorral frente a la erosividad de la lluvia, encuentran que esta es similar a la obtenida con una cubierta arbórea. Este resultado es particularmente interesante porque señala que la conservación y expansión del matorral mediterráneo podría ser una medida más eficaz y económica de protección del suelo frente a la erosión, que determinados planes de reforestación con especies arbóreas.

## **II.2. La Revegetación frente a la Desertificación del Mediterráneo**

### **2.1. Consideraciones Generales**

La acentuación de la aridez y de los procesos de desertificación de la Península, y, en especial, del Sureste Ibérico debido a la prolongada sequía que

atenaza España, hacen imprescindible la adopción de medidas urgentes para frenar el avance de la erosión de nuestros suelos y la degradación de las estructuras agroeconómicas. La **reconstrucción de una cubierta vegetal permanente que protega el suelo frente a los agentes erosivos** que lo amenazan parece ser la vía más inmediata y eficaz de acometer dicho problema. De hecho, en el análisis que realiza Carreras (1992) sobre el futuro del proyecto LUCDEME, se concluye diciendo que el objetivo prioritario es la producción de viveros "ad hoc" de material vegetal de interés, que permita afrontar de forma racional (ecológica) unos programas de revegetación destinados a promover el desarrollo de la cobertura vegetal en áreas degradadas. Así mismo, uno de los objetivos prioritarios de España dentro del marco de su liderazgo de la Presidencia de la Unión Europea durante el semestre final de 1995 es el reforzamiento de los planes y actuaciones contra la desertificación.

Para la consecución de este objetivo, varios autores, Morgan *et al.* (1990) y De Simon (1994), señalan la necesidad de un estudio previo y exhaustivo de varios aspectos relacionados. Entre ellos se encuentran el tipo de suelo del área en cuestión, la pendiente del terreno, las precipitaciones y clima de la zona, así como la cubierta vegetal remanente, y por tanto, la fase de degradación en la que se encuentra la climax del ecosistema. Dichas consideraciones nos permitirán acometer con éxito la tarea restauradora y definir la estrategia de manejo más apropiada.

En cuanto al uso de especies vegetales, el objetivo final que se pretenda alcanzar es la clave para definir que especies son las más adecuadas. Así, como recogen Morgan *et al.* (1990), el conocimiento de la climax del ecosistema y de las posibilidades reales de retornar a ella considerando las actuales condiciones, decidirá cuales son las especies más apropiadas. Un aspecto interesante es el que recoge De Simon (1994), un clima determinado puede ser apropiado para el mantenimiento de una cubierta vegetal determinada pero no para su creación porque faltan las modificaciones ecoclimáticas que crea esa misma cubierta vegetal. Ello quiere decir que es necesario utilizar especies "intermedias" que favorezcan la progresiva aparición de dichas condiciones ecoclimáticas. En general y atendiendo a las consideraciones de Le Houérou (1987), se deben elegir las especies más productivas bajo las circunstancias y objetivos perseguidos. Cuando se pretende una autorregeneración del ecosistema, es incuestionable, sin embargo, el uso de especies nativas puesto que es más probable que se hallen adaptadas a las condiciones climáticas existentes (Francis y Thornes, 1990). Respecto a este punto, son muy interesantes los resultados obtenidos por Herrera *et al.* (1993), en los que las razones que apoyan el uso de especies pertenecientes a la sucesión natural de la zona están plenamente justificadas por la falta de éxito de especies exóticas que habían sido, sin embargo, seleccionadas como adecuadas para restaurar otros ecosistemas de similares características.

En general, las especies elegidas deben tener capacidad de germinar y establecerse por si mismas en el ecosistema. Son importantes aquellas especies

que tienen una alta tasa de producción de semillas porque ello les permitirá tener más posibilidades de establecimiento. Tanto Morgan *et al.* (1990) como Francis y Thornes (1990) recomiendan, así mismo, el empleo de mezclas de plantas que favorezcan la biodiversidad y que permitan la coexistencia de especies de rápido desarrollo y establecimiento, pero de menor capacidad protectora del suelo, con otras de mayor porte pero de más lento desarrollo. Las especies herbáceas son capaces de crecer rápidamente y dejar restos orgánicos a su muerte, que favorezcan el posterior desarrollo de otras especies más exigentes. Sin lugar a dudas, las leguminosas leñosas pertenecen a este segundo tipo y su importancia es crucial en experiencias de revegetación por su aporte de nitrógeno al suelo (Morgan *et al.*, 1990; Herrera *et al.* 1993). Skujins y Allen (1986) recomiendan así mismo el uso de especies arbustivas pertenecientes a la sucesión natural que puedan favorecer un posterior establecimiento de especies arbóreas.

## **2.2. El Plan Forestal Andaluz: Propuestas de Revegetación**

El Plan Forestal Andaluz (PFA) se concibió, textualmente, "como un instrumento para la ordenación de los recursos renovables de la Comunidad Autónoma de Andalucía, en aras de conseguir una óptima utilización de los mismos que permita compatibilizar los valores de protección y restauración del medio natural con el desarrollo socioeconómico" (Martín, 1993). Entre los objetivos del PFA se encuentran, evidentemente, la lucha contra la desertización y por la conservación de los recursos hídricos, los suelos y la cubierta vegetal, en

especial la del monte mediterráneo; así como la restauración de los ecosistemas forestales degradados.

En cuando a gestión de ecosistemas, el PFA aporta unos conocimientos generales importantes que se transcriben a continuación:

*"Para conseguir la integración entre conservación y producción en la utilización racional de los recursos naturales, se hace preciso analizar y gestionar tales recursos en un marco suficientemente amplio como es el de los ecosistemas de los que forman parte.*

*Esa gestión debe contemplar una visión dinámica de los ecosistemas, sometidos a cambios a lo largo del tiempo, de manera que van variando su estructura, su composición y sus ciclos de funcionamiento.*

*Los cambios experimentados por los ecosistemas constituyen el proceso de sucesión, durante el cual las agrupaciones vegetales pueden ir pasando por distintos estados en sentido ascendente (progresión) o descendente (regresión), según se acerquen o alejen del estado final más o menos estable (climácico).*

*La gestión consiste en analizar el estado actual de los ecosistemas, y en función de los objetivos previstos; determinar los estados de la sucesión hacia los que debe evolucionar por la intervención humana."*

De otro lado,

## 18 Introducción

*"El Plan Forestal considera que las actuaciones deben incidir, fundamentalmente, sobre los propios ecosistemas, es decir, sobre el biotopo y su biocenosis, de forma que, en el tiempo, su estructura y composición alcancen estados favorables desde el punto de vista de la consecución de los objetivos. Por ello, la metodología básica se apoya en los conceptos: estado inicial, objetivos, tipos de manejo (con actuaciones específicas) y estado final.*

*Las actuaciones en el campo forestal necesitan plazos largos antes de manifestar su eficacia. Se ha estimado 60 años como un período que permite a los ecosistemas lograr su madurez y complejidad necesarias para que éstos respondan, con la máxima capacidad de autorregulación y autoregeneración".*

El PFA propone un **modelo de gestión de ecosistemas** (Fig.1) y entre los tipos de actuación propuestos se encuentra el **manejo de la vegetación**. El modelo propuesto para dicho manejo se halla en la Fig. 2.



## MODELO DE GESTION DE ECOSISTEMAS



Figura 1

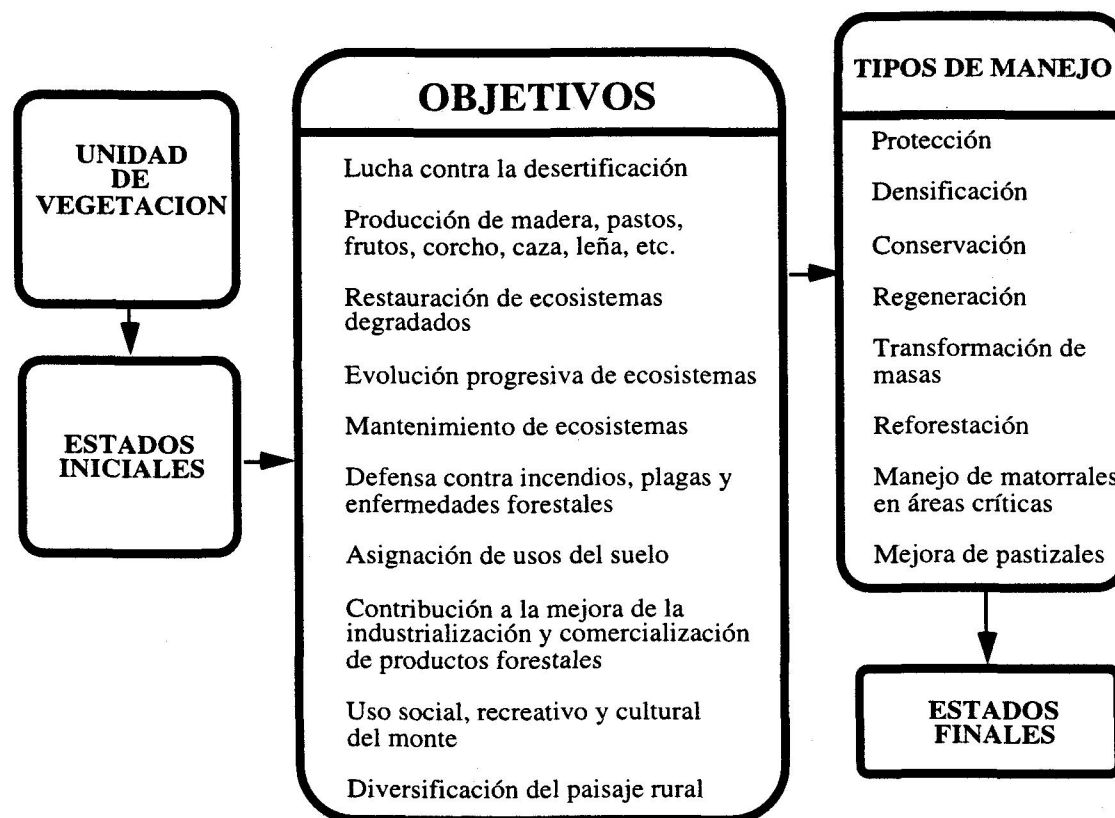


Figura 2

Ciñendonos al estudio propuesto en este trabajo, la unidad de vegetación que interesa corresponde según el PFA a matorrales mediterráneos en áreas críticas. Referente a esta unidad de vegetación, los objetivos previstos y las operaciones propuestas por dicho plan se hallan en la Fig.3.

