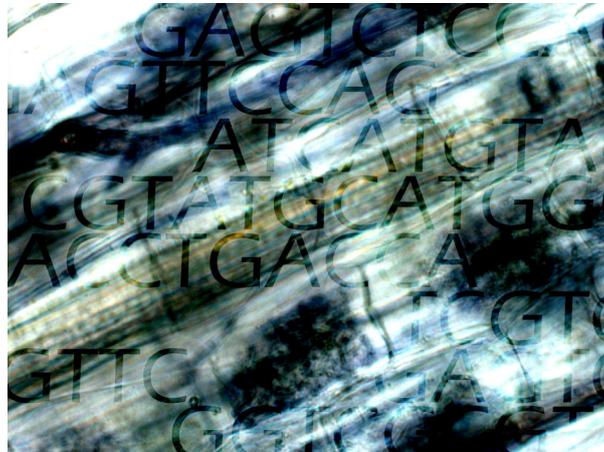




**Análisis de la estructura y diversidad de las
comunidades de hongos formadores de
micorrizas arbusculares asociados a plantas
de especial interés ecológico en ambientes
mediterráneos**



Iván Sánchez Castro

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Iván Sánchez Castro
D.L.: GR. 3085-2009
ISBN: 978-84-692-5110-2

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Fisiología Vegetal

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN
Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos



**Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades
de hongos formadores de micorrizas arbusculares
asociados a plantas de especial interés ecológico en
ambientes mediterráneos**

Tesis Doctoral

Iván Sánchez Castro

Granada, 2009

Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos

**Memoria que presenta el Licenciado
Iván Sánchez Castro
para optar al grado de Doctor.**

Fdo.: Iván Sánchez Castro

**Vº Bº
Directores del trabajo**

**Fdo.: José-Miguel Barea Navarro
Profesor de Investigación del CSIC**

**Fdo.: Nuria Ferrol González
Investigador Científico del CSIC**

El trabajo experimental de investigación que se expone en la presente Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada), gracias a una beca predoctoral concedida por la Junta de Andalucía y al proyecto de investigación “Análisis de la estructura y diversidad funcional de las comunidades de hongos micorrícicos asociados a plantas de especial interés ecológico en el parque Natural "Sierra de Baza" (Granada) y su aplicación, en interacción con la industria viverística, para la revegetación de zonas degradadas” (CICyT–Plan Nacional - REN2003-00968/GLO).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en diversos Congresos Internacionales, publicados como Capítulo en Libro o están en proceso de publicación en Revistas SCI.

Congresos:

Sánchez-Castro, I., Ferrol, N., Barea, J.M. (2005). AM fungal diversity analysis in a Mediterranean ecosystem. En curso COST: *Sampling and evaluation strategies for AMF diversity characterization*. Lisboa (Portugal)

Sánchez-Castro, I., Ferrol, N., Barea, J.M. (2006). Analysis of the AM fungi colonizing the roots of representative shrubland species in a desertification-threatened Mediterranean ecosystem. En: *5th International Conference on Mycorrhiza "Mycorrhiza for Science and Society"*. Granada (España)

Sánchez-Castro, I., Ferrol, N., Barea, J.M (2007). Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of plant species of singular ecological value from Natural Park of Sierra de Baza (Granada, Spain). En: *International Conference "Rhizosphere 2"*. Montpellier (Francia)

Sánchez-Castro, I., Barea, J.M., Ferrol, N. (2008) Analyzing the community composition of AM fungi colonizing the roots of representative shrubland species in a desertification-threatened Mediterranean ecosystem. En: *International Conference "Plant-Microbial Interactions"*. Cracovia (Polonia)

Capítulos de libro:

Barea, J. M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro, C., Azcón, R., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. (2007). Significado, diversidad e impacto de los hongos de las micorrizas arbusculares en ambientes mediterráneos En: *Biodiversidad y Conservación de Fauna y Flora en Ambientes Mediterráneos*. (J. M. Barea-Azcón, R. Travesí, M. Moleón, E. Ballesteros, J. M. Luzón, J. M. Tierno Eds.) Sociedad Granatense de Historia Natural. Granada, España, pp. 155-185.

Publicaciones:

Sánchez-Castro, I., Barea, J.M. & Ferrol, N. (2009) Analyzing the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the roots of representative shrubland species of singular ecological value in a Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza*. Trámite final de aceptación.

Sánchez-Castro, I., Ferrol, N. & Barea, J.M. (2009) Temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots of representative shrubland species in a Mediterranean ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*. Enviado.

Sánchez-Castro, I., Barea, J.M. & Ferrol, N. (2009) Differences in taxa composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities associated to *Rosmarinus officinalis* and *Thymus zygis*. En preparación.



A mis padres

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	XXI
1. NATURALEZA, INTERÉS Y FINALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN ..	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo general	26
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	27
3.1. Micorrizas.....	28
3.1.1. Conceptos generales: tipos de micorrizas, distribución y significado en el ecosistema.....	28
3.1.2. Micorrizas arbusculares (MA): características generales.....	30
3.1.3. Formación de las MA: tipos de propágulos	33
3.2. Hongos MA	35
3.2.1. Evolución y ecología	35
3.2.2. Clasificación y filogenia: Diversidad taxonómica vs. diversidad genética	37
3.2.3. Análisis de la diversidad de hongos MA.....	40
3.2.3.1. Métodos basados en criterios de tipo morfológico.....	40
3.2.3.2. Métodos basados en aproximaciones moleculares	41
3.2.3.3. Estudios de diversidad molecular de hongos MA en raíces y suelo..	45
3.3. Ecosistemas mediterráneos: Parque Natural “ <i>Sierra de Baza</i> ”	46
3.3.1. Características generales de los ecosistemas mediterráneos	46
3.3.2. Problemática de los ecosistemas mediterráneos y estrategias de restauración.....	47
3.3.3. Parque Natural “ <i>Sierra de Baza</i> ”: comunidades vegetales de interés.....	49
3.3.4. Estudios previos sobre el análisis de la diversidad de hongos MA en ecosistemas mediterráneos	52
II. PLAN Y ESTRATEGIAS DE TRABAJO	53

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
1. MATERIAL BIOLÓGICO	59
1.1. Especies vegetales	59
1.1.1. Descripción de las especies y su hábitat.....	59
1.1.1.1. Geografía, orografía y topografía	59
1.1.1.2. Clima	60
1.1.1.3. Vegetación.....	60
1.1.2. Toma de muestras en campo	62
1.2. Ensayos de mesocosmos.....	63
1.2.1. Diseño experimental.....	63
1.2.1.1. Sustrato de crecimiento	63
1.2.1.2. Obtención y cultivo de las plantas.....	64
1.2.2. Toma de muestras.....	64
2. DETERMINACIONES Y METODOLOGÍAS	65
2.1. Determinaciones de la formación y desarrollo de la micorrización.....	65
2.1.1. Porcentaje de micorrización	65
2.1.2. Longitud de micelio micorrícico	66
2.1.3. Extracción y caracterización de morfotipos de esporas de hongos MA... 67	
2.2. Métodos basados en técnicas de biología molecular	68
2.2.1. Extracción de ADN genómico.....	68
2.2.1.1. De material vegetal.....	68
2.2.1.2. De suelo	68
2.2.2. Cuantificación de ADN genómico	68
2.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	69
2.2.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	70
2.2.5. Purificación de productos de PCR.....	70
2.2.5.1. Recuperación de los fragmentos de ADN de los geles de agarosa.... 70	
2.2.5.2. Purificación de los productos de PCR en solución.....	71
2.2.6. Clonación de productos de PCR.....	71
2.2.6.1. Ligación y transformación.....	71
2.2.6.2. Selección y escrutinio de clones positivos	71
2.2.7. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante técnicas tipo <i>fingerprinting</i>	72

2.2.7.1. Electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE)	72
2.2.7.2. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) ...	73
2.2.7.3. Polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP)	74
2.2.7.4. Tinción de los geles de poliacrilamida	76
2.2.7.5. Análisis de los geles de poliacrilamida.....	76
2.2.7.6. Recuperación y reamplificación de los fragmentos de ADN de los geles de poliacrilamida	77
2.2.8. Secuenciación de ADN.....	77
3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	78
3.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas.....	78
3.2. Comparación de secuencias.....	78
3.3. Análisis filogenético	79
3.4. Definición de filotipos	79
4. DETERMINACIONES DE BIODIVERSIDAD	79
4.1. Curvas de rarefacción	79
4.2. Índices de diversidad	80
4.2.1. Riqueza de especies (S).....	80
4.2.2. Densidad específica (Di)	80
4.2.3. Equidad de Shannon-Wiener (H')	80
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	81
5.1. Análisis de varianza.....	81
5.2. Análisis factorial.....	81
5.3. Análisis de conglomerados.....	81
5.4. Análisis de correlación	82
IV. RESULTADOS	83
1. OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE HONGOS MA	85
1.1. Análisis de la especificidad de los oligonucleótidos NS31/AM1.....	85

1.2. Evaluación del potencial de diferentes técnicas de <i>fingerprinting</i> para el análisis molecular de la diversidad de hongos MA	86
1.2.1. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante TTGE	87
1.2.2. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante DGGE	88
1.2.3. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante SSCP	90
1.3. Análisis de diversidad de hongos MA mediante construcción y análisis de genotecas	92
1.4. Metodología seleccionada para el análisis molecular de la diversidad de hongos MA	96
2. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DE HONGOS MA PRESENTE EN LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS SELECCIONADAS	97
2.1. Colonización micorrícica	97
2.2. Amplificación del ADN por PCR y clonación de los amplicones generados .	97
2.3. Análisis de las genotecas y secuenciación de los clones seleccionados	98
2.4. Análisis de las secuencias nucleotídicas	101
2.4.1. Comparación con las secuencias presentes en la base de datos	101
2.4.2. Análisis de la homología entre las secuencias de hongos MA obtenidas	103
2.4.3. Análisis filogenético de las secuencias de hongos MA obtenidas	103
2.4.4. Definición y análisis de filotipos	106
2.5. Análisis de la diversidad de hongos MA presentes en las raíces	107
2.5.1. Equidad y riqueza específica de filotipos	108
2.5.2. Abundancia relativa de filotipos	108
2.6. Análisis comparativo de la influencia de la planta sobre las comunidades de hongos MA	109
3. DINÁMICA TEMPORAL DE LA COMUNIDAD DE HONGOS MA QUE COLONIZAN LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS SELECCIONADAS	111
3.1. Filotipos de hongos MA presentes en las raíces	112
3.1.1. Construcción y análisis de genotecas	112
3.1.2. Definición de filotipos	114
3.2. Análisis de la estructura de las comunidades y dinámica temporal de los hongos MA	117
3.2.1. Índices de equidad y riqueza específica	118
3.2.2. Abundancia relativa: influencia de la planta	118

3.2.3. Abundancia absoluta: dinámica temporal.....	119
3.2.4. Correlaciones entre filotipos.....	120
3.3. Influencia de las variables planta y tiempo sobre las comunidades de hongos MA.....	123
4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES DE HONGOS MA PRESENTES EN LA RAÍZ Y EN EL SUELO MICORRIZOSFÉRICO ASOCIADO	126
4.1. Determinaciones de tipo morfológico: desarrollos micorrícicos y diversidad de hongos MA	126
4.1.1. Determinaciones en raíz: grado de micorrización	126
4.1.2. Determinaciones en suelo: propágulos MA.....	128
4.1.2.1. Longitud de micelio MA	128
4.1.2.2. Abundancia de esporas MA y riqueza de morfotipos.....	128
4.2. Determinaciones basadas en métodos moleculares	131
4.2.1. Amplificación del ADN por PCR, clonación y análisis de las genotecas	131
4.2.2. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas, definición de filotipos y curvas de rarefacción.....	132
4.3. Análisis comparativo de las comunidades de hongos MA detectadas en suelo y raíz	137
4.3.1. Índices de diversidad y abundancia relativa	137
4.3.2. Relaciones entre desarrollo y diversidad de hongos MA	140
4.4. Análisis comparativo de las comunidades de hongos MA identificadas por métodos morfológicos y moleculares	142
4.5. Análisis comparativo de las comunidades de hongos MA detectadas en los ensayos de campo y mesocosmos.....	142
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	145
VI. CONCLUSIONES.....	165
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	169

I. INTRODUCCIÓN

1. NATURALEZA, INTERÉS Y FINALIDAD DE LA INVESTIGACIÓN

La importancia y singularidad ecológica de los ecosistemas mediterráneos adquieren especial relevancia en España donde el “bosque mediterráneo” gobierna gran parte del territorio, principalmente en el Sudeste Ibérico. A pesar de su relativa estabilidad en ausencia de perturbaciones, los ecosistemas mediterráneos se caracterizan por una gran fragilidad y baja resiliencia, es decir, una limitada capacidad de responder a las alteraciones del sistema. Esto se debe fundamentalmente a condicionantes climáticos, tales como una marcada estacionalidad, con alternancia de períodos en los que coinciden temperaturas elevadas y xericidad, con otros más fríos con una pluviosidad normalmente errática y a veces torrencial. Además, los ecosistemas mediterráneos se desarrollan en una orografía y un sustrato litológico característicos que actúan como coadyuvantes de procesos de degradación del suelo y de su cubierta vegetal.

Es un hecho contrastado que el funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas terrestres depende en gran medida de la diversidad y composición de especies de su cubierta vegetal. Sin embargo, los mecanismos ecológicos que regulan y mantienen en el tiempo la diversidad de especies vegetales característica de un ecosistema se conocen sólo de forma fragmentaria. Hoy se acepta que la diversidad y actividad de la microbiota del suelo es la base de uno de los mecanismos que más contribuyen a la conservación del suelo, al desarrollo y mantenimiento de la cubierta vegetal y por ende, a la estabilidad y funcionamiento del ecosistema.

Dado que en las últimas décadas el estudio de las interacciones de plantas y microorganismos ha recibido una especial atención por parte de los investigadores, hoy día se dispone de abundante información que permite sustentar la anterior aseveración. Concretamente, se sabe que los ciclos biogeoquímicos que ocurren en la naturaleza son propulsados por microorganismos, los cuales protagonizan, además, diversas acciones que producen beneficios a las plantas con las que se asocian. Así se conoce que los microorganismos facilitan la captación de nutrientes por parte de la planta, producen fitohormonas que favorecen el enraizamiento, protegen a la planta del impacto negativo de los estreses ambientales, descomponen sustancias tóxicas en el ecosistema y mejoran la estructura del suelo. Particularmente, un componente clave de la microbiota del suelo, como son los hongos formadores de micorrizas, se postulan como uno de los factores más influyentes en el mantenimiento de la variabilidad, estabilidad, diversidad y productividad de la cubierta vegetal. Aunque ello es generalmente aceptado, aún faltan estudios que permitan generalizar tal conclusión. Sin duda, los ecosistemas mediterráneos y las peculiares especies de plantas que en ellos se desarrollan ofrecen un modelo de interés prioritario para desarrollar investigaciones y estudiar el impacto de las asociaciones micorrícicas en el mantenimiento y desarrollo de dichos ecosistemas.

Como es bien conocido, las micorrizas, simbiosis hongo-raíz omnipresente en todos los biomas y ecosistemas terrestres desde hace más de 400 millones de años, son fundamentales para que las plantas adquieran nutrientes minerales y agua del suelo, particularmente en condiciones limitantes, así como una mayor resistencia a los estreses ambientales. Más del 80% de las especies de plantas existentes en el Planeta, entre ellas las arbustivas y sub-arbustivas, además de herbáceas, propias de ecosistemas mediterráneos, forman las llamadas “endomicorrizas arbusculares”, las **MA**, acrónimo por el que se les reconoce. En contraste con los demás tipos de micorrizas, los hongos formadores de MA (hongos MA) son microscópicos. El establecimiento de la micorriza no sólo resulta ventajoso para la planta y el hongo, sino que también favorece al ecosistema en su conjunto, ya que, como se esbozó anteriormente, mejora la calidad del suelo así como el desarrollo, la diversidad y la productividad de la cubierta vegetal.

Se ha demostrado que la mayoría de las plantas dependen de estar micorrizadas para establecerse y prosperar. Por ello, el conservar y/o promover el estado micorrícico (diversidad y disponibilidad de hongos micorrícicos) de un ecosistema es clave para propiciar el establecimiento y desarrollo de los trasplantes en programas de revegetación de ecosistemas degradados, o de reintroducción de especies que tienden a desaparecer de su hábitat natural. En este contexto surge la necesidad de proponer investigaciones que permitan desarrollar y evaluar una estrategia basada en la prospección y aplicación de las MA orientada a la conservación de ecosistemas mediterráneos degradados. Para lograr tal fin, y en lo que atañe a prospección, el primer paso lógico es investigar la diversidad de hongos MA asociados a las plantas objeto de estudio.

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

La existencia de distintos grados de compatibilidad funcional en la simbiosis MA tiene una connotación clara sobre la función que pueden presentar los diversos hongos MA como factores influyentes de la composición florística de los diferentes ecosistemas. En este sentido, algunos autores han encontrado que diferentes especies de hongos MA podrían ser potenciales determinantes de la estructura de la comunidad vegetal, dado el distinto nivel de dependencia de las diferentes especies de plantas a los distintos hongos MA presentes.

Tradicionalmente los estudios de diversidad de hongos MA en comunidades naturales se han basado en la identificación y cuantificación de las esporas. Sin embargo, en la actualidad se acepta que los estudios de diversidad basados en criterios morfológicos poseen algunas limitaciones técnicas para caracterizar este tipo de hongos. Los polimorfismos genéticos encontrados en esporas no diferenciables morfológicamente, la existencia de estacionalidad en el proceso de esporulación y

principalmente la dificultad para identificar mediante criterios morfológicos los hongos MA que están colonizando las raíces son las principales razones para plantearse otras opciones en los estudios de diversidad de los hongos MA. Surgió así la necesidad del desarrollo de herramientas moleculares para poder caracterizar, con ciertas garantías, a hongos MA, particularmente a los que están colonizando los sistemas radicales de las plantas. Aunque estas técnicas moleculares también poseen sus limitaciones, en la actualidad, son la mejor herramienta disponible para incrementar el conocimiento de la ecología de estos hongos como base para establecer más claramente el papel que juegan en el sistema suelo-planta.

En el contexto de los aspectos conceptuales antes expuestos se diseñó esta Tesis Doctoral, la cual se integra en un proyecto de investigación encuadrado en el Programa de Recursos Naturales y Conservación de la Biodiversidad (Biología de Organismos y Sistemas) del Plan Nacional de I+D+i. El objetivo general de dicho proyecto era analizar la diversidad de ecosimbiontes (plantas y hongos micorrícicos de la sucesión natural) en comunidades vegetales bien conservadas del Parque Natural “Sierra de Baza” (ecosistema mediterráneo modelo), como base de un programa de revegetación orientado a restaurar, de forma racional y sostenible, la diversidad y abundancia de especies autóctonas, incluyendo endémicas, y sus micorrizas, así como la calidad del suelo, en zonas en las que dichas comunidades están degradadas. Esta Tesis Doctoral pretende resolver algunas propuestas de dicho proyecto, mediante experimentos orientados a alcanzar los objetivos que se exponen a continuación.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar, mediante el uso de técnicas moleculares, la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en comunidades de romeral-tomillar bien conservadas del Parque Natural Sierra de Baza (Granada).

2.2. Objetivos específicos

Para la consecución de este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la diversidad de los hongos MA que están colonizando las raíces de las plantas objeto de estudio crecidas en condiciones naturales, así como la posible especificidad hongo-planta hospedadora, mediante análisis molecular de su diversidad genética basado en metodologías *ad hoc*, previamente adaptadas y/o implementadas específicamente para estos fines
2. Estudiar la dinámica temporal, en condiciones naturales, de las poblaciones de hongos MA que colonizan las raíces de las plantas más representativas de la comunidad estudiada: *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus zygis* (tomillo).
3. Efectuar, en condiciones controladas, un análisis comparativo de las comunidades de hongos MA presentes en raíz y en el suelo micorrizosférico natural asociado, en función de la edad de la planta y de la especie vegetal.

Como se esbozó anteriormente, aunque los objetivos propuestos pretenden avanzar en el conocimiento de la ecología de los hongos MA en ecosistemas mediterráneos, la investigación que sustenta esta Tesis Doctoral presenta también un marcado carácter orientado. En efecto, el conocer la diversidad de tipos de propágulos MA y de su diferente estrategia y dinámica de colonización es fundamental para decidir la composición y estructura de los inoculantes de hongos MA en los cuales debe estar representada la máxima diversidad genética y funcional posible para maximizar así su eficacia en programas de revegetación y/o recuperación de suelos degradados.

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La información disponible se va a analizar sistematizada en tres apartados principales: (i) micorrizas, (ii) hongos MA y (iii) ecosistemas mediterráneos: Parque Natural “*Sierra de Baza*”:

3.1. Micorrizas

3.1.1. Conceptos generales: tipos de micorrizas, distribución y significado en el ecosistema

El término *micorriza* (del griego *mikos*, hongo, y *rhiza*, raíz) fue utilizado por vez primera en 1885 por Frank para hacer referencia a determinadas asociaciones existentes entre algunos hongos del suelo y las raíces de las plantas. Sin embargo, no sería hasta mediados del pasado siglo cuando se empezara a poner de manifiesto la importancia y el significado de estas asociaciones, así como la universalidad de las mismas. Actualmente se estima que el 90% de las plantas que crecen sobre la Tierra están micorrizadas (Smith & Read, 2008). Tan sólo algunos taxones vegetales no presentan dicha asociación. Estos pertenecen a las familias *Cruciferae*, *Fumariaceae*, *Urticaceae*, *Poligonaceae* y *Quenopodiaceae* (Trappe, 1986).

Las micorrizas son una simbiosis, normalmente mutualista, de carácter biotrófico en la que el huésped autótrofo, la planta, proporciona compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis al simbionte heterótrofo, el hongo, así como un microhábitat protegido. A cambio el hongo corresponde al vegetal con el aporte de nutrientes minerales, principalmente fósforo, y agua, mediante un sistema ramificado de hifas extrarradicales capaz de explorar el suelo más allá de la zona de influencia de la raíz (Barea *et al.*, 1980).

El grado de interdependencia entre ambos simbioses es máximo, de modo que las plantas necesitan estar micorrizadas para alcanzar un desarrollo óptimo, e incluso para sobrevivir en situaciones extremas. El hongo, por su parte es bastante dependiente de la planta para completar su ciclo de vida, dependencia que es máxima en el caso de las micorrizas arbusculares, las más extendidas en la naturaleza como después se describe, en las que el hongo es un simbionte obligado que no puede completar su ciclo de vida en ausencia de una planta hospedadora (Bago & Becard, 2002). Esta asociación tan estrecha se puede comprender mejor si se tiene en cuenta que ambos tipos de

organismos han co-evolucionado desde hace 400 millones de años, según registros fósiles y estudios sobre filogenia y evolución (Redecker *et al.*, 2000).

En base a criterios morfológicos y fisiológicos, se han descrito cinco tipos de micorrizas, agrupados en tres modalidades tróficas (Smith & Read, 2008): endomicorrizas, ectomicorrizas y ectendomicorrizas.

a) **Endomicorrizas**: son las más extendidas en la naturaleza, en cuanto a especies y comunidades de plantas que las forman, cuya característica principal es que sus hifas intraradicales penetran en el interior de las células del córtex y/o epidermis de la raíz. Otra característica es que no forman manto de hifas que cubren las raíces. Dentro de este grupo se distinguen tres subgrupos:

a. *Ericoides*: características de las plantas de la familia de las Ericáceas y los hongos pueden pertenecer a los phylum Ascomycota o Basidiomycota. Los hongos presentan una gran versatilidad en cuanto al uso de fuentes de N y P (origen orgánico o inorgánico). Esta característica fúngica confiere parte de la capacidad a las plantas para crecer en suelos con un elevado contenido de materia orgánica (Pearson & Read, 1975; St-John *et al.*, 1985).

b. *Orquidioides*: son las que forman las plantas de la familia *Orquidiaceae* con hongos del phylum Basidiomycota. Como características morfológicas del hongo cabe resaltar que tras penetrar en las células de la raíz forman *ovillos* de hifas dentro de la célula hospedadora previa invaginación de la membrana plasmática, así como agregados poco organizados de hifas que liberan los nutrientes cuando degeneran (Smith, 1966).

c. *Arbusculares*: dado que la temática de este estudio se centra en este tipo de micorrizas, su estructura y función se tratan con mayor detalle en el apartado 3.1.2 de este Capítulo de Introducción.

b) **Ectomicorrizas**: se presentan en especies de plantas con interés forestal como Fagáceas, Betuláceas, Pináceas, entre otras familias, lo que supone el 3% de especies

vegetales micorrizables. Se caracterizan principalmente porque las hifas del hongo limitan su desarrollo a los espacios intercelulares del córtex, sin penetrar las células vegetales de la raíz, dando lugar a una estructura característica denominada red de Hartig (Smith & Read, 2008). La superficie de la raíz queda rodeada por un entramado denso de hifas que constituyen el denominado “manto”. Los hongos que forman este tipo de micorrizas pertenecen al phylum Basidiomycota, aunque también algunos están clasificados en el Ascomycota.

c) **Ectendomicorrizas:** presentan características comunes con los dos tipos de micorrizas expuestos anteriormente y son las menos extendidas. Con las ectomicorrizas tienen en común que pueden formar un “manto” más o menos desarrollado y la red de Hartig, y con las endomicorrizas, que existe penetración de las hifas en las células de la corteza formando enrollamientos u ovollos (Yu *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2003). Los hongos pertenecen al phylum Basidiomycota y las plantas son fundamentalmente arbutoides o monotropales.

3.1.2. Micorrizas arbusculares (MA): características generales

Las micorrizas arbusculares (MA) constituyen el tipo de simbiosis más ampliamente representado en la naturaleza. Se estima que está presente en el 80% de las plantas, principalmente Angiospermas, así como en Gimnospermas, Briofitas y Pteridofitas. Los hongos que las forman son microscópicos, en contraste con los demás hongos formadores de micorrizas. La principal característica morfológica de estos hongos son los *arbusculos*, estructuras típicas de la colonización que el hongo desarrolla en el interior de las células de la corteza de la raíz por ramificación dicotómica repetida de sus hifas.

Como se indicó anteriormente, los hongos MA y las plantas han evolucionado en una estrecha relación desde hace más de 400 millones de años. Quizá sea esta evolución conjunta la causa de una de las características principales de este tipo de hongos, su carácter de biotrofos obligados. Esto condiciona que el hongo tenga la necesidad de encontrar y colonizar una raíz hospedadora para poder continuar su crecimiento y

completar su ciclo de vida, que culmina con la formación de nuevos propágulos viables (Azcón-Aguilar *et al.*, 1991 y 1998; Bago *et al.*, 2000). Esta circunstancia es una de las principales limitantes del estudio de la biología de los hongos MA así como de los desarrollos biotecnológicos que permitan sus aplicaciones prácticas.

El hongo MA coloniza la raíz sin causarle perjuicio y desarrolla una red de micelio externo a la raíz, que conecta la planta con los microhábitats del suelo, y que es más eficaz que la propia raíz para extraer nutrientes y agua del mismo. Además, el desarrollo de la simbiosis induce cambios en la fisiología de la planta que la hacen más resistente a diferentes tipos de estreses ambientales (Smith & Read, 2008).

Las bases fundamentales sobre las que se establece la simbiosis MA son nutritivas. Como ya se indicó, la planta cede al hongo compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis, mientras que éste cede a la planta nutrientes minerales, especialmente aquellos menos asequibles para la misma, en virtud de la mayor accesibilidad del micelio externo del hongo a recursos del suelo más distantes de la capacidad de acceso del sistema radical (Barea *et al.*, 2008; Smith & Read, 2008; Ferrol & Pérez-Tienda, 2009). La actividad de las MA en la adquisición de nutrientes poco móviles es especial en el caso del fosfato, iones que se mueven muy lentamente por difusión en la solución del suelo hacia la superficie de la raíz. Sin embargo, cuando alcanzan la superficie de la raíz, ésta los capta muy rápidamente, por lo que se produce una zona de agotamiento en fosfato alrededor de la raíz. A la muy baja movilidad de los fosfatos se une la tendencia de estos iones a formar complejos insolubles asociándose a la mayoría de cationes del suelo o a ser absorbidos por los coloides del suelo (Barea *et al.*, 2007b). Las hifas fúngicas son energéticamente más rentables que las raíces por su menor grosor, a la vez que son más efectivas para alcanzar zonas de difícil acceso para las raíces por su mayor tamaño. Además de fósforo, se ha demostrado que los hongos MA tienen capacidad para absorber nitrógeno y otros nutrientes del suelo (Tobar *et al.*, 1994; Hodge *et al.*, 2001).

Aparte de estos efectos nutricionales de las MA, la planta recibe otros beneficios de la asociación. En resumen, y de acuerdo con la información recientemente revisada (Jeffries *et al.*, 2003; Ruíz-Lozano *et al.*, 2003; Lum & Hirsch, 2003; Rillig, 2004; van

der Heijden, 2004; Govindarajulu *et al.*, 2005; Barea *et al.*, 2005b y 2008; Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Smith & Read, 2008; González-Guerrero *et al.*, 2009), las MA realizan las importantes acciones en los sistemas suelo-planta: (i) mejoran el enraizamiento de las plantas (producción de fitohormonas), (ii) incrementan el suministro de nutrientes a las plantas, (iii) mejoran la estructura del suelo (formación de agregados hidroestables), (iv) protegen a la planta frente a estreses bióticos (patógenos) y abióticos (salinidad, sequía, estados de deficiencia o exceso en nutrientes, exceso de metales pesados, degradación del suelo), y (v) favorecen la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal (ya que cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos micorrícicos, por lo que la conservación de la diversidad de estos hongos, beneficia la diversidad y sucesión de las plantas).

Además de la relación obligada que establecen los hongos MA con sus plantas hospedadoras, interactúan con otros macro- y microorganismos del suelo, siendo de gran relevancia ecológica las interacciones en la llamada micorrizosfera con bacterias relacionadas con el ciclado de nutrientes (P, N), fitoestimulación, control biológico de patógenos o formación de agregados estables en el suelo (Johansson *et al.*, 2004; Barea *et al.*, 2005a y b).

Como se esbozó anteriormente, hoy se acepta que la diversidad de hongos MA es uno de los factores más influyentes en el mantenimiento de la estabilidad y diversidad de la cubierta vegetal (van der Heijden *et al.*, 1998; Hart & Klironomos, 2002; Maherli & Klironomos, 2007), así como en la recuperación de flora amenazada (Fuchs & Haselwandter, 2008). Es por todo esto que las MA resultan de gran importancia en ecosistemas naturales. Actualmente, se consideran claves en las estrategias destinadas a controlar la degradación de los ecosistemas puesto que juegan un papel crucial en las primeras etapas del establecimiento de las plantas, en especial en suelos afectados por procesos erosivos, incendios, laboreo excesivo, contaminación y sometidos a condiciones de estrés (sequía, salinidad, temperaturas elevadas, deficiencias nutricionales, etc.). Este es el caso que ocurre de manera especial en la revegetación con

especies autóctonas de ambientes mediterráneos, tal como se recoge en la revisión de Barea *et al.* (2007a).

3.1.3. Formación de las MA: tipos de propágulos

El primer aspecto a considerar es que una MA se compone de dos fases diferentes que se desarrollan en el suelo y en el interior de la planta, respectivamente.

El ciclo de vida de los hongos MA se inicia partiendo de los propágulos de estos hongos, que se mantienen en el suelo en forma de esporas, redes de micelio, o colonizando raíces activas o fragmentos de éstas que permanecen en el suelo. Estos son los propágulos capaces de iniciar la formación de una nueva micorriza. De hecho, el proceso de colonización micorrícica comienza con el contacto de la raíz con micelio procedente de las distintas formas de propágulos antes mencionadas. Los procesos que conducen a la formación de las MA, incluyendo sus determinantes genéticos, han sido revisados recientemente (Balestrini & Lanfranco, 2006; Giovannetti, 2008; Parniske, 2008), por lo que solo se describe aquí un resumen de algunos de los aspectos fundamentales de la información recogida en esas publicaciones.

Dado que las esporas de resistencia son la forma de conservación de los hongos MA en la naturaleza, en el sentido estricto del término, se puede decir que el ciclo de vida del hongo comienza con la germinación de dichas esporas presentes en el suelo, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables. Tras la emisión del tubo de germinación, el micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz hospedadora, donde forma entonces una estructura de precolonización llamada apresorio. A partir de esta estructura el hongo penetra la epidermis e inicia la colonización del tejido parenquimático de la raíz sin llegar a penetrar nunca en la endodermis ni en los tejidos vasculares y meristemáticos. En la capa interna de este tejido se empiezan a formar unas estructuras típicas que se denominan ovillos o “coils” que se forman mediante circunvoluciones de hifas intracelulares. A continuación, las hifas penetran en las células más internas del córtex de la raíz y se ramifican repetidamente en forma dicotómica para dar lugar a los arbusculos, los cuales presentan

Introducción

una vida media muy breve, aproximadamente de 7 a 10 días. La hifa ramificada se encuentra rodeada por la membrana plasmática de las células del parénquima cortical. A nivel de la interfase simbiótica que se desarrolla en las células corticales colonizadas por arbusculos, en la que las membranas plasmáticas de la planta y del hongo están separadas por una matriz interfacial, es donde mayoritariamente tiene lugar el intercambio de nutrientes. Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado de forma intra y/o intercelulares; presentan formas variadas según la especie (redondas, ovoides, alargadas...), suelen aparecer más tarde que los arbusculos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos. Ciertas especies de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no forman vesículas dentro de la raíz, pero en el micelio externo pueden producir células auxiliares. En la Figura 1 (Palenzuela & Barea, 2002) se esquematizan las distintas estructuras anatómicas de las MA dentro de la raíz:

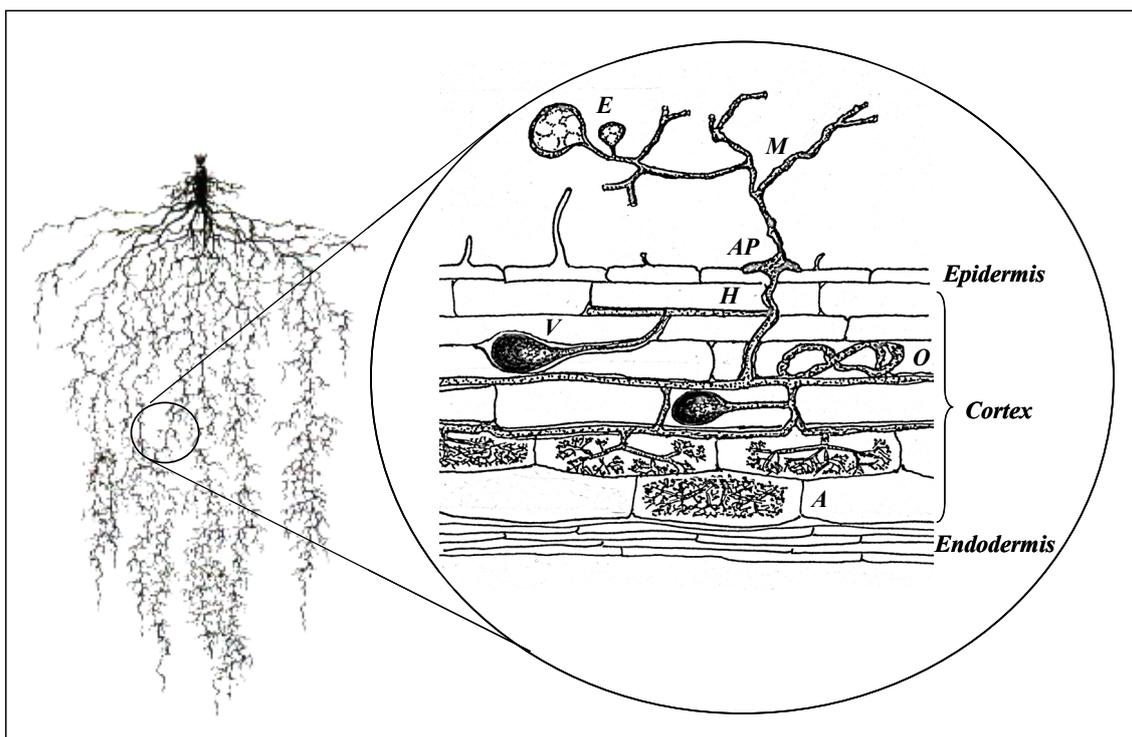


Figura 1. Anatomía de las micorrizas arbusculares. Abreviaturas: A, arbusculo; AP, apresorio; E, espora; H, hifa intercelular; M, micelio extrarradical; O, oviducto; V, vesícula. Tomado de Palenzuela & Barea, 2002.

Cuando la colonización interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces y, por tanto, su capacidad de captación de nutrientes (fósforo, zinc, cobre y amonio) y de agua. Además, el micelio extrarradical desempeña un papel clave en la estabilidad y mejora de las características físicas, químicas y biológicas del suelo (Barea *et al.*, 2005b). Concretamente, en diferentes estudios se ha mostrado la correlación existente entre el aumento de la concentración de hifas extrarradicales y la formación de agregados estables en el suelo (Tisdall *et al.*, 1997).

Las MA producen, normalmente, esporas a partir del micelio externo, y también en algunos casos, las forman en el interior de la raíz a partir del micelio interno, completando así el ciclo de vida de estos hongos. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en el suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedadora.

3.2. Hongos MA

3.2.1. Evolución y ecología

El origen de los hoy conocidos como hongos MA es muy antiguo, se remonta a la existencia de un ancestro que desarrolló una estrategia de reconocimiento y unas estructuras que posibilitaron la infección de organismos autótrofos (Tehler *et al.*, 2000). Estas características se consideran sinapomórficas para un grupo de hongos quitinosos que Tehler *et al.* (2003) llamaron *Symbiomycota*. Existen evidencias paleontológicas que apoyan la hipótesis de que estos hongos se desarrollaron en simbiosis con organismos fotoautótrofos bastante antes de que se produjera la evolución de las plantas terrestres (Yuan *et al.*, 2005).

En rizomas fósiles datados en el periodo Devónico, hace más de 400 millones de años, se han detectado arbuscúlos similares a los que pueden observarse en las micorrizas actuales (Remy *et al.*, 1994). Es más, existen referencias (Redecker *et al.*, 2000) en las que se describe la presencia de hifas y esporas “tipo Glomeromycota” datadas en unos 460 millones de años, lo que corresponde al periodo Ordovícico. Los datos obtenidos por aproximaciones moleculares incluso sugieren un origen bastante anterior para el phylum Glomeromycota, entre 600 millones de años (Berbee & Taylor, 2001) y 1000 millones de años (Heckman *et al.*, 2001). Parece ser que los hongos MA probablemente establecieron relaciones, quizás no mutualistas en un principio, con los ancestros de los primitivos briofitos, antecesores de las plantas vasculares, por lo que se infiere que estos hongos tuvieron una influencia decisiva en el origen y evolución de las plantas. Todo esto indica que esta simbiosis micorrícica surgió y evolucionó con anterioridad al establecimiento de las plantas en tierra firme y no como consecuencia de este hecho (Tehler *et al.*, 2003).

En la actualidad se cree que este grupo de hongos tan antiguo ha sido fundamental en el proceso de colonización terrestre por parte de las plantas (Pirozynski & Malloch, 1975; Simon *et al.*, 1993a; Schüssler, 2002). Los hongos pertenecientes al phylum Glomeromycota han podido jugar un papel clave en la capacidad para adquirir agua por parte de las primeras plantas terrestres, carentes de raíces en sus primeras etapas (Brundrett & Abbott, 2002). De acuerdo con lo que antecede, es probable que la mejora en la capacidad de acceso de las plantas a las fuentes limitantes de recursos, tales como el fósforo, haya sido la clave para el salto de las plantas a tierra firme (Helgason & Fitter, 2005).

Los hongos MA no poseen una reproducción sexual reconocida, producen esporas de resistencia que se forman sobre hifas vegetativas y son multinucleadas, aunque el número de núcleos es variable pudiendo llegar hasta 20.000 núcleos por espora (Ferrol *et al.*, 2004; Smith & Read, 2008).

3.2.2. Clasificación y filogenia: Diversidad taxonómica vs. diversidad genética

El phylum Glomeromycota (Figura 2) se estableció en 2001 como un grupo monofilético, independiente del phylum Zygomycota en el cual se había incluido previamente (Schüssler *et al.*, 2001). Diferentes estudios filogenéticos basados en técnicas moleculares colocan al phylum Glomeromycota al mismo nivel que Basidiomycota y Ascomycota (Tehler *et al.*, 2003; Lutzoni *et al.*, 2004; James *et al.*, 2006).

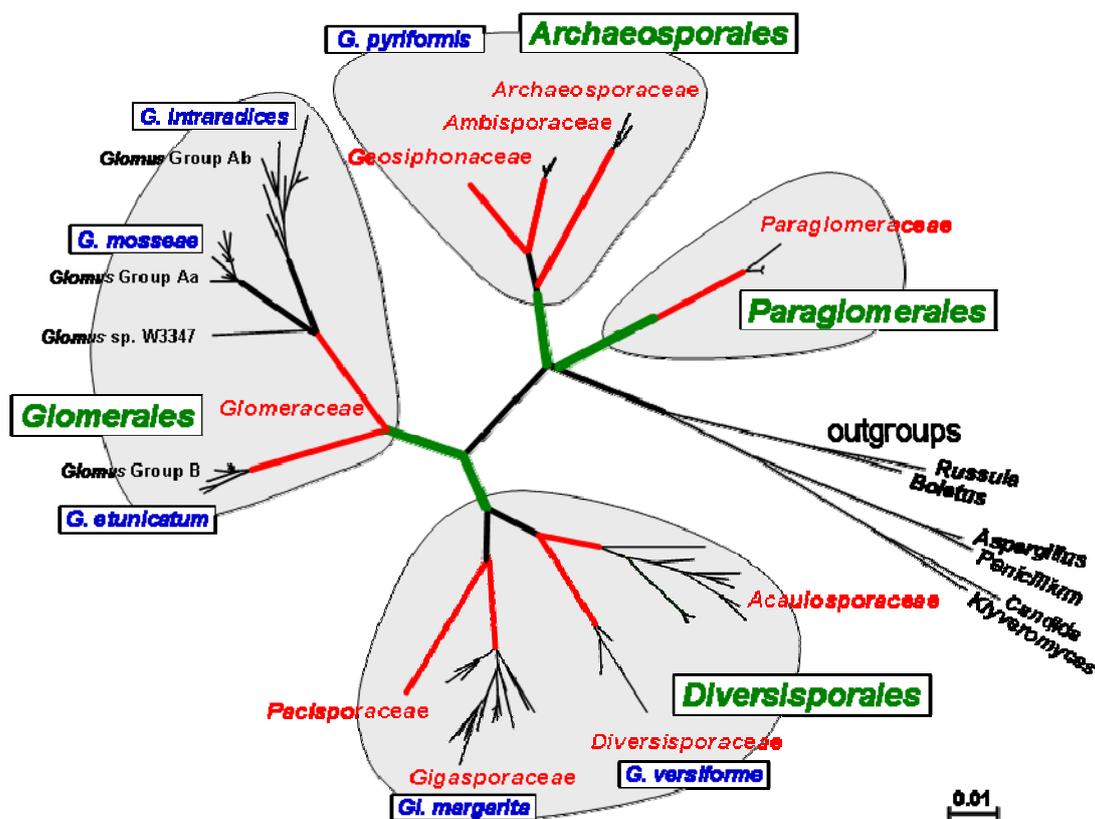


Figura 2. Relaciones filogenéticas en el phylum Glomeromycota basadas en las secuencias de la subunidad 18S ADNr. Basado en Walker & Schüssler, 2004 y actualizado con Walker *et al.*, 2007.

La taxonomía tradicional en el phylum Glomeromycota ha estado basada, principalmente, en la morfología y ontogenia de las esporas. Las estructuras intrarradicales del hongo, como los arbuscúlos y vesículas, son consideradas irrelevantes taxonómicamente. Alrededor de doscientas especies, agrupadas en once géneros (podrían ser hasta 19 géneros si se confirman los descritos recientemente), han sido descritas hasta hoy. La mayoría fueron descritas tras haberlas multiplicado y

aislado en cultivos “enriquecedores” por el sistema denominado de “plantas trampa”. En la actualidad, la aplicación de técnicas moleculares para la identificación de hongos MA en estudios de campo ha provocado la aparición de un gran número de secuencias de hongos MA que no habían sido descritos ni ubicados taxonómicamente con anterioridad.

Los estudios de filogenia más completos dentro del phylum Glomeromycota están basados en el gen 18S ADNr (Schüssler *et al.*, 2001). *Glomus* es el género que engloba más especies y durante mucho tiempo ha sido considerado como un grupo polifilético. En un principio, fueron distinguidos tres clados mayoritarios, *Glomus* grupo A, B y C (Schwarzott *et al.*, 2001). Uno de estos clados (*Glomus* grupo C) ha sido reubicado en la familia *Diversisporaceae* (Walker & Schüssler, 2004), que es monofilética con *Gigasporaceae* y *Acaulosporaceae*, pero no todas las especies que están incluidas en esta familia han sido renombradas y transferidas de *Glomus* a *Diversispora*. Los otros dos clados pertenecientes a *Glomus* (*Glomus* grupo A y B) no han sido renombrados como nuevas familias ya que sólo se han detectado diferencias significativas en estudios filogenéticos que tenían en cuenta un solo gen, pero que no estaban apoyadas suficientemente por aspectos morfológicos.

Una de las principales dificultades para realizar estudios de filogenia en los hongos MA es la carencia de una definición de “especie” aplicable a este tipo de microorganismos, ya que el concepto clásico de “especie biológica” no puede utilizarse en este caso, debido a la naturaleza asexual y carácter multinucleado de los miembros de este phylum (Morton & Benny, 1990; Walker, 1992). El análisis de la creciente información disponible de secuencias SSU ADNr sugiere que la clasificación y filogenia basada en la caracterización morfológica (Morton & Benny, 1990) deba ser complementada con la información obtenida a través de las secuencias correspondientes. De ello resulta un concepto de especie en el que habría que incluir una diversidad molecular correspondiente a cada una de las especies descritas morfológicamente. Esta diversidad molecular o genética que se encuentra en diferentes aislados de algunas especies definidas morfológicamente, puede corresponderse con una diversidad funcional, reflejada en el diferente comportamiento de estos aislados ante

condiciones variantes en un proceso de micorrización, como se detectó con el aislado WFVAM23 de *Glomus intraradices*. Este aislado es capaz de colonizar plantas mutantes de tomate que otros aislados de la misma especie no pudieron colonizar (Gao *et al.*, 2001; Poulsen *et al.*, 2005). Por tanto, para poder interpretar los análisis de diversidad de los hongos MA surge la necesidad de utilizar un concepto que permita agrupar las secuencias asociadas a la diversidad molecular de los aislados de cada especie, obteniendo grupos de secuencias o filotipos, definidos según unos criterios previamente establecidos, acercándonos así al concepto clásico de “especie” lo que permitiría aplicar las herramientas habituales de análisis de diversidad (Redecker & Raab, 2006). La falta de unidad de criterios a la hora de definir estos grupos de secuencias es el principal inconveniente para comparar diferentes estudios de diversidad de hongos MA.

Para poder clasificar filogenéticamente, dentro de las familias y géneros correspondientes, a las “especies” de hongos MA que componen una comunidad micorrízica en un ambiente natural se requieren estudios de diversidad. Dada la complejidad del concepto “diversidad” y todo lo que abarca, se han definido diferentes niveles de diversidad que permiten aproximaciones distintas para analizar un sistema. Concretamente, el presente estudio se centra en los conceptos de diversidad taxonómica y diversidad genética:

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

Las medidas que representan la diversidad de especies pueden dividirse en tres categorías: 1) *índices de riqueza de especies*, que son esencialmente una medida del número de especies en una unidad de muestreo definida; 2) *modelos de abundancia de especies*, que describen la distribución de las poblaciones de acuerdo a distintos modelos establecidos (serie geométrica, logarítmica, normal logarítmica, modelo de

palo quebrado, etc.); y 3) *abundancia proporcional de especies*, que pretenden incluir la riqueza de especies y la uniformidad de su distribución en una expresión sencilla (Magurran, 1988).

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

Existe una gran cantidad de técnicas para establecer mediciones de biodiversidad a escala genética, como la variación morfológica de caracteres cuantitativos (Solbrig, 1991), el nivel de heterocigosidad, la proporción de *loci* polimórficos, el número de alelos por *locus* (Mallet, 1996; Martínez, 1997), las diferencias de las estructuras proteicas como reflejo de la variación genética (Solbrig, 1991), y diversas aproximaciones tendentes a medir el polimorfismo del ADN entre individuos de la misma especie, como son el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), o el polimorfismo ampliado aleatoriamente (RAP) (Solbrig, 1991; Hunter & Sulzer, 1996).

3.2.3. Análisis de la diversidad de hongos MA

3.2.3.1. Métodos basados en criterios de tipo morfológico

Los estudios de diversidad de comunidades naturales de hongos MA se han basado tradicionalmente en la identificación y cuantificación de esporas. La caracterización de estas esporas a nivel de especie, e incluso a nivel de género, no siempre es posible debido a la falta de criterios morfológicos que permitan diferenciar entre algunas especies (Redecker & Raab, 2006). Por otra parte, la esporulación es considerada un fenómeno estacional que está altamente relacionado con el estado fisiológico de los

hongos y con factores ambientales. Además, la producción de esporas no es homogénea en todos los taxones de hongos MA, ya que algunas especies pueden producir pocas esporas, e incluso hay taxones considerados “no esporulantes”, ya que no se ha evidenciado tal fenómeno en su ciclo de vida (Sanders, 2004). Ello impide correlacionar el estudio de las esporas presentes en las muestras analizadas con la diversidad real de hongos MA del sistema objeto de estudio (Morton *et al.*, 1995). Es obvio que las características de los hongos MA impiden llevar a cabo un análisis adecuado de la diversidad de los mismos mediante técnicas basadas en criterios morfológicos. Por ello, surge la necesidad de desarrollar herramientas moleculares para un estudio más completo de sus poblaciones en muestras de campo. Además, el uso de técnicas moleculares permite la detección de las poblaciones de hongos MA colonizadores de la raíz de las plantas, y por tanto, ofrece una visión más completa y realista de las comunidades de estos microorganismos presentes en el sistema suelo-planta a analizar. Estos estudios moleculares han sugerido la existencia de taxones no esporulantes, presentes, y a veces dominantes, en la comunidad intra-radical de hongos MA de las plantas (Helgason *et al.*, 1999; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Santos-González *et al.*, 2007), lo cual apoyaría aun más la necesidad de usar estas herramientas moleculares.

3.2.3.2. Métodos basados en aproximaciones moleculares

Se han utilizado diversos tipos de herramientas moleculares para el estudio de los hongos MA, casi todas basadas en la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). En este sentido, Bruns & Gardes (1993), establecieron los siguientes criterios de selección de la región ideal para realizar las amplificaciones de PCR: (i) estar presente en todos los hongos de interés, (ii) permitir una amplificación selectiva del ADN del hongo, cuando éste se encuentra junto con el de la planta, y, por último, (iii) ser lo suficientemente variable como para permitir diseñar sondas específicas para diferentes categorías taxonómicas. Los genes de ADN ribosómico (ADNr) cumplen estos criterios, por lo que han sido comúnmente utilizados en este tipo de estudios. Además, en el genoma, tanto de procariotas como de eucariotas, existen repetidas copias de genes ribosómicos, que están altamente conservados.

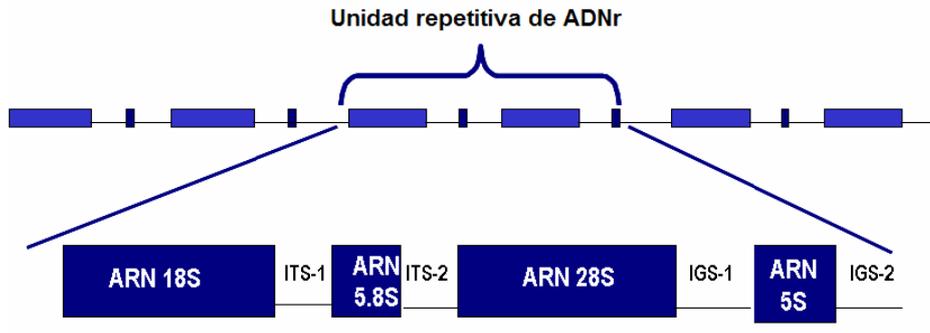


Figura 3. Estructura de los genes ribosómicos nucleares de eucariotas.

Dentro de estos genes, las regiones codificantes (18S, 5.8S y 28S) son las más conservadas, las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) muestran un cierto grado de variación, mientras que las regiones espaciadoras intergénicas (IGS) son las más variables (Figura 3) (Lanfranco *et al.*, 1998). Las secuencias de la subunidad pequeña del gen ribosómico (18S ADNr) evolucionan muy lentamente, por lo que son comúnmente usadas para estudiar la distancia evolutiva entre organismos relacionados (White *et al.*, 1990).

De acuerdo con lo que antecede, el primer paso para desarrollar estas herramientas moleculares orientadas al estudio de la diversidad de hongos MA en muestras naturales sería definir una región apropiada para el diseño de unos oligonucleótidos que permitan la amplificación selectiva de todas las secuencias de hongos MA presentes en las muestras analizadas. En este sentido, Simon *et al.* (1992a y b; 1993a y b), que fueron los primeros en aplicar técnicas de PCR al estudio de genes nucleares asociados a la subunidad 18S ADNr de los hongos MA, diseñaron el oligonucleótido “específico” de *Glomales* (actuales Glomeromicetos) VANS1 capaz de amplificar ADN fúngico en raíces. A partir de las primeras secuencias de hongos MA obtenidas con este oligonucleótido, se confirmó la clasificación por familias que se había elaborado previamente en base a estudios morfológicos. Posteriormente, fueron diseñados oligonucleótidos específicos para algunos géneros, VAGLO (*Glomus*), VAACAU (*Acaulospora*), VALETC (*G. etunicatum*) y VAGICA (*Gigaspora* y *Scutellospora*) que permitieron la secuenciación de hongos MA desconocidos hasta el momento, confirmando así el gran avance que estas técnicas suponían. Después de algunos años en los que se demostró que el oligonucleótido VANS1, a pesar del gran avance que supuso,

presentaba muchos problemas para amplificar algunos géneros de hongos MA, Helgason *et al.* (1998) diseñaron el oligonucleótido AM1 que amplificaba ADN de hongos MA, excluyendo el ADN de las plantas hospedadoras. Este oligonucleótido en combinación con el NS31, universal para eucariotas, amplifica una región del gen 18S ADNr de la mayoría de familias de hongos MA, excluyendo *Archaeosporaceae* y *Paraglomaceae*. Paralelamente, Redecker (2000) diseñó oligonucleótidos específicos para cada una de las familias de hongos MA.

El análisis de las relaciones entre diferentes especies de hongos MA se ha realizado en otros estudios mediante el análisis de la región ITS (Lloyd-MacGilp *et al.*, 1996; Redecker *et al.*, 1997; Renker *et al.*, 2005), utilizando oligonucleótidos universales como ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Esta región, menos conservada que la subunidad pequeña, no parece la más adecuada para el estudio de la diversidad de los hongos MA debido al alto grado de polimorfismo detectado en la composición nucleotídica entre esporas de hongos MA morfológicamente iguales e incluso dentro de una misma spora (Sanders, 1995). También, se han diseñado oligonucleótidos que amplifican específicamente una región de la subunidad ribosomal grande de distintos géneros de hongos MA (van Tuinen *et al.*, 1998; Trouvelot *et al.*, 1999; Gollote *et al.*, 2004), que funcionan tan sólo adecuadamente en un determinado rango de plantas hospedadoras (Cesaro *et al.*, 2008), ya que pueden amplificar el ADN de la raíz de algunas especies vegetales (Sánchez-Castro, en preparación).

En la literatura científica especializada se recogen continuamente publicaciones que describen los intentos de diseñar oligonucleótidos que amplifiquen todas las familias de hongos MA y que no presenten problema alguno de inespecificidad (Saito *et al.*, 2004; Wubet *et al.*, 2006). Hasta la fecha de inicio de esta Tesis Doctoral, no se habían conseguido unos oligonucleótidos que cumplieran totalmente con estos requisitos. No obstante, el oligonucleótido AM1 mencionado anteriormente es el que se ha utilizado mayoritariamente con éxito en la mayoría de estudios moleculares de diversidad de hongos MA en muy diversos tipos de ecosistemas (Helgason *et al.*, 1998; Whitfield *et al.*, 2004; Öpik *et al.*, 2008a; Sonjak *et al.*, 2009). Por último, mencionar que recientemente y, gracias a la existencia de un mayor número de secuencias de hongos

MA, se están diseñando nuevos oligonucleótidos que presentan mayor especificidad que el AM1 y que además amplifican todas las familias conocidas de hongos MA (Lee *et al.*, 2008, Krüger *et al.*, 2009).

Una vez amplificado específicamente el ADN de los hongos MA, se han aplicado numerosas técnicas moleculares, ya utilizadas previamente en estudios de diversidad de otros microorganismos. Entre estas técnicas se encuentran el RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*, análisis de polimorfismos en fragmentos de restricción) (Helgason *et al.*, 2002), SEAD (*Selective enrichment of amplified DNA*, enriquecimiento selectivo de ADN amplificado) (Clapp *et al.*, 1995, Redecker *et al.*, 2003) o la construcción y análisis de genotecas (Helgason *et al.*, 1998 y 1999; Ferrol *et al.*, 2004; Santos-González *et al.*, 2007; Hempel *et al.*, 2007; Öpik *et al.*, 2008a).

La irrupción en los últimos años de técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida, como la electroforesis con gradiente de temperatura (*temperature gradient gel electrophoresis*, TGGE; *temporal temperature gradient gel electrophoresis*, TTGE) (Cornejo *et al.*, 2004, Sonjak *et al.*, 2009), la electroforesis con gradientes desnaturizantes (*denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) (Santos-González *et al.*, 2006), polimorfismo del fragmento terminal de restricción (*Terminal restriction fragment length polymorphism*, T-RFLP) (Pietikainen *et al.*, 2007) o la técnica electroforética de polimorfismo de conformación de cadena simple (*single strand conformational polymorphism*, SSCP) (Stukenbrock & Rosendahl, 2005), ha supuesto un nuevo impulso en los estudios de diversidad microbiana y en la monitorización de las dinámicas poblacionales (Muyzer & Smalla, 1998; Muyzer, 1999). Estas herramientas permiten la caracterización de poblaciones en un gel de poliacrilamida, por la huella genética que generan debido a las variaciones en las secuencias contenidas en productos de PCR de ADN ribosómico. Estas variaciones producen cambios en las condiciones de desnaturización del ADN, con lo cual la movilidad de los diferentes fragmentos de ADN contenidos varía en el gel a medida que cambian las condiciones electroforéticas, produciéndose así la detención de la migración en distintos puntos del gel, de acuerdo a la composición nucleotídica de los fragmentos analizados.

3.2.3.3. Estudios de diversidad molecular de hongos MA en raíces y suelo

Desde que fuesen publicados los estudios anteriormente referenciados (Simon *et al.*, 1992a; Helgason *et al.*, 1998), ha incrementado rápidamente el número de estudios que utilizan técnicas moleculares para el análisis de la diversidad de hongos MA en raíces y suelo. Estos estudios de diversidad se han llevado a cabo en función de la planta hospedadora (Helgason *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002), de la época de muestreo (Helgason *et al.*, 1999; Daniell *et al.*, 2001), de los usos del suelo (Helgason *et al.*, 1998; Hijri *et al.*, 2006; Öpik *et al.*, 2006) y otros muchos aspectos.

Los datos de riqueza específica obtenidos en estos estudios indican una gran variabilidad en el número de taxones presentes en muestras de raíz, habiéndose encontrado valores de entre 1 y 20, según la especie vegetal analizada, el ecosistema en que ésta se encuentre, las condiciones ambientales dominantes en la zona y las características del suelo. Sin embargo, la conclusión general que se deriva de estos estudios es que existe un valor medio de 8-10 taxones en el sistema radical de una sola planta (Husband *et al.*, 2002; Öpik *et al.*, 2003 y 2006; Helgason *et al.*, 2007).

Conocer la composición de la comunidad de hongos MA presentes es también importante para poder interpretar la función de éstos en el sistema suelo-planta (van der Heijden *et al.*, 2006). Al igual que en el caso de la riqueza específica, se han descrito diferencias significativas en la composición de las comunidades de hongos MA entre diferentes plantas de un mismo ecosistema, en una misma planta a diferentes edades y condiciones ambientales, etc. (Helgason *et al.*, 1999; Daniell *et al.*, 2001; Santos-González *et al.*, 2007; Wolfe *et al.*, 2007). De especial interés son las diferencias observadas entre las comunidades de hongos MA detectadas en la raíz de una planta, su suelo rizosférico y las esporas presentes en este suelo, diferencias que podrían estar relacionadas con la función que cada una de estas diferentes comunidades tengan dentro del sistema suelo-planta (Hempel *et al.*, 2007). Incluso han llegado a encontrarse diferentes comunidades funcionales colonizando el sistema radical de una misma planta (Scheublin *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, una alta proporción de las secuencias detectadas en las muestras de raíz en la mayoría de estos estudios, resultaron ser secuencias desconocidas con respecto a las secuencias procedentes de esporas descritas morfológicamente con anterioridad (Öpik *et al.*, 2006), lo que sugiere que la diversidad de hongos MA descrita hasta el momento es sólo una pequeña parte de la diversidad real existente.

3.3. Ecosistemas mediterráneos: Parque Natural “Sierra de Baza”

3.3.1. Características generales de los ecosistemas mediterráneos

Los ecosistemas mediterráneos incluyen un importante número de comunidades bióticas que se desarrollan bajo la influencia del denominado *Clima Mediterráneo*. Éste está definido por la coincidencia de la estación cálida o verano, de al menos dos meses con la estación seca, lo que marca un carácter de aridez, en cuanto a la precipitación. En este sentido, se considera que un mes árido es aquel en el que la precipitación (en L/m²) es inferior al doble de la temperatura media mensual en grados centígrados ($P < 2T$) (Rivas-Martínez, 1976). También es una característica del clima mediterráneo la alternancia regular de dicha estación cálida y seca, con una estación fría y húmeda, con precipitaciones irregulares y esporádicas, pero frecuentemente torrenciales (López-Bermúdez & Albaladejo, 1990).

A pesar de denominarse clima mediterráneo debido a que su principal área de influencia abarca las regiones circundantes del mar Mediterráneo, es importante señalar que en el Planeta existen numerosas zonas que comparten las características de este clima. Entre estas zonas se encuentran la costa de California, Sudáfrica, el sudoeste de Australia y la zona central de Chile. Su ubicación geográfica se encuentra distribuida principalmente entre los 30 y 40° de latitud N y S, y principalmente en las costas oeste de los continentes.

Los ecosistemas de la región Mediterránea son muy variados, y su vegetación climática pueden ser bosques esclerófilos caducos, bosquetes espinosos, estepas

templadas o incluso semidesiertos helados, todos ellos adaptados a soportar un período de aridez de hasta nueve meses, incluyéndose en ombroclimas desde el árido inferior al hiperhúmedo (Rivas-Martínez, 1976). La vegetación Mediterránea desarrolla, principalmente, dos tipos de alternativas de adaptación xerófila, que son por una parte la presencia de estructuras aéreas persistentes (como en el caso de los matorrales) y por otro lado, la que expresa la vegetación de temporada, en el caso de las plantas terófitas, como por ejemplo los pastizales de especies anuales. Además, resulta interesante destacar que la biomasa aérea en estos ecosistemas es pequeña; no obstante, la relación de la biomasa subterránea respecto de la aérea es más alta que en otros ecosistemas (Montalvo, 1992). Otra característica importante de estos ecosistemas es su excepcional riqueza florística, la cual ha sido determinada por la conjunción de factores bióticos y ambientales, como son las variaciones climáticas y los cambios de las posiciones relativas de las grandes masas continentales (Blanca & Morales, 1991; López-González, 2001).

3.3.2. Problemática de los ecosistemas mediterráneos y estrategias de restauración

Por sus características geomorfológicas y climáticas, así como por la intervención humana, que en zonas concretas y en periodos históricos definidos ha sido decisiva, los procesos de degradación en los ecosistemas en el área mediterránea adquieren unas connotaciones especiales.

Es bien conocido que el equilibrio natural que rige la estabilidad de cualquier ecosistema puede ser perturbado por cambios en la actividad de agentes naturales (procesos climáticos, geomorfológicos o paleotectónicos, etc.). Consecuentemente, la estructura, morfología y la diversidad de especies de la vegetación potencial se degradan, proceso concomitante con un deterioro generalizado de las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo (López-Bermúdez & Albaladejo, 1990; Herrera *et al.*, 1993; Barea & Jeffries, 1995; Requena *et al.*, 1996; Barea & Olivares, 1998). Como se indicó anteriormente, las lluvias escasas e irregulares, con veranos secos y calurosos, junto con la presión antropogénica, ejercida en determinados e históricos periodos de

tiempo, son factores determinantes de la degradación de los ecosistemas mediterráneos, en general y de los semiáridos ibéricos, en particular.

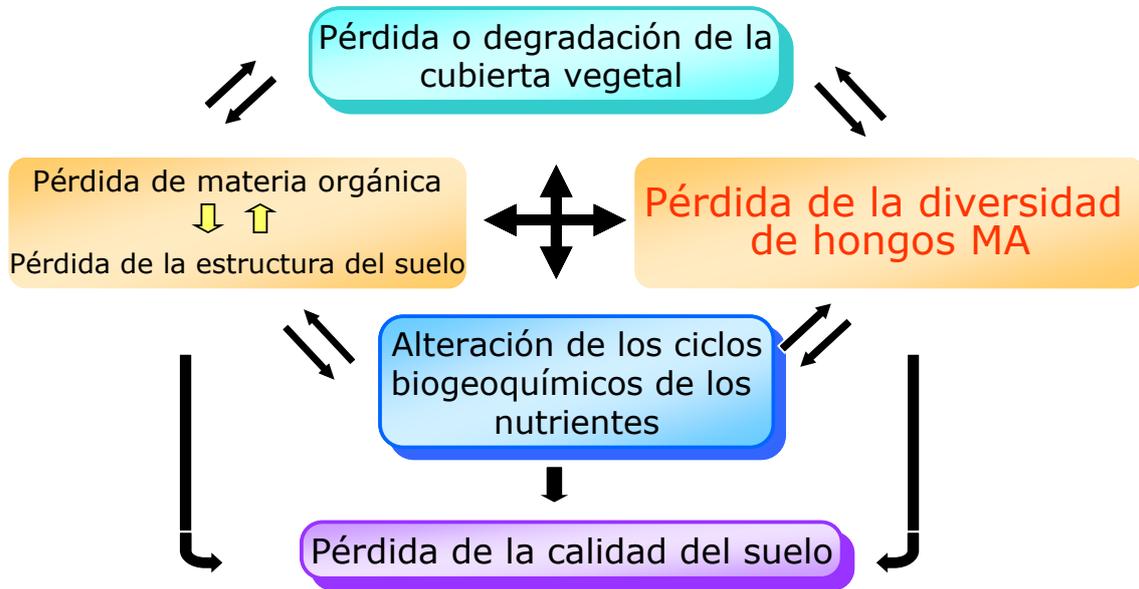


Figura 4. Proceso de degradación de los sistemas suelo-planta en ambientes mediterráneos.

En la Figura 4 se indica como esta degradación de la cubierta vegetal está directamente relacionada con la pérdida de materia orgánica y estructura del suelo, lo cual, junto con una degradación de la microbiota del suelo, provocaría una alteración de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes. La degradación de la cubierta tiene un especial impacto negativo entre los principales responsables de la pérdida de diversidad de hongos MA.

La vegetación potencial de la Cuenca Mediterránea estaría basada en el bosque esclerófilo de hoja perenne. Sin embargo, como consecuencia de procesos degradativos de diversa índole ha ocurrido un deterioro continuado del bosque mediterráneo. Una formación típica de estos bosques mediterráneos degradados es el matorral, muy comunes en las regiones áridas y semiáridas, que dependiendo de la planta predominante pueden ser tomillares, romerales, retamales, espinales, espartales, albadales, etc.

Entre las estrategias de revegetación más apropiadas para este tipo de ecosistemas están las basadas en el uso de especies arbustivas, subarbustivas y herbáceas. Los arbustos del matorral mediterráneo, con capacidad de enraizar profundamente, tienen un alto potencial en cuanto a la protección del suelo, pero precisamente son dichas especies las que han sufrido en mayor medida los procesos de degradación. Ello, en unión de ciertas limitaciones ecofisiológicas inherentes a su reproducción, hace que la recuperación natural de estas especies sea muy lenta. En general, es difícil pensar en una revegetación natural espontánea en áreas donde las precipitaciones anuales están por debajo de 350 mm.

Para desarrollar un programa de revegetación basado en principios ecológicos es necesario identificar los principales factores que limitan una instalación óptima de las plantas, entre estos el pobre estado de agregación, bajo contenido de materia orgánica y una actividad biológica muy deficiente. En este sentido, los microorganismos del suelo (hongos de la micorriza y rizobacterias, principalmente) desempeñan un papel fundamental tanto para la producción de plántulas mejoradas, como para el éxito global de la revegetación.

3.3.3. Parque Natural “Sierra de Baza”: comunidades vegetales de interés

Dada la importancia de los ecosistemas propios de la Cuenca Mediterránea, la presente Tesis Doctoral toma como área de estudio el Parque Natural “Sierra de Baza”, una de las zonas protegidas más emblemáticas del sureste peninsular.

Este Parque Natural es un Espacio Natural Protegido (ENP) de gran interés, con una extensión de 53.844 ha. Su área de influencia socioeconómica incluye los términos municipales de Baza, Caniles, Dólar, Gor y Valle del Zalabí, y ocupa una extensión de 112.936 ha. Entre todos ellos, Baza es, con gran diferencia, el municipio que más territorio aporta al ENP, con un 60% de la extensión protegida, siendo, por otra parte, el municipio en el que el espacio protegido tiene también mayor peso, el 59% de su término municipal está dentro del Parque Natural.

Introducción

El Parque Natural se encuentra en una zona de media y baja montaña mediterránea, pero con cambios de altitud bastante bruscos que generan fuertes pendientes, lo que permite pasar en pocos kilómetros de los 845 m de altitud en Baza a los 2.269 m del Calar de Santa Bárbara, cota más alta del ENP. Esta Sierra destaca paisajísticamente en el territorio por encontrarse situada entre dos extensas planicies que corresponden a la Hoya de Guadix-Granada y a los Llanos del Marquesado, representando un accidente geográfico de elevada espectacularidad.

Climatológicamente la Sierra de Baza se encuentra en una de las regiones más secas de la Península Ibérica con muchas zonas que reciben precipitaciones inferiores a 300 mm/año, como se registra en muchas de las estaciones meteorológicas que se encuentran en el territorio. Este clima mediterráneo seco se matiza ostensiblemente con relación a la altitud del macizo montañoso y a la orientación de las laderas. El efecto “isla climática” se manifiesta tanto en las temperaturas como en las precipitaciones, ambas con consecuencias significativas sobre todos los parámetros físicos del Parque Natural, sobre los ecosistemas y también sobre la vida humana.

Las precipitaciones que se producen en esta isla pluviométrica contrastan con el clima semiárido de los altiplanos adyacentes y constituyen la principal entrada de agua en el conjunto de la cuenca. Es decir, la sierra actúa como un colector de recursos hídricos de vital importancia para las poblaciones, actividades y ecosistemas, no sólo interiores, sino también circundantes. La red hidrológica superficial de la Sierra de Baza se caracteriza por su fuerte estacionalidad, presentando caudales bastante escasos, de carácter muy irregular, y marcados por los periodos veraniegos en los que quedan completamente secos o constituyendo un sistema de charcos y pozas. Este periodo veraniego contrasta con las fuertes avenidas provocadas por precipitaciones puntuales en otoño o invierno, y por el deshielo primaveral.

La gran heterogeneidad del medio físico y las condiciones climáticas y pluviométricas se traducen en una singular riqueza florística y faunística y en el funcionamiento del Parque Natural como una “isla botánica”, por la diferencia de esta vegetación con respecto a la de las zonas adyacentes. Existen un total de 149

endemismos, divididos en 81 ibéricos, 51 béticos y 17 granadinos, entre los que destaca por su escasez y belleza la clavelina (*Dianthus subbaeticus*), siempreviva (*Sempervivum tectorum* subsp. *lainzi*) y primaveras (*Primula elatior* subsp. *lofthousei*), narciso de Sierra Nevada (*Narcissus nevadensis*), etc. Se pueden distinguir comunidades vegetales muy diferentes. Coexisten reductos de bosque mediterráneo autóctono con coníferas de repoblación. Los pinares autóctonos de pino silvestre (*Pinus pinaster* subsp. *nevadensis*), con pino salgareño (*Pinus nigra* subsp. *clusiana*), sabinas y enebros rastreros (*Juniperus sabina* y *Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica*) representan ecosistemas de especial singularidad. En algunos lugares se presentan formaciones ricas en arces, servales, cerezos silvestres, endrinos, etc., donde encuentran refugio numerosas especies vegetales escasas y raras en Andalucía como *Saponaria glutinosa*, *Senecio adonicifolius*, *Ribes uva-crispa*, *Viola colina*, *Hepatica nobilis*, entre otras. En el resto del territorio son frecuentes los pinares subespontáneos o de repoblación, entre los que se localizan numerosos chaparrales y restos de antiguos encinares.

Existen en el Parque diversas comunidades de especies arbustivas y sub-arbustivas de un gran valor ecológico, características del mismo y, en general, de los ecosistemas mediterráneos. Entre ellas destacan el romeral/tomillar, el retamal, el espinal/salviar y el tomillar dolomítico. Las especies que integran estas comunidades son actualmente objeto de investigación desde el punto de vista de la prospección y aplicación de MA. Concretamente, se pretende la restauración de la biodiversidad de estas especies y sus micorrizas en zonas degradadas del Parque (Barea *et al.*, 2007a). Una de las comunidades vegetales más representativas, el romeral-tomillar, fue la comunidad elegida para estudiar en este proyecto:

- **Romeral/tomillar:** Esta comunidad vegetal también conocida como matorral mediterráneo de romero se encuentra asociada a suelos ricos en carbonato de calcio en la que predominan los pequeños arbustos de una altura entre 0.4 y 1 m. El romero (*Rosmarinus officinalis*), que excepcionalmente puede superar el metro y medio de altura, suele ser dominante en la comunidad, pero también le acompañan arbustos de menor tamaño como la genista (*Genista cinerea*), la mejorana (*Thymus mastichina*), la lavanda (*Lavandula latifolia*) o el tomillo (*Thymus zygis*).

3.3.4. Estudios previos sobre el análisis de la diversidad de hongos MA en ecosistemas mediterráneos

Los ecosistemas mediterráneos han sido objeto de diversos estudios relacionados con la simbiosis MA (Palenzuela & Barea, 2009). Algunos de estos estudios pretendían optimizar las metodologías de análisis de la diversidad de hongos MA presentes en ambientes naturales y cómo se veía afectada esta diversidad dependiendo de factores como las interacciones planta-planta o el estado de degradación en que se encuentra la cubierta vegetal.

Estos estudios, la mayoría de ellos basados en el análisis morfológico y molecular de las esporas presentes en el suelo, muestran bajos valores de diversidad de hongos MA en los ecosistemas mediterráneos (Calvente *et al.*, 2004; Ferrol *et al.*, 2004; Palenzuela & Barea, 2009). Así mismo se ha evidenciado que la degradación de la cobertura vegetal ejerce un efecto negativo sobre la diversidad de hongos MA (Barea *et al.*, 2007a). Estas observaciones se han visto corroboradas recientemente mediante el análisis molecular de la diversidad intrarradical de hongos MA (Rodríguez-Echeverría & Freitas, 2006; Alguacil *et al.*, 2008).

La mayoría de las investigaciones realizadas en los ecosistemas mediterráneos han ido dirigidas a la posible mejora de las estrategias de revegetación de zonas degradadas. Obviamente, en el presente estudio cobra protagonismo el uso de las MA. Para ello, se estudia la diversidad y condiciones en que se desarrolla la simbiosis MA en zonas de las mismas características, en buen estado de desarrollo, para la posterior aplicación de estos resultados en los programas de revegetación de las zonas más degradadas. En estos estudios se pone de manifiesto las ventajas de integrar el uso de hongos MA en estas estrategias de revegetación (Palenzuela *et al.*, 2002; Caravaca *et al.*, 2003; Estaún *et al.*, 1997; Azcón-Aguilar *et al.*, 2003; Ferrol *et al.*, 2004; Cornejo, 2006; Barea *et al.*, 2007a).

II. PLAN Y ESTRATEGIAS DE TRABAJO

Una vez definida la problemática ecológica que anima la presente investigación, establecidos sus Objetivos y revisados los antecedentes bibliográficos en relación con la temática de investigación, se planificó el desarrollo de la parte experimental que conforma esta Tesis Doctoral.

Los materiales de partida fueron, básicamente, muestras de raíces de las plantas más representativas de la comunidad elegida, el romeral-tomillar, crecidas en la zona seleccionada en el Parque Natural. Adicionalmente se llevó a cabo un ensayo en condiciones “cerradas”, que utilizó un sistema de mesocosmos orientado a esclarecer diversos aspectos básicos referentes al análisis comparativo de la evolución en el tiempo de interacciones de las comunidades de hongos MA presentes en raíz con las del suelo micorrizosférico natural asociado.