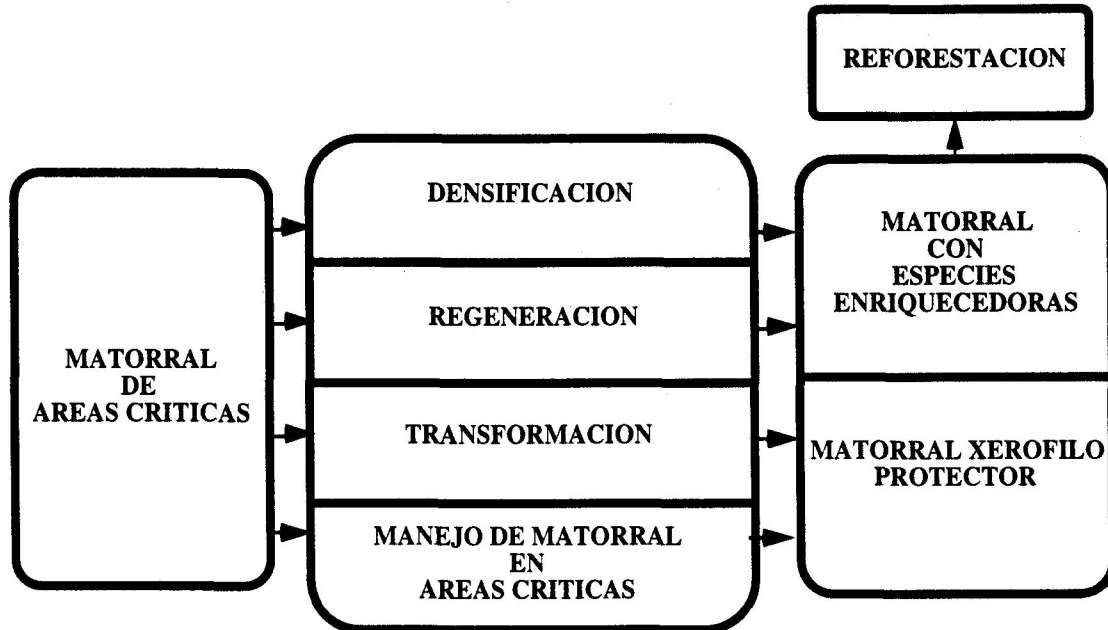


Figura 3

### II. 3. Papel de los Microorganismos Rizosfericos en Programas de Revegetación

Durante muchos años, los suelos de áreas desertizadas han sido considerados sin valor económico y caréntes de todo interés, por lo que los estudios ecológicos, incluidos aquellos sobre sus características microbianas han sido escasos. Sin embargo, recientemente dos razones han llevado a un cambio fundamental en la consideración de dichas áreas. Por una lado, una mayor necesidad de destinar parte de estos suelos a uso agrícola, especialmente en países del tercer mundo, y por otro, el incremento de la aridez y por tanto de los

## 22 *Introducción*

---

procesos de desertificación que han provocado la urgencia de proteger y rehabilitar muchas de las zonas con más peligro de erosión. Ambas causas han contribuido a una mayor necesidad de profundizar en el conocimiento de la dinámica de los procesos biológicos en ambientes xéricos (Skujins, 1984).

El funcionamiento de un ecosistema terrestre se haya gobernado en gran medida por la actividad microbiana del suelo ya que la mayoría de los ciclos bioquímicos en la naturaleza son llevados a cabo por microorganismos (Stevenson ,1986; Kennedy y Smith ,1995). La desaparición o disminución de éstos en el suelo debida a los procesos de erosión y desertificación puede llegar a ser, por tanto, muy grave, afectando no sólo al conjunto de organismos microscópicos que lo habitan sino a la cobertura vegetal que soporta. La baja densidad de propagulos microbianos que caracteriza a los ecosistemas desertificados puede limitar el establecimiento del material vegetal en programas de revegetación (Sylvia, 1990). El reestablecimiento de la diversidad microbiana es, en consecuencia, crítico, y el éxito de tales programas depende en muchas ocasiones de un adecuado manejo de tales microorganismos. Es preciso, por tanto, realizar estudios previos del estatus microbiano del suelo así como de su actividad, y si es necesario, reforzar la población natural con inoculaciones apropiadas (Allen *et al.*, 1992; Herrera *et al.*, 1993; Jasper, 1994; Requena *et al.*, 1996).

Los microorganismos del suelo llevan a cabo actividades cruciales para el establecimiento, desarrollo, nutrición y salud de las plantas (Azcón-Aguilar y Barea, 1992; Linderman, 1992; Barea y Jeffries, 1995). A excepción del horizonte superficial del suelo donde la materia orgánica representa su fuente de energía principal, la actividad microbiana del suelo se desarrolla mayoritariamente alrededor de las raíces de las plantas que lo habitan, puesto que representan un soporte no sólo físico sino nutricional para la microbiota del suelo al beneficiarse ésta de los exudados radicales y detritus de raíces (Fitter & Garbaye, 1994; Garbaye, 1994; Barea y Jeffries, 1995). Este nicho ecológico se denomina rizosfera (Bowen, 1980; Lynch, 1983; Azcón-Aguilar y Barea, 1992) y se extiende apenas unos milímetros desde la raíz en todas direcciones (Weller and Thomashow, 1994). El efecto rizosférico sobre los microorganismos repercute finalmente también sobre la propia planta a través de la actividad microbiana que hace disponible ciertos nutrientes, facilita la captación de estos por las plantas, produce fitohormonas, protege contra patógenos, descompone sustancias tóxicas o mejora la estructura del suelo (Kloepper *et al.*, 1991; Kloepper, 1992; Azcón-Aguilar y Barea, 1992, Höflich *et al.*, 1994; Barea y Jeffries, 1995).

Existen en la rizosféra dos grupos claves de microorganismos que son de particular interés en el desarrollo y establecimiento de las plantas: **(1) Saprofitos**, como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria), que se hallan implicadas en procesos de control biológico, establecimiento de plántulas, emergencia de estas, y estimulación del

## 24 Introducción

crecimiento en general (Kloepper, 1992). Entre ellas se hallan bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> en vida libre (Kennedy y Tchan, 1992) y bacterias solubilizadoras de fosfato (Barea *et al.*, 1983). (2) **Simbiontes mutualistas**, como los hongos de la micorriza y bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>.

### 3.1. SAPROFITOS:

#### 3.1.1. PGPR (plant growth promoting rhizobacteria)

##### Introducción

Las rizobacterias como su nombre indica son bacterias asociadas a plantas que colonizan de forma permanente la rizosfera de las mismas y son capaces de proliferar a medida que la raíz se desarrolla. Dentro de este grupo de bacterias se encuentran las llamadas PGPR o bacterias promotoras del crecimiento vegetal (del inglés, plant growth promoting rhizobacteria) que ejercen un efecto beneficioso sobre el desarrollo de la planta a la que se asocian. Los mecanismos mediante los que estas bacterias actúan son de dos tipos: **directos**, mediante la producción de sustancias de tipo fitohormonal, o mediante la facilitación de la captación de determinados nutrientes por parte de la planta como P o N; o **indirectos**, a través de un efecto de control biológico sobre patógenos de la planta a la que se asocian.

**3.2. SIMBIONTES MUTUALISTAS****3.2.1. HONGOS DE LA MICORRIZA****¿Qué son las micorrizas?**

La asociación mutualista conocida como micorrizas, que se desarrolla entre determinados hongos del suelo y las raíces de las plantas fue descrita por primera vez en 1885 por el investigador alemán Frank (1885). Olvidada por los investigadores durante años, probablemente debido a que representa una "interfase" entre los campos de la microbiología, micología y botánica, no fue hasta mediados de nuestro siglo cuando, gracias a los trabajos de Barbara Mosse, las micorrizas fueron rescatadas de su "periodo de dormancia". Es sorprendente, sin embargo, que hayan permanecido tanto tiempo desconocidas cuando más del 90% de las plantas vasculares en la naturaleza forman dicha simbiosis (Harley and Smith, 1983; Kendrick, 1985; Azcón-Aguilar et al., 1991). En la tabla I encontramos la información recogida por Brundrett (1991) sobre los tipos de micorriza y plantas asociadas de los ecosistemas más representativos del mundo.

De acuerdo a la morfología de la colonización así como a los taxones de los simbioses, planta y hongo, existen 7 tipos de micorrizas: micorrizas arbusculares (antes vesículo-arbuscular), ectotomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutoides, ericoides, monotropoides y orquidiáceas (Fig.4) (Harley and Smith,

## 26 Introducción

1983). Todas ellas poseen la característica de que el hongo nunca penetra la endodermis de la raíz ni produce reacciones de defensa en la planta (excepto en el caso de las orquidiáceas) lo que diferencia estos hongos de los patógenos, limitándose su colonización al córtex radical (Alvarez, 1991; Barea et al., 1991; Gianinazzi-Pearson and Smith, 1993).

Las micorrizas arbusculares (MA) son las más extendidas en la naturaleza. Aproximadamente el 90% de las familias botánicas poseen especies que forman este tipo de micorriza, abarcando especies herbáceas, arbustivas y arbóreas. La simbiosis MA es prácticamente omnipresente en agrosistemas, ecosistemas modificados por el hombre y en ecosistemas naturales, desarrollándose en todos los tipos de suelos y situaciones climáticas (Barea et al., 1995). En contraste con el alto número de especies botánicas que forman este tipo de simbiosis, aproximadamente sólo 150 especies de hongos pertenecientes a la clase Zygomycetos son capaces de inducirlos (Morton, 1988; Morton and Benny, 1990; Walker and Trappe, 1992). Todos los hongos pertenecen a la familia Endogonaceae, orden Glomales, en el que se distinguen 6 géneros: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutelospora*, *Glomus* y *Sclerocystis* (Barea et al., 1991; Walker, 1992).

Los hongos MA son simbioses biotrofos obligados puesto que solo completan su ciclo de vida en presencia de la planta hospedadora. Las esporas del hongo germinan en el suelo y producen un micelio que se extiende por el suelo



hasta contactar con una raíz hospedadora. Las hifas del hongo se engrosan entonces formando los llamados apresorios que dan lugar a los "puntos de entrada" del hongo hacia el interior de la raíz. Penetran dicha raíz y desarrollan estructuras intracelulares específicas como ovillos ("coils") por enrollamientos de las hifas, o arbusculos (estructuras en forma de árbol) en la parte del cortex más cercana al cilindro vascular, mediante invaginaciones de la membrana del hongo en el plasmalema celular. Dichos arbusculos son el órgano principal de la simbiosis pues está descrito como el lugar de intercambio bidireccional de nutrientes entre los dos simbioses (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988). La colonización se extiende a través de un micelio interno de hifas longitudinales intercelulares y posteriormente la emisión de un micelio externo encargando de la exploración del suelo en busca de nutrientes. Este micelio externo puede llegar a ser de hasta varios metros por centímetro de raíz colonizada (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988), pudiendo a su vez contactar nuevas raíces y actuar como propágulo de expansión del hongo. (Barea et al., 1991).

El establecimiento de la simbiosis comienza con la actividad tanto de las plantas como de los hongos regulada de forma independiente, solamente influenciada por las condiciones ambientales. Sin embargo, parece que existen evidencias de que al avanzar dicho proceso se producen interacciones genéticas entre ambos miembros de la simbiosis (Brundrett, 1991; Dumas et al., 199?; Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi, 1989). A pesar de ello, existe una carencia de especificidad en sentido estricto. En general cualquier hongo de micorriza puede

## 28 *Introducción*

colonizar cualquier especie de planta susceptible de infección por hongos MA, y al mismo tiempo un solo sistema radical puede albergar diversas especies de hongos MA. Es más, diversas especies de plantas pueden tener sus sistemas radicales comunicados a través del micelio fúngico (Barea, 1991), aunque la extensión de dichas interconexiones no está claramente establecida (Tinker, 1975; Heap & Newman, 1980). Este hecho es clave en ecosistemas naturales porque supone un flujo de nutrientes en el suelo "canalizado" a través del hongo. No obstante, distintas especies de plantas e incluso cultivares de la misma, varían en gran manera en el nivel de susceptibilidad a la colonización por hongos MA (Azcón y Ocampo, 1981), indicando que la planta controla en gran medida la entrada del hongo (Gianinazzi-Pearson, 1984). Por otro lado y puesto que el nivel de colonización que distintos hongos MA pueden tener para un mismo hospedador es diferente, se puede inferir que existe un cierto grado de especificidad en la simbiosis lo que lleva a la definición de compatibilidad (Barea, 1991). Smith and Gianinazzi-Pearson (1988) acuñan el término de *compatibilidad funcional* para indicar la expresión fenotípica de un hongo MA como resultado de las influencias del ambiente sobre la expresión genotípica del genoma de ambos simbioses, planta y hongo. Sin embargo, aunque en sistemas experimentales las incompatibilidades de las combinaciones planta-hongo MA sean escasas, ello suele ser más frecuente en condiciones naturales. La razón es que generalmente un determinado hongo está adaptado a condiciones ambientales determinadas y su introducción en ecosistemas diferentes puede provocar "inadaptaciones" al medio (Brundrett, 1991).

### **Papel de los HMA en el ciclado de nutrientes**

El significado de la simbiosis hongo MA y planta está esencialmente ligado a la transferencia de nutrientes que se produce entre ambos componentes de la simbiosis. El transporte de nutrientes bidireccional que tiene lugar en el arbusculo provee al hongo de productos de la fotosíntesis, esenciales para su desarrollo, y compensa a la planta con la captación de agua y nutrientes del suelo, principalmente P, a través del micelio externo. Ello significa que el hongo no es necesariamente dependiente de la planta en cuanto a nutrientes inorgánicos (Gianinazzi-Pearson and Smith, 1993). El micelio se comporta, en síntesis, como una prolongación de la raíz, permitiendo, por un lado, explorar mayores volúmenes de suelo y superar así la zona de agotamiento cercana a la raíz; y por otro, facilita la captación de nutrientes de lenta movilidad como el P o el Zn, y de otros algo más móviles como Cu o  $\text{NH}_4^+$  (Gianinazzi-Pearson and Smith, 1993; Jeffries and Barea, 1994). Por este beneficio, la planta ha de "pagar un precio", invirtiendo en ello de un 10 a un 20% de la producción neta de fotosintato (Jakobsen and Rosendahl, 1990).

El micelio fúngico es, por tanto, un elemento vital en el funcionamiento del ecosistema terrestre. La capacidad del micelio de crecer de forma intrusiva entre partículas de suelo y materia orgánica, llegando a sitios donde la raíz no alcanza es fundamental en la captación de nutrientes. Ello, junto a la rápida absorción de

### 30 *Introducción*

los mismos, hace a la micorriza competir hábilmente con otros microorganismos del suelo por los nutrientes y beneficiar de esa manera a la planta. Además otros procesos como la secreción enzimática y los cambios provocados en la hifósfera (zona de influencia del micelio externo) como alteraciones del pH, pueden actuar incrementando la disponibilidad de los nutrientes del suelo y en especial de los más insolubles (Gianinazzi-Pearson and Smith, 1993). Por todos estos motivos, el establecimiento y desarrollo de una planta en un suelo con una buena red de micelio fúngico es completamente diferente a cuando se establece en ausencia del micelio micorrícico (Jeffries y Barea, 1994). El micelio actúa compensando a la planta por la infertilidad del suelo, habiéndose encontrado que los niveles de nutrientes de plantas micorrizadas en condiciones de baja fertilidad son similares o ligeramente inferiores a los de plantas establecidas en suelos más fértiles pero con menor abundancia micorrícica (Mc Naughton & Oosterheld, 1990). Incluso, la red de micelio puede conectar distintas plantas micorrizadas entre sí, de tal manera que todas ellas tienen acceso a un conjunto de nutrientes común (Francis et al., 1986). En el caso de plantas leguminosas, este hecho puede ser de gran importancia pues si la movilidad del N es suficiente via micelio fúngico, plantas que no reciben aportes de N procedente de la atmósfera, via fijación biológica de N, pueden verse beneficiadas de la asociación con leguminosas (Jeffries & Barea, 1994). La importancia de la cantidad de N transferida via hifa, sin embargo, no está clara, y algunos autores sostienen que es pequeña (Bethlenfalvay et al., 1991). De cualquier manera, la simbiosis leguminosa-hongo de la micorriza es vital en la nutrición de dichas plantas debido al alto coste en P requerido para el

proceso de nodulación y fijación de N<sub>2</sub> (Barea et al., 1992). Por ello la asociación hongo-bacteria fijadora de N<sub>2</sub>-leguminosa es de un valor crítico en suelos con bajo contenido o baja disponibilidad de P, como suele ser el caso de ecosistemas desertificados o degradados (Barea et al., 1992; Marschner and Dell, 1994). Este hecho convierte a las leguminosas en candidatas muy apropiadas para la revegetación de zonas áridas con problemas de desertificación (Olivares et al., 1988; Francis y Thornes, 1990; Danso et al., 1992; Herrera et al., 1993; Requena et al., 1995).

Es importante considerar no obstante, que no todos los hongos son igualmente eficaces en la captación de nutrientes. Así, Jakobsen et al. (1992), utilizando la metodología isotópica del <sup>32</sup>P demuestran que ciertos hongos transportan el P de manera más eficaz a la planta, mientras que otros por el contrario lo acumulan en su interior. Sin embargo, a pesar de que algunos micelios no se muestran tan eficaces representan un almacén de nutrientes importante y al mismo tiempo son canalizaciones de los mismos de gran interés que impiden la dispersión de nutrientes via mineralización al morir las plantas. De esta manera, gran parte del contenido en N y P de una planta, en senescencia puede pasar a una adyacente via la red de micelio, de forma más eficiente que en ausencia de micorrizas (Newman and Eason, 1989; Eason and Newman, 1990). Los HMA, además de afectar directamente a la nutrición mineral de la planta, a través de la adquisición de nutrientes por el micelio, pueden modificar las tasas de

transpiración y la composición de la microbiota de la rizósfera afectando indirectamente a la nutrición vegetal (Marschner and Dell, 1994).