Por las razones antes expuestas, esta Tesis se centra en el análisis de la diversidad de hongos MA que se encuentran colonizando la raíz de plantas cuando crecen en su hábitat natural. A pesar de su importancia como componentes de la diversidad de hongos MA, no se estudiaron las poblaciones de hongos en forma de esporas asociadas a las plantas investigadas crecidas en campo. Precisamente, el análisis de la diversidad de morfotipos y filotipos de esporas de hongos MA en las comunidades de plantas del Parque Natural “Sierra de Baza” es objeto de otra Tesis Doctoral del Departamento. Sin embargo, sí que se estudió la diversidad de esporas en suelo micorrizosférico en los estudios llevados a cabo en mesocosmos en los cuales se pretende comparar la diversidad de hongos MA que van colonizando la raíz con la de los presentes en el suelo a lo largo del tiempo.

La mayoría de los análisis llevados a cabo en el presente trabajo doctoral utilizaron técnicas basadas en aproximaciones metodológicas propias de la biología molecular. Sin embargo, también se utilizaron técnicas denominadas “clásicas”, necesarias para determinar parámetros fundamentales que permiten conocer el estado micorrícico del sistema de estudio. Aunque al inicio de este trabajo doctoral se habían efectuado algunos estudios dirigidos a analizar la diversidad de hongos MA presentes en las raíces hospedadoras utilizando técnicas moleculares (Redecker *et al.*, 2003; Cornejo *et al.*, 2004), era imprescindible implementar, adaptar y optimizar dichas metodologías para poder acometer la identificación de los hongos MA presentes en muestras naturales de raíz y suelo, lo cual constituyó el objetivo de la primera parte de las investigaciones que constituyen esta Tesis Doctoral..

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, para la consecución de los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral, se decidió un Plan de Trabajo basado en las siguientes Tareas:

1. Optimización de metodologías para el análisis molecular de la diversidad de hongos MA en muestras de raíz de plantas crecidas en campo.
2. Analizar la comunidad de hongos MA presente en las raíces de las plantas seleccionadas en la comunidad del romeral-tomillar.
3. Analizar la dinámica temporal de la comunidad de hongos MA que colonizan las raíces de las plantas objeto de estudio en su hábitat natural.
4. Efectuar un análisis comparativo de las comunidades de hongos MA presentes en raíz y en el suelo micorrizosférico asociado en plantas desarrolladas en condiciones controladas en un sistema de mesocosmos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Especies vegetales

1.1.1. Descripción de las especies y su hábitat

Como se ha indicado en el Capítulo de Introducción de esta Tesis Doctoral, la zona de estudio se sitúa en el Parque Natural Sierra de Baza, Espacio Natural Protegido de gran importancia ecológica. La vegetación actual de la zona de estudio seleccionada pertenece a la serie de degradación de la vegetación autóctona que corresponde al Encinar Mesomediterráneo. Entre otras asociaciones de plantas, existen comunidades de romeral-tomillar, una de las más representativas del Parque Natural. Algunas de esas comunidades de romeral-tomillar están en buen estado de desarrollo, pero otras se encuentran en estado más o menos avanzado de degradación. Se seleccionó una comunidad bien conservada para realizar los estudios de diversidad de hongos MA asociados a las plantas que la conforman.

1.1.1.1. Geografía, orografía y topografía

La zona de estudio seleccionada (2° 50' W, 37° 24' N) está situada a una altitud de 1394 m. Se trata de una ladera cuya pendiente media es del 24% (terreno moderadamente escarpado) y con una posición fisiográfica convexa. La topografía circundante es de montañosa a socavada.

El material original en esta zona es caliza-dolomía y actualmente el tipo de suelo puede clasificarse como Cambisol calcárico (FAO, 1999). Algunas propiedades de este suelo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Algunas propiedades del suelo correspondiente a la zona de estudio.

pH	CaCO ₃ (%)	MO (%)	P (mg/kg)	Arena/Limo/Arcilla (%)	NO ₂ + NO ₃ (mg/kg)
7.77	30.50	6.25	0.23	45.5/33.5/21.0	0.50

Es un terreno muy pedregoso y con buen drenaje, lo que provoca que se mantenga húmedo casi siempre. Se pueden apreciar algunos efectos de la erosión laminar y en surcos producida por el paso del agua. También se aprecian los efectos producidos por el pastoreo que aún se mantiene en esta zona.

1.1.1.2. Clima

El clima es típicamente mediterráneo con temperaturas medias mensuales de 6°C en enero y de 25°C en julio. La precipitación anual media es de 385 mm.

1.1.1.3. Vegetación

Las especies dominantes de la comunidad del romeral-tomillar (Figura 5) seleccionadas para la realización del presente estudio fueron genista (*Genista cinerea* (Vill.) DC.), lavanda (*Lavandula latifolia* Medicus), mejorana (*Thymus mastichina* (L.) L.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y tomillo (*Thymus zygis* Loefl. ex L.) (Figura 6).



Figura 5. Comunidad de romeral-tomillar del Parque Natural *Sierra de Baza* correspondiente a la zona de estudio.

Seguidamente se hace una breve descripción de las características eco-botánicas de las especies de plantas objeto de estudio:

- **Genista**: Pertenece a la familia de las leguminosas. Es un arbusto retamoide de una altura inferior a 2 metros que se puede encontrar en matorrales o retamales basófilos degradados. Su floración se produce a final de la primavera y principio del verano.

- **Lavanda**: Pertenece a la familia de las labiadas. Es una planta presente en buena parte de la región mediterránea. Constituyente de matorrales heliófilos establecidos sobre sustratos calizos, principalmente en los pisos meso y supramediterráneo con ombroclima seco. Su floración se presenta de julio a septiembre (Blanca & Morales, 1991).

- **Mejorana**: Pertenece también a la familia de las labiadas. Se presenta en buena parte de la Península Ibérica, de forma abundante. Forma parte de matorrales heliófilos como tomillares, en los pisos meso y supramediterráneos con ombroclima seco. Su floración ocurre entre junio y julio (Blanca & Morales, 1991).

- **Romero**: Especie perteneciente a la familia de las labiadas. Es una planta originaria de ambientes mediterráneos y especialmente de suelos secos y pedregosos. Es un arbusto perenne que puede crecer hasta un metro y medio de altura aproximadamente. Presenta una gran profusión de hojas verdes lustrosas por el haz y blancas por el envés, casi cilíndricas y sésiles. Florece casi todo el año, principalmente entre septiembre y mayo (Blanca & Morales, 1991).

- **Tomillo**: Pertenece a la familia de las labiadas. Es una mata de 10-20 cm de altura con ramas erectas y leñosas. Esta especie es uno de los tomillos más frecuentes en la Península Ibérica, capaz de crecer en una amplia gama de ambientes, pero especialmente abundante en las pendientes secas y matorrales de los encinares mediterráneos.



Figura 6. Especies vegetales utilizadas en el estudio. Correspondencia: **a**, romero; **b**, tomillo; **c**, genista; **d**, lavanda; **e**, mejorana.

1.1.2. Toma de muestras en campo

Una vez acotada la zona de muestreo, se identificaron varios individuos, del mismo tamaño aproximadamente, pertenecientes a cada una de las especies vegetales objeto de estudio. Se tomaron muestras representativas de raíces de las plantas correspondientes. Estas muestras se conservaron en frío hasta que se trasladaron al laboratorio donde se extrajo parte de las raíces de cada uno de los individuos muestreados, que fueron lavadas y secadas. Se separó una alícuota de las raíces obtenidas para evaluar posteriormente el porcentaje de raíz micorrizada. El resto de las raíces, destinadas a los análisis moleculares, se cortaron en trozos de 1 cm aproximadamente, se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido en alícuotas de 150 mg (cantidad de raíces equivalente a una longitud de 3 a 6 m de raíz, dependiendo del grosor de éstas). Posteriormente, se conservaron a -80°C hasta que se realizó la extracción de ADN.

Como posteriormente se detalla, el análisis de la diversidad de los hongos MA presentes en las raíces de las diferentes especies vegetales se efectuó siguiendo dos aproximaciones secuenciales. En la primera se pretendía evaluar la factibilidad de las técnicas implementadas para esta Tesis Doctoral y efectuar a su vez una prospección de la diversidad de hongos MA en las raíces de las plantas diana. En este caso, se

estableció una única fecha de muestreo en primavera (mayo), coincidiendo con la época de máximo crecimiento de las raíces. La segunda aproximación pretendía el análisis de la dinámica poblacional de los hongos MA a lo largo de un año. Para ello, se realizaron 3 muestreos consecutivos en los meses de enero ($T < 4^{\circ}\text{C}$, precipitación media de 25-50 mm), mayo ($T \approx 12\text{-}16^{\circ}\text{C}$, precipitación media de 25-50 mm) y septiembre ($T \approx 6\text{-}20^{\circ}\text{C}$, precipitación media 0-25 mm), correspondientes a las estaciones de invierno, primavera y otoño, respectivamente.

1.2. Ensayos de mesocosmos

1.2.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo estos ensayos, se seleccionaron dos de las cinco especies de plantas analizadas en campo: romero y tomillo. Se utilizaron contenedores de 7 L de capacidad (mesocosmos). En estos contenedores se transplantaron plántulas no micorrizadas de las especies vegetales seleccionadas. En cada unidad experimental se transplantaron 6 individuos de la planta correspondiente. Los sistemas de mesocosmos se establecieron en mayo de 2005 y se mantuvieron durante dos años en un umbráculo, protegidos de la lluvia pero expuestos a condiciones ambientales naturales de humedad y temperatura. La cantidad de agua semanal aplicada a las unidades experimentales se estimó a partir de los datos de precipitaciones medias anuales para invierno y verano en la zona de procedencia de las plantas (Sierra de Baza).

1.2.1.1. Sustrato de crecimiento

El sustrato utilizado para el crecimiento de las plantas fue una mezcla de suelo natural de la zona de romeral-tomillar de la Sierra de Baza y arena, en proporción 3:1 (v:v). El suelo se obtuvo a una profundidad entre 5 y 25cm y se tamizó por tamiz de 1 cm de luz de malla. La arena se autoclavó a 121°C durante 20 minutos.

1.2.1.2. Obtención y cultivo de las plantas

Las plantas de romero se obtuvieron por estaquillado de ramas jóvenes provenientes de plantas adultas de romero, recolectadas en la comunidad vegetal de la zona del Parque donde se realizaron los muestreos. Las estaquillas se prepararon dejando unos 3-4 cm de raquis central y los elementos foliares vecinos a la yema apical. Se lavaron varias veces con agua, se sumergieron durante 10 minutos en una solución esterilizante de hipoclorito sódico al 10% y se pusieron en bandejas alveoladas conteniendo como sustrato de crecimiento turba (autoclavada a 121°C durante 20 minutos). Las estaquillas se mantuvieron en invernadero, con unas condiciones de 16-25°C, 16 horas de luz y permanentemente húmedas mediante adición de H₂O, hasta que las plántulas presentaron un significativo desarrollo radical.

Para la obtención de las plantas de tomillo se utilizaron semillas provenientes de plantas de tomillo adultas presentes en la zona del Parque objeto de estudio. Las semillas se esterilizaron en superficie con hipoclorito sódico al 10% durante 10 minutos y escarificadas químicamente sumergiéndolas en H₂O₂ diluido al 1% durante 24 horas para facilitar de esta manera su germinación. Posteriormente, se depositaron en bandejas alveoladas conteniendo como sustrato una mezcla de arena:turba en una relación volumétrica de 1:1 y autoclavando previamente ambos sustratos. Estas semillas permanecieron constantemente húmedas hasta que germinaron y la plántula tenía un tamaño adecuado para poder ser transplantada al sistema de mesocosmos.

1.2.2. Toma de muestras

Los muestreos se realizaron a los 12 meses (mayo 2006) y 24 meses (mayo 2007) del establecimiento de los mesocosmos. Mediante el uso de un nucleador de acero de 1.5 cm de diámetro se recogieron muestras de suelo y de raíces de los contenedores, lo que representaba una retirada de aproximadamente 150 g de sustrato.

Dado el diseño adoptado y la necesidad de realizar muestreos periódicos, a fin de no tomar las muestras en el mismo sector del contenedor en los distintos muestreos, se establecieron zonas dentro del contenedor, con lo que se pudo programar la obtención de muestras desde zonas del mesocosmos que no se hubiesen muestreado con anterioridad. La muestra retirada se repuso inmediatamente con el mismo sustrato con el que se establecieron las unidades experimentales inicialmente.

De las muestras recogidas de los mesocosmos, en primer lugar, se separaron minuciosamente las raíces, con ayuda de pinzas de laboratorio esterilizadas, quedando perfectamente definidas y separadas las muestras de suelo y de raíz para su procesamiento posterior. Las raíces se trataron como se menciona en el apartado anterior para las raíces de campo. El suelo se almacenó a 4°C hasta su posterior utilización.

2. DETERMINACIONES Y METODOLOGÍAS

2.1. Determinaciones de la formación y desarrollo de la micorrización

2.1.1. Porcentaje de micorrización

Se utilizó el método de intersección en línea de McGonigle & Fitter (1990), con algunas modificaciones, sobre la raíz teñida con azul-tripán (Phillips & Hayman, 1970). El colorante azul-tripán interacciona con las estructuras que presentan quitina, como es el caso de las paredes celulares de los hongos MA (Bartnicki-García, 1968).

Procedimiento

1. Las raíces se cortaron en segmentos de alrededor de 1 cm y se sumergieron en una solución de KOH al 10% p/v, donde permanecieron durante tres días.
2. Posteriormente se eliminó la solución de KOH y las raíces se lavaron con abundante agua.

3. Las raíces se sumergieron en una solución de HCl 0.1 N, donde permanecieron durante 30 min.
4. Posteriormente se eliminó la solución de HCl y se añadió solución de azul-tripán al 0.05% p/v en ácido láctico, dejándolas durante 24 h en esas condiciones.
5. Finalmente, se eliminó la solución de azul-tripán. Las raíces se lavaron con agua y se conservaron en ácido láctico hasta su observación.
6. Para la cuantificación de la colonización, las raíces teñidas se extendieron sobre placas de metacrilato, con una cuadrícula de 1 x 1 cm, contándose las intersecciones entre las raíces y la cuadrícula. La proporción de raíz micorrizada se obtiene de la relación entre las intersecciones donde la raíz presenta colonización respecto del total de intersecciones cuadrícula-raíz.

2.1.2. Longitud de micelio micorrízico

Para la determinación de la longitud de hifas de hongos MA en el suelo asociado a las raíces se utilizó la metodología descrita por Abbott *et al.* (1984), tanto para la extracción como para su cuantificación. Se utilizó una modificación, ya que la tinción del micelio se realizó en la suspensión del suelo en agua, antes del proceso de filtración, y no sobre el filtro de nitrocelulosa como se describe en el artículo citado.

Procedimiento

1. A 1 g de suelo se le agregaron 45 mL de agua y 5 mL de azul-tripán. Se agitó vigorosamente durante 10 segundos.
2. Se dejó teñir durante 3 días a temperatura ambiente.
3. El matraz se agitó durante 1 min y se dejó decantar durante 30 segundos.
4. Se tomaron 2.5 mL de la suspensión decantada, se vertieron sobre un tamiz de 50 μm de luz y se lavó con abundante agua.
5. El micelio teñido se transfirió a un filtro de nitrocelulosa con cuadrícula, de 0.2 μm de tamaño de poro, posicionado en un sistema de filtración al vacío.
6. Los filtros de nitrocelulosa se montaron sobre portaobjetos y se observaron al microscopio a 100-200 aumentos.

7. Se contaron las intersecciones entre hifas y la retícula del filtro, tanto en sentido horizontal como vertical.
8. Se calculó la longitud total de la retícula y el área total analizada, y se obtuvo la longitud total de micelio presente en la muestra de partida usando la ecuación de Newman (1966), que se representa según

$$R = (\pi AN/2H) \times Fd \times Fps$$

en donde R es la longitud de hifas en el área de medición (m), A es el área de medición en el filtro (m²), N es el número de intersecciones, H es la longitud total de la retícula utilizada, Fd es el factor de dilución de suelo (en este caso 20) y Fps es el factor de peso seco o factor de humedad del suelo que se calcula dividiendo los gramos de suelo húmedo entre los gramos de suelo seco para una alícuota tomada del suelo analizado.

2.1.3. Extracción y caracterización de morfotipos de esporas de hongos MA

De las muestras de suelo micorrizosférico tomadas en el ensayo en mesocosmos se extrajeron las esporas correspondientes a hongos MA para proceder a su cuantificación y clasificación. Las esporas se separaron del sustrato por el método del decantado y tamizado húmedo (Gerdemann & Nicolson, 1963), con algunas modificaciones. Las esporas separadas del sustrato se utilizaron para su conteo y agrupación en morfotipos.

Procedimiento

1. Se pesaron 25 g de sustrato, se mezclaron vigorosamente con agua y se centrifugaron a 2500 rpm durante 2 min.
2. El sobrenadante, conteniendo una gran parte de los materiales orgánicos gruesos de suelo, esporas destruidas, trozos de raíz y otros materiales poco densos, se eliminó.
3. Seguidamente, el sustrato decantado se mezcló y suspendió en una solución de sacarosa al 50% p/v y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores.

4. Esta vez el sobrenadante se vertió sobre una serie de tamices Tyler de 500, 250 y 50 μm de luz, se lavó con agua corriente y se arrastró a placa Doncaster para su observación microscópica bajo lupa estereoscópica a 50-75 aumentos.

5. Se separaron todos los tipos de espora presentes (según su tamaño, forma y color), se cuantificaron y se identificaron con especies MA en los casos que era posible.

2.2. Métodos basados en técnicas de biología molecular

2.2.1. Extracción de ADN genómico

2.2.1.1. De material vegetal

El ADN genómico de las hojas y raíces de las plantas objeto de estudio se extrajo usando el kit comercial de extracción de ADN *DNeasy Plant Mini Extraction* (Qiagen, CA, USA), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. En todos los casos, se partió de 150 mg de peso fresco del tejido vegetal. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

2.2.1.2. De suelo

Para obtener ADN de suelo se utilizó el kit comercial de extracción de ADN *UltraCleanTM Soil DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories, CA) según el protocolo del fabricante, aplicando pequeñas modificaciones. La cantidad de suelo utilizada para la extracción fue de 0.5 g. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta que se utilizó para las amplificaciones por PCR.

2.2.2. Cuantificación de ADN genómico

El ADN aislado se cuantificó en gel de agarosa mediante comparación visual de la intensidad de la banda correspondiente al ADN genómico, una vez teñido en una solución de bromuro de etidio, respecto de las distintas bandas del marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + Hind III (Promega, Heidelberg).

2.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las diferentes PCRs se realizaron en un termociclador automático (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg). Las amplificaciones se realizaron usando el producto comercial *pure-TaqTM Ready-To-Go PCR beads* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) en un volumen final de 25 µL. Este producto contiene todos los componentes necesarios para que se lleve a cabo la PCR, con una concentración final en 25 µL de 2.5 unidades de puRE Taq DNA polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl y 1.5 mM MgCl₂.

Los diferentes oligonucleótidos empleados se usaron en una concentración final de 0.4 µM. Las condiciones de tiempo y temperatura de las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, así como el número de ciclos correspondientes a cada una de las parejas de oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 2. Para todas las reacciones se utilizó un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min y un paso final de extensión a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR resultantes se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Tabla 2. Combinaciones de oligonucleótidos usadas en las distintas PCRs, secuencias nucleotídicas de los mismos y condiciones de la correspondiente PCR.

Pareja de oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Desn.	Hibr.	Ext.	N. ciclos
NS31 (Simon <i>et al.</i> , 1992a)	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	94°C	50°C	72°C	35
NS41	CCCGTGTGAGTCAAATTA	30''	45''	1'	
NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	94°C	55°C	72°C	30
AM1 (Helgason <i>et al.</i> , 1998)	GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA	45''	45''	1'	
NS31-GC	CGCCCGGGCGCGCCCGGGCG GGGCGGGGCACGGGGG + NS31	94°C	55°C	72°C	35
Glo1 (Cornejo <i>et al.</i> , 2004)	GCCTGCTTAAACTCTA	45''	1'	1'	

Abreviaturas: **Desn.**, fase de desnaturalización; **Hibr.**, fase de hibridación; **Ext.**, fase de extensión; **N. ciclos**, número de ciclos.

2.2.4. Electroforesis en geles de agarosa

La separación electroforética del ADN, tanto genómico como amplicones, se realizó en geles de agarosa al 1.2% en tampón TAE 1X (20 mM Tris-Acetato, 10 mM acetato de sodio, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 7.4). La electroforesis se realizó en tampón TAE 1X con una diferencia de potencial eléctrico de 100 V durante 35-60 minutos, dependiendo del tamaño del ADN a separar.

Para estimar el tamaño de los productos de PCR, así como su cuantificación, se depositó en una de las calles del gel un marcador de peso molecular. En el caso de los segmentos de más de 500 pb se utilizó el marcador Lambda DNA/EcoRI + Hind III (Promega, Heidelberg) y para los productos de menor tamaño se utilizó el marcador pGEM® DNA (Promega, Heidelberg). Las muestras se prepararon en tampón de carga 1X (tampón de carga 6X = sacarosa 50% p/v; 0.3% azul bromofenol p/v).

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 20 minutos con bromuro de etidio (1 mg/L en TAE 1X), se lavaron durante 10 minutos en ddH₂O, y se visualizaron y fotografiaron bajo luz UV (260 nm; Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

2.2.5. Purificación de productos de PCR

2.2.5.1. Recuperación de los fragmentos de ADN de los geles de agarosa

Las bandas de ADN de interés para su clonación o análisis mediante técnicas de TTGE, DGGE o SSCP se cortaron del gel de agarosa con un escalpelo estéril, y extrajeron utilizando el kit comercial *QiaexII Gel Extraction kit* (Qiagen, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El volumen final obtenido fue de 20 µL.

2.2.5.2. Purificación de los productos de PCR en solución

Los productos de PCR seleccionados para su secuenciación se purificaron con las columnas *Montage® PCR Centrifugal Filter Devices* (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), según las instrucciones del fabricante.

2.2.6. Clonación de productos de PCR

2.2.6.1. Ligación y transformación

Para la clonación de los productos de PCR se usó el vector *pCR®2.1* del kit de clonación *TA Cloning®* (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany). Este vector de clonación usa las colas de adenina típicas de productos de PCR resultantes de la actividad transferasa terminal de la Taq polimerasa sin actividad correctora de prueba. Para la transformación se utilizaron las células competentes *One Shot® TOP10F' Chemically Competent Escherichia coli cells* (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany). Los procedimientos de ligación y transformación se realizaron según las instrucciones del fabricante del kit utilizado.

2.2.6.2. Selección y escrutinio de clones positivos

La selección se realizó por la tolerancia al antibiótico ampicilina que confieren estos plásmidos. El sitio de clonación se encuentra en el marco de lectura del gen *LacZ*, por lo que es posible la selección de los plásmidos portadores del inserto mediante la diferenciación de colonias blancas/azules de *E. coli* cultivadas en medio LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% ClNa, pH 7, 1.5% agar) en presencia de 50 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-gal), se disuelve en dimetilformamida y se conserva a -20°C en recipiente opaco por su fotosensibilidad) y de 100 µg/µL de ampicilina.

Las colonias seleccionadas (colonias blancas que supuestamente se transformaron con el vector conteniendo el inserto) se replicaron en placas LB suplementadas con

ampicilina e incubaron a 37°C durante 16-20 horas. El escrutinio de las colonias portadoras del plásmido se realizó mediante amplificación por PCR del inserto correspondiente usando un lisado bacteriano y los oligonucleótidos NS31/AM1. Para preparar el lisado se tomó una porción de cada colonia con un palillo de madera estéril, se agitó en un vial con 50 µL de ddH₂O estéril y se calentó a 100°C durante 5 minutos.

2.2.7. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante técnicas tipo *fingerprinting*

2.2.7.1. Electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE)

Fundamento

Esta técnica se basa en la temperatura de fusión del ADN (T_m). La T_m de una secuencia viene definida por su contenido en guanina y citosina (GC), propiedad que va a permitir separar gradualmente moléculas de ADN de distintas secuencias (diferente T_m) en un gradiente desnaturalizante. Cuando el punto de fusión se alcanza, la doble hebra se separa parcialmente, creando una molécula ramificada con movilidad reducida en un gel de poliacrilamida (Figura 7). El ambiente desnaturalizante se crea mediante una concentración alta de urea y un gradiente temporal de temperatura. La separación total de las hebras de ADN se evita mediante una cola rica de GC que se acopla al extremo 5' de uno de los oligonucleótidos utilizados en la PCR, en nuestro caso, al oligonucleótido NS31.

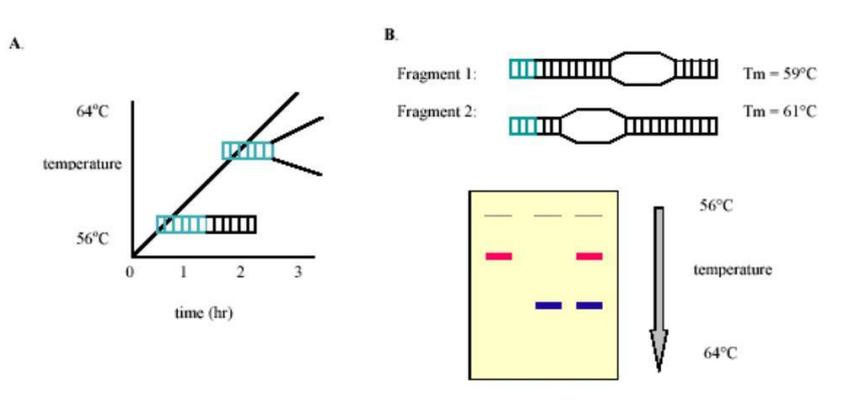


Figura 7. Esquema explicativo del fundamento de la técnica TTGE. Abreviaturas: **T_m**, temperatura de fusión del ADN.

Procedimiento

Para la separación de los productos de PCR mediante TTGE se utilizó el equipo *DCodeTM Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se utilizaron geles de 16 cm x 16 cm x 1 mm, que se prepararon utilizando las soluciones comerciales de acrilamida y bis-acrilamida (*Acrylamide and Bis-Acrylamide Solutions*, Bio-Rad Laboratories). La composición de los geles fue: 8% acrilamida-bis-acrilamida (37.5:1), 7 M urea, 1.5X TAE, 0.1% N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 0.1% persulfato amónico.

Las muestras se prepararon añadiendo a 7-15 µL de los productos de PCR (500 ng de ADN) un volumen del tampón de carga 2X (70% glicerol p/v, 0.05% xileno cianol p/v y 0.05% p/v azul de bromofenol). La separación electroforética de los fragmentos de ADN se realizó en tampón 1.5X TAE a 130 voltios durante 7 h, con una temperatura inicial de 52°C, temperatura final de 59°C y una rampa de 1°C/h).

2.2.7.2. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)

Fundamento

Al igual que el TTGE, esta técnica se basa en la separación electroforética de fragmentos de ADN en función de sus temperaturas de fusión, pero en este caso el ambiente desnaturalizante se crea con urea y formamida.

Procedimiento

Para la separación de los productos de PCR mediante DGGE se utilizó también el equipo *DCodeTM Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad Laboratories), aunque en este caso las dimensiones de los geles fueron de 16 cm x 16 cm x 1 mm. En este caso la composición de los geles fue: 6% acrilamida-bis-acrilamida (37.5:1), 7 M urea, 0.5X TAE, 40% formamida, 0.1% N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 0.1%

persulfato amónico. El gradiente desnaturante utilizado fue de 25-35%, considerando el nivel 100% denaturante un gel 7 M urea y 40% formamida (Muyzer *et al.*, 1993)

Los productos de PCR se aplicaron directamente en el gel (Muyzer *et al.*, 1993) y se separaron electroforéticamente a una temperatura constante de 60°C en tampón 0.5X TAE a 200 V durante 10 min y 80 V durante 16 h.

2.2.7.3. Polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP)

Fundamento

El análisis mediante SSCP se basa en la separación electroforética de los fragmentos de ADN amplificados por PCR, sobre la base de la diferente movilidad que las moléculas de ADN de cadena sencilla presentan en un gel de poliacrilamida. El retardo en la movilidad de estas moléculas se produce por las diferencias en el plegamiento de las mismas, y que es dependiente de su secuencia (Figura 8). En este caso, la electroforesis se realiza en condiciones no desnaturantes siendo necesaria la desnaturalización previa de los productos de PCR.

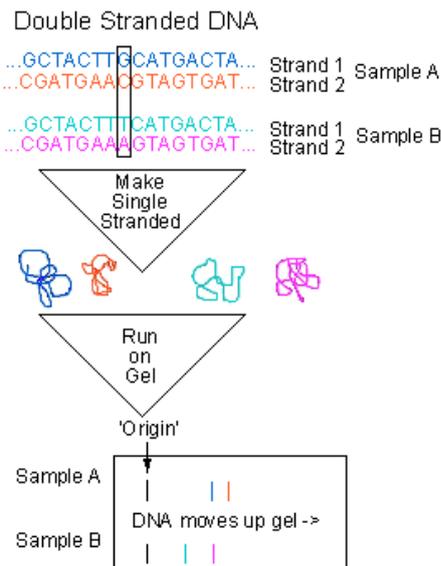


Figura 8. Esquema explicativo del fundamento de la técnica SSCP.

Una limitación importante de la aplicación del SSCP en los análisis de ADN de comunidades es que una buena proporción de las cadenas de ADN simple que se generan tras la desnaturalización del ADN se re-anillan durante la electroforesis. Es más, puesto que cada molécula de ADN genera dos bandas en el gel, la interpretación de los geles resultantes del análisis de comunidades es compleja. Sin embargo, estos fenómenos se pueden minimizar mediante fosforilación de una de las cadenas del ADN en la PCR utilizando un oligonucleótido fosforilado, en nuestro caso el AM1, y posterior digestión de la cadena fosforilada con la enzima λ exonucleasa (Figura 9) (Schwieger & Tebbe, 1998).

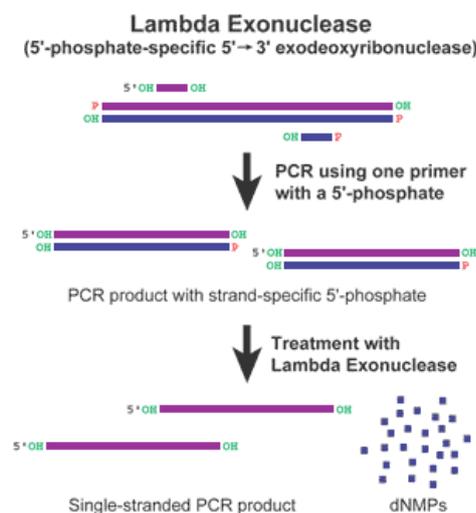


Figura 9. Digestión de la cadena de ADN fosforilada con la enzima λ exonucleasa. Tomado de www.epibio.com.

Procedimiento

La separación electroforética se realizó en el equipo *Protean^R II xi Cell* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La dimensión de los geles fue de 20 cm x 20 cm x 0.5 mm y se prepararon utilizando el producto comercial *MDE* (Mutation Detection Enhancement) *polyacrylamide gel* (Cambrex Bio Sciences Rockland, ME). Los geles empleados presentaban la siguiente composición: 0.6X MDE (una matriz de poliacrilamida específicamente optimizada para los análisis de SCCP), 0.6X TBE (1X TBE = 90 mM Tris-base, 64.6 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.3), 0.1% TEMED y 0.1% persulfato amónico.

La desnaturalización de los productos de PCR se realizó mediante la adición de 1 volumen del tampón de carga 2X (95% formamida v/v, 10 mM NaOH, 0.05% xileno cianol p/v, 0.05% azul de bromofenol), incubación durante 3 min a 95°C y durante 3 min en baño de hielo. La electroforesis se desarrolló a 20°C en 0.6X TBE a 4 W durante 16 h.

En el caso del uso de esta técnica para el análisis de mezclas complejas de ADN correspondientes a muestras de comunidad, la PCR anidada se realizó con el oligonucleótido fosforilado AM1P y NS31. Previamente a la desnaturalización, se digirieron 10-15 µL de este producto de PCR con 10 unidades de la enzima λ exonucleasa y una concentración final 1X de tampón λ-exonucleasa durante 2 horas a 37°C en un volumen final de 25 µL.

2.2.7.4. Tinción de los geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con nitrato de plata utilizando el kit comercial *Bio-Rad Silver Stain* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez teñido el gel, se conservó en glicerol al 10% hasta que se fotografió.

2.2.7.5. Análisis de los geles de poliacrilamida

Los patrones de las bandas presentes en los geles de poliacrilamida se analizaron utilizando el programa informático *InfoQuest FP software v.4.50* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Este programa permite realizar comparaciones de calles de diferentes geles, corrigiendo los posibles errores instrumentales y fluctuaciones no controlables en las condiciones de electroforesis aplicadas a los geles.

El margen de tolerancia de posición de las bandas utilizado fue optimizado mediante comparación de patrones de bandas de secuencias conocidas, estableciendo como valor final el 1%.

2.2.7.6. Recuperación y reamplificación de los fragmentos de ADN de los geles de poliacrilamida

El ADN de las bandas de interés se recuperó de los geles y se reamplificó por PCR utilizando el procedimiento que se indica a continuación.

Procedimiento

1. La banda seleccionada se cortó del gel con un escalpelo estéril y se depositó en un tubo de microcentrífuga.
2. Se añadieron 50 μ L de ddH₂O estéril y se rompió el fragmento de gel recuperado con la ayuda de un micropistilo de terminación cónica.
3. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas, a -20°C durante 24 horas, a 67°C durante 2 horas y finalmente a -80°C durante 2 horas.
4. Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min y se recogió el sobrenadante en el cual se encontraban disuelto el ADN recuperado.
5. Dos μ L de este sobrenadante se utilizaron para realizar una PCR con los mismos oligonucleótidos usados en la PCR cuyos productos fueron usados en el gel de poliacrilamida del que se cortaron las bandas.
6. Los productos de PCR resultantes se cargaron en su totalidad en gel de agarosa, se purificaron y se clonaron para poder secuenciarlos posteriormente.

2.2.8. Secuenciación de ADN

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

Cada reacción de secuenciación consistió de 10-40 ng de ADN molde y 6.4 pmol de oligonucleótido, en un volumen final de 12 μ L.

3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

3.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas se revisaron manualmente y corrigieron, en caso de que fuera necesario, con el programa informático *Sequence Scanner* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La posible existencia de secuencias-quimera se comprobó con el programa *RDP Chimera Check* (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>). Los análisis de homología de las secuencias nucleotídicas se llevaron a cabo con el programa informático *BioEdit* (Hall, 1999).

3.2. Comparación de secuencias

Las secuencias obtenidas en esta tesis se contrastaron con las presentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando el algoritmo *Blastn* (Altschul *et al.*, 1990). Para poder realizar alineamientos y estudios filogenéticos de las secuencias obtenidas se buscaron secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del gen ribosómico (18S ADNr) de diversos hongos MA en las bases de datos del EBI (European Bioinformatics Institute; <http://www.ebi.ac.uk>) y del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo utilizando el programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Thompson *et al.*, 1997).

Todas las secuencias obtenidas, una vez revisadas, se depositaron en la base de datos *EMBL Nucleotide Sequence Database* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

3.3. Análisis filogenético

Las distancias genéticas entre las secuencias analizadas se realizó utilizando se utilizó el método de “Kimura 2 parámetros” (Kimura 2-parameter, K2P). Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo con el método *Neighbour-Joining* y *Maximum Parsimony* usando el paquete informático *Phylip* (Felstein, 1993). Como “grupo distante” (outgroup), para enraizar estos árboles filogenéticos, se usó la secuencia del hongo no MA *Mortieriella polycephala*. Para la representación de los árboles se utilizó el programa informático *Treewiew* (Roderic, 1996).

3.4. Definición de filotipos

El polimorfismo existente en las secuencias nucleotídicas de esporas de hongos MA morfológicamente iguales e incluso dentro de una misma espora (Sanders *et al.*, 1995) determina que sea imposible asignar una secuencia concreta a cada especie. Con el fin de agrupar secuencias que, a pesar de variar en algún nucleótido, pudieran ser consideradas como iguales se definieron una serie de grupos de tipos de secuencia o filotipos. Los criterios fijados para agrupar estas secuencias fueron: (i) un apoyo filogenético (*bootstrap value*) en los árboles mayor al 80% y (ii) una homología en las secuencias mayor al 97% (Santos-González *et al.*, 2006).

4. DETERMINACIONES DE BIODIVERSIDAD

4.1. Curvas de rarefacción

Las curvas de rarefacción o esfuerzo muestran el cambio en el valor esperado de riqueza de especies de acuerdo al tamaño de la muestras. Se realizaron con el programa informático *Analytical Rarefaction Program v. 1.3* (www.uga.edu/~strata/software/).

4.2. Índices de diversidad

Los índices de diversidad se determinaron a partir de la cuantificación de las esporas encontradas en las muestras de suelo y de los distintos tipos de secuencias obtenidos en raíz y suelo. Los parámetros utilizados para estimar la diversidad de especies y su estructura se indican a continuación.

4.2.1. Riqueza de especies (S)

También conocido como Índice de Riqueza Específica, se define como el número total de especies encontradas por censo de una comunidad.

4.2.2. Densidad específica (D_i)

Se define como la proporción de individuos de la especie *i* en la muestra en relación al número total de individuos. Se representa según la siguiente igualdad

$$D_i = n_i / N$$

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

4.2.3. Equidad de Shannon-Wiener (H')

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

$$H' = -\sum p_i \ln(p_i)$$

donde p_i es la abundancia proporcional de una especie o morfotipo.

Para aplicar este índice a las secuencias obtenidas, se utilizaron los filotipos definidos a modo de especies y el número de secuencias de cada filotipo como el número de individuos de las diferentes especies.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se usaron diferentes técnicas estadísticas para analizar los resultados de este estudio. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico *SPSS* v. 14.0.

5.1. Análisis de varianza

Para analizar las diferencias en la abundancia relativa de filotipos de hongos MA y los índices de diversidad estudiados en las diferentes muestras, se realizó análisis de varianza de dos vías (ANOVA) sin interacción entre los factores. En este caso, la probabilidad de significancia se estableció en $P < 0.05$.

5.2. Análisis factorial

Para reducir y simplificar la dimensión de las variables de respuesta obtenidas, se realizó análisis factorial con el método de extracción de componentes principales (CP), que permitió resumir las variables que mayor injerencia y relación presentaran con los modelos utilizados, y que explicaran una alta proporción de la varianza global.