### **Hongos MA en Condiciones Naturales. Ecología de Hongos MA**

La complejidad de la dinámica de estructura y funcionamiento de los hongos arbusculares en condiciones naturales es considerablemente mayor que en condiciones de laboratorio o de invernadero. El hecho de ser además simbioses obligados dificulta sobremanera el estudio de la ecología de dichos hongos. El potencial de micorriza de un suelo depende de la dispersión y mantenimiento de los propágulos existentes y de su viabilidad. Es imprescindible que éstos estén presentes cuando el conjunto de nuevas raíces comienza a desarrollarse cada estación y que puedan colonizar nuevas raíces (Brundrett, 1991; Sanders, 1993). Los propágulos de hongos MA incluyen esporas, fragmentos de raíz colonizada y micelio externo (Barea et al., 1991). Muchos autores consideran a las esporas como el principal propágulo micorrícico de un suelo. Sin embargo, a menudo su número no se corresponde con la infectividad de dicho suelo (Abbot y Robson, 1984; 1991; Mc Gee, 1989; Brundrett, 1991). La esporulación está influenciada por muchos factores, entre otros la planta hospedadora y las condiciones ambientales. Así, tanto Rabatin y Wicklow (1979) como Bethlenfalvay (1984) encuentran que en comunidades vegetales donde la mayoría de las plantas son hospedadoras de HMA, la diversidad de hongos está directamente relacionada con la diversidad de plantas. Un ejemplo más de ello son los resultados de Gange *et*

*al.* (1990) quienes encuentran que una reducción de la infección micorrícica en condiciones de campo por la aplicación de un fungicida (Iprodione), resulta en una disminución de la diversidad de plantas presentes. Barea & Jeffries (1995) recogen dos significativos ejemplos: Abbot & Robson (1977) encuentran que en condiciones naturales donde dominan especies de plantas arbustivas, el número de esporas de HMA es generalmente menor que en suelos agrícolas adyacentes. O por el contrario, en praderas nativas Kucey & Paul (1983) describen que el número de esporas era mucho mayor que en suelos adyacentes cultivados con trigo.

Un factor importante al considerar los ecosistemas naturales es el hecho de que muchas esporas no actúan como propágulos si están quiescentes (no germinan si las condiciones del suelo no son las adecuadas) o si poseen estadios de dormancia naturales, mecanismos ambos de resistencia ante condiciones ambientales adversas (Tommerup, 1987). Las esporas poseen además otros mecanismos para resistir condiciones adversas como puede ser la capacidad de retraer el citoplasma cuando la hifa de germinación no contacta con una planta hospedadora o las condiciones del medio no son adecuadas. La espora puede así germinar varias veces y esperar a que las condiciones del medio sean más favorables o exista una raíz susceptible de ser colonizada (Warner & Mosse, 1980; Koske, 1988). El contenido melánico parece ser otra forma de protección de las esporas. En general, las esporas son consideradas el propágulo más resistente (Abbot y Robson, 1991; Hayman, 1982; Daniels, 1984). Sin embargo,

### 34 *Introducción*

la rápida colonización micorrícica de las nuevas plantas en condiciones naturales parece deberse más a una red establecida de micelio fúngico que a la germinación e infección a partir de esporas (Jasper et al, 1989a y b; Mc Gee, 1989; Requena et al, 1996). En ocasiones, vesículas de hongos MA, generalmente consideradas como órganos lipídicos de reserva, desarrollan paredes multicapa parecidas a esporas y pueden actuar como propágulos (Biermann and Lindermann, 1983). Los fragmentos de raíces colonizadas parecen ser sin embargo, el propágulo más agresivo colonizando nuevas raíces (Barea et al, 1991).

La actividad micorrícica (estimada mediante el cálculo de la longitud de raíz colonizada y el número de esporas) se concentra generalmente en las capas más superficiales del suelo. Sin embargo, en ecosistemas áridos se han hallado propágulos a mayor profundidad (Brundrett, 1991). Es importante tener en cuenta a la hora de determinar propágulos (vease esporas) el factor "estacional" de su formación, dependiente en muchos casos de los ciclos de vegetativos de las plantas con las que forman simbiosis. En cuanto a la dispersión de los propágulos, Read (1976) sugiere que la mayor expansión de los hongos de la micorriza se debe a contactos raíz-raíz. Es decir, el micelio procedente de una raíz colonizada contacta a otra iniciándose una nueva colonización. Puesto que la expansión del micelio es muy lenta, en casos de alteración severa del suelo, la dispersión de esporas debe considerarse como medio principal de propagación (Allen, 1993 o 91?). En ecosistemas áridos, la expansión de las esporas de tipo más pequeño puede tener lugar por el viento (Warner et al., 1987; Allen, 1988; Tommerup,



1982). Sin embargo, si el número de esporas de un suelo sometido a una alteración severa es pequeño, la recolonización de raíces por hongos MA estará sujeta a la supervivencia de los fragmentos de raíz infectados remanentes. En ocasiones, los propágulos micorrícicos son transportados por animales, describiéndose incluso la resistencia de esporas al tracto digestivo de algunos animales (Allen, 1988; Trappe y Maser, 1976).

Otro aspecto importante de la ecología de las plantas micorrizadas es su **micotrofia**. Se entiende por micotrofia el grado de dependencia de la planta a la colonización para "alimentarse" a través del hongo. Baylis (1975) estableció que raíces con un sistema radical poco desarrollado, con pocos pelos radicales, del tipo llamado "magnoliode" tienden a ser muy micotróficas, y a la inversa, raíces del tipo "graminoide" son en principio menos dependientes de los hongos micorrícicos. La mayoría de las plantas poseen, sin embargo, sistemas radicales intermedios entre ambos tipos, lo que dificulta conocer su micotrofia a priori (StJohn and Coleman, 1981). La dependencia de la planta a la micorriza es probablemente también variable con el tiempo pues plantas germinadas recientemente poseen un corto sistema radical incapaz de acceder a ciertos nutrientes y su micorriza puede beneficiarlas nutritivamente más en dicho estado que una vez alcanzado un desarrollo radical mayor (StJohn and Coleman, 1981).

La micotrofia es un aspecto de particular importancia cuando se considera el papel de los hongos de la micorriza arbuscular en la **sucesión natural**.

### 36 *Introducción*

Comenzando desde una fase de suelo desnudo, las primeras plantas que aparecen suelen ser de carácter no-micotrófico, pertenecientes a familias Cruciferae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae y Polygonaceae (Francis and Read, 1994). Estas plantas, que son anuales o bianuales en su mayoría, poseen estrategias de crecimiento del tipo r, es decir son plantas poco especializadas y su estrategia de desarrollo y reproducción se basa en la posesión de un pequeño porte, capacidad de rápida germinación y su carácter estacional (Grime, 1979). Esta sucesión de tipo primario que juega un papel fundamental protegiendo el suelo y creando microhabitats adecuados, no se ve afectada por la introducción de micorrizas, o incluso puede verse desfavorecida. Existen evidencias del efecto detrimento de hongos MA sobre plantas no-micotróficas (Allen et al., 1989; Francis & Read, 1994). Sin embargo, de acuerdo a Allen & Allen (1984), la inoculación puede ser un factor decisivo sobre la sucesión vegetal cuando el estadio sucesional se encuentra en la fase de transición desde plantas anuales herbáceas no-micotróficas a especies dependientes, en muchos casos, de porte arbustivo. La micorriza parece actuar "inclinado la balanza" en favor de las especies dependientes al mejorar su capacidad competitiva por la captación eficaz de nutrientes (Gange et al. 1990; St John and Coleman, 1983). Sobre este aspecto es curioso el punto de vista de Francis & Read (1994) sobre el papel de los hongos MA en la sucesión natural. Mientras la mayoría de estudios sobre el tema coinciden en señalar que la progresiva sustitución de especies no-micotróficas por otras de carácter micotrófico esta motivada por aspectos nutricionales incrementados por el hongo que favorecen a la planta hospedadora (Reeves et al., 1979; Miller, 1987; Allen &

Allen, 1980; Janos, 1980), Francis & Read centran la cuestión del problema en un efecto "egoista" del hongo que actúa seleccionando a la población micotrófica de plantas mediante efectos antagónicos (como producción de fitoalexinas) sobre las plantas no susceptibles de micorrización (Figura 4). Al avanzar la sucesión, las especies arbustivas van siendo desplazadas por las arbóreas, y los hongos MA van siendo así mismo sustituidos por hongos del tipo ectomicorrícico. Existen, no obstante, numerosas especies "intermedias" que son micorrizadas por ambos tipos de hongos. Inicialmente en su etapa juvenil forman simbiosis con hongos endomicorrícicos y al alcanzar la madurez la forman con hongos ectomicorrícicos. (Insertar esquema de D. Read)

En cuanto a la diversidad de plantas existentes en un ecosistema, el punto de vista de Francis & Read (1994) de nuevo se enfoca más hacia la posición del hongo. Del mismo modo que veíamos como la diversidad de hongos estaba determinada, al menos en parte, por el tipo de plantas existentes, estos autores recogen algunos ejemplos que ilustran cómo la diversidad florística de una comunidad es en parte un reflejo del resultado-beneficio relativo que cada planta puede obtener de su asociación con hongos de la micorriza. Sin embargo, no hay que olvidar que al valorar la importancia de la micorriza en la estructura de la comunidad vegetal es interesante señalar que las limitaciones nutritivas del propio ecosistema condicionan la respuesta de las plantas. De esta manera se observa que ecosistemas herbáceos se hallan principalmente limitados por la cantidad de P

existente mientras que en ecosistemas forestales las limitaciones al crecimiento vegetal están marcadas por el N (Read, 1991).

### **Erosión y HMA**

Se sabe que los propágulos micorrícicos se afectan gravemente por la erosión tanto de la vegetación como del suelo, procesos frecuentemente provocados por la actividad humana. Los distintos procesos de alteración actúan reduciendo el número de esporas viables, rompiendo la red de micelo en el suelo y haciendo imposible la colonización de nuevas raíces a partir de fragmentos ya colonizados (Habte, 1989; Brundrett, 1991). Day et al. (1987) encuentran que la densidad de población de HMA se ve reducida incluso si los procesos de erosión son moderados y no afectan a la cobertura vegetal. La alteración del suelo disminuye la tasa de colonización por los hongos MA debido a la ruptura de la red de micelio (Read & Birch, 1988; Jasper et al., 1989a, b) hecho que se puede relacionar con la disminución en la captación de P observada en plantas micotróficas, mientras que parecía no afectar a las que no formaban la simbiosis (Evans & Miller, 1988). Este hecho podría afectar a los procesos de sucesión natural favoreciendo procesos de recesión de la estructura de la comunidad vegetal. La pérdida de propágulos micorrícicos en un suelo, por tanto, puede modificar y condicionar la sucesión natural ya que como hemos visto las especies pioneras son de carácter no-micotrófico y pueden llegar a perdurar hasta 15 años en ecosistemas áridos o semi-áridos si no existen aportes de propágulos externos,

y dominar así sobre formas de vegetación más protectoras del suelo (Allen, 1989a). Adicionalmente los procesos erosivos pueden modificar la biodiversidad de especies fúngicas, apareciendo ecotipos más adaptados pero generalmente menos efectivos (Allen, 1989b).

Entre los procesos descritos que afectan a la micorriza se encuentran la alteración de la capa superficial del suelo por la actividad minera (Jasper et al, 1987; Allen 1989) o por los claros de bosque contra incendios (Janos, 1987). Prácticas agrícolas como el arado (Evans & Miller, 1988), largos periodos de barbecho (Thompson, 1987), siembra de cultivos no micorrícicos (Ocampo & Hayman, 1981; Powell, 1982), aplicación de biocidas como pesticidas y fungicidas (Medve, 1984), o la inundación continua de campos para el cultivo del arroz, son así mismo procesos detrimentes del número de propágulos micorrícicos. El abandono de campos de cultivo en zonas áridas y semi-áridas del Mediterráneo, sometidas durante años a algunos de estos manejos agrícolas perjudiciales para la población de HMA, agrava el problema puesto que se deja al suelo desnudo de una vegetación protectora que cobije a la microbiota remanente de las desfavorables características edafoclimáticas: bajo contenido en nutrientes, termicidad, así como escasas y torrenciales precipitaciones. Los procesos de sucesión natural, tanto los concernientes a la vegetación como a la microbiota fúngica, se ven así ralentizados o, en condiciones extremas, detenidos.

#### 40 *Introducción*

Además de la importancia "per se" de la pérdida de propágulos micorrícicos y consecuentemente de su actividad ya descrita, su desaparición es crítica al llevar aparejada cambios de tipo físico y estructural en el suelo. Estos cambios se hallan provocados por la desaparición de los agregados de suelo a que los HMA dan lugar cuando extienden la red de micelio por el suelo. Estos agregados que son críticos para mantener la estructura del suelo, representan, además, el soporte o nicho ecológico de otros muchos componentes de la microbiota del suelo que ven por tanto afectada su supervivencia y actividad (Tisdall, 1994). Estos agregados, que durante mucho tiempo han sido obviados por los investigadores, parecen ser claves en la formación de ácumulos de nutrientes inorgánicos así como en la encapsulación de restos orgánicos (Miller & Jastrow, 1992a y b; Bethlenfalvay, 1992). Bethlenfalvay y colaboradores (1984) encontraron que dichos agregados poseían así mismo la capacidad de meteorizar partículas de mica del suelo, incrementando de esta manera la capacidad del suelo para retener agua y proporcionar nutrientes a los microsimbiontes asociados. Por otro lado, se sabe que el micelio aumenta la superficie de contacto de las raíces con las partículas de suelo, así como disminuyendo la resistencia al flujo de agua lo que es de vital importancia en suelos con alta resistencia a la conductividad hídrica como es el caso de los suelos de ecosistemas áridos o semi-áridos (Miller & Jastrow, 1992a).

A pesar de que la ateración del suelo conlleva otros efectos asociados, distintos de la ruptura de la red de micelio, tales como rotura de la estructura del

suelo, alteración de la capacidad de retención de agua, redistribución de nutrientes y materia orgánica a través del horizonte superficial del suelo, McLellan et al. (1995) encuentran que son principalmente las plantas micorrícicas las afectadas por los procesos de erosión, señalando que tales efectos sean secundarios respecto a la ruptura de la red de micelio externo. Sin embargo, como hemos visto, tales otros efectos se hallan en gran medida condicionados por la extensión y ramificación de la red de micelio que conforma, en parte, la estructura del suelo. Por tanto, parece que más bien se trata de la suma e interacción de un conjunto de factores que finalmente llevan a la pérdida de fertilidad del suelo y de su capacidad para ser autosostenible.

### **3.2.1. BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO**

#### **Fijación Biológica de Nitrógeno**

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es el gas más abundante en la atmósfera terrestre (aproximadamente 80%), pero debido a su carácter inerte, no es útil per se como fuente de nitrógeno para el desarrollo de la vida en la tierra ya que las plantas sólo son capaces de asimilar amonio o nitrato. Junto a este limitante, el alto coste de los abonos nitrogenados y la baja eficiencia de estos, pues la mitad del nitrógeno aplicado en estas formas se pierde por desnitrificación, volatilización o lixiviación, hacen que el N sea uno de los principales nutrientes

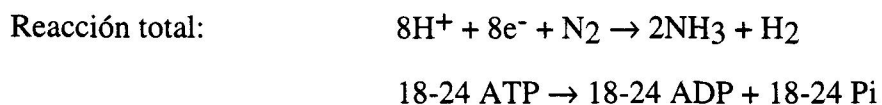
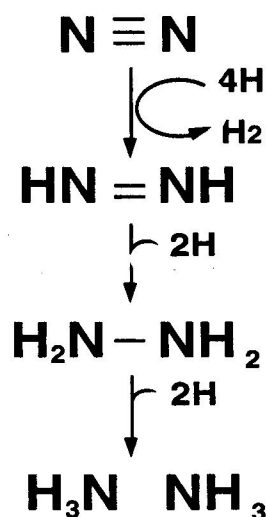
## 42 *Introducción*

limitantes, junto con el agua y el P, para el desarrollo de las plantas, en especial en zonas áridas o semi-áridas (Alexander, 1984).

Existen, sin embargo, un conjunto de microorganismos procariotas denominados diazotrofos capaces de fijar el dinitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado a través del denominado proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Se sabe que más del 50% del nitrógeno atmosférico fijado anualmente, estimado en 170 millones de toneladas, procede de la FBN. Los microorganismos encargados del proceso pueden pertenecer a dos categorías: microorganismos **fijadores de vida libre**, asimbióticos, entre los que se encuentran bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*; o microorganismos **fijadores simbióticos**, con cuatro géneros reconocidos (Moore & Moore, 1992): *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* que se asocian con plantas leguminosas (Familia Fabaceae). El actinomicete *Frankia* es un caso especial. Esta bacteria filamentososa forma simbiosis con hasta ocho familias de plantas diferentes muchas de las cuales no presentan relaciones evolutivas entre sí, lo que indica que el proceso de nodulación en la simbiosis con *Frankia* podría ser un fenómeno más generalizado que el proceso altamente específico de la simbiosis Rhizobiaceae-leguminosa (Brock & Madigan, 1991). Muchas de las especies que forman simbiosis con *Frankia* tienen interés de tipo forestal, así como en la recuperación de terrenos erosionados, tal es el caso de *Alnus* y *Casuarina* (Cervantes y Rodríguez-Barrueco, 1992).



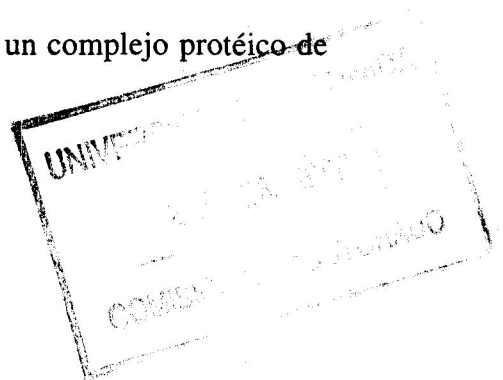
El proceso de fijación biológica de nitrógeno, en el que el  $N_2$  se reduce hasta amonio, está catalizado por el enzima Nitrogenasa formada por dos componentes proteícos (I y II) denominados dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. Ambos componentes contienen hierro y la dinitrogenasa contiene también molibdeno. Debido a la alta estabilidad del enlace triple entre los dos átomos de nitrógeno, el proceso de rotura del enlace requiere una gran cantidad de energía. Seis electrones han de ser transferidos para reducir el  $N_2$  a  $2NH_3$ . El proceso es altamente reductor por lo que el enzima es altamente sensible al oxígeno, inactivándose de forma irreversible. Por ello la FBN transcurre a tensiones de oxígeno muy bajas obtenidas mediante la aparición de diversos sistemas protectores (Gallon, 1981). El proceso de FBN es un proceso muy caro energéticamente hablando (21 mol de ATP por mol de  $N_2$  como media) por lo que se halla finamente regulado en todos los sistemas diazotróficos donde se ha descrito (Sanjuán y Olivares, 1992).



La FBN se inhibe cuando existe  $\text{O}_2$  en el medio o cuando la presencia de N fijado es alta (incluyendo las formas,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , así como algunos aminoácidos). La mayor parte de la regulación sobre la FBN tiene lugar a nivel transcripcional. Los genes para la Nitrogenasa forman parte de un complejo regulon llamado regulón *nif*. Además de los genes estructurales, existen un conjunto de genes que codifican para el cofactor Fe-Mo, para las proteínas transportadoras de electrones participantes, así como para un gran número de proteínas reguladoras (Figura 6). esquema del Brock y Madigan

La transcripción de los genes estructurales se activa por la proteína Nif A (regulación positiva) y se reprime por la Nif L (regulación negativa). La producción de amonio por la nitrogenasa no reprime la actividad del enzima porque este compuesto es rápidamente incorporado a la forma orgánica y usado en la biosíntesis. Sin embargo, cuando el amonio se halla en exceso la síntesis de nitrogenasa se reprime rápidamente evitando así un gasto inútil de ATP (Brock & Madigan, 1991). Además de la regulación de la síntesis de nitrogenasa a nivel transcripcional, se ha descrito en algunos organismos fijadores una regulación post-transduccional. Esta regulación conocida como el efecto *switch off-on* del amonio es un mecanismo reversible y más rápido que la regulación a nivel transcripcional. Cuando la presencia de amonio en el medio es alta, las bacterias que son capaces de llevar a cabo este tipo de regulación, realizan una modificación covalente sobre la dinitrogenasa reductasa, consistente en su ADP-ribosilación (unión de ADP-ribosa a un residuo específico de arginina). Este mecanismo de regulación no ha sido observado en *Rhizobium* cuando se halla en simbiosis en forma de bacteroide, aunque sí cuando crece en vida libre. Esto mismo ocurre en la cianobacteria *Anabaena*, indicando que debe existir un proceso por el cual el amonio en exceso es transportado al otro miembro de la simbiosis posiblemente gracias a la participación de factores hormonales suministrados por este último (Sanjuan & Olivares, 1991).