5.3. Análisis de conglomerados

Para analizar la similaridad de las comunidades de hongos MA presentes en las muestras analizadas, utilizando los valores de los factores obtenidos después de la extracción de componentes principales para la abundancia relativa de los diferentes filotipos encontrados en cada una de las muestras, se realizó un análisis de conglomerados jerárquico mediante el método de Ward.

5.4. Análisis de correlación

En determinados casos se comprobó la existencia de relación lineal directa o inversa entre las diferentes variables, mediante el coeficiente de correlación bivariada de Pearson (r). Cuando la probabilidad asociada al coeficiente de correlación obtenido fue $p < 0.05$ se consideró que las variables se encontraban relacionadas entre sí.

IV. RESULTADOS

1. OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE HONGOS MA

Los estudios moleculares desarrollados en esta Tesis Doctoral se han basado en el análisis de la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr debido a que, como se ha mencionado en el Capítulo de Introducción, el oligonucleótido AM1 amplifica específicamente el ADN de la mayoría de familias de hongos MA y a que la variabilidad genética que presenta esta región permite la identificación de hongos MA hasta el nivel de especie.

Aunque, como se ha indicado anteriormente, al iniciarse este trabajo doctoral ya se habían aplicado diferentes técnicas moleculares para analizar la diversidad de hongos MA en raíces, fue imprescindible implementar, adaptar y/o optimizar dichas metodologías para llevar a cabo los estudios que se proponen en esta Tesis. A continuación se presentan los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas.

1.1. Análisis de la especificidad de los oligonucleótidos NS31/AM1

Antes de proceder a realizar los estudios de diversidad propiamente dichos se evaluó la especificidad de la pareja de oligonucleótidos NS31/AM1 para amplificar el ADN de los hongos MA en el sistema experimental objeto de estudio. Como se muestra en la Figura 10, cuando la PCR se realizó utilizando como ADN molde el ADN genómico extraído de las hojas de genista, lavanda, mejorana, romero y tomillo no se obtuvo

ninguna banda; sin embargo, sí se obtuvo una banda del tamaño esperado de 550 pb cuando la PCR se realizó con ADN genómico extraído de las raíces de dichas plantas. A modo de ejemplo se muestra, en la Figura 10, la banda obtenida con el ADN de raíces de genista.

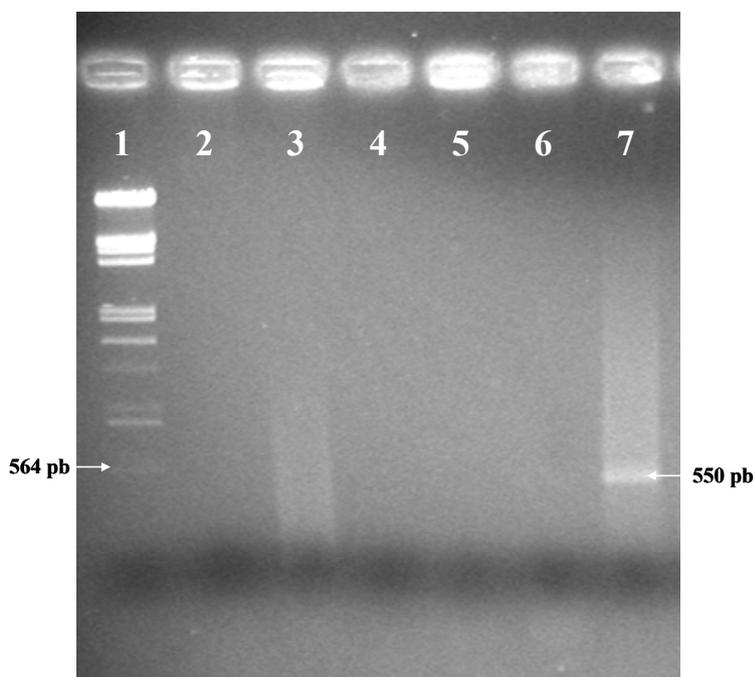


Figura 10. Análisis de la especificidad de los oligonucleótidos NS31/AM1. Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2%. Las PCRs se realizaron utilizando ADN genómico aislado de: hojas de genista (calle 2), lavanda (calle 3), mejorana (calle 4), romero (calle 5) y tomillo (calle 6) ó de raíces de genista (calle 7). La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + Hind III.

1.2. Evaluación del potencial de diferentes técnicas de *fingerprinting* para el análisis molecular de la diversidad de hongos MA

Con el fin de obtener la huella genética de los hongos MA que colonizan las raíces, y así poder realizar de una manera rápida y eficiente el análisis molecular de las comunidades de hongos MA presentes en las mismas, los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del material genético de dichos hongos MA se analizaron mediante TTGE, DGGE y SSCP. Dado que algunas de estas técnicas se aplicaban por vez primera

al estudio de comunidades de hongos MA en raíces fue necesaria una optimización previa de las mismas.

1.2.1. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante TTGE

En primer lugar se evaluó la potencialidad de la técnica TTGE desarrollada previamente por el grupo de investigación para el análisis de comunidades de hongos MA en raíces crecidas bajo condiciones controladas (Cornejo *et al.*, 2004). En este caso, puesto que las diferencias existentes entre las temperaturas de fusión correspondientes a la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr de los diferentes hongos MA no permite discriminar las secuencias de diferentes hongos MA en un gel de TTGE, y con el fin de obtener un fragmento de PCR más pequeño que permitiera tal discriminación, el producto de PCR NS31/AM1 se reamplificó (PCR anidada) con los oligonucleótidos Glo1/NS31-GC (Cornejo *et al.*, 2004).

Como se observa en la calle 2 de la Figura 11, la separación electroforética mediante TTGE del producto de la PCR anidada obtenido a partir del ADN aislado de las raíces de lavanda permitió obtener un patrón de bandas bien diferenciado que, potencialmente, podría ser objeto de un posterior análisis. Sin embargo, en la mayoría de las muestras analizadas, como se muestra en las calles 3-5 de la Figura 11, la baja calidad del ADN genómico aislado de las raíces crecidas en campo determinó que el producto de la PCR anidada no tuviera calidad suficiente como para ser analizado mediante esta técnica.

A la vista de estos resultados se realizaron múltiples intentos para mejorar la calidad del ADN y por tanto de los productos de PCR. De todas las pruebas realizadas, la única que consiguió mejorar la calidad de los productos de PCR consistió en realizar una PCR con los oligonucleótidos universales NS31/NS41, previa a la realizada con los oligonucleótidos NS31/AM1. Por tanto, la aplicación de esta optimización requeriría la realización de tres PCRs consecutivas para amplificar el ADN de los hongos MA presente en las raíces con el fin de obtener un producto de PCR adecuado para ser analizado mediante TTGE. Sin embargo, la consideración de que en los estudios de

Resultados

ecología molecular no se deben utilizar más de dos PCRs, llevó a descartar el uso de esta técnica.

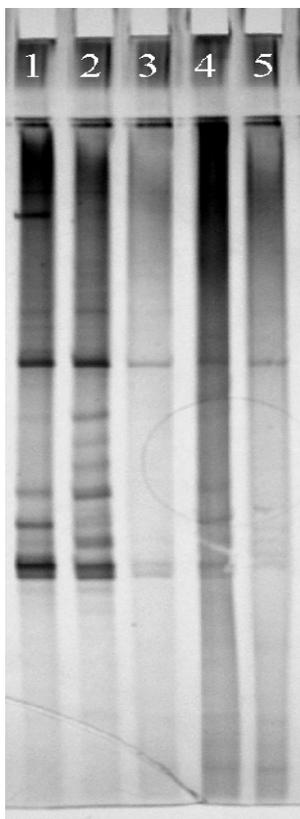


Figura 11. Análisis mediante TTGE de la región Glo1/NS31GC del gen 18S ADNr de los hongos MA que colonizan las raíces de genista (calle 1), lavanda (calle 2), mejorana (calle 3), romero (calle 4) y tomillo (calle 5).

En resumen, estos experimentos de optimización permitieron concluir que la amplificación por PCR del ADN genómico de los hongos MA que colonizan las raíces crecidas en su hábitat natural requería de dos PCRs consecutivas, una primera con los oligonucleótidos universales de eucariotas NS31/NS41 y una segunda, o PCR anidada, con los oligonucleótidos NS31/AM1. De ahí, que en todos los estudios posteriores se haya realizado esta PCR anidada.

1.2.2. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante DGGE

Dado que esta técnica se había utilizado previamente en estudios de diversidad de las comunidades de hongos MA en base a la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr

(Kowalchuk *et al.* 2002), se decidió analizar mediante DGGE los amplicones resultantes de la PCR anidada NS31/AM1. Sin embargo, los resultados de la aplicación de esta metodología, utilizando las condiciones descritas por Kowalchuk *et al.* (2002), mostraron un defecto de resolución de los patrones de bandas que provocaba una acumulación y superposición de dichas bandas y por tanto, pérdida de información (Figura 12).

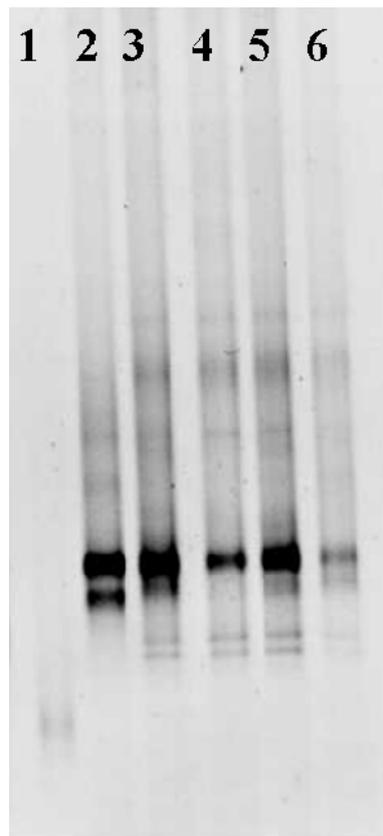


Figura 12. Análisis mediante DGGE de la región AM1/NS31GC del gen 18S ADNr de los hongos MA que colonizan las raíces de genista (calle 2), lavanda (calle 3), mejorana (calle 4), romero (calle 5), tomillo (calle 6). La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + Hind III. El gradiente de desnaturalización utilizado fue 25-35%.

También se detectó una falta de reproducibilidad en los patrones resultantes. Por estas razones se descartó el uso de esta técnica para analizar la diversidad de hongos MA en muestras naturales.

1.2.3. Análisis de la diversidad de hongos MA mediante SSCP

Al igual que en el caso anterior, se evaluó el potencial de esta técnica para discriminar las diferencias existentes entre las secuencias nucleotídicas de la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr de los diferentes hongos MA. Puesto que el análisis mediante SSCP produce dos bandas por molécula de ADN de doble cadena, para obtener en el gel una sola banda por cada tipo de secuencia presente en el producto de PCR, la PCR anidada se realizó utilizando un oligonucleótido fosforilado, concretamente el oligonucleótido AM1, y la hebra de ADN fosforilada se digirió posteriormente con la enzima λ exonucleasa.

En este caso, puesto que era la primera vez que esta técnica se aplicaba para el análisis de la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr de hongos MA, se llevaron a cabo numerosas pruebas para optimizar la posición y separación de las bandas en el gel. Estas pruebas consistieron básicamente en la utilización de diferentes concentraciones de MDE (0.5X – 0.6X), diferentes tiempos de separación electroforética (de 12 a 20 h) y diferentes potencias eléctricas (de 2 a 4 W). Las condiciones que produjeron una mejor resolución de las diferentes bandas de ADN se corresponden con geles de 0.6X MDE en tampón 0.6X TBE durante 16 h a 4 W y a una temperatura constante de 20°C. Como se muestra en la Figura 13, el análisis mediante SSCP de los amplicones mostró un patrón de bandas diferenciadas.

Para confirmar que los patrones de bandas obtenidos en el gel reflejaban la diversidad de hongos MA presente en las muestras estudiadas se analizaron los fragmentos de ADN correspondientes a tres bandas elegidas aleatoriamente, B1, B2 y B3 (Figura 13). Para ello, una vez recuperado el ADN de cada una de las bandas seleccionadas, éste se amplificó con los oligonucleótidos NS31/AM1 y se clonó en el vector *pCR®2.1* del kit de clonación *TA Cloning*. Para confirmar que la posición del producto reamplificado coincidía con la posición de cada una de las bandas cortadas se analizaron tres clones correspondientes a cada una de las tres bandas en un nuevo gel de SSCP. La reamplificación mediante PCR de las bandas de ADN de cadena simple

eluidas del gel regeneró la cadena de ADN complementaria, por lo que por cada molécula de ADN se detectan dos bandas en los geles de SSCP.

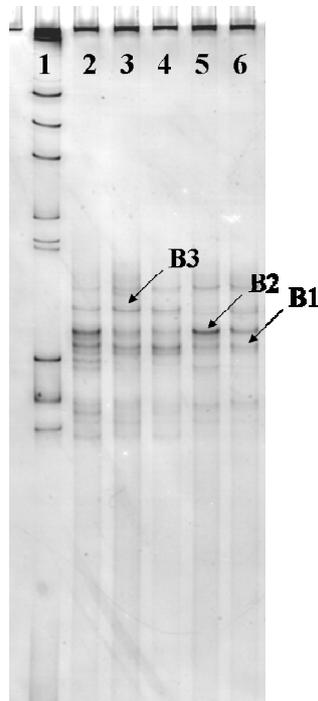


Figura 13. Análisis mediante SSCP de la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr de los hongos MA que colonizan las raíces de genista (calle 2), lavanda (calle 3), mejorana (calle 4), romero (calle 5), tomillo (calle 6). La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + Hind III. B1, B2 y B3 indican la posición de las tres bandas cortadas para su posterior análisis.

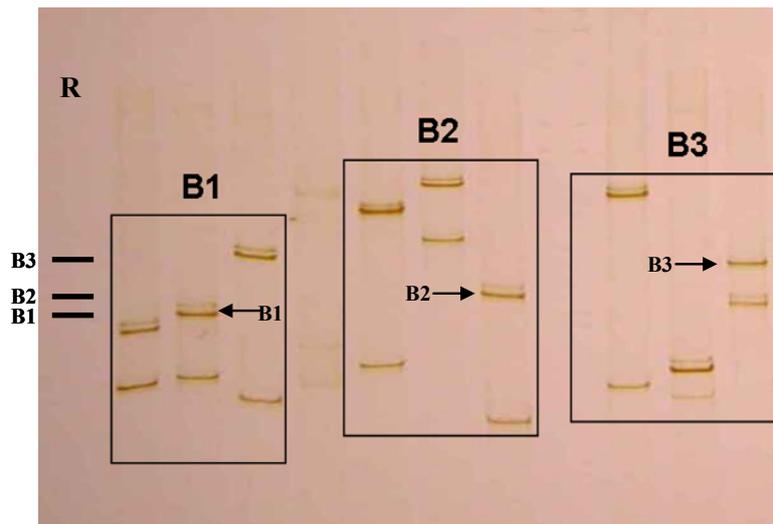


Figura 14. Análisis mediante SSCP del amplicón NS31/AM1 de tres clones procedentes del ADN recuperado de cada una de las tres bandas cortadas del gel de SSCP mostrado en la Figura 13. En la calle R se han dibujado las bandas cortadas B1, B2 y B3 respetando la posición de éstas en el gel original.

En la Figura 14 se observa que de los tres clones analizados de cada una de las bandas de ADN cortadas, tan sólo uno migraba a la posición esperada (clon 2 para la banda B1, clon 3 para la banda B2 y clon 3 para la banda B3). Esto indicó, por tanto, que las bandas detectadas en el gel de SSCP resultante del análisis de los amplicones obtenidos de las raíces no eran producidas por una sola secuencia sino por una mezcla de secuencias, lo que hace inviable la aplicación de esta técnica para la investigación propuesta.

1.3. Análisis de diversidad de hongos MA mediante construcción y análisis de genotecas

Es evidente que las técnicas de *fingerprinting* ensayadas muestran considerables limitaciones para su aplicación, debidas tanto a la dificultad para extraer material genético de buena calidad de las muestras naturales, como a la escasa resolución electroforética de las diferentes moléculas de ADN presentes en los productos de PCR. Por ello, se consideró que la aplicación de estas técnicas para alcanzar los objetivos propuestos conllevaría una subestimación de la diversidad de hongos MA. Por tanto, se decidió construir genotecas, que serían analizadas mediante un proceso de selección de los diferentes tipos de clones presentes para secuenciar al menos un clon de cada uno de estos tipos de clones definidos, minimizando así la pérdida de información. Concretamente, se utilizaron las técnicas de *fingerprinting* TTGE y SSCP, ensayadas anteriormente, para el proceso de selección de clones.

El fragmento de ADN clonado fue el amplicón generado al amplificar con los oligonucleótidos NS31/AM1 el producto de PCR resultante de la amplificación del ADN genómico de las raíces con los oligonucleótidos universales NS31/NS41.

Con el fin de evaluar cual de las dos técnicas ensayadas, el TTGE o el SSCP, ofrecía una imagen más realista de las diferencias existentes entre las secuencias de los clones estudiados, se secuenciaron y analizaron mediante geles de SSCP y TTGE 18 clones de la genoteca construida a partir de una muestra de raíz de genista, utilizada como modelo.

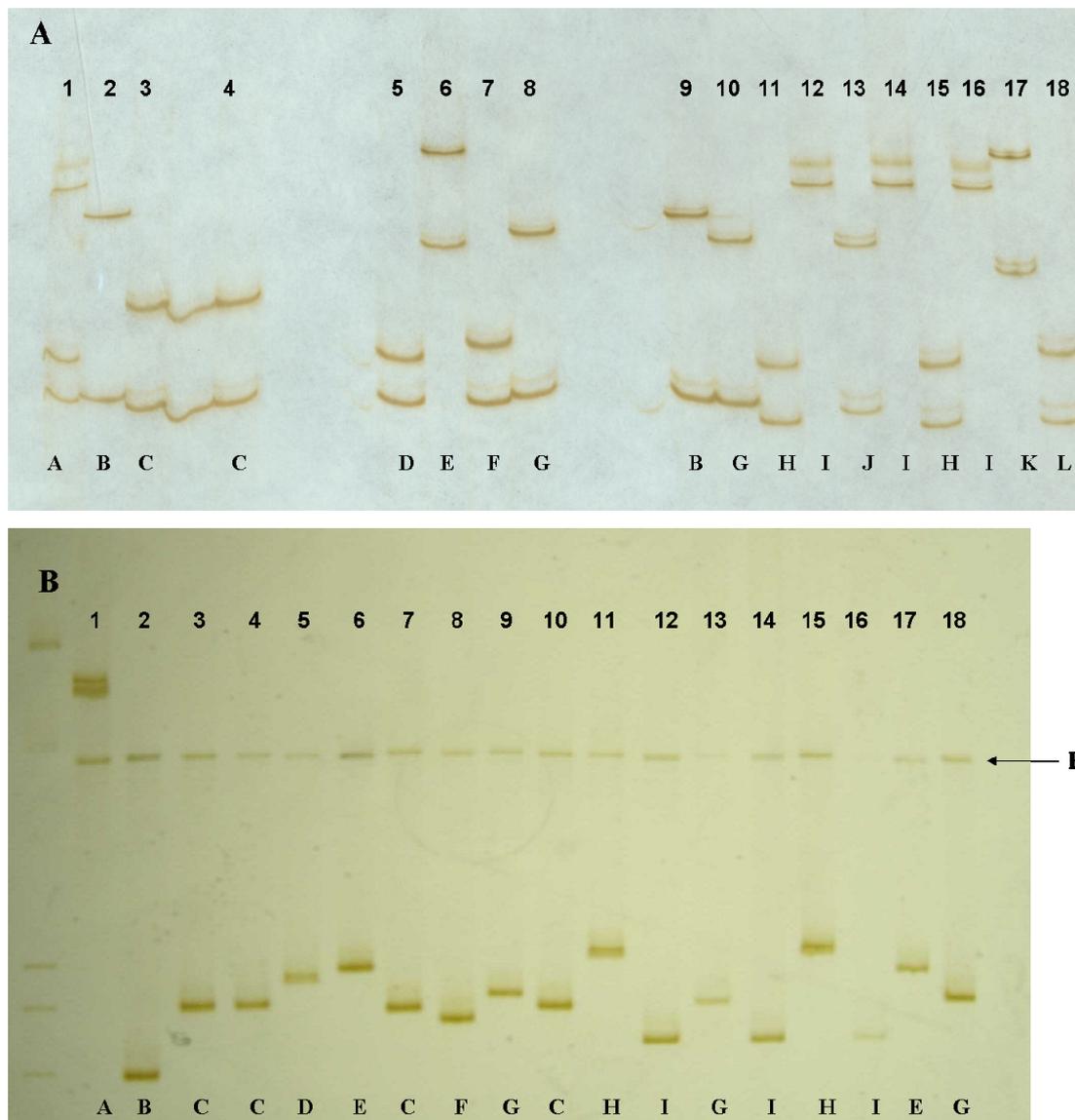


Figura 15. Análisis de la genoteca construida con la región NS31/AM1 del gen 18S ADN_r de los hongos MA que colonizan las raíces de genista. (A) Análisis mediante SSCP. El ADN plasmídico de 18 colonias de *E. coli* se amplificó con los cebadores NS31/AM1 y los productos de PCR tras ser desnaturalizados se separaron electroforéticamente en un gel 0.6X MDE durante 16 h a 4 W. (B) Análisis mediante TTGE. El ADN plasmídico de 18 colonias de *E. coli* se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos Glo1/NS31GC. Los productos de PCR se separaron en gradiente temporal de temperatura en un gel de poliacrilamida al 8% a 130 V durante 7 h (52°C-59°C). La banda P que aparece en el gel de TTGE corresponde a un artefacto producido por efecto de los oligonucleótidos usados. Los clones están numerados del 1 al 18 según la calle que ocupan en el gel y los diferentes patrones de bandas se han clasificado por letras para cada uno de los geles.

Resultados

El análisis mediante SSCP de los 18 clones seleccionados permitió distinguir un total de 12 patrones de clones diferentes (Figura 15A: A-L), mientras que el análisis mediante TTGE distinguió tan sólo 9 (Figura 15B: A-G).

Tabla 3. Porcentaje de identidad entre las secuencias correspondientes a los diferentes clones analizados. Las secuencias corresponden a la región NS31/AMI del gen 18S ADNr de los hongos MA que colonizan las raíces de genista.

Clon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	ID	82.9	83.5	83.7	84.7	80.8	83.3	84.1	83.1	84.3	85.1	80.0	82.8	79.6	84.7	79.4	80.1	82.7	
2		ID	97.1	97.3	92.4	85.7	98.1	92.6	99.3	92.8	92.8	86.9	91.2	86.5	92.4	86.3	85.7	96.1	
3			ID	99.7	92.4	86.1	97.5	92.2	97.7	92.4	92.8	88.5	90.8	88.1	92.4	87.9	85.1	98.1	
4				ID	92.6	86.3	97.7	92.4	97.9	92.6	93.0	88.7	91.0	88.3	92.6	88.1	85.3	98.3	
5					ID	86.3	93.2	95.9	93.0	96.3	98.5	84.6	94.6	84.2	98.1	84.2	85.3	92.2	
6						ID	86.5	86.9	86.3	87.3	86.5	87.1	85.7	86.7	86.1	86.5	96.5	85.3	
7							ID	93.2	98.7	93.4	93.4	87.3	91.8	86.9	93.0	86.7	85.5	96.5	
8								ID	93.2	99.5	96.9	85.1	97.7	84.6	96.5	84.4	86.3	91.8	
9									ID	93.4	93.4	87.3	91.8	86.9	93.0	86.7	85.7	96.7	
10										ID	97.3	85.1	98.1	84.6	96.9	84.4	86.7	92.0	
11											ID	85.5	95.7	85.1	99.5	84.8	86.1	92.6	
12												ID	84.2	84.2	85.1	99.3	86.1	87.7	
13													ID	83.8	95.5	83.6	84.9	90.4	
14														ID	84.6	98.9	85.7	87.3	
15															ID	84.4	85.7	92.2	
16																ID	84.4	85.5	87.1
17																	ID	85.5	84.3
18																			ID

Se presentan en negrita las identidades > 99%.

La comparación de las secuencias obtenidas para los 18 clones analizados con las presentes en las bases de datos del NCBI mostró que todas ellas, con la excepción de la de las correspondientes a los clones 1, 6 y 17, presentaban la mayor homología con secuencias de hongos MA. El porcentaje de identidad entre las secuencias de los 18 clones secuenciados se muestra en la Tabla 3. Las secuencias con porcentajes de identidad mayores del 99% fueron consideradas como secuencias iguales. Por tanto, se concluyó que de los 18 clones analizados 12 eran diferentes.

En la Tabla 4 se indica la fidelidad con la que los patrones de bandas definidos a partir de los geles correspondientes a las técnicas SSCP y TTGE se ajustan a las relaciones existentes entre las secuencias obtenidas. En el caso del SSCP, los 12 patrones de bandas definidos a partir del gel se confirmaron analizando las secuencias correspondientes. En el caso de la técnica TTGE, los resultaron no fueron tan buenos y de los 9 patrones de bandas definidos sólo se confirmó que eran correctos 4 de ellos.

Tabla 4. Correspondencia entre los índices de identidad de las secuencias correspondientes a los 18 clones analizados y los patrones de bandas definidos a partir de los geles de SSCP y TTGE.

Patrón de bandas	SSCP	TTGE	Clones iguales en base a su secuencia
A	1	1	1
B	2, 9	2	2, 9
C	3, 4	3, 4, 7, 10	3, 4
D	5	5	5
E	6	6, 17	6
F	7	8	7
G	8, 10	9, 13, 18	8, 10
H	11, 15	11, 15	11, 15
I	12, 14, 16	12, 14, 16	12, 14, 16
J	13	-	13
K	17	-	17
L	18	-	18

Estos resultados mostraron que la técnica de SSCP refleja mejor las diferencias existentes entre los clones analizados. Por tanto, SSCP fue la técnica elegida en el proceso de selección de clones a secuenciar.

1.4. Metodología seleccionada para el análisis molecular de la diversidad de hongos MA

De acuerdo con lo que antecede, se concluyó que la construcción de genotecas y posterior análisis de los clones mediante SSCP era la metodología que aportaba los mejores resultados para analizar la diversidad de hongos MA en las muestras objeto de estudio. En la Figura 16 se sintetiza la metodología seleccionada y las diferentes etapas que la componen.

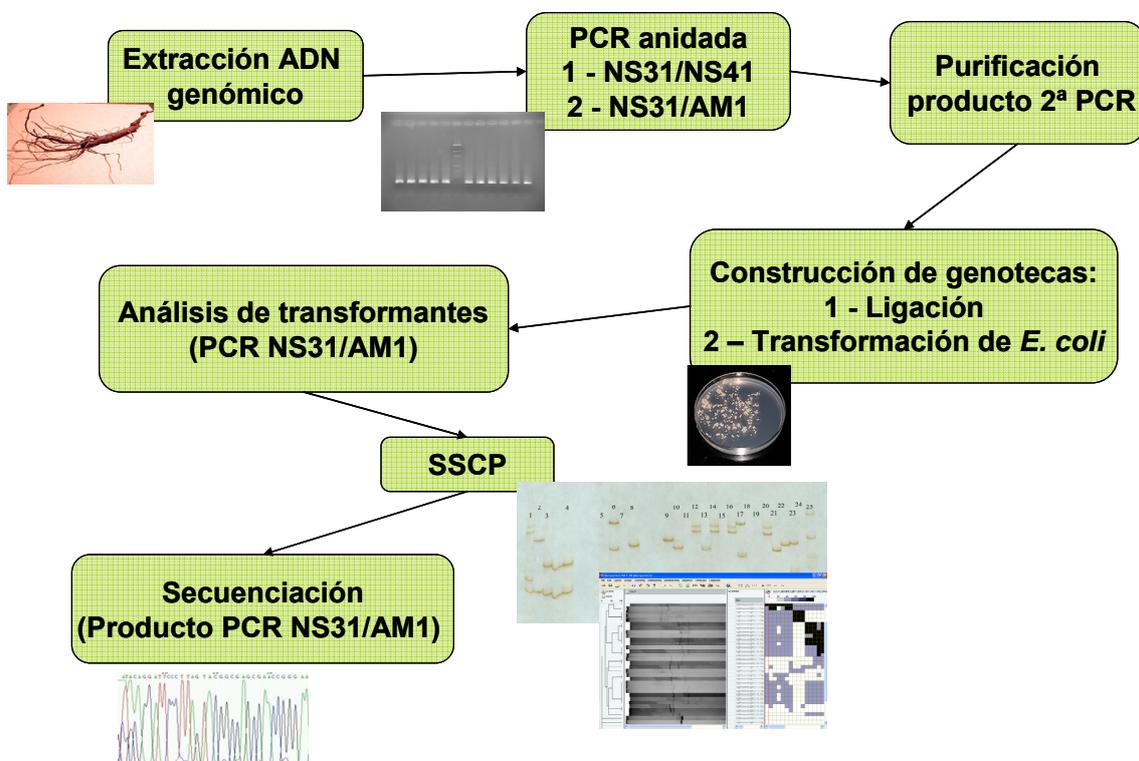


Figura 16. Esquema de la metodología seleccionada tras la fase de optimización.

2. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD DE HONGOS MA PRESENTE EN LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS SELECCIONADAS

Una vez definidas las metodologías de elección se procedió a analizar la diversidad de hongos MA presente en las raíces de las plantas seleccionadas dentro de la comunidad de romeral-tomillar del Parque Natural *Sierra de Baza*. Como se indicó anteriormente, las plantas elegidas fueron genista, lavanda, mejorana, romero y tomillo. Para realizar este análisis se llevó a cabo un muestreo en el mes de mayo de 2004 en el que se extrajeron raíces de las cinco especies de plantas seleccionadas.

2.1. Colonización micorrícica

Todas las raíces analizadas presentaron estructuras de tipo *Arum*, con presencia de arbuscúlos, hifas y vesículas característicos. Los porcentajes de colonización micorrícica, determinados como se describe en el apartado 2.1.1 del Capítulo de Material y Métodos, se muestran en la Tabla 5. Como puede apreciarse los valores obtenidos fueron relativamente elevados y similares entre sí.

Tabla 5. Porcentaje de micorrización observado en la raíz de las plantas objeto de estudio.

Planta	Porcentaje de micorrización (M)
Genista	63
Lavanda	55
Mejorana	67
Romero	52
Tomillo	50

2.2. Amplificación del ADN por PCR y clonación de los amplicones generados

La PCR anidada con los oligonucleótidos NS31/AM1 del amplicón resultante de la amplificación del ADN genómico procedente de las raíces de genista, lavanda,

Resultados

mejorana, romero y tomillo con los oligonucleóticos NS31/NS41 produjo una banda de unos 550 pb (Figura 17).

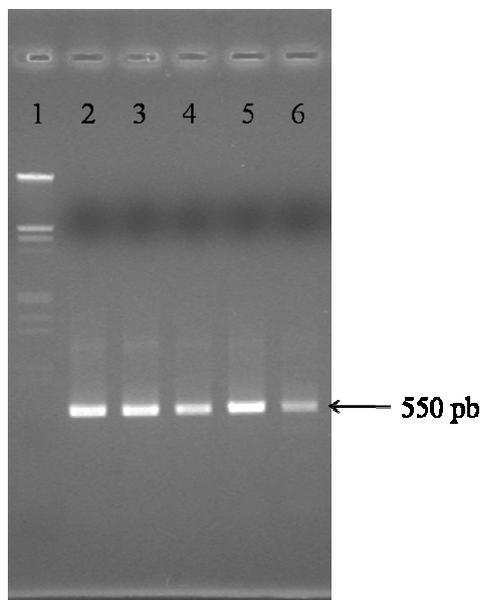


Figura 17. Gel de agarosa al 1.2% de la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr de raíces de genista (calle 2), lavanda (calle 3), mejorana (calle 4), romero (calle 5) y tomillo (calle 6). La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular de ADN Lambda DNA/EcoRI + Hind III.

Estas bandas de ADN, tras ser purificadas, fueron clonadas en el vector comercial *pCR®2.1*. De esta manera se obtuvieron genotecas correspondientes a la región NS31/AM1 de la subunidad 18S ADNr de los hongos MA que colonizan las raíces de las 5 plantas objeto de estudio.

2.3. Análisis de las genotecas y secuenciación de los clones seleccionados

La identificación de los hongos MA que colonizan las raíces requería de la secuenciación de los clones presentes en las genotecas generadas. Sin embargo, con el fin de secuenciar el mínimo número de clones, en primer lugar se procedió a identificar los clones que tenían insertos con secuencias iguales. Concretamente, y de acuerdo con lo descrito en el apartado 1.4. del sub-Capítulo 1 de Resultados, se analizaron mediante SSCP los insertos correspondientes a 50 clones de cada una de las genotecas.

Cada uno de estos clones generó un patrón de bandas complejo consistente en dos bandas mayoritarias, correspondientes a las dos hebras desnaturalizadas del ADN de doble cadena, junto con algunas bandas adicionales asociadas a éstas, correspondientes a las diferentes conformaciones que puede presentar el ADN de cadena sencilla. No obstante, cada clon presentó un patrón de bandas característico y las bandas adicionales, que se evidenciaron también en ensayos posteriores, no dificultaron la interpretación de los datos.

Los 250 clones analizados se compararon y se agruparon, mediante análisis informático de las imágenes correspondientes a los geles de SSCP obtenidos. En la Figura 18 se presentan los diferentes patrones de bandas obtenidos para cada una de las plantas. Como puede observarse, se detectaron 17 patrones de bandas diferentes en las raíces de genista, 15 en las de lavanda y mejorana, 21 en las de romero y 19 en las de tomillo. Algunos de los patrones de bandas se presentaban en las raíces de varias plantas, como el del clon R2 que estaba presente en las raíces de romero y tomillo, e incluso algunos en las de todas las plantas, como es el caso del clon G1.

De los 250 clones analizados se identificaron 51 patrones de bandas o clones diferentes. Posteriormente se secuenció al menos un clon correspondiente a cada uno de ellos.

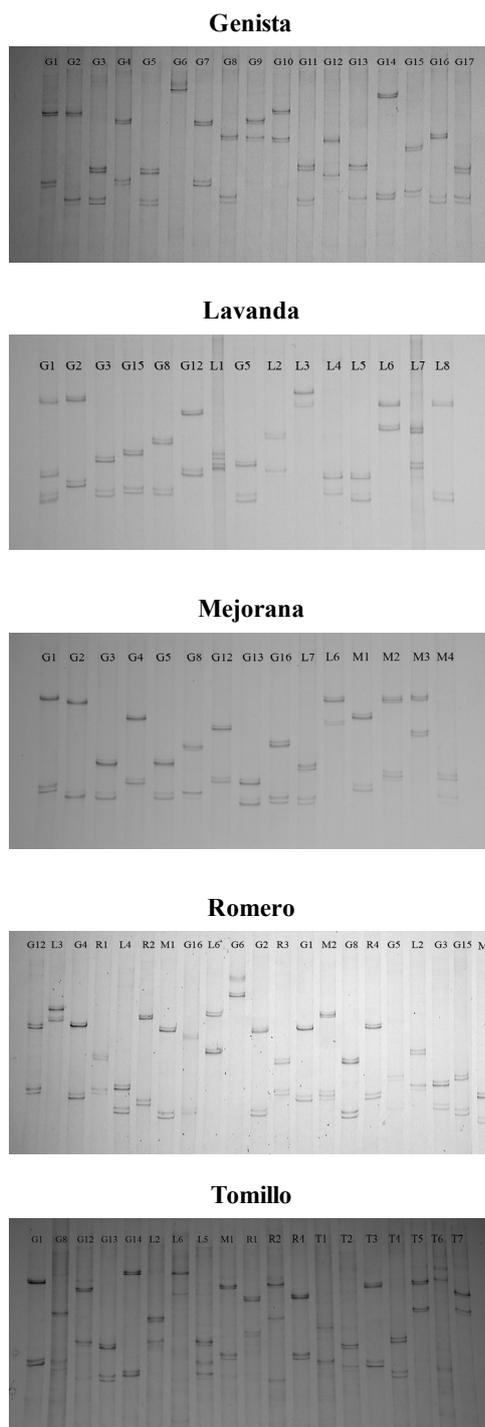


Figura 18. Análisis mediante SSCP de los clones obtenidos de las raíces de genista, lavanda, mejorana, romero y tomillo. El ADN plasmídico se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos NS31/AM1. Los geles de SSCP se corrieron a 4 W durante 16 h con una temperatura constante de 20°C. Los diferentes tipos de clones se nombraron asignando la primera letra de la planta en que fue detectado cada tipo de clon por primera vez y un número que indica el orden en que éste fue detectado.

2.4. Análisis de las secuencias nucleotídicas

2.4.1. Comparación con las secuencias presentes en la base de datos

La comparación de las secuencias obtenidas con las existentes en las bases de datos mostró que tan sólo 40 de ellas presentaron la mayor homología (96-100% identidad) con secuencias correspondientes a la región NS31/AM1 de la subunidad 18S ADNr de diferentes hongos MA (Tabla 6). Las 11 secuencias restantes presentaron la mayor homología con secuencias de los genes ribosómicos de otros tipos de organismos, fundamentalmente, hongos del phylum Ascomycota como *Tetracladium sp.*, *Helminthosporium solani* y *Phoma sp.*, por lo que fueron consideradas secuencias contaminantes. Además, de las 40 secuencias correspondientes a hongos MA, tres de ellas se descartaron para posteriores análisis. Estas fueron las correspondientes a los clones G6, L3 y M3, ya que resultaron ser secuencias quiméricas o artificiales que se crean espontáneamente a partir de diferentes fragmentos de otras secuencias.

Una alta proporción de las secuencias obtenidas no mostraron homología con secuencias correspondientes a aislados de hongos MA definidos morfológicamente con anterioridad, por lo que no pudieron ser asignadas a especies de hongos MA conocidas.

Resultados

Tabla 6. Abundancia absoluta de los diferentes tipos de clones identificados y homología de las secuencias obtenidas con las presentes en las bases de datos.

Tipo de secuencia ¹	Planta hospedadora (Número de clones) ²	Organismo (No. acceso) ³	Homología (%)
G1	<i>G.c.</i> (2) <i>L.l.</i> (1) <i>T.m.</i> (10) <i>R.o.</i> (1) <i>T.z.</i> (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123426)	99
G2	<i>G.c.</i> (4) <i>L.l.</i> (1) <i>T.m.</i> (4) <i>R.o.</i> (4)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
G3	<i>G.c.</i> (3) <i>L.l.</i> (1) <i>T.m.</i> (2) <i>R.o.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ085238)	98
G4	<i>G.c.</i> (4) <i>T.m.</i> (3) <i>R.o.</i> (2)	<i>Glomus sp.</i> (AY129625)	99
G5	<i>G.c.</i> (4) <i>L.l.</i> (6) <i>T.m.</i> (1) <i>R.o.</i> (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99
G6*	<i>G.c.</i> (7) <i>R.o.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AJ563864)	98
G7	<i>G.c.</i> (4)	<i>Glomus sp.</i> (AJ854089)	99
G8	<i>G.c.</i> (1) <i>L.l.</i> (2) <i>T.m.</i> (3) <i>R.o.</i> (4) <i>T.z.</i> (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
G9	<i>G.c.</i> (1)	<i>Glomus sp.</i> (AJ496097)	98
G10	<i>G.c.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123426)	99
G11	<i>G.c.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99
G12	<i>G.c.</i> (1) <i>L.l.</i> (1) <i>T.m.</i> (1) <i>R.o.</i> (6) <i>T.z.</i> (1)	<i>Glomus sp.</i> (AJ496095)	98
G13	<i>G.c.</i> (1) <i>T.m.</i> (1) <i>T.z.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	100
G14	<i>G.c.</i> (1) <i>T.z.</i> (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
G15	<i>G.c.</i> (1) <i>L.l.</i> (2) <i>R.o.</i> (1) <i>T.z.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123426)	98
G16	<i>G.c.</i> (7) <i>T.m.</i> (3) <i>R.o.</i> (3)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
G17	<i>G.c.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99
L1	<i>L.l.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	98
L2	<i>L.l.</i> (1) <i>R.o.</i> (3) <i>T.z.</i> (3)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ085238)	97
L3*	<i>L.l.</i> (1) <i>T.m.</i> (2) <i>R.o.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ085180)	98
L4	<i>L.l.</i> (1) <i>T.m.</i> (1) <i>R.o.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ396718)	98
L5	<i>L.l.</i> (2) <i>T.z.</i> (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99
L6	<i>L.l.</i> (2) <i>T.m.</i> (1) <i>R.o.</i> (1) <i>T.z.</i> (1)	<i>Glomus sp.</i> (AJ496097)	97
L7	<i>L.l.</i> (1)	<i>Glomus sp.</i> (AJ496097)	99
L8	<i>L.l.</i> (3)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
M1	<i>T.m.</i> (2) <i>R.o.</i> (1) <i>T.z.</i> (11)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ164827)	98
M2	<i>T.m.</i> (8) <i>R.o.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123426)	100
M3*	<i>T.m.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ164815)	98
M4	<i>T.m.</i> (1) <i>R.o.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99
R1	<i>R.o.</i> (2) <i>T.z.</i> (1)	<i>Glomus sp.</i> (AJ418893)	99
R2	<i>R.o.</i> (2) <i>T.z.</i> (2)	<i>Glomus sp.</i> (AJ854089)	98
R3	<i>R.o.</i> (1)	<i>Glomus sp.</i> (AJ418893)	99
R4	<i>R.o.</i> (1) <i>T.z.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF177590)	97
T1	<i>T.z.</i> (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99
T2	<i>T.z.</i> (3)	<i>Glomus sp.</i> (AF074353)	99
T3	<i>T.z.</i> (1)	<i>Glomus etunicatum-like</i> (Y17644)	99
T4	<i>T.z.</i> (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AY330273)	97
T5	<i>T.z.</i> (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123426)	99
T6	<i>T.z.</i> (1)	Uncultured <i>Diversispora</i> (EU123388)	96
T7	<i>T.z.</i> (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99

¹Los nombres indicadores de los clones hacen referencia a la planta en la que fueron identificados por primera vez y el orden en que fueron detectados.

²El número entre paréntesis indica el número de clones de cada tipo de secuencia detectado en cada planta. *G.c.* = Genista; *L.l.* = Lavanda; *T.m.* = Mejorana; *R.o.* = Romero; *T.z.* = Tomillo.

³En esta columna se presentan los organismos de la base de datos cuya secuencia presenta la mayor homología con cada tipo de secuencia obtenido. Entre paréntesis se presentan los números de acceso de las secuencias de estos organismos. Se mantiene la terminología en inglés de las secuencias procedentes de la base de datos para respetar sus nombres originales.

*Secuencias quiméricas.

2.4.2. Análisis de la homología entre las secuencias de hongos MA obtenidas

Todas las secuencias de hongos MA obtenidas fueron alineadas y comparadas entre sí con el programa informático *Bioedit*, como se indica en el Capítulo de Material y Métodos. Se establecieron porcentajes de homología entre todas ellas mediante una matriz similar a la presentada en la Tabla 3 del sub-Capítulo 1 de Resultados, que debido a su extensión no se reproduce en la presente Memoria de Tesis. A modo de resumen indicar que los porcentajes de homología entre las diferentes secuencias oscilaban entre el 89 y el 99%, que más del 60% de las secuencias presentaban una homología mayor del 99% con al menos una de las demás secuencias, y que más del 80% presentó una homología superior al 97% con al menos una de las otras secuencias.

2.4.3. Análisis filogenético de las secuencias de hongos MA obtenidas

A partir de las secuencias de hongos MA obtenidas se procedió a establecer sus relaciones filogenéticas con secuencias correspondientes a la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr de otros hongos MA depositadas en las bases de datos.

En las Figuras 19 y 20 se muestran los árboles filogenéticos, obtenidos con los métodos de *Neighbour-Joining* y *Maximum Parsimony*, en los que se incluyen las 37 secuencias pertenecientes a hongos MA obtenidas en este estudio. Principalmente, se observó que en ambos árboles filogenéticos las secuencias obtenidas en este estudio se distribuían claramente en grupos de secuencias filogenéticamente homogéneas.

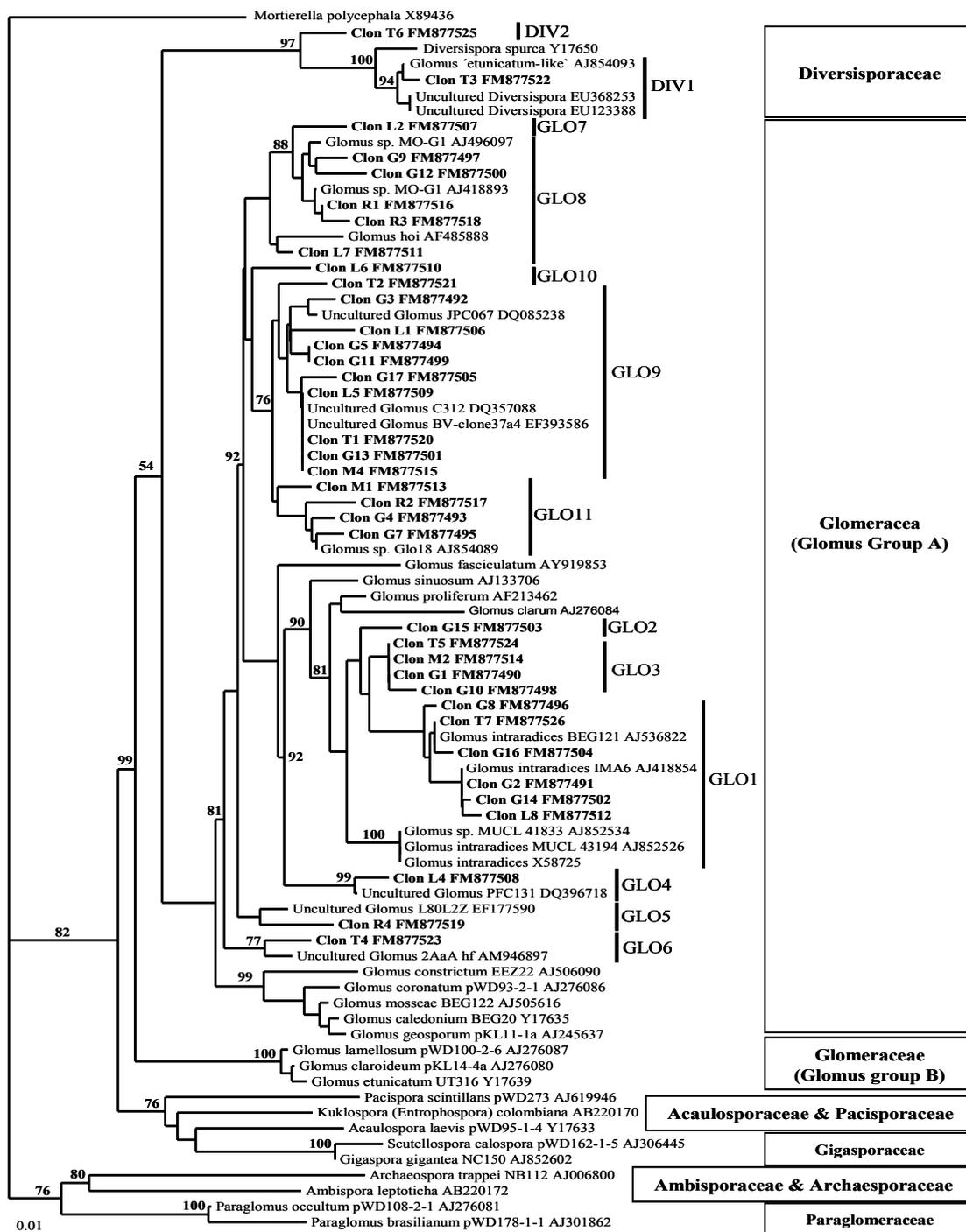


Figura 19. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hongos MA obtenidas en este estudio y secuencias de referencia del phylum Glomeromycota procedentes de la base de datos. El árbol se construyó usando el método *Neighbour-Joining*. La secuencia de *Mortierella polycephala* fue usada para enraizar el árbol. Los números sobre las ramas del árbol indican los valores de *bootstrap* cuando se realizan 100 repeticiones. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrita y van acompañadas de su número de acceso en la base de datos. La escala situada abajo a la izquierda es proporcional a la longitud de las ramas del árbol.



Figura 20. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hongos MA obtenidas en este estudio y secuencias de referencia del phylum Glomeromycota procedentes de la base de datos. El árbol se construyó usando el método *Maximum Parsimony*. La secuencia de *Mortierella polycephala* fue usada para enraizar el árbol. Los números sobre las ramas del árbol indican los valores de *bootstrap* cuando se realizan 100 repeticiones. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrita y van acompañadas de su número de acceso en la base de datos. La escala situada abajo a la izquierda es proporcional a la longitud de las ramas del árbol.

2.4.4. Definición y análisis de filotipos

La alta homología existente entre determinadas secuencias de las obtenidas en este estudio, así como la distribución de las mismas en grupos filogenéticamente homogéneos, puede ser consecuencia de polimorfismos genéticos que existen en los hongos MA (Sanders *et al.*, 1995), consistentes en variaciones puntuales en las secuencias correspondientes a los individuos de una misma población. Por tanto, para evitar que se produjeran sobreestimaciones en los estudios de diversidad llevados a cabo, se decidió agrupar estas secuencias, tan estrechamente relacionadas, en diferentes grupos de *filotipos* o *tipos de secuencia*. En este caso, y teniendo en cuenta los criterios establecidos que se citan con anterioridad en el apartado 3.4. del Capítulo de Material y Métodos, se definieron un total de 13 filotipos de hongos MA nombrados como GLO1, GLO2, GLO3, GLO4, GLO5, GLO6, GLO7, GLO8, GLO9, GLO10, GLO11, DIV1 y DIV2, de los cuales los 11 primeros pertenecen a la familia *Glomeraceae* y los dos últimos a la familia *Diversisporaceae* (Figuras 19 y 20).

De los 13 filotipos definidos, los 11 pertenecientes a la familia *Glomeraceae* englobaban el 95% de las secuencias obtenidas (35 de 37) mientras que los dos filotipos pertenecientes a la familia *Diversisporaceae* incluían tan sólo el 5% de las secuencias identificadas (2 de 37) (Tabla 6). Tal y como se mostró anteriormente a nivel de secuencias, tan sólo dos de los filotipos definidos pudieron ser relacionados con especies de hongos MA descritas previamente mediante criterios morfológicos. Concretamente, el filotipo GLO1 que se identificó como *G. intraradices* y el filotipo DIV1 que presentó altos valores de homología con la secuencia obtenida a partir de esporas de *G. etunicatum-like*, un hongo perteneciente a la familia *Diversisporaceae* y con una alta similitud morfológica con esporas de *G. etunicatum* (Schwarzott *et al.*, 2001) (Tabla 7).

Tabla 7. Correspondencia de los filotipos definidos con secuencias de las bases de datos.

Filotipo	Secuencias más relacionadas	Homología (%)
GLO1	<i>Glomus intraradices</i>	99
GLO2	Uncultured <i>Glomus</i>	98
GLO3	Uncultured <i>Glomus</i>	99
GLO4	Uncultured <i>Glomus</i>	99
GLO5	Uncultured <i>Glomus</i>	97
GLO6	Uncultured <i>Glomus</i>	97
GLO7	Uncultured <i>Glomus</i>	97
GLO8	<i>Glomus sp.</i>	99
GLO9	Uncultured <i>Glomus</i>	99
GLO10	<i>Glomus sp.</i>	99
GLO11	Uncultured <i>Glomus</i>	98
DIV1	<i>Glomus etunicatum-like</i>	99
DIV2	Uncultured <i>Diversispora</i>	96

Se mantiene la terminología en inglés de las secuencias procedentes de la base de datos para respetar sus nombres originales.

2.5. Análisis de la diversidad de hongos MA presentes en las raíces

Una vez definidos los diferentes tipos de secuencias o filotipos, y antes de proceder a realizar los análisis de diversidad propiamente dichos, se determinó si el número de clones analizados, 50 por planta, permitía estimar adecuadamente la diversidad de hongos MA presente en las raíces de las cinco especies vegetales muestreadas. Para ello se realizaron las curvas de esfuerzo o rarefacción para cada una de las plantas analizadas (Figura 21).

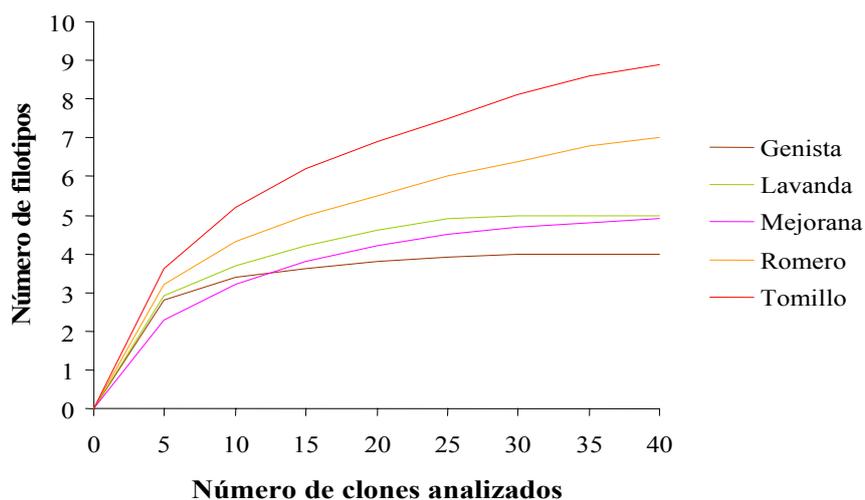


Figura 21. Curvas de rarefacción de las genotecas analizadas, procedentes de las raíces de genista, lavanda, mejorana, romero y tomillo.

Resultados

Todas las curvas de esfuerzo realizadas se estabilizaron antes de alcanzar el número total de clones analizados. En el caso de genista y lavanda el análisis de 25 clones hubiese sido suficiente para detectar el número de filotipos encontrados en su raíz. Sin embargo, en el caso del romero, mejorana y tomillo, las curvas se estabilizaron aproximadamente en los 40 clones analizados. Estos datos permiten concluir que el análisis de 50 clones por planta llevado a cabo fue suficiente para no subestimar la diversidad presente en las muestras estudiadas.

2.5.1. Equidad y riqueza específica de filotipos

Para analizar la diversidad presente en las muestras se calcularon los índices de diversidad de Shannon-Wiener y de riqueza específica para cada una de las plantas muestreadas a partir de los 13 filotipos de hongos MA definidos. Los niveles más altos de equidad se encontraron en las raíces de tomillo, seguidos de los obtenidos para las raíces de romero, genista y mejorana. Las raíces de lavanda fueron las que presentaron los índices de equidad más bajos. Los valores del índice de riqueza específica también resultaron más altos en tomillo y más bajos en genista y mejorana (Tabla 8).

Tabla 8. Índice de diversidad de Shannon-Wiener y riqueza específica para cada una de las plantas estudiadas.

	Riqueza específica (S)	Índice de Shannon-Wiener (H')
Genista	6	1.50
Lavanda	7	1.35
Mejorana	6	1.43
Romero	9	1.86
Tomillo	12	2.12

2.5.2. Abundancia relativa de filotipos

Teniendo en cuenta el número total de secuencias de hongos MA obtenidas para cada una de las muestras analizadas, se calculó la abundancia relativa de los diferentes filotipos para cada una de las plantas objeto de estudio y para el total de ellas. Se encontró que de los 13 filotipos definidos, GLO1 resultó ser el filotipo mayoritario, englobando el 24% del total de las secuencias obtenidas. Por el contrario, los filotipos GLO4, GLO5, GLO6, GLO10, DIV1 y DIV2 representaron aproximadamente el 5% de

los clones. Algunos filotipos, concretamente GLO1, GLO3, GLO8 y GLO9, fueron detectados en todas las plantas muestreadas. Sin embargo, otros sólo se presentaban en determinadas plantas, como es el caso de GLO6, GLO10, DIV1 y DIV2 que fueron detectados exclusivamente en las muestras correspondientes a tomillo (Figura 22).

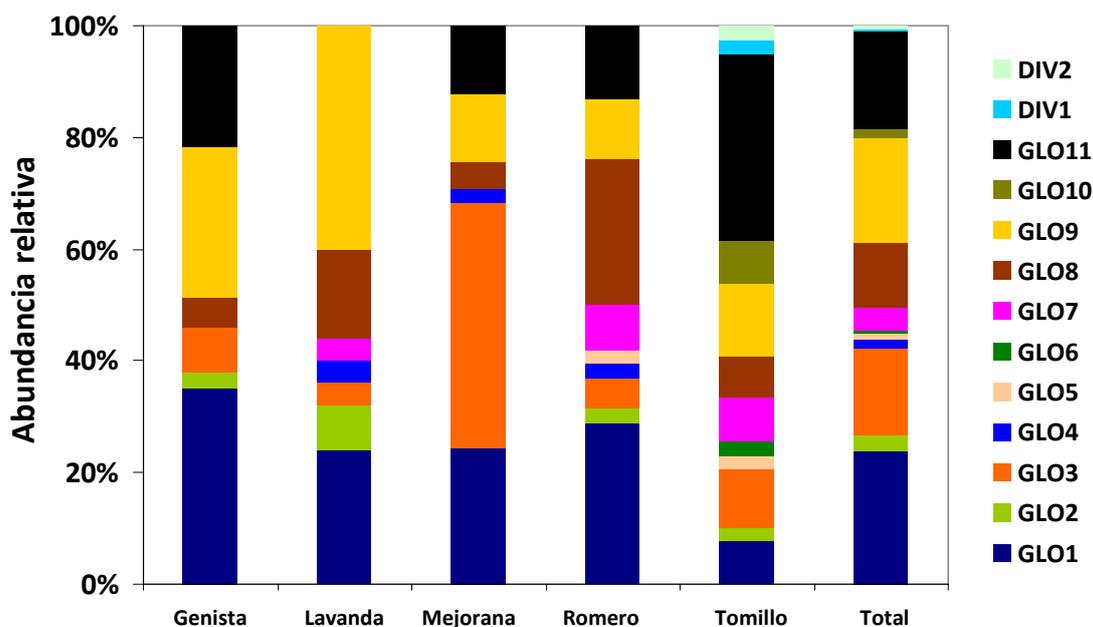


Figura 22. Abundancia relativa de los filotipos presentes en las raíces de genista, lavanda, mejorana, romero, tomillo y en el total de las muestras.

2.6. Análisis comparativo de la influencia de la planta sobre las comunidades de hongos MA

Las comunidades de hongos MA presentes en cada una de las plantas objeto de estudio se compararon mediante un análisis de componentes principales (ACP), que permitió sintetizar la información obtenida y agrupar las diferentes variables en dos ejes o componentes que explicaban el 84.3% de la varianza. Como variables se utilizaron los valores de los diferentes índices de diversidad utilizados y las proporciones de los filotipos definidos para cada una de las plantas estudiadas (Figura 23).

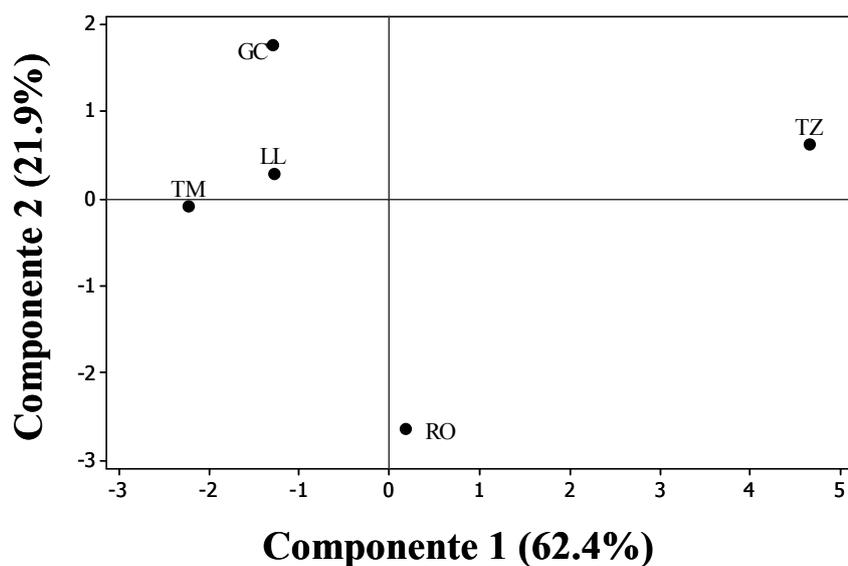


Figura 23. Análisis de componentes principales (ACP) de las comunidades de hongos MA encontradas en las cinco plantas objeto de estudio. G.c. = Genista; L.l. = Lavanda; T.m. = Mejorana; R.o. = Romero; T.z. = Tomillo. El número entre paréntesis indica el porcentaje de varianza explicado por las componentes definidas.

Como se muestra en la Figura 23 las comunidades de hongos MA presentes en las raíces de genista, lavanda y mejorana no difieren significativamente entre ellas. Sin embargo, las plantas de romero y tomillo están representadas por puntos distantes en el diagrama, lo que indica que albergan una comunidad de hongos MA diferente.

3. DINÁMICA TEMPORAL DE LA COMUNIDAD DE HONGOS MA QUE COLONIZAN LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS SELECCIONADAS

Los ensayos descritos en el sub-Capítulo 2 demuestran la factibilidad y aplicabilidad de las técnicas moleculares propuestas en el sub-Capítulo 1 para analizar la diversidad de hongos MA que colonizan las raíces de plantas crecidas en condiciones naturales. Concretamente, se han analizado y determinado los filotipos de hongos MA presentes en las raíces de las plantas objeto de estudio en un momento definido de su ciclo de vida, que coincide con el de máximo crecimiento de las raíces. Logrados estos objetivos, se consideró que el siguiente paso de esta investigación debería ser el estudio de la dinámica temporal en la composición de la comunidad de hongos MA que colonizan las plantas objeto de estudio. En efecto, el proceso de micorrización es dinámico en el tiempo y las poblaciones de hongos colonizadores pueden cambiar tanto cuantitativamente como cualitativamente. Averiguar esa dinámica es precisamente el objetivo de las investigaciones que se presentan en este sub-capítulo.

Dada la complejidad del diseño experimental, basado en tres muestreos anuales y análisis de 50 clones/muestra, se seleccionaron para este estudio las dos plantas que presentaron valores más altos en los índices de diversidad en los ensayos descritos en el sub-Capítulo 2 de Resultados, es decir, romero y tomillo. Los muestreos se llevaron a cabo en los meses de mayo, septiembre y enero, que son meses con marcadas diferencias de las condiciones ambientales, lo cual se refleja en diferentes estados fenológicos en las plantas. Lógicamente, para cumplir los objetivos de este sub-capítulo se utilizaron las herramientas moleculares desarrolladas previamente y que fueron usadas con éxito en el sub-capítulo anterior.

3.1. Filotipos de hongos MA presentes en las raíces

3.1.1. Construcción y análisis de genotecas

Los productos de la PCR anidada, obtenidos tras la amplificación del ADN genómico de cada una de las muestras (raíces de romero y tomillo muestreadas en campo en los meses de mayo y septiembre de 2004 y en enero de 2005), fueron clonados en el vector *pCR®2.1*. Las 6 genotecas generadas se analizaron, al igual que en el sub-capítulo anterior, mediante análisis por SSCP de la secuencia correspondiente a la región NS31/AM1 del gen 18S ADN_r insertada en los diferentes clones.

Este análisis permitió la identificación de 63 patrones de bandas distintos, lo que representaría la existencia de 63 tipos de clones diferentes entre los 300 clones analizados (50 de cada genoteca). Del total de tipos de clones definidos, 43 estaban presentes en las muestras correspondientes a romero y 48 en las de tomillo. Debido al gran número de geles realizados para analizar los 300 clones (18 geles), se decidió no mostrarlos en la presente Memoria de Tesis. Sirvan como ejemplo los que se presentaron en el sub-capítulo anterior.

La secuenciación de los diferentes tipos de clones identificados generó un total de 63 secuencias. La comparación de estas secuencias con las presentes en las bases de datos mostró que 43 de éstas presentaban la mayor homología con secuencias correspondientes a la región NS31/AM1 del gen 18S ADN_r de diferentes hongos MA (Tabla 9). Las 20 secuencias restantes mostraron la mayor homología con secuencias correspondientes al gen 18S ADN_r de otros organismos y, por tanto, fueron consideradas secuencias contaminantes. En este caso, no se detectó ninguna secuencia quimérica.

Tabla 9. Abundancia absoluta de los diferentes tipos de clones identificados y homología de las secuencias obtenidas con las presentes en las bases de datos.

Tipo de secuencia ¹	Planta hospedadora (Número de clones) ²	Organismo (No. acceso) ³	Homología (%)
ST1	T.z.2 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909669)	98
ST2A	R.o.1 (1) R.o.2 (1) R.o.3 (3) T.z.1 (11) T.z.2 (5) T.z.3 (6)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ164827)	98
ST2B	R.o.1 (2) R.o.2 (1) R.o.3 (1) T.z.1 (2) T.z.3 (1)	<i>Glomus</i> sp. (AJ418893)	99
ST3	R.o.1 (2) R.o.2 (1) T.z.1 (3) T.z.2 (1) T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123426)	99
ST4	R.o.2 (1) T.z.2 (1) T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946806)	98
ST5	T.z.3 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909674)	97
ST6	R.o.1 (3) R.o.2 (3) R.o.3 (2)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
ST7	R.o.1 (1) R.o.3 (1) T.z.1 (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
ST8	R.o.2 (4) R.o.3 (2) T.z.3 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU573773)	99
ST9A	R.o.1 (4) R.o.2 (1) R.o.3 (1)	<i>Glomus</i> sp. (AJ496095)	98
ST9B	R.o.1 (4) R.o.2 (2) R.o.3 (1) T.z.1 (2) T.z.2 (1)	<i>Glomus</i> sp. (AJ854089)	98
ST10	R.o.1 (1) R.o.3 (1) T.z.1 (1) T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF177590)	97
ST13A	R.o.1 (7) R.o.2 (7) R.o.3 (3) T.z.1 (1) T.z.2 (5) T.z.3 (3)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
ST14	R.o.2 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123433)	98
ST15	R.o.2 (3) R.o.3 (2) T.z.2 (2) T.z.3 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ388618)	99
ST16	T.z.1 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99
ST17A	R.o.1 (3) R.o.2 (3) T.z.1 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	100
ST18A	R.o.1 (1) R.o.2 (2) T.z.1 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ085238)	98
ST18B	R.o.1 (1) R.o.2 (1) R.o.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ396718)	98
ST18C	R.o.1 (1) T.z.1 (1) T.z.2 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU123426)	98
ST18D	T.z.1 (3)	<i>Glomus</i> sp. (AF074353)	99
ST18E	R.o.1 (3) R.o.3 (3) T.z.1 (3) T.z.2 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ085238)	97
ST19	T.z.1 (1)	<i>Glomus etunicatum-like</i> (Y17644)	99
ST21	R.o.2 (2) T.z.1 (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
ST23	R.o.2 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909669)	98
ST24	R.o.2 (1) T.z.1 (1) T.z.2 (6) T.z.3 (4)	Uncultured <i>Glomus</i> (EU573773)	98
ST25	T.z.3 (5)	<i>Glomus constrictum</i> (AJ506090)	98
ST26	T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909669)	97
ST29	R.o.2 (3) T.z.2 (3) T.z.3 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909670)	97
ST30	R.o.3 (1)	<i>Glomus</i> sp. (EU518489)	98
ST31	R.o.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946832)	99
ST32	T.z.1 (1)	Uncultured <i>Diversispora</i> (EU123388)	96
ST33	T.z.1 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AY330273)	97
ST35	T.z.2 (1)	<i>Glomus</i> sp. (EU518487)	99
ST36	R.o.3 (1) T.z.2 (1) T.z.3 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946802)	99
ST38A	R.o.1 (3) R.o.3 (2)	<i>Glomus</i> sp. (AJ418893)	99
ST54	R.o.1 (1) R.o.2 (1) T.z.1 (1)	<i>Glomus</i> sp. (AJ496097)	97
ST56	T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909669)	97
ST58	T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946802)	97
ST61	T.z.2 (1) T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946802)	98
ST64	R.o.3 (1) T.z.3 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946802)	98
ST65	T.z.3 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909669)	99
ST66	R.o.1 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (EF393586)	99

¹La numeración en los nombres indicadores de los clones hacen referencia al orden en que fueron detectados.

²El número entre paréntesis indica el número de clones de cada tipo de secuencia detectado en cada planta y tiempo. R.o.1 = Romero-mayo; R.o.2 = Romero-septiembre; R.o.3 = Romero-enero; T.z.1 = Tomillo-mayo; T.z.2 = Tomillo-septiembre; T.z.3 = Tomillo-enero.

³En esta columna se presentan los organismos de la base de datos cuya secuencia presenta la mayor homología con cada tipo de secuencia obtenido. Entre paréntesis se presentan los números de acceso de las secuencias de estos organismos. Se mantiene la terminología en inglés de las secuencias procedentes de la base de datos para respetar sus nombres originales.

3.1.2. Definición de filotipos

Al igual que en el sub-capítulo anterior, se establecieron tipos de secuencias o filotipos que agrupasen las secuencias más relacionadas filogenéticamente y que presentasen una homología en su composición nucleotídica superior al 97%. Como se muestra en las Figuras 24 y 25, correspondientes a los árboles filogenéticos obtenidos usando los métodos del *Neighbour-Joining* y *Maximum Parsimony*, respectivamente, se definieron un total de 16 filotipos, distribuidos en las familias *Glomeraceae* (GLO1 a GLO14) y *Diversisporaceae* (DIV1 y DIV2).

Cabe destacar que, de nuevo en este caso, una alta proporción de estos filotipos no pudo asociarse a secuencias de hongos MA definidos morfológicamente ya que de los 16 filotipos establecidos, sólo tres de ellos están relacionados con secuencias de especies de hongos MA definidas por criterios morfológicos (esporas). Concretamente, GLO1 se corresponde con *G. intraradices*, GLO13 con *G. constrictum* y DIV1 con *G. etunicatum-like* (Schwarzott *et al.*, 2001). El resto de filotipos se identificaron, en su mayoría, con secuencias de hongos MA encontradas, en raíces, en estudios de diversidad similares al que aquí se presenta (Tabla 10).

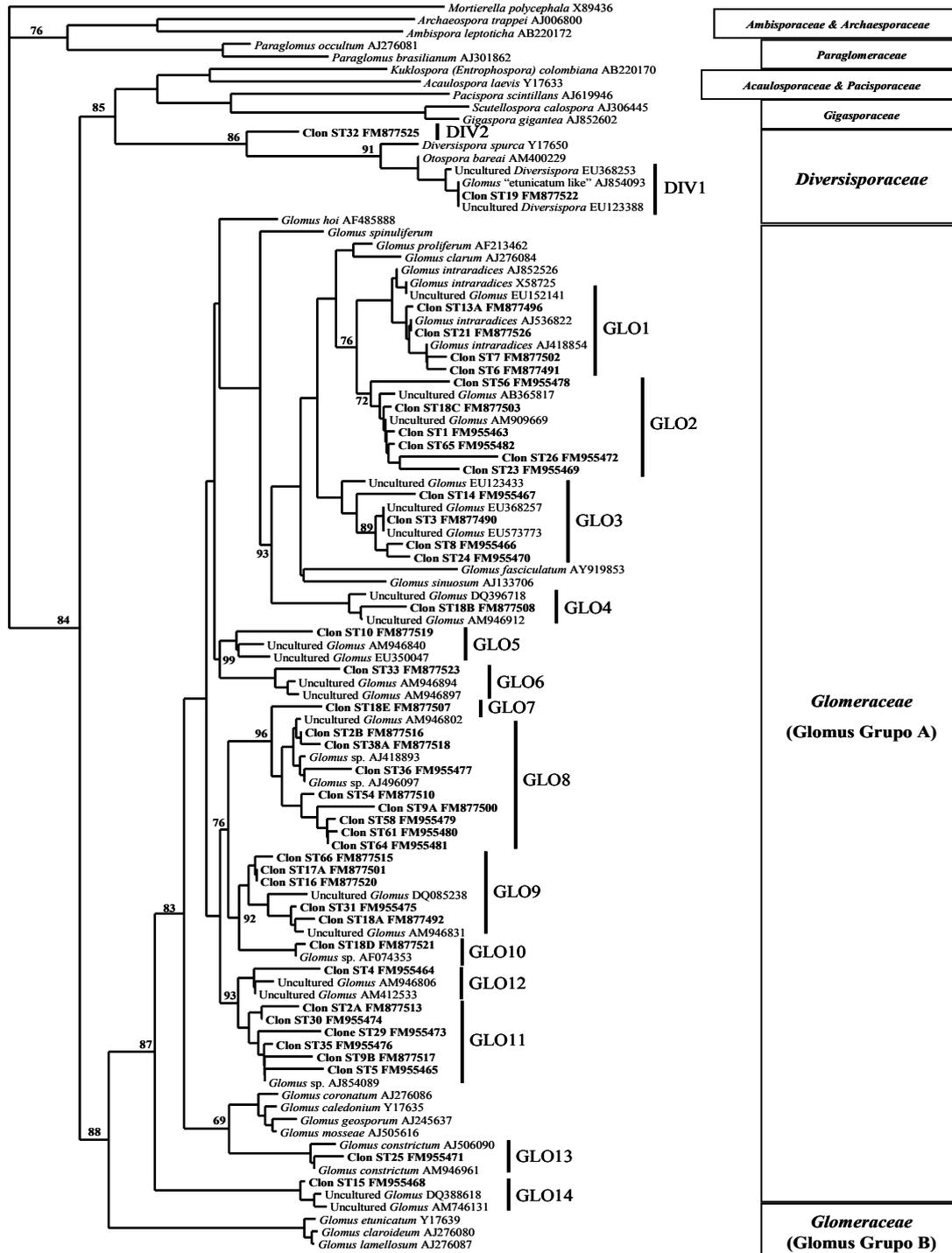


Figura 24. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hongos MA obtenidas en este estudio y secuencias de referencia del phylum Glomeromycota procedentes de la base de datos. El árbol se construyó usando el método *Neighbour-Joining*. La secuencia de *Mortierella polycephala* fue usada para enraizar el árbol. Los números sobre las ramas del árbol indican los valores de *bootstrap* cuando se realizan 100 repeticiones. Las secuencias obtenidas en este estudio están en **negrita** y van acompañadas de su número de acceso en la base de datos. La escala situada abajo a la izquierda es proporcional a la longitud de las ramas del árbol.

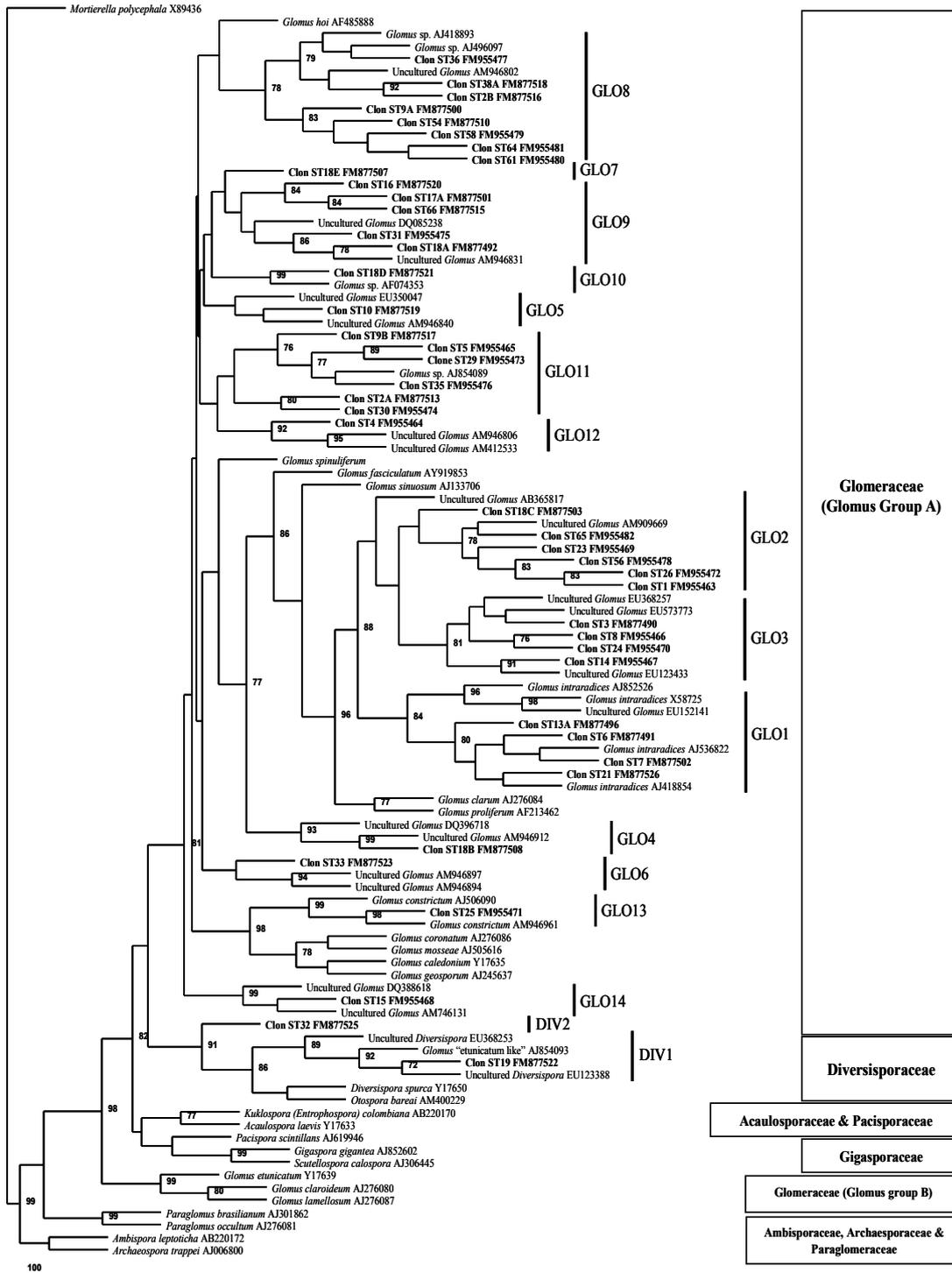


Figura 25. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hongos MA obtenidas en este estudio y secuencias de referencia del phylum Glomeromycota procedentes de la base de datos. El árbol se construyó usando el método *Maximum Parsimony*. La secuencia de *Mortierella polycephala* fue usada para enraizar el árbol. Los números sobre las ramas del árbol indican los valores de *bootstrap* cuando se realizan 100 repeticiones. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrita y van acompañadas de su número de acceso en la base de datos. La escala situada abajo a la izquierda es proporcional a la longitud de las ramas del árbol.