El enzima nitrogenasa ha sido purificada de un gran número de microorganismos y en todos los casos ha resultado ser un complejo protéico de



#### 46 *Introducción*

dos subunidades. Aunque el enzima no siempre contiene molibdeno. Alternativamente puede contener vanadio o incluso contener sólo hierro. Es muy interesante, como dentro de las molibdeno-nitrogenasas, la dinitrogenasa de un organismo funciona con la dinitrogenasa reductasa de otro, incluso si son de organismos no muy cercanos evolutivamente, tal es el caso de los organismos fototróficos y no-fototróficos, indicando que el enzima se halla muy conservado. Ello sugiere que los requerimientos para la fijación de nitrógeno son bastante específicos. De hecho sondas de ADN conteniendo genes de la fijación como nif H, D y K, se ha encontrado que hibridan con todas las bacterias fijadoras de nitrógeno, y no lo hacen con las que no lo son (Hopwood & Chater, 1989).

#### **Fisiología de la FBN en la familia Rhizobiaceae**

Los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* están formados por bacterias Gram negativas aerobias, heterótrofas, de forma bacilar. *Rhizobium* comprende a las bacterias de rápido crecimiento en medio YMA (Yeast Mannitol Agar) mientras que *Bradyrhizobium* son bacterias de lento crecimiento en dicho medio. El encuentro entre planta hospedadora y bacteria da lugar, tras el proceso de infección, a la formación de una estructura específica, el nódulo donde la bacteria se diferenciará a bacteroide y llevará a cabo la FBN. La bacteria se desarrolla inicialmente en la rizosfera de la planta al mismo tiempo que esta extiende el desarrollo de sus pelos radicales y promueve la excrección de sustancias tipo

flavonoide que actúan como quimioatrayentes para las bacterias e inducen los genes de la nodulación (nod) (Hirsch, 1992). Los exudados radicales promueven en la bacteria la formación de polisacáridos y lipopolisacáridos que favorecerán la unión de la bacteria a los pelos radicales de nueva formación aunque la manera de unión no está completamente esclarecida. Así, el papel inicial que se les atribuyó a las lectinas (glicoproteínas de la pared celular de la planta) como receptores de los lipopolisacáridos de la pared bacteriana esta hoy en duda, si bien parecen jugar un papel esencial en etapas posteriores de la nodulación. Mas bien parece que la unión inicial a la pared celular de la planta se debe a la interacción con una proteína de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  localizada en la superficie de la bacteria denominada ricaadhesina (Smit et al., 1992). Posteriormente la bacteria se une más firmemente a través de uniones a dichas lectinas y/o a fibrillas de celulosa de la pared vegetal. Parece ser que la unión a través de dichas fibrillas de celulosa no ocurre siempre pero podría tener importancia en condiciones de campo.

A continuación se producen en la planta cambios aparentes como la deformación y curvatura de los pelos radicales y la formación del llamado cordón de infección. Este cordón se forma con la hidrólisis localizada de de la pared celular de la planta en el ápice del pelo radical curvado (Bakhuzien, 1988). Tras la hidrólisis el núcleo de la célula del pelo radical migra hacia el sitio de infección para dar lugar a la síntesis de nuevo material de estructura semejante al de la pared celular (Kijne, 1992). El canal progresa hacia el interior del pelo radical cuando las bacterias se introducen en el interior por invaginación de la membrana

#### 48 *Introducción*

plásmatica. Las bacterias se multiplican en el interior de esta, quedando protegidas por una matriz mucopolisacáridica en cuya formación parecen tomar parte ambos simbioses.

Inducida por los factores de nodulación (Nod) las células del cortex radical comienzan a dividirse y diferenciarse para dar lugar al primordio nodular. Dependiendo si la división se origina en las células internas del cortex o en las externas se formarán nódulos de tipo indeterminado, característicos de leguminosas de climas templados, o nódulos de tipo determinado, de estructura globulosa, propios de leguminosas tropicales. Las bacterias a través del canal de infección llegan al primordio nodular donde mediante un proceso de endocitosis las bacterias quedan rodeadas por una membrana peribacteroidal que deriva del plasmalema de la célula vegetal (Roth et al., 1988). Por último, las células se diferenciarán a su forma pleiomórfica endosimbiótica de bacteroides que serán las encargadas de llevar a cabo la FBN.

La bacteria una vez diferenciada a bacteroide comienza el proceso de FBN. Sin embargo, como hemos visto anteriormente, dicho proceso requiere una gran cantidad de energía en forma de ATP así como de poder reductor. La planta suministra dicha energía en forma de sustratos carbonados procedentes de la fotosíntesis a la bacteria a través de la membrana peribacteroidal. Los sustratos carbonados de la fotosíntesis son así mismo la fuente de esqueletos carbonados necesarios para la formación de aminoácidos que transportarán el N fijado al

interior de la planta a través de dicha membrana. Esta membrana constituye, por tanto, el "órgano" de intercambio de nutrientes entre ambos simbioses. Udvardi & Kahn (1993) han sugerido que la membrana peribacteroidea funciona controlando el intercambio de metabolitos entre los simbioses dando idea de una asociación simbiótica bien regulada. La sacarosa es el principal nutriente carbonado que se transporta desde el floema desde el tallo hacia los nódulos, donde es hidrolizada y metabolizada en el citoplasma de las células vegetales del nódulo. La capacidad del bacteroide para utilizar los azúcares de forma directa parece limitada. Sin embargo, los ácidos carboxílicos están siendo cada vez más relacionados como la fuente de C y energía en el bacteroide al que pasan a través de un sistema de transporte activo. Kahn et al. (1985) sugieren que otros compuestos carbonados conteniendo nitrógeno, tales como los aminoácidos, puedan ser utilizados así mismo como fuente de C y energía para el bacteroide.

Sin embargo, de forma cada vez más evidente parece que el transporte a través de la membrana peribacteroidal no es tan simple como C hacia el bacteroide y N hacia el citoplasma vegetal, ya que existen múltiples evidencias de transporte de ciertos metabolitos carbonados hacia el citosol vegetal así como de formas nitrogenadas al interior del bacteroide (Streeter and Salminen, 1988; Kahn et al., 1988). A pesar de que en el citosol de las células del nódulo se encuentran una gran cantidad de compuestos carbonados disponibles para el bacteroide, estos son sólo capaces de oxidar determinados compuestos como ácidos orgánicos, alcoholes y aldehidos. Entre ellos son capaces de oxidar fumarato, succinato,

malato, piruvato, o glutamato, pero no oxidan o lo hacen en una cantidad muy pequeña glucosa, fructosa y sacarosa (Golvano et al., 1991).

### **Ecología de la FBN simbiótica**

Las poblaciones indígenas de rhizobia así como los rhizobia que nodulan plantas distintas a las leguminosas de interés agrícola han sido muy poco estudiados por lo que su papel en el ciclado de N es muy desconocido (Brockwell et al., 1995). A pesar de ello se sabe que la **magnitud y estado de una población** de rhizobia en un suelo natural depende de numerosos factores entre ellos la cantidad de materia orgánica, contenido en arcilla, pH del suelo, temperatura, estado de saturación de bases, media anual de precipitaciones, irradiación luminosa o presencia de leguminosas adecuadas y vigor de las mismas. Estos factores hacen que la población pueda oscilar entre valores de  $10-10^7$  ufc/g de suelo (Alexander, 1984; Bottomley, 1992). En climas templados el número de rhizobia disminuye con la llegada del invierno mientras que aumenta considerable en primavera con el desarrollo de las nuevas plántulas (Alexander, 1984). La ausencia de leguminosas no impide que una determinada población de rhizobia pueda mantenerse de forma saprofitica durante largos periodos de tiempo en el suelo. Sin embargo, sí se ha comprobado que la introducción de un hospedador específico hace variar enormemente el equilibrio entre las distintas densidades de población de biovares muy relacionados dentro de la misma especie. Tales cambios no se sabe con certeza si se deben a efectos rizosféricos específicos o a la



liberación de bacterias desde nódulos en senescencia. Estos efectos son mejor conocidos en *Rhizobium* spp. mientras que las especies de *Bradyrhizobium* han sido menos estudiadas en estos aspectos (Bottomley, 1992). A pesar del gran número de rhizobia existentes en la rizofera de las leguminosas, menos del 10 % de la raíz total está colonizada. El grado de susceptibilidad parece depender del tipo de planta y de sus exudados (Rovira et al., 1974).

Dentro de una población determinada de rhizobia no todas las bacterias son **viabiles y capaces de nodular**. Existen un grupo de ellas que están de forma inactiva, incapaces de llevar a cabo el proceso de infección. La magnitud de este grupo aumenta con la profundidad, y la causa de ello es posible que se deba a la inaccesibilidad a ciertos nutrientes o a estar expuestas a la presencia de depredadores como nematodos o protozoos (Alexander, 1984). Se han utilizado recientemente métodos de inmunofluorescencia para determinar magnitudes de población en rhizobia del suelo frente a métodos más clásicos de MPN. Sin embargo, debido a la falta de viabilidad de parte de la población existente en el suelo, estos métodos suelen sobreestimar el número de rhizobia viabiles existentes, ya que las propiedades antigénicas de estas bacterias inviables no se ve alterada.

A pesar del gran beneficio que la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas en un suelo carente de ellas puede reportar a las leguminosas, el mayor obstáculo encontrado para la expansión de *Brady/Rhizobium* como inóculo comercial se debe a su pobre persistencia en el

## 52 Introducción

suelo y a la pérdida de efectividad en subsiguientes cosechas (Bottomley, 1992; Giller & Cadisch, 1995). De hecho en muchas ocasiones los inoculantes de rhizobia para un suelo resultan ineficaces por su incapacidad para sobrevivir y crecer en el suelo donde se inoculan, o de colonizar las raíces y formar nódulos (Alexander, 1984). Existen además un conjunto de especies ya bien establecidas en los suelos, que suelen ser de baja efectividad, y que sin embargo, son difícilmente desplazables por otras de nueva introducción más eficaces en la FBN (Kamiker & Brill, 1986; Pauu, 1989). Tal es el caso del serogrupo USDA 123 de *Bradyrhizobium japonicum*, de eficiencia simbiótica inferior a otros serogrupos estudiados que son, sin embargo, incapaces de desplazar al 123 de los nódulos de plantas de soja inoculadas con las otras cepas más eficientes en la FBN (Brockwell et al., 1995). Streeter et al. (1991) atribuyen esta capacidad de no ser desplazado por otros serogrupos a la producción de polisacáridos nodulares que le confieren a la cepa una mayor persistencia y por tanto la capacidad de dominar numéricamente a largo plazo. Este tipo de polisacáridos parecen ser comunes entre serotipos que dominan en los nódulos en formación en condiciones de campo (Streeter et al., 1993; 1994).

Es interesante destacar que los nódulos pueden estar co-ocupados por distintas razas de rhizobia (Demezas & Bottomley, 1986; May & Bohlool, 1983; Vincent, 1988; Thies et al., 1992), lo que puede afectar a la efectividad de los rhizobium inoculados, puesto que se ha observado que en muchas ocasiones la raza efectiva cohabita con razas indígenas de menor efectividad. En cuanto a la

competencia por la nodulación se ha observado en condiciones de suelo estéril que cuando la diferencia de **efectividad** entre razas no es extrema, se ha observado que el éxito en la nodulación (**infectividad**) por parte de un rhizobia determinado es directamente proporcional al número relativo de individuos de ese tipo existente entre la población total de rhizobia del suelo. Este hecho es totalmente diferente en condiciones de suelo no estéril ya que se ha demostrado que infectividad es una característica totalmente independiente de la efectividad (Bottomley, 1992) y puesto que, además, las condiciones ambientales junto al tipo de planta hospedadora son factores determinantes para decidir qué razas de rhizobia pueden llegar a dominar en la ocupación de nuevos nódulos (Thies et al., 1992). Una estrategia interesante a la hora de buscar un inóculo de rhizobia determinado para un sistema suelo-planta determinado es la elección de una raza competitiva dentro de las nativas de dicho suelo y que posea así mismo una buena capacidad de fijación de nitrógeno. De esta manera los problemas inherentes a la adaptabilidad y competitividad de la raza una vez liberada en el suelo se verían minimizados (Bottomley, 1992). La preexposición de plántulas a un determinado rhizobia modifica así mismo los patrones de competencia entre cepas por lo que esta es así mismo una estrategia de manejo a la hora de obtener plantas noduladas en campo con el rhizobia apropiado (Kosslak and Bohlool, 1984; Kosslak et al., 1983; Sargent et al., 1987).

El tipo de suelo se ha descrito como un factor que afecta a la capacidad competitiva de las distintas especies de *Rhizobium* (May and Bohlool, 1989;

#### 54 Introducción

Moawad and Bohlool, 1984; Somasegaran et al., 1988), mientras que en experimentos semejantes no pareció afectar a la de *Bradyrhizobium japonicum* (George et al., 1987). Se sabe que una gran parte (aprox. 90%) de los rhizobia de un suelo se hallan íntimamente ligados a las partículas del suelo (Ozawa & Yamaguichi, 1986). Existen suelos donde los rhizobia se ven especialmente desfavorecidos. Así, suelos con tendencia a la sequía o con alta capacidad de fijación de P son inadecuados para el mantenimiento de una población de rhizobia apropiada. Así por ejemplo, George et al. (1995) han descrito cómo la FBN está seriamente limitada en suelos tropicales debido a la deficiencia en P de los mismos.

Debido a los grandes requerimientos de P de las leguminosas para llevar a cabo la FBN (Singleton et al., 1985; Israel, 1987) la falta de P disponible en determinados suelos (como los tropicales o como los semiáridos del SE español y en general los de zonas desertizadas) puede significar un elemento crucial a la hora de determinar el estado de la población de rhizobia de un suelo. La concentración de fosfato en la solución del suelo suele oscilar entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  M, llegando a disminuir de  $10^{-8}$  M en suelos tropicales o en la rizosfera de la planta (Wild, 1988). Es importante destacar que cada rizobia tiene una determinada capacidad para captar P, y que por ejemplo *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* difieren enormemente en la eficiencia del uso del P aunque ambos requieren al menos entre  $5 \cdot 10^{-8}$  M de P (Cassman et al., 1981; Beck and Munns, 1985). Por tanto la deficiencia en P en la rizosfera de las plantas es un

hecho, que se incrementa en condiciones de suelos ácidos (Graham, 1992) o en ecosistemas con un elevado desequilibrio de nutrientes, tales como los de zonas áridas. En general, la deficiencia de P es un factor que comunmente limita el potencial de la FBN (Giller and Cadisch, 1995) y parte de las ventajas competitivas de los rhizobia indígenas de suelos áridos parece que podrían deberse a una mejor capacidad en el uso del P (Almendras and Bottomley, 1987). El P es esencial tanto para la nodulación como para FBN. Es interesante observar que el contenido en P del nódulo es muy superior al existente en raíces o parte aérea, pudiendose afirmar que la FBN y la actividad específica del nódulo están directamente relacionadas con la disponibilidad de P (Graham and Rosas, 1979; Jakobsen, 1985). No es extraño pues, que la adición de fósforo a un suelo altere el equilibrio entre las poblaciones indígenas de rhizobia determinando así que unas sean dominantes sobre otras para una cantidad de fosforo disponible (Almendras and Bottomley, 1987) o que el proceso de transformación en bacteroide se vea afectado (Almendras and Bottomely, 1988).

En cuanto a la influencia de la FBN en los procesos de sucesión, existen evidencias de que la tasa de FBN y sucesión en ecosistemas semi-áridos está íntimamente relacionada, y de que dicha tasa incrementa cuando el ecosistema se halla próximo al estado climácico (Waughman et al., 1981). Es interesante destacar, cómo a pesar de lo que cabría esperar, la competición de plantas fijadoras con otras no fijadoras no reduce la magnitud de la FBN sino que la incrementa cuando las condiciones de N disponible en suelo no son limitantes.

## 56 *Introducción*

---

Este hecho es debido a que la captación de N del suelo por parte de las plantas no fijadoras reduce el pool de N disponible evitando así la inhibición de la FBN por presencia de nitrato. Este hecho ha sido aprovechado extensivamente en los llamados sistemas de "intercropping" o de "alleycropping" en los que plantas no fijadoras como el maíz se crecen en presencia de una leguminosa como la soja dando lugar a espectaculares aumentos de la biomasa de ambas plantas. En condiciones en las que las plantas compiten por los recursos, el "intercropping" deprime, sin embargo, el crecimiento de la leguminosa (Brockwell et al., 1995).

### **FBN y aridez**

Los ambientes desérticos y semidesérticos, caracterizados por una alta irradiación solar, a menudo poseen una **temperatura** terrestre superior hasta en 15 °C a la del aire lo que conlleva grandes pérdidas de agua por evaporación y la formación de costras superficiales. En estos ambientes inhóspitos la fijación de N<sub>2</sub> en vida libre es muy difícil, debido a estar limitada a los periodos de tiempo en que las condiciones de humedad y temperatura, así como de C disponible sean las más adecuadas. En estos suelos la mayor parte de la FBN tiene lugar por parte de bacterias simbióticas asociadas a leguminosas arbustivas perennes de zonas áridas (Skujins, 1984; Waughman et al., 1981). Para la mayoría de los rhizobia la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 28 y 30 °C, sin embargo, existen excepciones tanto por arriba como por abajo, llegando en casos extremos a haberse descrito crecimientos de rhizobia a 45-47 °C en el laboratorio (Karanja &

Wood, 1988) y hasta 40 °C en las savanas del Sahel (Graham, 1992; Eaglesham and Ayanaba, 1984). Se han descrito diversas adaptaciones a las altas temperaturas aunque la mayoría de las cepas resistentes pierden su capacidad infectiva con las altas temperaturas, efecto que se atribuye a la curación de plásmidos (Karanja and Wood, 1988). La elevada temperatura del suelo es un factor de estrés importante que afecta al tamaño de la población. En suelos tropicales se han descrito temperaturas de entre 40 y 60 °C en la superficie del suelo de hasta 40 °C que se han correlacionado con disminuciones inmediatas en la población rizobiacea (Alexander, 1984), siendo de destacar los efectos letales del calor húmedo (Somasegaran et al., 1984). Además de los efectos perjudiciales de las altas temperaturas sobre la propia planta como la disminución de la formación de pelos radicales (Munevar & Wollum, 1981), estas afectan a la unión de las bacterias a los pelos radicales, a la diferenciación en bacteroide, a la estructura del nódulo, a la formación de leghemoglobina y al funcionamiento de la simbiosis (Graham, 1992). Este autor afirma así mismo, que en condiciones de elevadas temperaturas, una inoculación más masiva de lo habitual puede ser requerida para obtener efectos de nodulación similares a los obtenidos con inóculos menos concentrados en suelos a temperaturas más bajas.