Tabla 10. Correspondencia de los filotipos definidos con secuencias de las bases de datos.

Filotipo	Secuencias más relacionadas	Homología (%)
GLO1	<i>Glomus intraradices</i>	99
GLO2	Uncultured <i>Glomus</i>	98
GLO3	Uncultured <i>Glomus</i>	99
GLO4	Uncultured <i>Glomus</i>	99
GLO5	Uncultured <i>Glomus</i>	97
GLO6	Uncultured <i>Glomus</i>	97
GLO7	Uncultured <i>Glomus</i>	97
GLO8	<i>Glomus sp.</i>	99
GLO9	Uncultured <i>Glomus</i>	99
GLO10	<i>Glomus sp.</i>	99
GLO11	Uncultured <i>Glomus</i>	98
GLO12	Uncultured <i>Glomus</i>	98
GLO13	<i>Glomus constrictum</i>	98
GLO14	Uncultured <i>Glomus</i>	99
DIV1	<i>Glomus etunicatum-like</i>	99
DIV2	Uncultured <i>Diversispora</i>	96

Se mantiene la terminología en inglés de las secuencias procedentes de la base de datos para respetar sus nombres originales.

3.2. Análisis de la estructura de las comunidades y dinámica temporal de los hongos MA

Como se muestra en las curvas de esfuerzo presentadas en la Figura 26, el análisis de 50 clones por muestra fue suficiente para cubrir la diversidad de hongos MA presente en las raíces de las dos plantas a los tres tiempos ensayados.

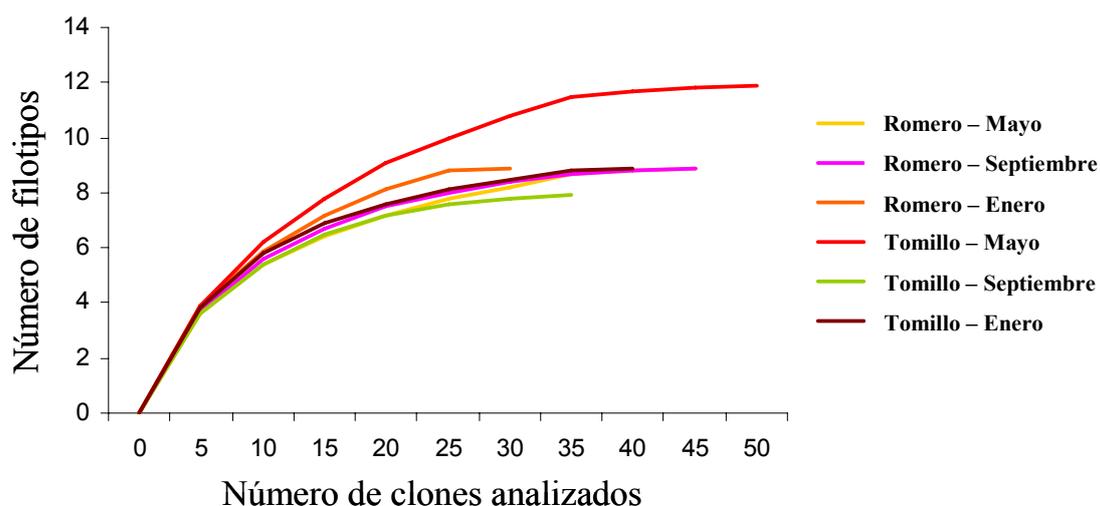


Figura 26. Curvas de rarefacción de las genotecas analizadas, procedentes de las raíces de romero y tomillo para los tres tiempos de muestreo.

3.2.1. Índices de equidad y riqueza específica

La riqueza específica de filotipos de hongos MA en romero fue constante en el tiempo, 9, igual a la encontrada en tomillo para el mes de enero. Sin embargo, la riqueza específica en tomillo si que varió a lo largo del año. Concretamente, en el muestreo correspondiente a mayo, fue 12 y en septiembre 8. Los valores correspondientes al índice de diversidad de Shannon-Wiener también mostraron algunas variaciones en la diversidad de hongos MA a lo largo del tiempo, que resultaron ser un poco más acusadas en el caso del tomillo que del romero (Tabla 11).

Tabla 11. Índice de diversidad de Shannon-Wiener y riqueza específica para cada una de las plantas estudiadas en los diferentes tiempos de muestreo.

		Riqueza específica (S)	Índice de Shannon-Wiener (H')
Romero	Mayo	9	1.86
	Septiembre	9	1.93
	Enero	9	1.98
Tomillo	Mayo	12	2.12
	Septiembre	8	1.84
	Enero	9	1.98

3.2.2. Abundancia relativa: influencia de la planta

La variación estacional en la composición de las comunidades de hongos MA presentes en las raíces de las plantas analizadas se evaluó comparando la abundancia relativa de los filotipos de hongos MA definidos previamente (Figura 27).

Como se muestra en la Figura 27, de los 11 filotipos definidos en romero, GLO1 y GLO8 presentaron dominancia sobre el resto de filotipos, ya que comprenden el 27 y el 18%, respectivamente, del total de las secuencias de hongos MA identificadas. En el caso del tomillo, los filotipos dominantes fueron GLO3 y GLO11, con una presencia del 16 y del 30%, respectivamente. Cuatro de los filotipos definidos (GLO1, GLO3, GLO8 y GLO11) pueden considerarse los más comunes ya que fueron detectados en ambas plantas y en todos los tiempos de muestreo. Los filotipos menos representados o minoritarios fueron GLO4, GLO5, GLO6, GLO10, GLO12, GLO13, DIV1 y DIV2, que

entre todos constituyen menos del 10% de los clones analizados. También se encontraron algunos filotipos exclusivos de cada una de las plantas muestreadas como el filotipo GLO4 que sólo fue detectado en romero, o los filotipos GLO6, GLO10, GLO13, DIV1 y DIV2 que se encontraron colonizando, exclusivamente, las raíces de tomillo.

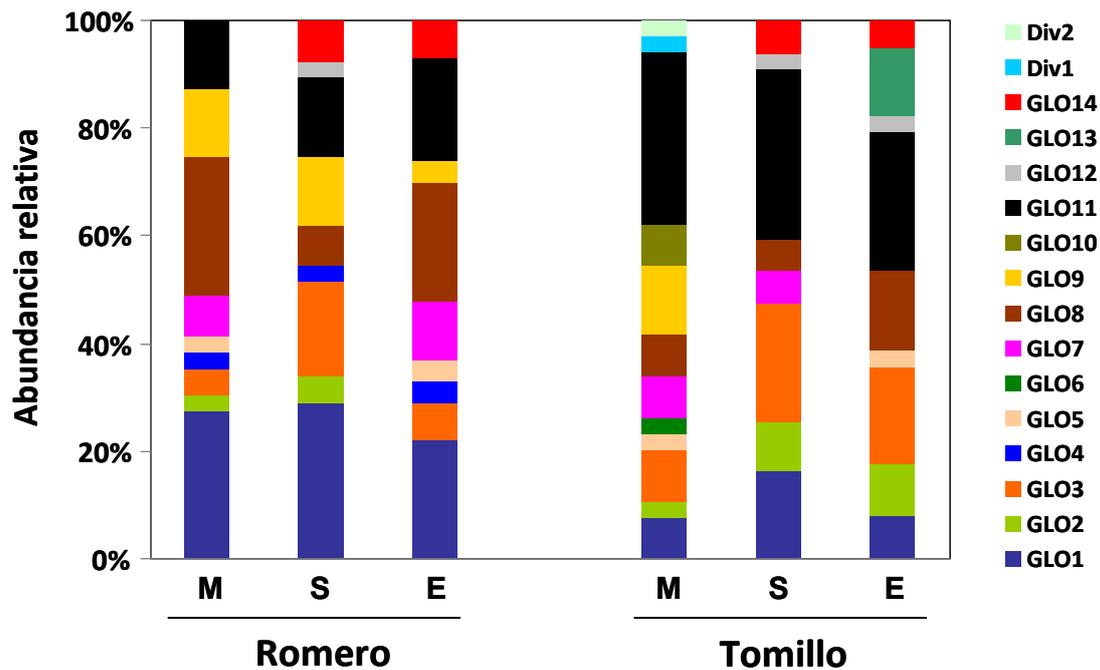


Figura 27. Abundancia relativa de los filotipos presentes en las raíces de romero y tomillo para cada uno de los tres tiempos analizados. M = mayo; S = septiembre; E = enero.

3.2.3. Abundancia absoluta: dinámica temporal

Con el fin de analizar de manera más detallada los cambios en la composición de la comunidad de hongos MA en las raíces de ambas plantas dependiendo del mes en que se realizaron los muestreos, se analizó la abundancia absoluta de los filotipos presentes en las raíces de romero y tomillo para cada uno de los tres tiempos analizados. En los muestreos de mayo y enero el tipo de secuencia dominante fue GLO11 (23% de las secuencias) para ambas plantas, mientras que en septiembre, la secuencia dominante fue GLO1 con el 24% de las secuencias analizadas. Algunos de los filotipos se detectaron bien en ninguna, una, o en las dos plantas dependiendo del mes en el que se realizó el

muestreo. Así, el filotipo GLO5 se encontró en las raíces de ambas plantas en los muestreos de mayo y enero, pero no en los de septiembre. El filotipo GLO12 se detectó en las raíces de las dos plantas analizadas en el muestreo de septiembre, en las de tomillo en el muestreo de enero, pero estaba ausente en las raíces, tanto de tomillo como de romero, en las muestras correspondientes a mayo. Así mismo, se observó que el filotipo GLO14 estaba presente en las raíces de ambas plantas en los muestreos de enero y septiembre, pero no en los de mayo (Figura 28).

Los filotipos que se encontraron específicamente en las raíces de las plantas de tomillo también presentaron una variación estacional. Así, los filotipos GLO6, GLO10 y los correspondientes a la familia *Diversisporaceae* (DIV1 y DIV2) sólo se detectaron en los muestreos correspondientes a mayo, mientras que el filotipo GLO13 sólo apareció en las muestras de enero.

3.2.4. Correlaciones entre filotipos

El análisis de correlaciones de Pearson puso de manifiesto la existencia de correlaciones positivas y negativas entre los valores de abundancia relativa de algunos filotipos. Se encontraron correlaciones positivas entre los filotipos GLO2, GLO3 y GLO12. Los filotipos GLO1 y GLO4 presentaron así mismo una correlación positiva. También se encontraron correlaciones negativas entre la abundancia relativa de algunos filotipos como GLO1 con GLO11, GLO4 con GLO11 o GLO12 con GLO7 (Tabla 12).

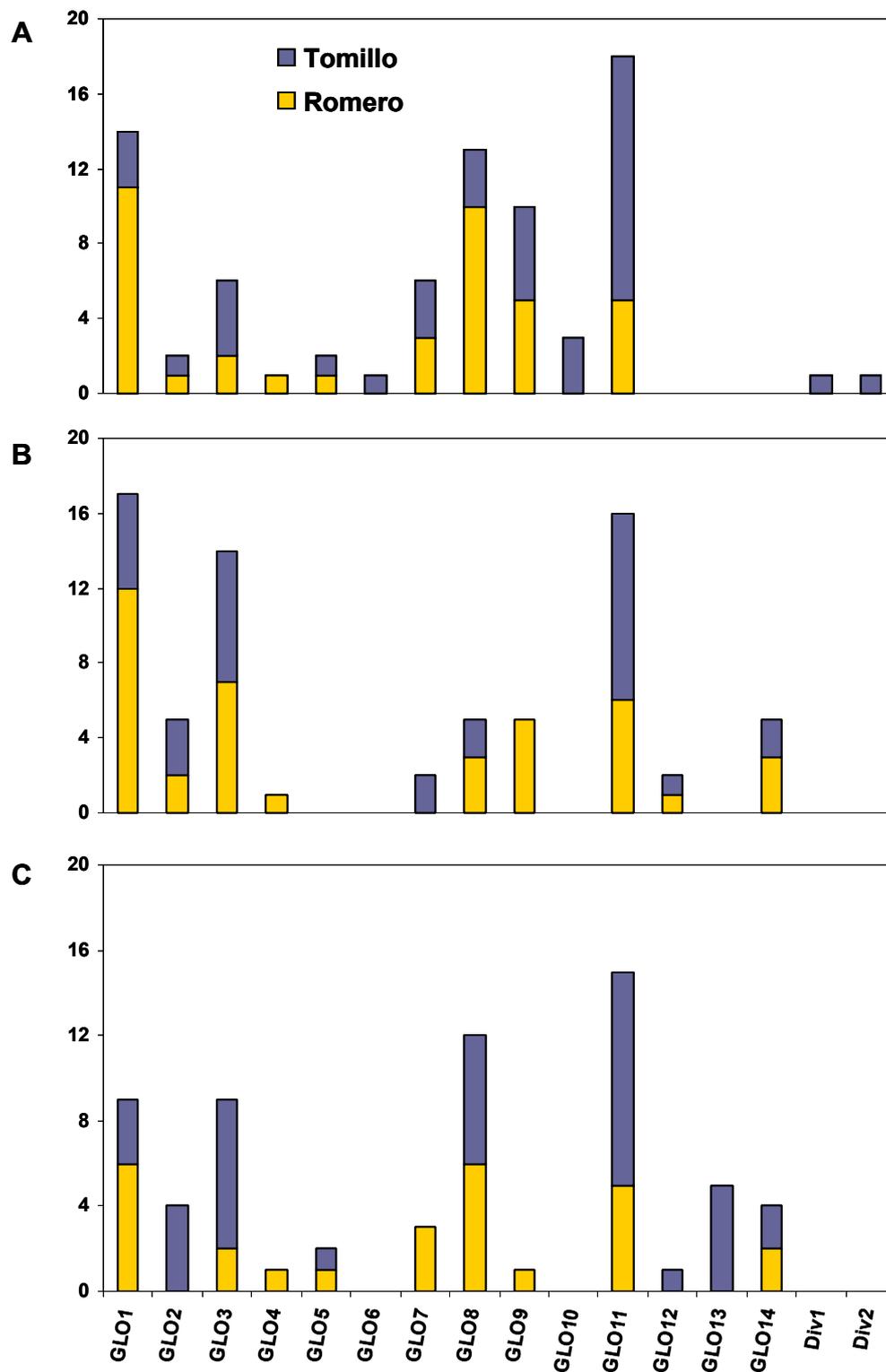


Figura 28. Abundancia absoluta de los filotipos presentes en las raíces de romero y tomillo para cada uno de los tres tiempos analizados. A = Mayo; B = Septiembre; C = Enero.

Tabla 12. Análisis de correlación de Pearson para los valores de abundancia relativa de los filotipos de hongos MA y de los índices de diversidad.

	GL02	GL03	GL04	GL05	GL07	GL08	GL09	GL011	GL012	GL014	S	H'	PC1	PC2
GL01	-0.42	-0.25	0.84*	-0.27	0.05	0.36	0.46	-0.08	-0.89*	0.27	-0.44	-0.58	-0.47	-0.72
GL02		0.85*	-0.73	-0.51	-0.72	-0.50	-0.57	0.85*	0.42	0.21	-0.38	-0.31	-0.46	0.82*
GL03			-0.56	-0.78	-0.71	-0.78	-0.51	0.95**	0.42	0.56	-0.40	-0.26	-0.50	0.83*
GL04				0.21	0.30	0.63	0.37	-0.39	-0.87*	0.27	-0.26	-0.24	-0.26	-0.90*
GL05					0.52	0.71	0.02	-0.74	-0.07	-0.44	0.40	0.49	0.48	-0.44
GL07						0.44	0.10	-0.84*	0.05	-0.38	0.23	0.11	0.46	-0.57
GL08							0.09	-0.59	-0.65	-0.27	-0.18	-0.20	-0.08	-0.81
GL09								-0.47	-0.41	-0.47	0.55	0.25	0.47	-0.45
GL011									0.15	0.63	-0.56	-0.38	-0.68	0.69
GL012										-0.17	0.39	0.44	0.45	0.78
GL014											-0.61	-0.28	-0.70	0.15
S												0.89*	0.96**	0.09
H'													0.82*	0.19
PC1														0.00

*Valores significativos.

S = Riqueza específica; H' = Índice de Shannon-Wiener.

3.3. Influencia de las variables planta y tiempo sobre las comunidades de hongos MA

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se encontraron diferencias significativas en la abundancia relativa de algunos filotipos que se pueden atribuir a las variables *planta* y *tiempo de muestreo* (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis de varianza de Fisher de los valores de abundancia relativa de los diferentes filotipos y los índices de diversidad en función de los factores *planta* y *tiempo*.

Filotipos e índices de diversidad*	Planta		Tiempo de muestreo	
	F	P-value	F	P-value
GLO1	19.9	0.01	0.25	0.80
GLO2	3.16	0.10	0.41	0.69
GLO3	1.54	0.28	2.93	0.20
GLO4	100	0.00	0.03	0.97
GLO5	0.05	0.84	43.0	0.00
GLO6	1.00	0.37	1.00	0.47
GLO7	0.17	0.70	0.48	0.66
GLO8	2.18	0.21	1.24	0.40
GLO9	1.16	0.34	1.98	0.28
GLO10	1.00	0.37	1.00	0.47
GLO11	27.6	0.00	0.00	0.99
GLO12	0.50	0.52	3.00	0.19
GLO13	1.00	0.37	1.00	0.47
GLO14	0.18	0.69	21.5	0.02
DIV1	1.00	0.37	1.00	0.47
DIV2	1.00	0.37	1.00	0.47
S	0.31	0.60	1.30	0.39
H	0.42	0.56	0.53	0.63

* Valores significativos al nivel 0.05.

Resultados

La abundancia relativa de los filotipos GLO1, GLO4 y GLO11 resultó significativamente afectada por la variable *planta hospedadora*, mientras que en el caso de GLO5 y GLO14 fue la variable *tiempo de muestreo* la que afectó significativamente la distribución de estos filotipos en las diferentes plantas hospedadoras. No se encontraron efectos significativos de las variables *planta* y *tiempo de muestreo* sobre los valores de los índices de diversidad utilizados en el presente estudio.

Como en el sub-Capítulo 2, se llevó a cabo un análisis de componentes principales o ACP para integrar toda la información obtenida en una sola gráfica. Los valores que integran cada una de estas componentes principales son valores referidos a la abundancia relativa de los diferentes filotipos definidos en este estudio y a los índices de diversidad aplicados. Los dos primeros componentes explican el 75.5% de la varianza de los datos (CP1: 43.7%, CP2: 31.8%). Los valores de riqueza específica y del índice de Shannon-Wiener se correlacionan significativa y positivamente con la componente 1. La componente 2 se correlaciona, principalmente y de forma positiva, con los valores de abundancia relativa de los filotipos GLO2, GLO3 y GLO4. La Figura 29 muestra la posición de cada muestra (*planta * tiempo de muestreo*) en el espacio definido por las componentes principales.

Como se muestra en esta figura las comunidades de hongos MA presentes en romero durante los meses de enero y mayo son muy similares, al igual que las comunidades correspondientes a los meses de enero y septiembre para tomillo. Sin embargo, las muestras correspondientes a septiembre en tomillo y a mayo en romero difieren significativamente del resto de muestras, lo que indica que en estas épocas y plantas hospedadoras se alberga una comunidad de hongos MA diferente.

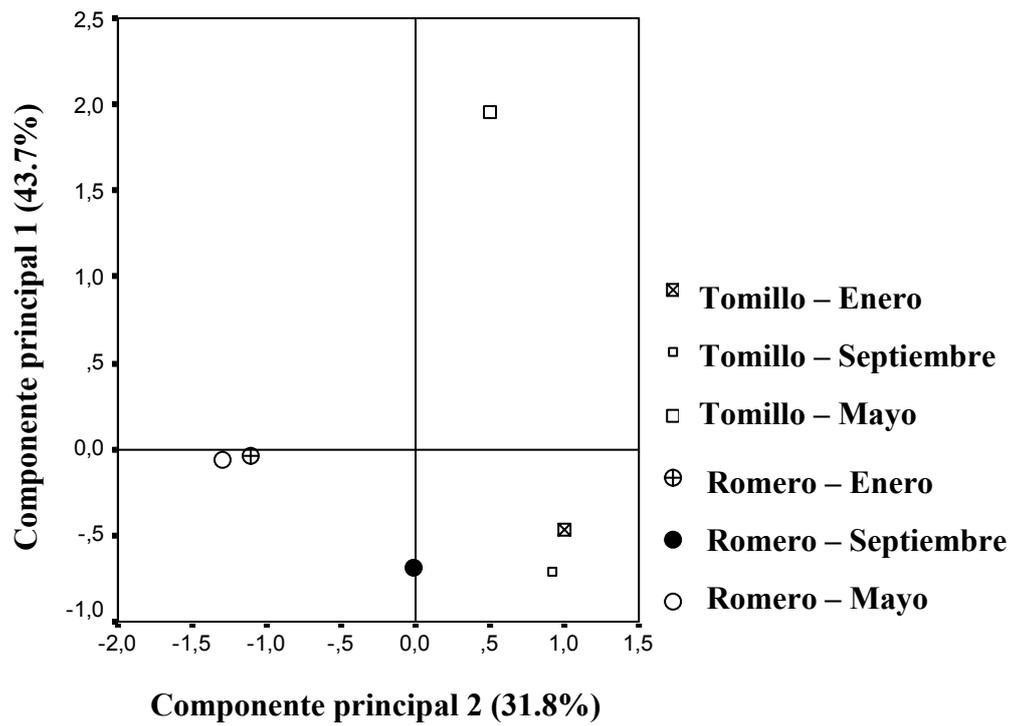


Figura 29. Análisis de componentes principales (ACP) de las comunidades de hongos MA encontradas en las dos plantas objeto de estudio en los muestreos correspondientes a enero, mayo y septiembre. El número entre paréntesis indica el porcentaje de varianza explicado por las componentes definidas.

4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS COMUNIDADES DE HONGOS MA PRESENTES EN LA RAÍZ Y EN EL SUELO MICORRIZOSFÉRICO ASOCIADO

Como se ha mostrado en los dos sub-capítulos anteriores, una alta proporción de las secuencias de hongos MA detectadas en las raíces de las plantas investigadas no se corresponde con ninguna de las secuencias obtenidas con anterioridad mediante el análisis molecular de esporas de estos hongos. Con el fin de tratar de entender el por qué de esta disparidad, se decidió analizar la dinámica espacio-temporal de las comunidades de hongos MA presentes en la zona objeto de estudio, utilizando sistemas controlados de mesocosmos. Se seleccionaron dos especies vegetales como plantas hospedadoras: romero y tomillo, y suelo natural como sustrato de crecimiento y única fuente de propágulos MA. Se decidió usar sistemas de mesocosmos ya que de esta forma se cerraba el sistema suelo-planta y, por tanto, permitía analizar la dinámica de las comunidades de hongos MA con mayor fiabilidad. Con la idea de analizar la dinámica interanual de las comunidades de hongos MA que colonizan las raíces desarrolladas en este sistemas de mesocosmos, se llevaron a cabo muestreos anuales durante dos años consecutivos.

4.1. Determinaciones de tipo morfológico: desarrollos micorrícicos y diversidad de hongos MA

4.1.1. Determinaciones en raíz: grado de micorrización

Puesto que los experimentos de mesocosmos se establecieron a partir de plantas no micorrizadas, para conocer el estado de desarrollo de la micorriza se determinó el grado de colonización micorrícica en ambas plantas y a los dos tiempos de muestreo considerados. Aunque los niveles de colonización micorrícica fueron ligeramente inferiores en las raíces de las plantas de romero del primer muestreo (47%), no hubo diferencias significativas en los porcentajes de micorrización de las raíces de las

diferentes muestras analizadas, observándose valores del 63-65% para las plantas de romero en el segundo año y para las de tomillo en ambos muestreos (Figura 30).

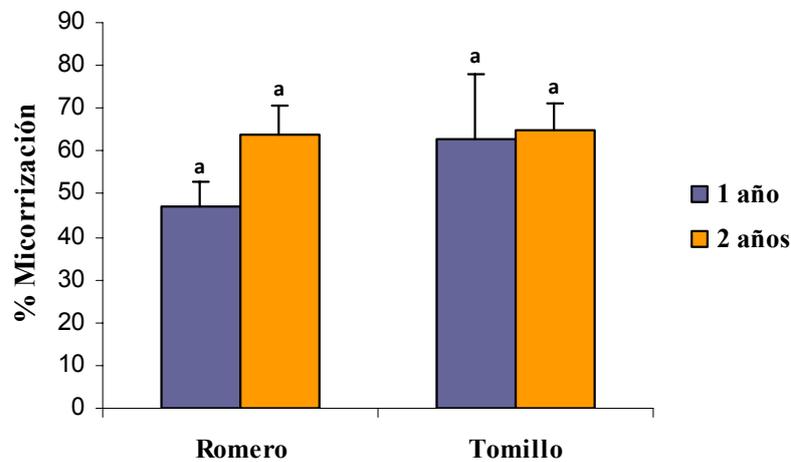


Figura 30. Grado de colonización micorrícica de las raíces de romero y tomillo tras uno y dos años del establecimiento de los sistemas de mesocosmos. Las barras representan el error estándar. Análisis de varianza realizado según el test LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Estos resultados confirmaron un desarrollo adecuado de la asociación simbiótica. Como se puede observar en la Figura 31, la colonización micorrícica se basó en el desarrollo de hifas intercelulares y arbuscúlos y por tanto podría clasificarse como tipo *Arum*, como ya se apuntó en el sub-Capítulo 2.

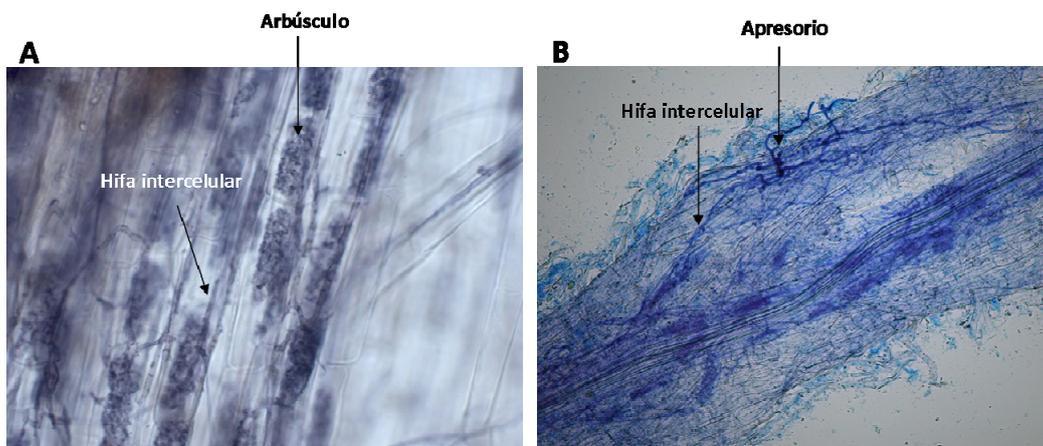


Figura 31. Raíces de romero (A) y tomillo (B) micorrizadas correspondientes al muestreo llevado a cabo a los dos años del establecimiento de los mesocosmos.

4.1.2. Determinaciones en suelo: propágulos MA

Para evaluar el desarrollo y diversidad de los hongos MA presentes en el suelo micorrizosférico asociado a las plantas hospedadoras se determinó, en los dos tiempos de muestreo, la longitud de micelio MA, la abundancia de esporas MA y la riqueza específica de morfotipos de esporas MA. Los resultados correspondientes a estas determinaciones se detallan a continuación.

4.1.2.1. Longitud de micelio MA

Se evidenció un aumento significativo en los valores de esta variable de respuesta en el segundo muestreo en el caso del romero. En el caso del tomillo, solo se apreció un pequeño incremento no significativo (Figura 32).

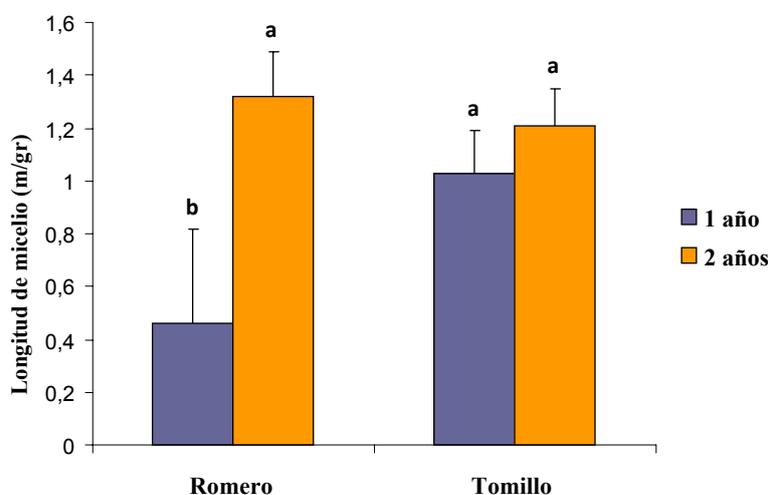


Figura 32. Longitud de micelio micorrícico correspondiente a las muestras de suelo tomadas en los mesocosmos de romero y tomillo según el tiempo de muestreo. Las barras representan el error estándar. Análisis de varianza realizado según el test LSD de Fisher ($p < 0.05$).

4.1.2.2. Abundancia de esporas MA y riqueza de morfotipos

Dado que las esporas de resistencia de los hongos MA son consideradas las estructuras naturales de dispersión y multiplicación del hongo, se determinó el número y

diversidad de estos propágulos que se iban generando a lo largo del tiempo. Se pretendía así mismo estudiar la correlación entre la diversidad de tipos de esporas encontrados en el suelo usado como sustrato en los sistemas de mesocosmos y la diversidad molecular de secuencias de hongos MA detectada tanto en muestras de suelo como en raíces procedentes de los mismos sistemas de mesocosmos.

Se realizaron cuantificaciones de la abundancia absoluta de esporas MA en las muestras de suelo asociado a ambas plantas hospedadoras y para los dos tiempos establecidos. En la Figura 33 se puede observar un aumento en el número de esporas en el segundo muestreo en relación al primero, siendo este incremento mayor para los mesocosmos en los que crecía tomillo como planta hospedadora.

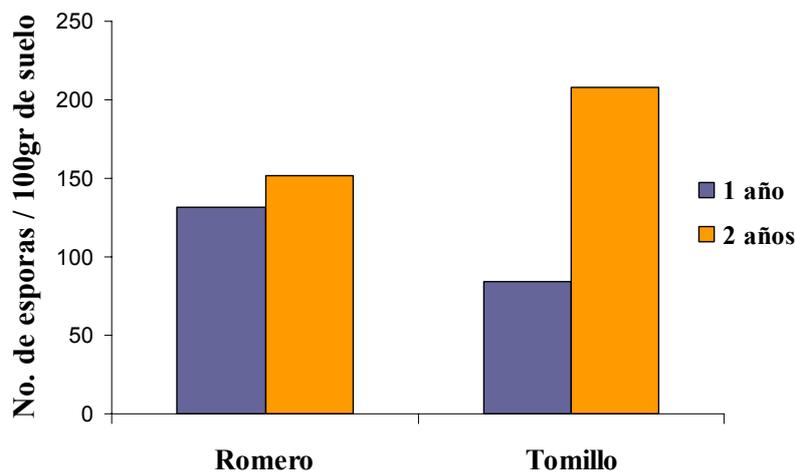


Figura 33. Abundancia absoluta de esporas de hongos MA correspondiente a las muestras de suelo tomadas en los mesocosmos de romero y tomillo según el tiempo de muestreo.

En cuanto a la evaluación de la riqueza específica de morfotipos de esporas de hongos MA en las muestras de suelo analizadas para ambas plantas hospedadoras y en los dos tiempos establecidos, se evidenció la existencia de 8 morfotipos diferentes (Figura 34).

Resultados

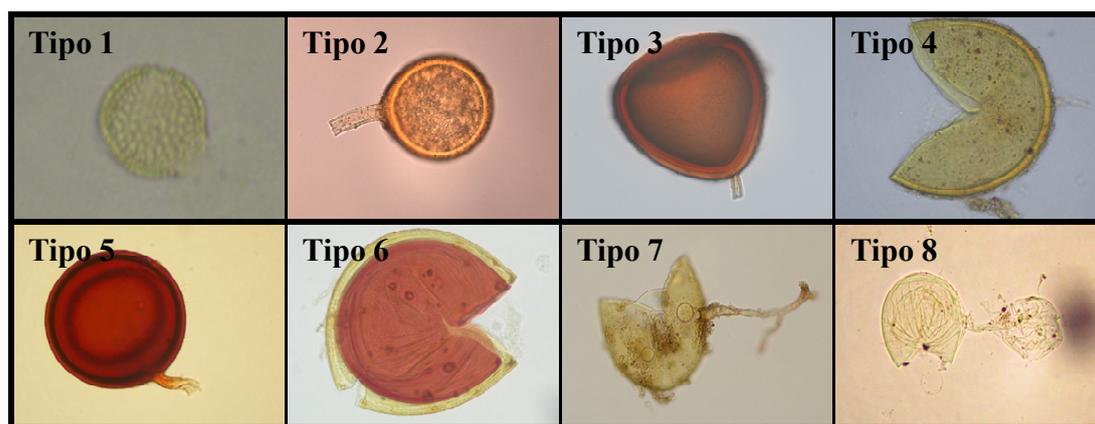


Figura 34. Morfotipos de esporas de hongos MA encontrados en las muestras tomadas en los mesocosmos de romero y tomillo.

Como se resume en la Tabla 14, 6 de los 8 morfotipos encontrados se pudieron identificar morfológicamente asociándolos a especies de hongos MA descritas previamente.

Tabla 14. Identificación morfológica y presencia de los morfotipos de hongos MA definidos en las distintas plantas y tiempos de muestreo.

Morfotipo	Identificación morfológica	Romero		Tomillo	
		1 año	2 años	1 año	2 años
Tipo 1	<i>Acaulospora</i> sp.	X ¹	X	X	X
Tipo 2	Sin identificar		X		
Tipo 3	Sin identificar	X	X	X	X
Tipo 4	<i>Glomus claroideum</i>	X	X	X	X
Tipo 5	<i>Glomus constrictum</i>		X		
Tipo 6	<i>Pacispora</i> sp.	X	X		
Tipo 7	<i>Glomus mosseae</i>	X	X	X	X
Tipo 8	<i>Acaulospora</i> sp.	X	X	X	X
S ²		6	8	5	5

¹La X indica la presencia de ese determinado morfotipo en la muestra correspondiente.

²S = Riqueza específica de morfotipos de hongos MA.

Mientras que en los sistemas de mesocosmos con romero como planta hospedadora se detectaron los 8 morfotipos, en el caso de los mesocosmos con tomillo sólo se detectaron 5 (Tipo 1, Tipo 3, Tipo 4, Tipo 7 y Tipo 8). Como se muestra en la Tabla 14, en los mesocosmos con tomillo el número de morfotipos detectados se mantiene constante en el tiempo. Por el contrario, cuando la planta hospedadora es romero el

número de morfotipos detectados aumenta de 6 (Tipo 1, Tipo 3, Tipo 4, Tipo 6, Tipo 7 y Tipo 8) a 8 en el segundo muestreo.

4.2. Determinaciones basadas en métodos moleculares

4.2.1. Amplificación del ADN por PCR, clonación y análisis de las genotecas

Tal y como se procedió en los sub-capítulos anteriores, en este ensayo también se realizó una PCR anidada sobre el ADN genómico extraído de las muestras de raíz de romero y tomillo, así como de las muestras de suelo en el que crecían estas plantas. Los productos de PCR NS31/AM1 (550 pb), resultantes de la segunda etapa de amplificación, se clonaron y se utilizaron para construir genotecas correspondientes a las diferentes muestras de raíz y suelo tomadas para cada planta hospedadora y tiempo.

En este caso se analizaron, mediante la técnica SSCP, un total de 336 clones, 42 por cada una de las 8 genotecas generadas, para proceder a la selección de los diferentes tipos de clones presentes. En este ensayo se redujo el número de clones a analizar por genoteca ya que los estudios previos, mostrados en los dos sub-capítulos anteriores, pusieron de manifiesto que los índices de diversidad encontrados en este tipo de muestras no requerían analizar más de 40 clones por genoteca.

Debido al gran número de geles realizados para analizar los 336 clones (20 geles), éstos no se muestran en la presente Memoria. El análisis, mediante el programa informático *InfoQuest FP*, de las imágenes de los geles de SSCP resultantes permitió detectar 32 patrones diferentes de bandas en los geles pertenecientes al análisis de las muestras de suelo y 39 en los de las muestras de raíz.

El análisis de las secuencias obtenidas para cada clon permitió concluir que, de los diferentes tipos de clones identificados, tan sólo 15 de los analizados en las muestras de suelo y 18 de los de las muestras de raíz correspondían a tipos distintos de secuencia de hongos MA (Tabla 15).

Resultados

Tabla 15. Abundancia absoluta de los diferentes tipos de clones identificados y homología de las secuencias obtenidas con las presentes en las bases de datos.