Temperatura y humedad se hallan muy relacionadas. Sin embargo, es la **sequía el estrés principal** que afecta a los rhizobia. La deficiencia de agua tiene un efecto intenso sobre la FBN porque la iniciación de la nodulación, crecimiento del nódulo y actividad de este son más sensibles al estrés hídrico de lo que lo son,

en general, el metabolismo de la raíz o de la parte aérea (Brockwell et al., 1995). Cuando el suelo pierde humedad al llegar la estación seca, la población de rhizobia decrece, de forma acusada inicialmente, y más paulatinamente después (Alexander, 1984). Se ha visto que la presencia de materia orgánica o de determinados elementos minerales en el suelo, como la montmorillonita, afectan de manera importante a estos descensos relacionados con la pérdida de agua del suelo, reduciendo la tasa de mortalidad de la población de rhizobia (Marshall, 1964). Cuando la época de lluvias retorna y las semillas comienzan a germinar el número de rhizobia comienza a incrementar de nuevo de forma rápida en la rizosfera (Alexander, 1984), aunque se ha visto también que si el periodo de lluvia es corto y no da tiempo a que se forme la infección de las nuevas plántulas la población de rhizobia decrece drásticamente de nuevo.

El estrés producido por la falta de agua se manifiesta sobre el proceso de FBN de diversas maneras. Por un lado respecto a la formación de nódulos se ha descrito que los nódulos de leguminosas de zonas semi-áridas como *Prosopis* spp. no se suelen encontrar cerca de la superficie del suelo (Skujins, 1984) sino como se describió en el desierto de Sonora, a profundidades de 4 y 6 m cerca del nivel freático (Virginia et al., 1986). Este mismo hecho se ha descrito, pero menos exacerbado, para plantas de alfalfa crecidas en las zonas desérticas de California, donde en los 5 cm más superficiales existen muy pocos nódulos mientras que están, sin embargo, profusamente noduladas en profundidad (Munns et al., 1977). Dupuy & Dreyfus (1992) encuentran extensas poblaciones de *Bradyrhizobium* a



profundidades de 30 y 35 m bajo la rizosfera de árboles de *Fhaiderbia*, una leguminosa de zonas áridas de Africa que forma "islas de fertilidad" en zonas desérticas, y es probable que los nódulos de esta planta se formen cerca del nivel freático donde las raíces llegan en busca de agua. Por otro lado, Graham & Rosas (1978) describen como plantaciones con una amplia cobertura vegetal poseen más nódulos en superficie que otras más ralas. Se ha observado que como mecanismo compensador a la disminución en la FBN por sequía, la producción de nódulos puede verse incrementada (Fyson & Sprent, 1982; Yousef & Sprent, 1983). No obstante, la falta de agua ralentiza los procesos fisiológicos y metabólicos normales tanto del nódulo como de la planta, por lo que el desarrollo normal del nódulo y su actividad se ven mermados (Engin & Sprent, 1973; Gallacher and Sprent, 1978; Albrecht et al., 1984); este proceso se ve agravando al disminuir así mismo la tasa fotosintética de la planta. Los nódulos de plantas perennes han demostrado, sin embargo, ser resistentes a periodos largos de sequía, manteniendo su actividad al mínimo y volviendo a normalizarla cuando el agua esta disponible. Plantas arbustivas perennes características de ecosistemas semi-áridos pueden fijar nitrógeno durante todo el año gracias a sus extensos y profundos sistemas radicales que les permiten captar agua en periodos de máxima sequía (Sprent, 1986). Así, la FBN se ha descrito a profundidades inferiores a 2,7 m en ecosistemas semi-áridos (Felker & Clark, 1982).

Un aspecto muy relacionado con la falta de agua y que produce efectos similares es la **salinidad**. La salinidad afecta disminuyendo la FBN como se ha

visto mediante medidas de reducción de acetileno (Yousef and Sprent, 1983). Así mismo, el desarrollo de los nódulos se ve limitado al producirse procesos de inhibición mitótica, de aceleración de la senescencia y inhibiciones de la diferenciación a bacteroide (Sprent and Zahran, 1988). El estrés osmótico producido tanto por salinidad como por desecación provocan respuestas fisiológicas parecidas en los rhizobia. Se ha detectado la acumulación intracelular de glutamato, que sin embargo algunos autores consideran como poco significativa para ser capaz de influir en la regulación osmótica (Botsford and Lewis, 1990). Se ha observado así mismo, un incremento en la concentración de ión K y se especula con la idea de que al igual que ocurre en otras bacterias como *E. coli*, la acumulación de glutamato potásico sea una señal que desencadene una respuesta secundaria ante el estrés como podría ser la acumulación de glicina betaina o trehalosa (Tombras-Smith et al., 1988; Elsheikhand & Wood, 1990; Graham, 1992).

mm

Por otro lado se ha comprobado que el género *Bradyrhizobium* es más resistente a condiciones ambientales de sequía más duras que las que son capaces de soportar especies del género *Rhizobium*. (Woomer et al., 1988). Uno de los mecanismos sugeridos ha sido que *Bradyrhizobium* spp. entra en dormancia (células viables pero no cultivables) más fácilmente debido a ser capaz de reducir su contenido hídrico interno en condiciones de baja humedad en el suelo (Bushby & Marschall, 1977). Sin embargo, este es un punto muy controvertido (Bottomley,

1992) y otros estudios, incluyendo ambos géneros, indican la participación de mecanismos más complejos (Brockwell et al., 1995).

Como hemos visto, en regiones áridas y semiáridas la supervivencia de los rhizobia a largos periodos de calor y sequedad es un handicap que limita el establecimiento de las leguminosas en suelos pertenecientes a estas regiones. De nuevo, este hecho representa un problema al buscar inoculantes para plantas de estas regiones puesto que razas seleccionadas por su eficacia fijadora en condiciones de invernadero pueden no estar bien adaptadas al medio y por tanto ser finalmente ineficaces en el proceso de FBN. Las bacterias ineficaces compiten con las eficaces por la ocupación del nódulo con igual fuerza. Por ello la raza a seleccionar debería obtenerse del mismo área donde va a utilizarse o de zonas con semejantes características edafoclimáticas (Olivares et al., 1988).

### **III. *Objetivos del Estudio***

De acuerdo con lo expuesto en la introducción se proyectó un programa de trabajo con el objetivo de estudiar el papel de los microorganismos (hongos de la micorriza arbuscular, rhizobia y rizobacterias) en la recuperación de la cubierta vegetal de zonas erosionadas de ecosistemas mediterráneos. Los objetivos generales planteados fueron los siguientes:

1. *Elección de una parcela experimental representativa de un ecosistema semi-árido mediterráneo. Descripción de la misma*
2. *Determinación del potencial microbiano natural del ecosistema.*
3. *Aislamiento de microorganismos de interés. Procesos de selección y caracterización.*
4. *Inoculación cruzada de microorganismos de interés: Compatibilidad funcional y selección para uso en campo.*
5. *Ensayos de campo en unidades piloto seleccionadas y evolución temporal.*
6. *Desarrollo de metodologías de caracterización y seguimiento de los microorganismos inoculados.*

*Elección y descripción de la parcela experimental  
representativa de un ecosistema semi-árido  
mediterráneo*

***Elección y descripción de la parcela experimental  
representativa de un ecosistema semi-árido  
mediterráneo***

La Cordillera Bética, producto de una gran serie de cabalgamientos que dieron como resultado estructuras de tipo alpino con cuatro complejos tectónicos principales: Nevado-Filábride, Ballabona-Cuacharón, Alpujárride y Maláguide, tiene en su extremo oriental una serie de alineaciones montañosas de dirección general E-W, separadas por cuencas sedimentarias. Entre las alineaciones montañosas se encuentran la Sierra de los Filabres (2168 m) bordeada por dos sistemas montañosos, la Sierra de las Estancias por el norte, y las sierras de Gador, Alhamilla y Cabrera por el sur. Hacia el norte de la sierra de los Filabres se sitúa la depresión de la cuenca del río Almanzora, mientras que hacia el norte se encuentran dispersas una serie de cuencas, Canjayar, Tabernas, Sorbas y Vera. Las cuencas de Canjayar y Tabernas se hallan drenadas por el río Andarax mientras que las de Sorbas y Vera lo son por el río Aguas (ICONA, 1987; Costa et al., 1991). Geológicamente esta región puede considerarse de actividad tectónica reciente con levantamientos en el Mioceno y compresiones posteriores en el Plioceno que conformaron la estructura emergente de la región que a su vez determinó la de la vegetación que se desarrolló en el Cuaternario. En la zona de contacto entre la sierra de Filabres y de la Alhamilla con el extremo oriental de la cuenca de Tabernas son característicos los llamados abanicos aluviales. La mayoría de estos sufre una degradación por acarcavamiento en la cabecera y una

agradación distal, por lo que los materiales que forman el abanico experimentan una relocación en el mismo. Se eligió uno de estos abanicos situado en el paraje denominado Rambla Honda por ser característico y representativo de una zona de erosión natural en un ecosistema semi-árido mediterráneo y que además ha sufrido el abandono de la vida rural tradicional con el consiguiente deterioro de la cubierta arable (ver localización en el mapa). El suelo de la zona esta desarrollado sobre micaesquistos con variable proporción de cuarcita. El clima es semi-árido con 230 mm de precipitación y 18 °C de temperatura media anual. La zona piloto se sitúa en una ladera entre 650 y 800 m de altitud en el sector inferior de la cuenca. Desde la divisoria de la ladera pueden encontrarse tres zonas fundamentales: la superior, compuesta por micaesquistos, cubierta mayoritariamente por *Stipa tenacissima*; una zona intermedia en la pendiente formada por abanicos aluviales antiguamente labrados y actualmente colonizados por islas de vegetación compuestas principalmente por *Anthyllis cytisoides*; y la zona distal del abanico, abandonada recientemente como zona cultivable, con ejemplares aislados de *Retama sphaerocarpa* rodeados por un pastizal mezquino, frecuentemente utilizado como pasto para el ganado, en el que destaca la grámnea *Stipa capensis*.

Otras plantas situadas en el pez de degradación elegido son ejemplares de *Artemisia herba alba*, que alternan en la zona dominada por *Anthyllis cytisoides*, y algunos ejemplares de *Thymelaea hirsuta*. La vegetación climácica correspondiente a la altura en la que se situó la zona piloto correspondería a un