Tipo de secuencia ¹	Planta hospedadora (Número de clones) ²	Organismo (No. acceso) ³	Homología (%)
S3	R.o.1 (1)	<i>Glomus mosseae</i> (AY635833)	99
S4	R.o.1 (4) R.o.2 (3)	<i>Glomus mosseae</i> (AY635833)	99
S5	T.z.1 (1)	<i>Glomus claroideum</i> (AJ276080)	99
S6	R.o.2 (11)	<i>Glomus constrictum</i> (AM946961)	99
S8	R.o.2 (1)	<i>Glomus sp.</i> (EU518487)	99
S10	R.o.1 (4) R.o.2 (1) T.z.1 (13)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946829)	100
S11	R.o.2 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ396705)	98
S13	T.z.1 (2) T.z.2 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM412539)	99
S16	R.o.1 (2) R.o.2 (3) T.z.1 (2) T.z.2 (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	98
S17	R.o.1 (3) R.o.2 (2) T.z.1 (2) T.z.2 (1)	<i>Glomus sp.</i> (EU518487)	98
S18	R.o.1 (1)	<i>Glomus sp.</i> (EU518487)	98
S19	R.o.1 (1) T.z.2 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909670)	97
S20	R.o.1 (15) R.o.2 (7) T.z.1 (1) T.z.2 (7)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909674)	99
S21	R.o.1 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909674)	99
S27	R.o.2 (1)	<i>Glomus claroideum</i> (AJ276080)	99
R1	R.o.2 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909674)	99
R2	R.o.1 (9) R.o.2 (3) T.z.2 (6)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909674)	99
R3	T.z.1 (3)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	98
R4	T.z.1 (11)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909674)	99
R5	R.o.2 (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
R6	R.o.1 (1)	<i>Glomus sp.</i> (EU518487)	98
R7	R.o.1 (6) T.z.1 (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	98
R8	R.o.1 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909670)	97
R13	R.o.2 (1) T.z.2 (1)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	99
R14	R.o.1 (4) R.o.2 (2)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM909674)	99
R15	R.o.1 (3) R.o.2 (1) T.z.2 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946802)	97
R30	T.z.1 (1)	Uncultured <i>Glomus</i> (AM946802)	99
R33	T.z.1 (2)	<i>Glomus claroideum</i> (AJ276080)	99
R34	R.o.2 (6)	<i>Glomus etunicatum-like</i> (Y17644)	99
R36	R.o.2 (1) T.z.2 (9)	Uncultured <i>Glomus</i> (DQ396705)	98
R37	R.o.1 (3) R.o.2 (3) T.z.2 (1)	<i>Glomus mosseae</i> (AY635833)	99
R38	T.z.2 (1)	<i>Glomus claroideum</i> (AJ276080)	99
R39	R.o.1 (2) T.z.2 (8)	<i>Glomus intraradices</i> (AJ536822)	98

¹La nomenclatura indica si el clon fue aislado de las muestras de suelo (S) o raíz (R) y el orden en que fue detectado.

²El número entre paréntesis indica el número de clones de cada tipo de secuencia detectado en cada planta y tiempo. R.o.1 = Romero-año 1; R.o.2 = Romero-año 2; T.z.1 = Tomillo-año 1; T.z.2 = Tomillo-año 2.

³ En esta columna se presentan los organismos de la base de datos cuya secuencia presenta la mayor homología con cada tipo de secuencia obtenido. Entre paréntesis se presentan los números de acceso de las secuencias de estos organismos. Se mantiene la terminología en inglés de las secuencias procedentes de la base de datos para respetar sus nombres originales.

4.2.2. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas, definición de filotipos y curvas de rarefacción

Las secuencias obtenidas, tanto de las muestras de raíz como de las de suelo se analizaron filogenéticamente de manera conjunta para clasificarlas dentro del phylum

Glomeromycota. De los 15 tipos de secuencia correspondientes a las muestras de suelo, 13 se clasificaron en el grupo A de la familia *Glomeraceae* y dos en el grupo B de esta misma familia. En el caso de las muestras de raíz, 15 pertenecieron al grupo A de *Glomeraceae*, dos al grupo B de la misma familia y uno a la familia *Diversisporaceae* (Figura 35 y 36).

En base a los criterios previamente establecidos, se utilizaron los porcentajes de homología nucleotídica y las relaciones filogenéticas entre las diferentes secuencias, para establecer diferentes filotipos que agrupen las secuencias más similares. Para llevar a cabo este proceso de definición de filotipos se analizaron de manera conjunta todas las secuencias identificadas en el estudio, es decir, las secuencias identificadas en las muestras de suelo y raíz de ambas plantas y a los tiempos de estudio considerados. Se definieron un total de 8 filotipos de hongos MA, 6 filotipos pertenecientes al grupo A de la familia *Glomeraceae* (MESO1, MESO2, MESO3, MESO4, MESO5, MESO6), uno perteneciente al grupo B de la misma familia (MESO8) y otro a la familia *Diversisporaceae* (MESO7).

De los diferentes filotipos definidos, 5 de ellos se pudieron relacionar con especies de hongos MA descritas morfológicamente con anterioridad. En el caso del filotipo MESO3, éste presentó alta homología con *G. mosseae*, MESO4 con *G. constrictum*, MESO6 con *G. intraradices*, MESO7 con *G. etunicatum-like* y MESO8 con *G. claroideum*. Los 3 filotipos restantes (MESO1, MESO2 y MESO5) se correspondieron con secuencias detectadas en otros estudios moleculares de diversidad de hongos MA pero que no están relacionadas con especies caracterizadas morfológicamente (Tabla 16). Las secuencias correspondientes a estos tres filotipos se compararon con las secuencias obtenidas a partir de esporas de hongos MA procedentes de la misma zona de estudio de la que se tomó el suelo para este ensayo y cuyo análisis se ha llevado a cabo en este Grupo de Investigación. No obstante, ninguna de estas secuencias se correspondía con las tres secuencias no identificadas en el presente ensayo de mesocosmos.

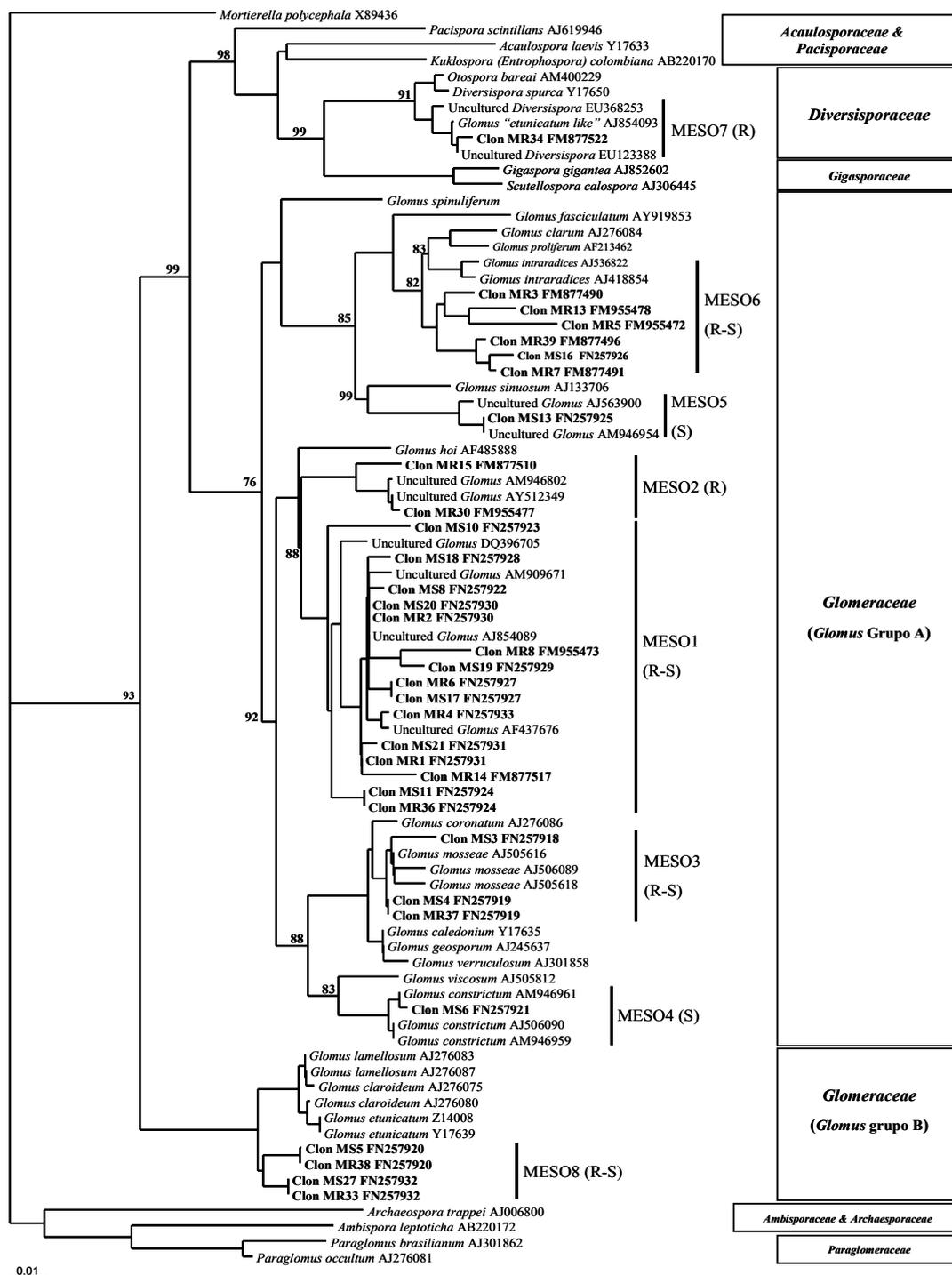


Figura 35. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hongos MA obtenidas de las muestras de suelo y de raíces del ensayo de mesocosmos y secuencias de referencia del phylum Glomeromycota procedentes de la base de datos. El árbol se construyó usando el método *Neighbour-Joining*. La secuencia de *Mortierella polycephala* fue usada para enraizar el árbol. Los números sobre las ramas del árbol indican los valores de *bootstrap* cuando se realizan 100 repeticiones. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrita y van acompañadas de su número de acceso en la base de datos. La escala situada abajo a la izquierda es proporcional a la longitud de las ramas del árbol.

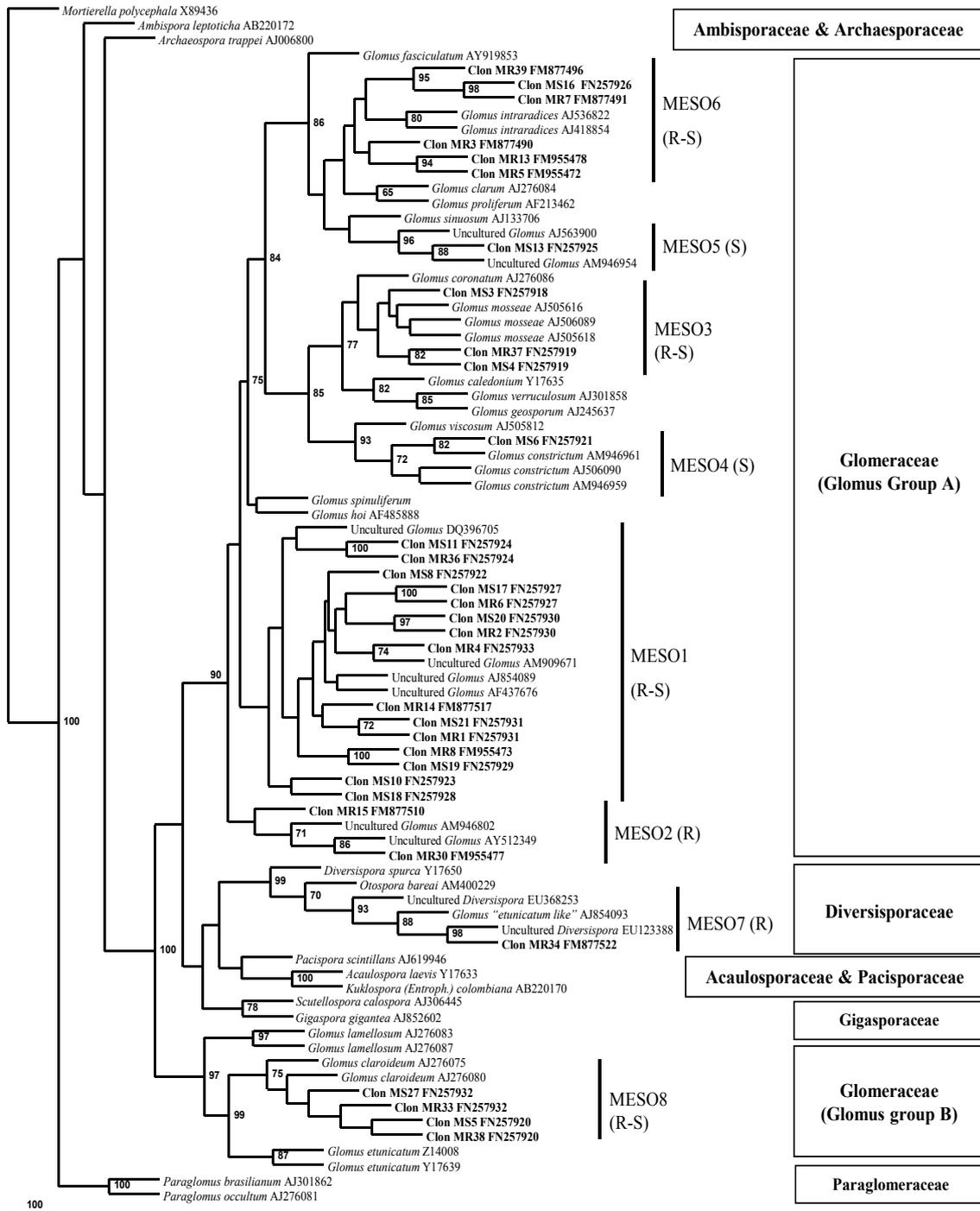


Figura 36. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hongos MA obtenidas de las muestras de suelo y de raíces del ensayo de mesocosmos y secuencias de referencia del phylum Glomeromycota procedentes de la base de datos. El árbol se construyó usando el método *Maximum Parsimony*. La secuencia de *Mortierella polycephala* fue usada para enraizar el árbol. Los números sobre las ramas del árbol indican los valores de *bootstrap* cuando se realizan 100 repeticiones. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrita y van acompañadas de su número de acceso en la base de datos. La escala situada abajo a la izquierda es proporcional a la longitud de las ramas del árbol.

Resultados

Tabla 16. Correspondencia de los filotipos definidos con secuencias de las bases de datos.

Filotipo	Secuencias más relacionadas	Homología (%)
MESO1	Uncultured <i>Glomus</i>	99
MESO2	Uncultured <i>Glomus</i>	99
MESO3	<i>G. mosseae</i>	99
MESO4	<i>G. constrictum</i>	99
MESO5	Uncultured <i>Glomus</i>	99
MESO6	<i>G. intraradices</i>	98
MESO7	<i>G. etunicatum-like</i>	99
MESO8	<i>G. claroideum</i>	99

Se mantiene la terminología en inglés de las secuencias procedentes de la base de datos para respetar sus nombres originales.

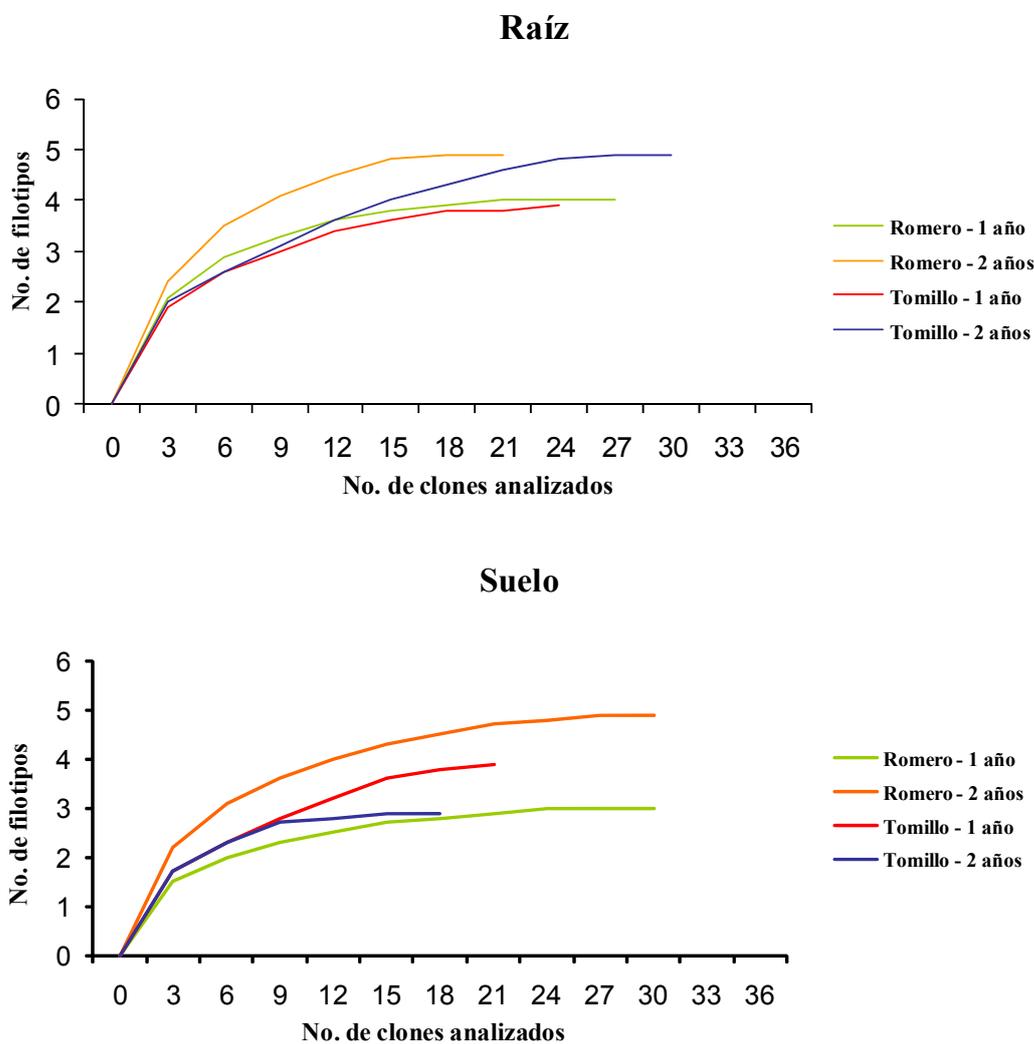


Figura 37. Curvas de rarefacción de las genotecas analizadas, procedentes de las muestras de raíz y suelo extraídas de los mesocosmos de romero y tomillo para los dos tiempos de muestreo.

Para confirmar que el número de clones analizados fue el apropiado para el estudio de diversidad realizado, se construyeron las curvas de rarefacción correspondientes que, como se muestra en la Figura 37, se estabilizaron en todas las muestras antes de alcanzar el número máximo de clones analizados.

4.3. Análisis comparativo de las comunidades de hongos MA detectadas en suelo y raíz

Para comparar la diversidad y comportamiento de los hongos MA detectados en muestras de suelo y raíz de plantas crecidas en mesocosmos, se llevaron a cabo análisis comparativos, tanto a nivel de secuencias detectadas como de otras variables, en función de la planta hospedadora y del tiempo de muestreo.

4.3.1. Índices de diversidad y abundancia relativa

En primer lugar se evaluaron los índices de diversidad de hongos MA presentes en los dos compartimentos analizados, suelo y raíz, mediante el cálculo de los índices de Shannon-Wiener y de riqueza específica (Tabla 17).

Tabla 17. Índice de diversidad de Shannon-Wiener y riqueza específica para cada una de las muestras de raíz y suelo correspondientes a los mesocosmos de romero y tomillo en los dos tiempos de muestreo.

Planta hospedadora	Tiempo (años)	Riqueza específica (S)	Índice de Shannon-Wiener (H')
Romero	Suelo	1	0.60
		2	1.31
	Raíz	1	1.16
		2	1.39
Tomillo	Suelo	1	0.83
		2	0.72
	Raíz	1	1.00
		2	1.09

La riqueza específica de filotipos fue mayor en las raíces que en el suelo micorrizosférico de las plantas de romero desarrolladas durante el primer año en los

sistemas de mesocosmos. Un año más tarde, como era previsible, la riqueza fue superior en ambos compartimentos, detectándose la misma riqueza específica de filotipos en las raíces que en su rizosfera. Sin embargo, en las muestras recogidas de los mesocosmos con tomillo se observó una pauta diferente. En este caso, la riqueza específica de filotipos fue la misma en las raíces y en el suelo de las plantas desarrolladas al primer año, aunque dicha variable de respuesta incrementó con el tiempo en las muestras de raíces. Por el contrario, la riqueza específica de filotipos en el suelo micorrizosférico de las plantas de tomillo disminuyó con el tiempo. En el caso de los valores correspondientes al índice de equidad de Shannon-Wiener se detectó un aumento significativo de éstos en el caso de los mesocosmos con romero, tanto en muestras de suelo como de raíz. Para los mesocosmos con tomillo, las diferencias detectadas no fueron significativas en ninguno de los dos compartimentos.

El análisis de la abundancia relativa de filotipos indicó que 6 de los 8 filotipos definidos estaban presentes tanto en las muestras de suelo como en las de raíz, dos únicamente en las muestras de suelo (MESO4 y MESO5) y dos en las de raíz (MESO2 y MESO7) (Figura 38). El filotipo dominante, tanto en las muestras de suelo como en las de raíz, es MESO1, presente en un 65% de los clones en las muestras de suelo y un 52% en las de raíz.

En relación al tiempo de muestreo se apreció que en las muestras correspondientes al primer año se detectaron 6 filotipos, pasando a detectarse los 8 filotipos definidos en el muestreo correspondiente al segundo año (Figura 38).

En los mesocosmos con romero se observó que los filotipos MESO1, MESO3 y MESO6 estaban presentes en todas las muestras analizadas, siendo los únicos que se detectaron en las muestras de suelo en el primer año. El filotipo MESO2 se detectó en las raíces en los dos muestreos realizados. Sin embargo, de los filotipos adicionales detectados en las muestras de suelo a los dos años de crecimiento de las plantas con respecto a las del primer año, ninguno se correspondió con MESO2. La abundancia relativa de MESO1 disminuyó considerablemente en las muestras de suelo del segundo año respecto a las del primer año, lo que probablemente determinara que se pudieran

detectar más filotipos. Por último, mencionar que las raíces de romero a los dos años presentaban un filotipo adicional (MESO7) que no se había detectado previamente en ninguna de las otras muestras.

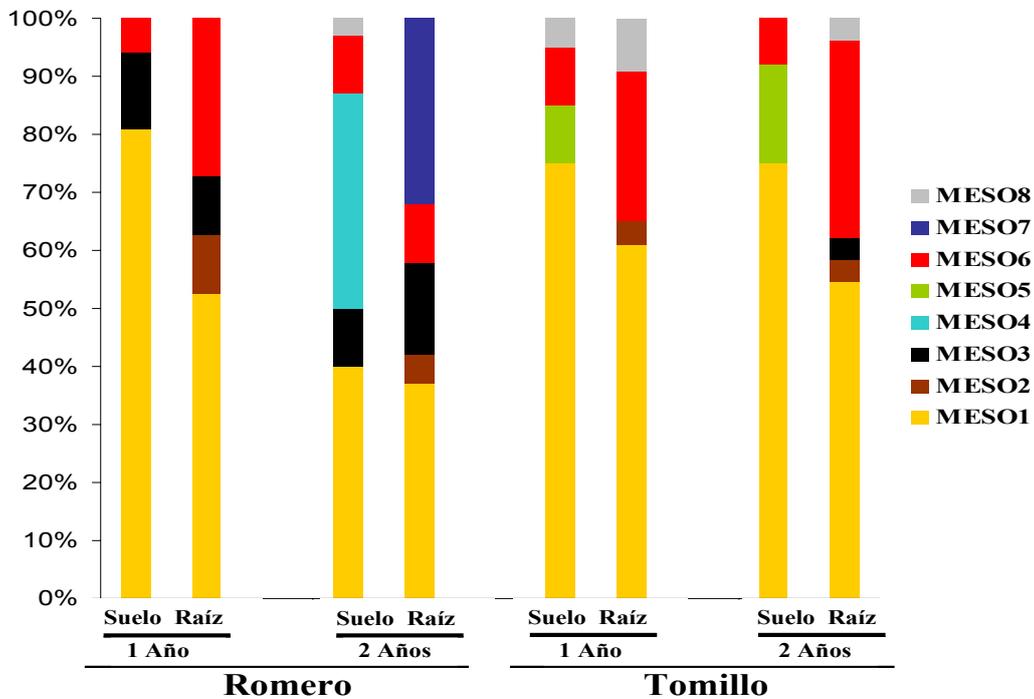


Figura 38. Abundancia relativa de los filotipos presentes en las muestras de raíz y suelo correspondientes a los mesocosmos de romero y tomillo según el tiempo de muestreo.

En los mesocosmos de tomillo tan sólo dos filotipos (MESO1 y MESO6) estaban presentes en todas las muestras analizadas. El filotipo MESO8 se detectó en las muestras de raíz y en las de suelo del primer año. El hecho de que este filotipo no se haya detectado en las muestras de suelo del segundo año puede deberse a un problema de sensibilidad de la técnica como consecuencia del incremento en la abundancia relativa del filotipo MESO5. Las raíces de tomillo de los dos muestreos presentan el filotipo MESO2, que al igual que en los mesocosmos de romero no se detectó en las muestras de suelo. Por último, el filotipo adicional de las raíces de tomillo del segundo año se corresponde con MESO3, un filotipo que estaba presente en todas las muestras analizadas de los mesocosmos de romero.

4.3.2. Relaciones entre desarrollo y diversidad de hongos MA

Con la intención de evaluar la existencia de posibles relaciones o tendencias entre las diferentes variables estudiadas y así conocer algo más el comportamiento de los hongos MA presentes en los sistemas de mesocosmos establecidos, se realizó un análisis de correlación de Pearson. En la Tabla 18 se detallan solamente aquellas variables que mostraron correlaciones significativas para los datos obtenidos en el presente estudio. Las principales correlaciones positivas se dieron entre: (i) la abundancia relativa de algunos filotipos, como es el caso de MESO4 en muestras de suelo, con MESO7 en muestras de raíz, (ii) porcentaje de micorrización en planta y longitud de micelio en suelo y (iii) el índice de diversidad de Shannon-Wiener para las secuencias detectadas en las muestras de raíz con la riqueza de morfotipos de esporas. Por otro lado, las correlaciones negativas más relevantes que se muestran en la tabla son las establecidas entre: (i) filotipos procedentes de raíz y suelo (MESO1 en suelo y MESO7 en raíz), (ii) filotipos correspondientes a muestras de suelo (MESO1 y MESO4) o raíz (MESO1 y MESO3) y (iii) las abundancias relativas de los filotipos MESO1 en suelo y MESO1 en raíz con los índices de Shannon-Wiener relativos a la diversidad de secuencias detectadas en muestras de suelo y raíz respectivamente.

Tabla 18. Análisis de correlación de Pearson para los valores de abundancia relativa de los filotipos de hongos MA, de los índices de diversidad y del resto de determinaciones calculadas para las muestras de raíz y suelo

	MESO1 Suelo	MESO4 Suelo	Long. Micelio	%M	S Esporas	S Sec. Suelo	MESO1 Raíz	MESO2 Raíz	MESO3 Raíz	MESO7 Raíz	H' Suelo	H' Raíz
MESO1 Suelo	1.000	-.989*	-.666	-.470	-.882	-.898	.878	.321	-.719	-.989*	-.982*	-.860
MESO4 Suelo		1.000	.549	.332	.943	.870	-.930	-.174	.810	1.000*	.953*	.920
Long. Micelio			1.000	.964*	.246	.596	-.332	-.897	.051	.549	.711	.283
%M				1.000	.000	.479	-.072	-.982*	-.215	.332	.551	.021
S Esporas					1.000	.739	-.970*	.164	.943	.943	.810	.975*
S Sec. Suelo						1.000	-.639	-.394	.472	.870	.957*	.626
MESO1 Raíz							1.000	-.111	-.958*	-.930	-.779	-.999*
MESO2 Raíz								1.000	.390	-.174	-.427	.160
MESO3 Raíz									1.000	.810	.595	.971*
MESO7 Raíz										1.000	.953*	.920
H' Suelo											1.000	.759
H' Raíz												1.000

En esta tabla se muestra un extracto de la tabla original en la que se presentan todas las correlaciones significativas obtenidas

*Valores significativos

S = Riqueza específica; H' = Índice de Shannon-Wiener; Long. Micelio = Longitud de micelio; %M = Porcentaje de micorrización

4.4. Análisis comparativo de las comunidades de hongos MA identificadas por métodos morfológicos y moleculares

Como se indicó anteriormente, 6 de los 8 morfotipos de esporas aisladas de los mesocosmos pudieron identificarse morfológicamente con especies de hongos MA conocidas. Teniendo en cuenta que 5 de los 8 filotipos identificados en las muestras de suelo y raíz se asignaron también a especies de hongos MA conocidas, fue posible hacer una estimación aproximada de la correspondencia existente entre los hongos presentes como esporas en el suelo y de aquellos detectados molecularmente en las muestras de raíz y de suelo. Como se muestra en la Tabla 19, de los 5 morfotipos de esporas identificados en las muestras de suelo, dos de ellos fueron detectadas en las muestras de raíz (*G. mosseae* y *G. claroideum*) y tres en las de suelo (*G. mosseae*, *G. claroideum* y *G. constrictum*).

Tabla 19. Correspondencia de los morfotipos de esporas MA identificados con los filotipos detectados molecularmente y presencia de éstos en las muestras de suelo y raíz analizadas.

Filotipo	Morfotipo	Identificación morfológica	Romero		Tomillo	
			Suelo	Raíz	Suelo	Raíz
MESO8	Tipo 4	<i>Glomus claroideum</i>	E/S		E/S	S
MESO4	Tipo 5	<i>Glomus constrictum</i>	E/S			
MESO3	Tipo 7	<i>Glomus mosseae</i>	E/S	S	E	S

E – Detectado como espora.

S – Detectado como secuencia.

4.5. Análisis comparativo de las comunidades de hongos MA detectadas en los ensayos de campo y mesocosmos

Una vez definidos los filotipos correspondientes al ensayo de mesocosmos, éstos fueron comparados con los definidos previamente en los ensayos de campo, encontrando que solamente la mitad de los filotipos definidos en el ensayo de mesocosmos se correspondían con alguno de los encontrados en muestras de campo. Como se muestra en la Tabla 20 los 4 filotipos que han sido detectados en ambos ensayos son los correspondientes a GLO1-MESO6 (*Glomus intraradices*), GLO11-MESO1 (Uncultured *Glomus*), GLO13-MESO4 (*Glomus constrictum*) y DIV1-MESO7 (*Glomus etunicatum-like*).

Tabla 20. Correspondencia de los filotipos definidos en los ensayos de campo con los del ensayo de mesocosmos y secuencias conocidas más relacionadas con éstos.

Ensayos de campo	Ensayo de mesocosmos	Secuencia conocida más relacionada
GLO1	MESO6	<i>Glomus intraradices</i>
GLO2	-	-
GLO3	-	-
GLO4	-	-
GLO5	-	-
GLO6	-	-
GLO7	-	-
GLO8	-	-
GLO9	-	-
GLO10	-	-
GLO11	MESO1	-
GLO12	-	-
GLO13	MESO4	<i>Glomus constrictum</i>
GLO14	-	-
DIV1	MESO7	<i>Glomus etunicatum-like</i>
DIV2	-	-
-	MESO2	-
-	MESO3	<i>Glomus mosseae</i>
-	MESO5	-
-	MESO8	<i>Glomus claroideum</i>

V. DISCUSIÓN GENERAL

La información obtenida de los diversos experimentos desarrollados en esta Tesis Doctoral se discute en el presente capítulo, sistematizada en una serie de apartados con objeto de facilitar la apreciación de tal información.

1. Adaptación/Optimización de técnicas moleculares

Aunque no está explicitado como tal en los Objetivos Específicos de esta Tesis Doctoral, *de facto*, uno de los objetivos principales de este trabajo de investigación era adaptar y optimizar metodologías moleculares apropiadas para analizar las comunidades de hongos MA presentes en muestras de raíz y suelo en plantas crecidas en su ambiente natural, en este caso, un ecosistema mediterráneo. De las técnicas moleculares desarrolladas para el análisis de la diversidad microbiana (Tiedje *et al.*, 1999) se seleccionaron aquellas más utilizadas en estudios de diversidad de hongos MA presentes en las raíces de las plantas (Cornejo *et al.*, 2004; Stukenbrock & Rosendahl, 2005; Santos-González *et al.*, 2006 y 2007; Pietikainen *et al.*, 2007).

1.1. Elección de oligonucleótidos adecuados

El primer paso para un correcto análisis molecular de la diversidad de hongos MA presente en muestras de raíces crecidas en campo es la elección de los oligonucleótidos (*primers*) apropiados para desarrollar una PCR. La pareja de oligonucleótidos utilizados en este estudio, NS31/AM1, amplifica la mayoría de familias de hongos MA. Se eligieron estos oligonucleótidos por la alta especificidad que le confiere el oligonucleótido AM1 al proceso de amplificación y porque la región comprendida en el

amplicón generado permite la discriminación de los hongos MA hasta el nivel de especie. En numerosos estudios se han utilizado estos oligonucleótidos para detectar la presencia de hongos de las familias *Glomeraceae*, *Acaulosporaceae*, *Diversisporaceae*, *Gigasporaceae*, *Entrophosporaceae* y *Pacisporaceae* (orden *Glomerales* y *Diversisporales*) en diferentes ecosistemas (Rodríguez-Echeverría & Freitas, 2006; Santos-González *et al.*, 2006; Vallino *et al.*, 2006; Santos-González *et al.*, 2007; Alguacil *et al.*, 2008; Öpik *et al.*, 2008a; Sonjak *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). A pesar de la limitación que supone el uso del oligonucleótido AM1 para amplificar secuencias correspondientes a las familias *Paraglomeraceae* y *Archaeosporaceae* (Redecker *et al.*, 2000), Santos-González (2007) y Schechter & Bruns (2008) obtuvieron secuencias pertenecientes al género *Archaeospora*. Sin embargo, en el presente estudio no se detectaron secuencias pertenecientes a las familias *Paraglomeraceae* y *Archaeosporaceae*.

El hecho de que se detectaran algunas secuencias de Ascomicetos y otros organismos contaminantes en las muestras analizadas no es sorprendente debido a que la especificidad del oligonucleótido utilizado (AM1) no es total (Redecker, 2000; Helgason *et al.*, 2002; Douhan *et al.*, 2005). Como se describe en trabajos previos (Douhan *et al.*, 2005; Santos-González *et al.*, 2007), la proporción de secuencias contaminantes obtenidas depende, en gran medida, de la planta hospedadora y de los ecosistemas de los que se extraen las muestras. En el presente estudio se observaron algunas diferencias en la proporción de secuencias de hongos no MA entre las diferentes plantas analizadas, siendo la lavanda la que presentó mayor proporción de secuencias contaminantes entre los clones analizados.

En la actualidad están surgiendo nuevos oligonucleótidos (Lee *et al.*, 2008, Krüger *et al.*, 2009), como se indica en el Capítulo de Introducción, que potencialmente amplifican todas las familias de hongos MA con altos grados de especificidad y que, por tanto, tras el pertinente proceso de adaptación y optimización, podrían mejorar los resultados que se están obteniendo actualmente en este tipo de estudios.

1.2. Técnicas moleculares ensayadas

En base a las técnicas de *fingerprinting* más utilizadas en los estudios de diversidad microbiana en los últimos años, se seleccionaron TTGE, DGGE y SSCP para, una vez adaptadas, evaluar su aplicabilidad. La técnica TTGE ha sido usada en los últimos años en estudios de diversidad de bacterias (Vásquez *et al.*, 2001; Batisson *et al.*, 2009) y otros microorganismos (Marie *et al.*, 2006). En el caso de los hongos MA, se ha empleado para hacer un seguimiento de la dinámica de diversas especies de hongos MA en condiciones controladas (Cornejo *et al.*, 2004) y para estudiar la diversidad de hongos MA asociados a las raíces de plantas presentes en suelos salinos y contaminados por metales pesados (Sonjak *et al.*, 2009). La técnica DGGE también ha sido ampliamente utilizada en estudios de diversidad microbiana (Ma *et al.*, 2005; de Ridder-Duine *et al.*, 2005), y en menor medida, para el análisis de comunidades de hongos MA (Kowalchuk *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2009). Sin embargo, la técnica SSCP, ampliamente usada durante los últimos años en estudios de diversidad de hongos (He *et al.*, 2005, Scherwinski *et al.*, 2008; Zachow *et al.*, 2009), en el caso de los hongos MA se ha aplicado en estudios de diversidad basados en el análisis de la subunidad 25S ADNr usando oligonucleótidos específicos de especies o de género (Kjoller *et al.*, 2000; Jansa *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004).

A pesar de que los diversos antecedentes bibliográficos citados sugieren la aplicabilidad de estas técnicas para el estudio de la diversidad de poblaciones de hongos MA en muestras de raíces crecidas en campo, en los ensayos realizados en esta Tesis Doctoral no fue posible obtener la huella genética de los hongos que colonizan las raíces basada en el análisis de la región NS31/AM1 del gen 18S ADNr. En el caso de las técnicas de TTGE y de DGGE, esto se debe a que las diferencias existentes entre las temperaturas de fusión de las secuencias de la región NS31/AM1 de los diferentes hongos MA no permite su discriminación en un gradiente desnaturizante, y a que la obtención de un producto de PCR cuantitativa y cualitativamente adecuado para su análisis requiere de la realización de una PCR anidada, usando en la primera PCR oligonucleótidos universales y en la segunda oligonucleótidos específicos. Esta última

observación, puesta de manifiesto por múltiples autores en diferentes estudios de diversidad de hongos MA en muestras de campo (Renker *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009), no permitió aplicar al estudio abordado en esta Tesis Doctoral la metodología desarrollada previamente por Cornejo *et al.* (2004) basada en el análisis mediante TTGE del amplicón resultante de una PCR anidada en la que se usan oligonucleótidos específicos en la primera PCR y no específicos en la segunda.

En el caso del SSCP, se detectó falta de resolución en los patrones de bandas obtenidos, produciéndose una acumulación y superposición de bandas, lo cual pudo ser provocado por la cantidad de secuencias casi idénticas existentes en los productos de PCR utilizados para generar estos patrones de bandas, impidiendo así la posibilidad de distinguir adecuadamente los patrones generados y cortar las bandas obtenidas para poder recuperar los fragmentos de ADN que las producen.

Sanders *et al.* (1995) ya describieron la existencia de polimorfismos en hongos MA, lo cual fue apoyado años después por Pawlowska & Taylor (2004) que propusieron la existencia de variabilidad intraespecífica en este tipo de hongos. Estos hechos han provocado que la mayoría de técnicas moleculares basadas en la separación de las diferentes secuencias existentes en geles de poliacrilamida (técnicas de *fingerprinting*) no hayan sido tan útiles como se suponía en base a otros estudios en los que se aplicaron para analizar la diversidad de otros organismos microbianos. Debido a la alta sensibilidad de estas técnicas, ya que pueden detectar incluso cambios de un nucleótido en diferentes secuencias, se hace realmente complicado llevar a cabo estudios de diversidad de hongos MA destinados a identificar los miembros de las poblaciones existentes en el sistema estudiado. No obstante, este tipo de técnicas aportan información suficiente para detectar cambios en las poblaciones presentes o incluso para establecer estimaciones de diversidad basadas en el número de bandas detectadas en los geles (Dilly *et al.*, 2004). Estas metodologías también son adecuadas para el estudio de las especies dominantes en una comunidad de hongos MA (Sonjak *et al.*, 2009).

Para superar las limitaciones descritas, se propuso el uso de técnicas de clonaje combinadas con la técnica de *fingerprinting* SSCP para llevar a cabo un escrutinio

eficiente de los clones obtenidos. La construcción y análisis de genotecas a partir de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del material genético de los hongos MA es la técnica que actualmente se utiliza con más frecuencia en los estudios de diversidad de hongos MA en raíces desarrolladas en su hábitat natural . Sin embargo, en la mayoría de los estudios el análisis de las genotecas se realiza mediante la secuenciación de un número elevado de clones (Santos-González et al., 2007; Öpik et al., 2008a) o bien mediante la selección de los diferentes tipos de secuencias tras el análisis mediante RFLP de los diferentes clones obtenidos (Valino *et al.*, 2006; Alguacil *et al.*, 2008). Ambas aproximaciones presentan un alto coste económico y, además, el análisis mediante RFLP de los clones suele subestimar de la diversidad presente en las muestras, ya que se ha observado que clones con secuencias diferentes presentan el mismo patrón de RFLP (Valino *et al.*, 2006). Con el fin de obviar estas limitaciones, durante los últimos años se han realizado algunos esfuerzos encaminados a analizar los clones obtenidos mediante la aplicación de técnicas de *fingerprinting*. Concretamente, Liang y colaboradores (2008) realizaron el escrutinio de las genotecas resultantes de clonación del producto de PCR NS31/AM1 mediante el análisis por DGGE de la región NS31/Glo1 utilizada en esta Tesis Doctoral cuando se evaluó el potencial de la técnica de TTGE para la discriminación de los diferentes tipos de clones presentes en las genotecas construidas. Los resultados obtenidos del estudio comparativo entre el poder resolutivo del TTGE y SSCP muestran que, sin lugar a dudas, la técnica que ofreció una selección precisa, rápida y de bajo coste económico de los diferentes tipos de secuencias presentes en las muestras analizadas era el análisis de los clones mediante SSCP, ya que todas las secuencias diferentes migraban de una manera diferencial en los geles de SSCP.

El hecho de que el SSCP permita discriminar diferencias de hasta un nucleótido cuando se aplica al análisis de clones, mientras que no permitiera resolver las diferentes secuencias presentes en los productos de PCR puede ser consecuencia de diferentes factores, tales como: (i) digestión parcial de la cadena de ADN fosforilada, con la consecuente posible renaturalización del ADN durante la electroforesis, (ii) las diferentes conformaciones que el ADN de cadena simple puede presentar, y (iii) a la formación de heteroduplex entre productos de PCR que tienen secuencias muy

parecidas. Todos estos procesos se favorecen cuando se utilizan altas concentraciones de ADN, como ocurre en los análisis de comunidades que presentan una alta diversidad. Sin embargo, se minimizan en el caso del análisis de clones, ya que en cada calle del gel se analiza una sola secuencia.

2. Originalidad de los estudios de diversidad de hongos MA desarrollados

Los estudios de diversidad de hongos MA presentes en raíces de plantas pertenecientes a una comunidad representativa de los ecosistemas mediterráneos son muy escasos (Rodríguez-Echeverría & Freitas, 2006; Alguacil *et al.*, 2008). Concretamente, en esta Tesis Doctoral se analiza por primera vez la dinámica de esta diversidad en diferentes estaciones del año y diferentes especies vegetales en dichos ecosistemas.

3. Nivel de diversidad de hongos MA que colonizan las raíces

En general, los resultados obtenidos muestran que la diversidad de hongos MA en las raíces de las plantas analizadas en campo es elevada. Ello concuerda con los resultados descritos en estudios previos (revisados por Öpik *et al.*, 2006) en los que se describen de 6 a 10 filotipos por planta en ecosistemas similares al que se estudia en este caso. Cabe destacar en este sentido los valores de diversidad especialmente altos encontrados en ambientes naturales como es el caso de un bosque caducifolio en Inglaterra donde se detectaron de 6 a 8 filotipos por planta (Helgason *et al.*, 2002) o de unos pastizales en Holanda en donde se encontraron un total de 15 filotipos repartidos en diferentes especies vegetales pertenecientes a una misma comunidad (Scheublin *et al.*, 2004).

Los mayores valores en los índices de diversidad de hongos MA se encontraron en tomillo y romero, que son las plantas más abundantes en el ecosistema objeto de estudio. En un principio se pensó que una posible razón para explicar los menores índices de diversidad encontrados en lavanda, genista y mejorana fuera el hecho de que estas plantas pudieran tener niveles de micorrización más bajos. Sin embargo, esta

circunstancia se descartó ya que todas las plantas estudiadas presentaban niveles de micorrización muy similares, independiente de la diversidad de hongos que hospedaban.

4. Influencia de la planta en la composición de la comunidad colonizadora: especificidad/preferencia hongo MA - planta

Durante mucho tiempo, debido principalmente a limitaciones técnicas, no se había podido demostrar la existencia de determinados grados de especificidad hongo MA – planta. Informaciones más recientes mostraron que la diversidad de hongos MA en plantas de similares características puede ser muy diferente (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Santos-González *et al.*, 2006; Sykorova *et al.*, 2007). En el presente estudio se ha comprobado que las diferentes plantas analizadas hospedan comunidades de hongos MA diferentes, tanto en composición como en número de filotipos detectados, lo cual corrobora y fortalece la información procedente de dichos estudios.

Esto puede explicarse por la existencia de cierta especificidad hongo MA – planta o de preferencias por parte de las diferentes plantas analizadas a la hora de seleccionar los hongos MA que más le benefician. La existencia de asociaciones preferenciales de algunos hongos MA con algunas plantas es un hecho de interés ecológico, tal como había sido apuntado en estudios previos (Helgason *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002 y 2003; Johnson *et al.*, 2003; Hempel *et al.*, 2007; Sykorova *et al.*, 2007). Aunque los mecanismos que determinan esta especificidad se desconocen actualmente, se ha propuesto que una de las razones de la existencia de estas asociaciones preferenciales planta-hongo podría deberse a que la planta proporciona de manera preferencial fotosintatos a los hongos que más le benefician (Bever *et al.*, 2009).

5. Dominancia secuencias del género *Glomus*

Todas las secuencias correspondientes a hongos MA encontradas en romero, lavanda, genista y mejorana pertenecen a la familia *Glomeraceae*. En el caso del tomillo, aunque predominan las especies pertenecientes a la misma familia, también se detectaron secuencias pertenecientes a la familia *Diversisporaceae*.

Un estudio previo de diversidad de hongos MA basado en el análisis morfológico de las esporas encontradas en el mismo ecosistema analizado en el presente estudio mostró que las especies dominantes en este ambiente pertenecen al género *Glomus* (Barea *et al.*, 2007a). Otros estudios, también basados en la morfología de las esporas, que se llevaron a cabo en ambientes semiáridos mediterráneos, concluyen que las especies del género *Glomus* son las más abundantes en estas regiones (Dodd & Krikun, 1984; Requena *et al.*, 1996; Calvente *et al.*, 2004; Ferrol *et al.*, 2004). Este dominio de las especies del género *Glomus* en ambientes mediterráneos podría deberse al éxito evolutivo de este taxón, determinado por su alta capacidad de esporulación y la capacidad de colonizar las raíces de las plantas a partir de fragmentos de hifas (Öehl *et al.*, 2003). Al igual que se describió en otros estudios (Daniell *et al.*, 2001; Husband *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Alguacil *et al.*, 2008), todas las secuencias obtenidas que corresponden al género *Glomus*, pertenecen a *Glomus* grupo A. Las especies pertenecientes a *Glomus* grupo B, aunque presentan más dificultad para ser amplificadas por el oligonucleótido AM1, también han sido detectadas en algunos estudios que utilizan este oligonucleótido, como se comprueba en el sub-Capítulo 4 del Capítulo de Resultados de la presente Memoria, y en otras publicaciones (Helgason *et al.*, 1998 & 2002; Schechter & Bruns, 2008).

6. Existencia de secuencias de hongos MA no descritas fuera de la raíz

La mayoría de las secuencias obtenidas en este estudio no se corresponden con secuencias de hongos MA (esporas) descritas morfológicamente con anterioridad, pero sí que coinciden con secuencias obtenidas en otros estudios realizados sobre muestras de raíces crecidas en campo. De los 16 filotipos definidos en los ensayos de campo sólo tres de ellos se corresponden con especies de hongos MA definidas morfológicamente: GLO1, GLO13 y DIV1 que se corresponden con *G. intraradices*, *G. constrictum* y *G. etunicatum-like*, respectivamente. Esta tendencia parece generalizable ya que es similar a la que se había encontrado en otros estudios que analizaron la diversidad de hongos MA en diferentes ambientes (Husband *et al.*, 2002; Wubet *et al.*, 2003; Öpik *et al.*, 2003 y 2008; Haug *et al.*, 2004; Börstler *et al.*, 2006; Alguacil *et al.*, 2008).

El alto porcentaje de secuencias *desconocidas* encontradas en esta Tesis Doctoral apoya las predicciones de que el número de 200 morfoespecies de hongos MA sugerido recientemente por Allen *et al.* (2002) podría ser una pequeña fracción de la diversidad real en el phylum Glomeromycota (Öpik *et al.*, 2006). Por las razones antes expuestas, la comparación de las secuencias detectadas, en esta Tesis Doctoral, en las raíces de las plantas desarrolladas en su hábitat natural y las secuencias obtenidas a partir de las esporas extraídas del suelo rizosférico de las mismas plantas (Barea *et al.*, 2007a) puso de manifiesto una correlación muy baja entre los taxones detectados en ambas muestras procedentes del mismo ecosistema. De hecho, solamente los filotipos correspondientes a *G. intraradices* y a *G. constrictum* se encontraron tanto en la comunidad de hongos MA presente en la raíz como en la comunidad de esporas MA presentes en el suelo. Algunos estudios previos también habían encontrado una escasa correlación entre las comunidades de hongos MA presentes en el suelo en forma de spora y en la raíz en un mismo punto de muestreo (Clapp *et al.*, 1995; Renker *et al.*, 2005; Hempel *et al.*, 2007). Esta disparidad podría deberse a que la colonización de las raíces se haya producido a partir del micelio extraradical que coloniza el suelo y no a partir de las esporas, hipótesis, que como se discute más adelante, se ve apoyada por los resultados presentados en el sub-Capítulo 4. Aunque este tipo de micelio no se ha considerado hasta ahora en los estudios de diversidad, debido fundamentalmente a la dificultad metodológica que supone su análisis, los resultados obtenidos en cuanto a la disparidad de secuencias de hongos MA *in planta* y en esporas de su rizosfera implican la necesidad de incluir dicha forma de propágulo en los estudios de ecología (diversidad) de hongos MA (Hempel *et al.*, 2007).

Para intentar explicar estas discrepancias, Clapp *et al.* (1995) propusieron la existencia de especies de hongos MA no esporulantes que se propagarían mediante transmisión directa planta-planta y que, por tanto, no necesitarían completar su ciclo de vida en el suelo (Hempel *et al.*, 2007). Incluso cabe la posibilidad de que no todos los hongos MA sean totalmente dependientes de una planta hospedadora para completar su ciclo de vida, es decir, que no sean simbioses obligados (Hildebrandt *et al.*, 2006;

Hempel *et al.*, 2007). Obviamente, esta última hipótesis parece excesivamente arriesgada.

7. Distribución geográfica y ecológica de las secuencias detectadas

Los filotipos definidos en este estudio y que han podido ser identificados con especies de hongos MA descritas morfológicamente en estudios previos (GLO1, GLO13 y DIV1), también han sido detectadas en muestras de raíz correspondientes a plantas analizadas en diversos ambientes. Este es el caso de GLO1, filotipo dominante en este estudio y que se corresponde con *G. intraradices*, que ha sido descrito con anterioridad, también como filotipo dominante, en muy diversos ecosistemas (Husband *et al.*, 2002; Öpik *et al.*, 2003; Scheublin *et al.*, 2004; Whitfield *et al.*, 2004; Wirsal, 2004; Hijri *et al.*, 2006; Alguacil *et al.*, 2008; Cesaro *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Sonjak *et al.*, 2009), hecho debido, probablemente, al elevado nivel de tolerancia que posee esta especie ante los cambios en las condiciones ambientales. El filotipo identificado en este estudio como *G. constrictum* (GLO13) ha sido encontrado en las raíces de plantas herbáceas en un bosque de coníferas en Estonia (Öpik *et al.*, 2008a) y en las raíces de las plantas de *Ammophila arenaria* desarrolladas en un clima Mediterráneo (Rodríguez-Echeverría & Freitas, 2006). El otro filotipo detectado, correspondiente a hongos MA descritos morfológicamente y perteneciente a la familia *Diversisporaceae*, DIV1, había sido detectado en raíces de especies amenazadas de coníferas en un bosque de Etiopía (Wubet *et al.*, 2006) y en las raíces de *A. arenaria* anteriormente mencionadas (Rodríguez-Echeverría & Freitas, 2006).

Con respecto al resto de filotipos se puede decir que la mayoría de ellos han sido detectados previamente en raíces de plantas procedentes de otros ambientes naturales. El filotipo GLO10 fue encontrado en un bosque caducifolio y en cultivos herbáceos en Inglaterra y en suelos contaminados del norte de Italia (Helgason *et al.*, 1998; Daniell *et al.*, 2001; Vallino *et al.*, 2006), mientras que GLO9, tipo de secuencia muy parecido al anterior, ha sido descrito en el esporofito de *Botrychium virginianum* (Kovacs *et al.*, 2007). Los filotipos GLO4, GLO5, GLO8 y GLO12 fueron detectados en un ecosistema alpino en Austria (Moser & Haselwandter, sin publicar). Además, GLO4 y GLO8

también han sido secuenciados en plantas propias de pastizales en estudios llevados a cabo en Estonia y Holanda (Öpik *et al.*, 2003; Scheublin *et al.*, 2004) y en raíces de *Taxus baccata* (Wubet *et al.*, 2003).

Las secuencias pertenecientes al filotipo GLO11 son de las más comúnmente obtenidas tanto en el presente estudio como en otros que analizan la diversidad en muestras de raíces crecidas en ambientes naturales (Husband *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Santos-González *et al.*, 2006; Alguacil *et al.*, 2008; Appelhans *et al.*, 2008). El análisis de la diversidad de hongos MA en diferentes ecotipos de *Collinsia sparsiflora* del norte de California reveló la presencia de los filotipos GLO2 y GLO3 colonizando las raíces de esta especie (Schechter & Bruns, 2008). El tipo de secuencia GLO14 ha sido encontrado recientemente en muestras de suelo en un bosque de cedro rojo (Liang *et al.*, 2008). El resto de filotipos, GLO6, GLO7 y DIV2, no habían sido detectados previamente, o al menos no existen referencias previas que los citen. De estos filotipos, GLO6 y DIV2 han sido detectados exclusivamente en raíces de tomillo, por lo que podrían ser considerados filotipos específicos de esta planta.

Estos datos demuestran la amplia distribución existente en la mayoría de secuencias pertenecientes a especies de hongos MA. Concretamente, los filotipos GLO1 y GLO11, dos de los filotipos más comúnmente detectados en este tipo de estudios, podrían ser definidos como hongos generalistas debido a la multitud de ámbitos geográficos y plantas hospedadoras donde han sido citados.

8. Cambios intra-anales en la comunidad de hongos MA

Los resultados de este estudio confirman la idea de que las comunidades de hongos MA que colonizan las raíces de las plantas varían a lo largo de las diferentes épocas del año. Resulta evidente que algunos filotipos desaparecen a lo largo del tiempo y son sustituidos por otros que no habían sido detectados con anterioridad. En otros casos, solamente varían las abundancias relativas correspondientes a algunos filotipos dependiendo de la época en que se realiza el muestreo.

Estos cambios detectados en la distribución de los filotipos en las diferentes épocas analizadas podrían estar indicando la existencia de una diversidad funcional de hongos MA, que variaría en función tanto de las fluctuaciones estacionales de los factores abióticos del ecosistema estudiado (Bever *et al.*, 2001) como con los cambios fenológicos de las plantas hospedadoras (Merryweather & Fitter 1998; Eom *et al.*, 2000). Esta diversidad funcional permitiría a los hongos MA ayudar a las plantas a adaptarse a las condiciones cambiantes del ecosistema a través de una adecuada selección del conjunto de hongos MA que más beneficios le puedan aportar en cada etapa de su desarrollo.

Los valores más altos en cuanto a los índices de riqueza específica de filotipos MA se detectaron en el muestreo llevado a cabo en primavera, concretamente en el mes de mayo, coincidiendo con la época de mayor crecimiento de las plantas objeto de estudio. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Santos-González *et al.* (2007) en unos pastizales de Suecia, en donde se detectó una tendencia a acumular un mayor número de filotipos de hongos MA en las raíces de las plantas muestreadas en los meses de primavera. Se ha observado que los porcentajes de micorrización también se pueden afectar en los meses correspondientes a la época de crecimiento de las plantas habiéndose detectado aumentos significativos de estos valores en primavera (Bohrer *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009).

En el análisis de correlaciones realizado en el sub-Capítulo 3 de Resultados, en el que se evaluaron las relaciones existentes entre los filotipos de hongos MA detectados en este estudio, se encontraron algunas correlaciones positivas significativas, que pueden indicar una complementariedad funcional entre determinados filotipos, así como negativas, que sugerirían una competencia temporal que impediría la coexistencia de ciertos filotipos en la misma planta hospedadora en un momento determinado. Este sería el caso del filotipo GLO11 que presentó valores significativos de correlación negativa con los filotipos GLO1 y GLO4, por lo que cuando la presencia relativa de GLO11 incrementaba, disminuiría la presencia de GLO1 y GLO4, que pueden llegar incluso a desaparecer.

Los resultados que se muestran en el sub-Capítulo 3 concuerdan básicamente con los obtenidos previamente en estudios desarrollados en ambientes muy diversos. Los primeros estudios en dinámica poblacional de hongos MA describen la existencia de cambios estacionales en una población de esporas de *Gigaspora gigantea* (Lee & Koske, 1994). Posteriormente, Merryweather & Fitter (1998) detectaron patrones temporales en la colonización de raíces correspondientes a *Hyacinthoides non-scripta*, resultados que fueron confirmados posteriormente mediante técnicas moleculares (Helgason *et al.*, 1999). Estudios subsiguientes confirmaron la existencia en muy diversos ambientes de este tipo de patrones temporales para determinados filotipos de hongos MA, e incluso para el conjunto de la comunidad de hongos MA. Por ejemplo en campos de cultivo en Inglaterra (Daniell *et al.*, 2001; Hijri *et al.*, 2006), en praderas de Escocia y Suecia (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Santos-González *et al.*, 2007) o en un bosque tropical de Panamá en el que se detectaron cambios estacionales de las especies de hongos MA dominantes en función de los cambios en las condiciones ambientales (Husband *et al.*, 2002).

Todas estas observaciones apoyan la idea de que para conocer bien la diversidad de hongos MA en un determinado ambiente es conveniente considerar e investigar esta dinámica poblacional (Liu *et al.*, 2009).

9. Dinámica espacio-temporal en condiciones controladas

Como se ha discutido anteriormente, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en consonancia con los recogidos en diversas publicaciones recientes, muestran que una alta proporción de las secuencias de hongos MA detectadas en las raíces de las plantas investigadas no habían sido encontradas con anterioridad en esporas de hongos MA (Santos-González *et al.*, 2006 & 2007; Öpik *et al.*, 2003 y 2008b). Los resultados del experimento de mesocosmos, diseñado a fin de determinar las posibles causas de esta discrepancia, aportan información adicional, que se discute a continuación.

9.1. Grado de micorrización, diversidad en raíces y longitud de micelio

El nivel de micorrización de las plantas un año después del establecimiento de los sistemas de mesocosmos era elevado, evidenciándose además que los valores de colonización apenas varían a los dos años de desarrollo de las plantas. Esto indica que las plantas hospedadoras se establecieron correctamente en el sistema y se asociaron rápidamente con los hongos MA presentes en el suelo hasta alcanzar un nivel de colonización suficientemente óptimo que se mantuvo constante en los dos tiempos de muestreo. Estos valores de colonización fueron más estables a lo largo del tiempo que los valores de diversidad de secuencias presentes en el interior de la raíz que sí registraron un cierto incremento en el segundo año. Por tanto, se puede decir que el aumento en los valores de los índices de diversidad de hongos MA en el interior de la raíz se debe a que se producen colonizaciones por parte de propágulos presentes en el suelo cuya dinámica de colonización era más lenta, confirmándose así la idea de que los distintos propágulos de hongos MA en el suelo exhiben ritmos de colonización muy diferentes (Helgason *et al.*, 2002; Cornejo, 2006).

Estos valores de porcentaje de micorrización correlacionan positiva y significativamente con los de longitud de micelio en suelo, lo que indicaría una dinámica de crecimiento que garantizaría el funcionamiento de la micorriza a lo largo del tiempo. Hay que hacer notar que los valores de longitud de micelio son relativamente bajos con respecto a los descritos en otros estudios llevados a cabo en campo (Giovannetti *et al.*, 2001) o en condiciones controladas (Cornejo, 2006).

De acuerdo con los resultados de las determinaciones de micelio y esporas se evidenciaron diferentes comportamientos de los hongos MA presentes en el suelo en función de la planta hospedadora. En el caso del romero los valores de abundancia absoluta de esporas se mantienen constantes entre el primer y segundo muestreo pero los valores de longitud de micelio aumentan significativamente entre estos dos muestreos. Cuando la planta hospedadora es el tomillo, sucede lo contrario, puesto que los valores de longitud de micelio apenas varían mientras que el número de esporas encontrado se duplica en el segundo muestreo en relación al primero. Este hecho indica

la activación de diferentes estrategias de colonización por parte de los hongos MA presentes en el suelo dependiendo, entre otros factores, de la planta hospedadora, como se había apuntado anteriormente (Hart & Reader, 2002; Liu *et al.*, 2009).

9.2. Comparación de la diversidad de hongos MA en raíz y suelo

Una primera observación destacable es que los valores de los índices de diversidad en las muestras de raíz eran ligeramente superiores a los obtenidos en suelo, un hecho novedoso pues normalmente se ha descrito lo contrario (Hempel *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en estos experimentos en mesocosmos apoyan la idea de que no todos los hongos MA presentes en el suelo se asocian por igual con diferentes plantas hospedadoras, como ya se apuntó anteriormente en este capítulo para el caso de los ensayos de campo. En efecto, se obtuvieron diferentes índices de diversidad y diferente composición de la comunidad en las muestras de suelo y raíz correspondientes a los sistemas de mesocosmos para cada una de las plantas hospedadoras. También se encontró que las comunidades de hongos MA correspondientes a esporas y micelio en suelo difieren significativamente, como cabía esperar en base a las diferencias detectadas en los valores de longitud de micelio y abundancia de esporas para las diferentes plantas hospedadoras.

El hecho de que se hayan encontrado filotipos en raíz no detectados en suelo puede explicarse de dos formas, bien porque algunos hongos MA, aunque débilmente representados en el suelo, experimentan un considerable desarrollo en el interior de las plantas hospedadoras sin necesidad de multiplicarse en el suelo, o bien porque procedan de los morfotipos de esporas que no pudieron ser identificados morfológicamente y por tanto no es factible asignarles una secuencia para saber si están relacionados o no. Los resultados de Hart & Reader (2002) apoyan esta idea ya que encontraron especies del género *Glomus* grupo A dominando las comunidades de hongos MA detectadas en raíz y presentando a su vez poca presencia en las muestras de suelo asociadas a estas plantas, sugiriendo por tanto diferentes comportamientos de este tipo de hongos en planta y en suelo.

9.3. Cambios interanuales en la comunidad de hongos MA en raíz y suelo

En el suelo se detectaron pequeños cambios a lo largo del tiempo. Se pasó de detectar 5 filotipos en el primer año a 6 en el segundo, debido a la aparición del filotipo MESO4 (*G. constrictum*) en este segundo tiempo de muestreo, coincidiendo su detección en forma de micelio y en forma de esporas en este mismo tiempo. Por tanto, se puede considerar a *G. constrictum* como un hongo más lento en su desarrollo en el suelo o bien con una funcionalidad enfocada a plantas bien establecidas en el sistema, y probablemente en un estado fenológico diferente. Estos resultados corroboran los obtenidos por Cornejo (2006) en relación a la dinámica de esta especie de hongo MA.

Al igual que sucedió en las muestras de suelo, también se detectaron algunos cambios en la diversidad detectada en raíz a lo largo del tiempo, pasando el número de filotipos encontrados de 5 a 6. En este caso el filotipo que aparece en el segundo año es MESO7, identificado como *G. etunicatum-like*.

Estos resultados se aproximan a los obtenidos en estudios previos en los que no se detectó una dinámica interanual definida en la diversidad de hongos MA en muestras correspondientes a diferentes años (Benjamin *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2009).

9.4. Correlaciones entre los filotipos de raíz y suelo, y con las otras variables experimentales estudiadas

Las correlaciones positivas entre filotipos procedentes de diferentes compartimentos del sistema de mesocosmos pueden estar reflejando una actividad micorrícica de la planta coordinada en cuanto al desarrollo y función de las fases extra- e intrarradicales del hongo. En el caso de las correlaciones negativas pueden indicar una sustitución funcional debida a algún cambio en las condiciones que afectan al sistema, de esta forma, unos filotipos resultarían sustituidos por otros, dependiendo de las necesidades de la planta en cada momento. Las correlaciones negativas detectadas entre el filotipo MESO1 en raíz y suelo con sus respectivos índices de diversidad en raíz y suelo, lo que

estaría indicando que el dominio ejercido en ambas comunidades de hongos MA por el filotipo MESO1 impide el desarrollo de otros hongos MA y por tanto hace que disminuyan significativamente los índices de diversidad. La correlación negativa detectada entre los porcentajes de micorrización y la abundancia relativa del filotipo MESO2 en las muestras de raíz, y teniendo en cuenta que los índices de micorrización se calcularon mediante la técnica de McGonigle & Fitter (1990), indica que este filotipo probablemente base su colonización en la producción de arbusculos y vesículas y no tanto en la de hifas intrarradicales que es lo que mide principalmente esta técnica.

10. Comparación de la diversidad de hongos MA de los ensayos de campo con la del ensayo de mesocosmos

Si se comparan las poblaciones de hongos MA detectadas en las muestras de raíz en condiciones de mesocosmos (sub-Capítulo 4 de Resultados) con las encontradas en las muestras de raíces de campo (sub-Capítulos 2 y 3 de Resultados), se observa que la correlación entre ambas poblaciones es bastante baja. En el caso del romero, las muestras de campo presentaron una riqueza específica de 11, teniendo en cuenta los 3 muestreos estacionales realizados, mientras que en las muestras de raíz correspondientes al ensayo de mesocosmos este índice era de 5, teniendo en cuenta los resultados correspondientes a los dos tiempos de muestreo. De los 5 filotipos detectados en el ensayo de mesocosmos, sólo dos estaban incluidos en los 11 filotipos correspondientes a las muestras de campo, estos son: MESO1 que se corresponde con GLO11 y MESO6 (*G. intraradices*) que se corresponde con GLO1. En tomillo, las diferencias referentes a la riqueza específica detectada son mayores, ya que en las muestras de campo se detectaron un total de 15 filotipos durante los tres tiempos de muestreo, mientras que en el ensayo de mesocosmos solamente se encontraron 5 filotipos, teniendo en común entre ambas muestras los mismos filotipos que en el caso del romero. La explicación obvia es que el ensayo en mesocosmos las plantas partían con solo los propágulos del suelo como fuente de inóculo, mientras que en campo las plántulas pueden disponer, desde sus inicios, de otras fuentes de inóculo. Concretamente, el proporcionado por plantas bien micorrizadas que crecen en su proximidad. De igual forma se puede explicar el

hecho de que en el ensayo de mesocosmos la proporción de filotipos “desconocidos” sea menor que en el caso de los estudios en raíces de campo.

11. Expectativas que ofrecen los resultados en cuanto a posibles desarrollos biotecnológicos para la producción de inoculantes representativos de la diversidad ecosistémica

Aunque los objetivos de esta Tesis se centraron en incrementar el conocimiento de aspectos básicos de la ecología (diversidad) de los hongos MA en ecosistemas naturales (mediterráneos), en la investigación desarrollada subyace un carácter orientado. Éste viene dado por las posibilidades de utilizar los hongos MA como inoculantes de las plantas que van a ser usadas en programas de revegetación y/o recuperación de suelos degradados. En este contexto, hay que recordar que, como es bien sabido (Barea *et al.*, 2007a), el máximo beneficio de la inoculación con hongos MA solo se consigue después de una selección muy controlada de los hongos más idóneos, representativos de la diversidad natural del ecosistema.

A la vista de la información obtenida y discutida en este trabajo sobre la diversidad de filotipos presentes en los diversos tipos de propágulos MA y de su diferente estrategia y dinámica de colonización, es obvio que estos conocimientos deben ser considerados para decidir la composición y estructura de los inoculantes de hongos. La razón, como se ha esbozado más arriba, es que en dichos inoculantes debe estar representada la máxima diversidad genética y funcional posible y maximizar así su eficacia en programas de revegetación/conservación. Los propágulos de hongos MA seleccionados se utilizarían como base para producir inóculos micorrícicos de calidad, adecuadamente contrastados y formulados para su aplicación en la producción de plantas con micorrización optimizada.

VI. CONCLUSIONES

1. La caracterización molecular de las comunidades de hongos MA presentes en raíces de plantas crecidas en campo requirió construir genotecas de la región NS31/AM1 de la subunidad 18S del ADNr de dichos hongos.
2. Las especies de plantas del romeral-tomillar objeto de estudio están colonizadas en su hábitat natural por comunidades de hongos MA bastante diversas cuyos filotipos pertenecen, mayoritariamente, al grupo A del género *Glomus*.
3. La mayoría de las secuencias de hongos MA detectadas en las raíces no habían sido descritas con anterioridad en esporas de estos hongos presentes en suelo micorrizosférico.
4. Los filotipos de hongos MA GLO1, correspondiente a *G. intraradices*, GLO3 y GLO8 pueden considerarse hongos generalistas o ubicuos en la comunidad vegetal romeral-tomillar, puesto que se detectaron en las diferentes plantas hospedadoras analizadas y en todos los tiempos de muestreo.
5. La composición de la comunidad de hongos MA que coloniza las raíces de las plantas estudiadas varía en función de la especie vegetal y de la época del año, lo que indica una selección preferencial por parte de la planta y la existencia de diferentes ritmos de colonización y funcionalidad de los distintos hongos MA.
6. El análisis comparativo en un sistema de mesocosmos de las comunidades de hongos MA presentes en raíz y en el suelo micorrizosférico asociado indica la existencia de diferentes comportamientos de colonización de los hongos MA, en cuanto a la producción de micelio extrarradical y esporas liberadas al suelo, en función de la planta hospedadora.
7. La presencia de secuencias de hongos MA en raíz no detectadas en el suelo del cual provienen pone de manifiesto la necesidad de proponer nuevas técnicas que permitan expresar toda la diversidad existente en las diferentes fuentes de inóculo de hongos MA en un ecosistema.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, L.K., Robson, A.D. & Boer, G.D.** (1984) The Effect of Phosphorus on the Formation of Hyphae in Soil by the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus fasciculatum*. *New Phytol* **97**(3), 437-446.
- Alguacil, M.M., Caravaca, F., Azcon, R. & Roldan, A.** (2008) Changes in biological activity of a degraded Mediterranean soil after using microbially-treated dry olive cake as a biosolid amendment and arbuscular mycorrhizal fungi. *European Journal of Soil Biology* **44**(3), 347-354.
- Alguacil, M.M., Lumini, E., Roldán, A., Salinas-García, J.R., Bonfante, P. & Bianciotto, V.** (2008) The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecol Appl* **18**(2), 527-536.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3), 403-410.
- Allen, M.F., Lansing, J. & Allen, E.B.** (2002) The role of mycorrhizal fungi in the composition and dynamics of plant communities: A scaling issue. *Progress in Botany, Vol 63* **63**, 344-367.
- Appelhans, M., Weber, H.C. & Imhof, S.** (2008) *Rutaceae* sampled from Germany, Malta, and Mallorca (Spain) are associated with AMF clustering with *Glomus hoi* Berch & Trappe. *Mycorrhiza* **18**(5), 263-268.
- Applied-Biosystems** (2005) Sequence scanner v.1.0.
- Azcón-Aguilar, C., Bago, B., Barea, J.M., Hock, B. & Varma, A.** (1998) Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. In *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 391-408. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Azcón-Aguilar, C., García-García, F. & Barea, J.M.** (1991) Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. In *Fijación y movilización biológica de nutrientes. Nuevas tendencias*, Vol. 2, pp. 129-147. Eds. J. Olivares & J.M. Barea. Madrid: CSIC.

- Azcón-Aguilar, C., Palenzuela, J., Roldán, A., Bautista, S., Vallejo, R. & Barea, J.M.** (2003) Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Appl Soil Ecol* **22**, 29-37.
- Bago, B. & Becard, G.** (2002) Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhizal Technol Agr Genes Bioproducts*, 33-48.
- Bago, B., Pfeffer, P.E. & Shachar-Hill, Y.** (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**(3), 949-957.
- Balestrini, R. & Lanfranco, L.** (2006) Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **16**(8), 509-524.
- Barea, J.M., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C.** (2005a) Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* **3**, 195-212.
- Barea, J.M., Escudero, J.L. & Azcon-Aguilar, C.** (1980) Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P fertilizers. *Plant and Soil* **54**(2), 283-296.
- Barea, J.M., Ferrol, N., Azcon-Aguilar, C. & Azcón, R.** (2008) Mycorrhizal symbioses. In *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions. Series: Plant Ecophysiology*, Vol. 7 pp. 143-163. Eds. P.J. White & J.P. Hammond. Dordrecht: Springer.
- Barea, J.M. & Jeffries, P.** (1995) Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. In *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*, pp. 521-559. Eds. A. Varma & B. Hock. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Barea, J.M. & Olivares, J.** (1998) Manejo de las propiedades biológicas del suelo. In

Agricultura Sostenible, pp. 173-193. Eds. R.M. Jiménez-Díaz & J. Lamo de Espinosa. Madrid: Editorial Mundi Prensa.

Barea, J.M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro, C., Quiñones, P.B., Azcón, R., Ferrol, N. & Azcón-Aguilar, C. (2007a) Significado, diversidad e impacto de los hongos de las micorrizas arbusculares en ambientes mediterráneos. In *Biodiversidad y Conservación de Fauna y Flora en Ambientes Mediterráneos*, pp. 155-185. Eds. J.M. Barea-Azcón, M. Moleón, R. Travesí, E. Ballesteros, J.M. Luzón & J.M. Tierno. Granada, España: Sociedad Granatense de Historia Natural.

Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. (2005b) Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* **56**(417), 1761-1778.

Barea, J.M., Toro, M. & Azcón, R. (2007b) The use of ³²P isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of phosphate-solubilizing bacteria and mycorrhizal fungi at increasing plant P availability. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Series: Developments in Plant and Soil Sciences*, pp. 223-227. Eds. E. Velázquez & C. Rodríguez-Barrueco. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Bartnicki-García, S. (1968) Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* **22**, 87-&.

Batisson, I., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.F., Mallet, C. & Bohatier, J. (2009) Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp from soil. *Environ Pollut* **157**(4), 1195-1201.

Benjamin, P.K., Anderson, R.C. & Liberta, A.E. (1989) Vesicular arbuscular mycorrhizal ecology of little bluestem across a prairie forest gradient. *Can J Bot* **67**(9), 2678-2685.

Berbee, M.L. & Taylor, J.W. (2001) Fungal molecular evolution: Gene trees and geologic time. *Mycota Vii: Systematics and Evolution, Pt B* **7**, 229-245.

- Bever, J.D., Richardson, S.C., Lawrence, B.M., Holmes, J. & Watson, M.** (2009) Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters* **12**(1), 13-21.
- Bever, J.D., Schultz, P.A., Pringle, A. & Morton, J.B.** (2001) Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience* **51**(11), 923-931.
- Bio-Rad-Laboratories** *Bio-Rad Silver Stain Handbook*. Hercules.
- Bio-Rad-Laboratories** *The Dcode™ Universal Mutation Detection System. Handbook*. Hercules.
- Bio-Rad-Laboratories** Gel Doc 2000. Hercules.
- Bio-Rad-Laboratories** InfoQuest FP software v.4.50. Hercules.
- Bio-Rad-Laboratories** *Protean II xi Cell System. Handbook*. Hercules.
- Blanca, G. & Morales, C.** (1991) *Flora del Parque Nacional de la Sierra de Baza*. Universidad de Granada: Servicio de publicaciones de la Universidad de Granada.
- Bohrer, K.E., Friese, C.F. & Amon, J.P.** (2004) Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza* **14**(5), 329-337.
- Borstler, B., Renker, C., Kahmen, A. & Buscot, F.** (2006) Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. *Biol Fertil Soils* **42**(4), 286-298.
- Brundrett, M.C. & Abbott, L.K.** (2002) Arbuscular mycorrhizas in plant communities. *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*, 151-193.
- Bruns, T.D. & Gardes, M.** (1993) Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Mol*

Ecol 2(4), 233-242.

Calvente, R., Cano, C., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. (2004) Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Appl Soil Ecol* 26(1), 11-19.

Caravaca, F., Barea, J.M., Palenzuela, J., Figueroa, D., Alguacil, M.M. & Roldan, A. (2003) Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Soil Ecol* 22(2), 103-111.

Cesaro, P., van Tuinen, D., Copetta, A., Chatagnier, O., Berta, G., Gianinazzi, S. & Lingua, G. (2008) Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato growing area. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM.00719-08.

Clapp, J.P., Young, J.P.W., Merryweather, J.W. & Fitter, A.H. (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol* 130(2), 259-265.

Cornejo, P., Azcon-Aguilar, C., Barea, J.M. & Ferrol, N. (2004) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fems Microbiology Letters* 241(2), 265-270.

Cornejo, P.E. (2006) Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrícicos y sus efectos en la estabilización de suelos degradados. Thesis. In *Facultad de Ciencias (Sección de Biología)* Granada: Universidad de Granada.

Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H. & Young, J.P.W. (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol Ecol* 36(2-3), 203-209.

- de Ridder-Duine, A.S., Kowalchuk, G.A., Klein Gunnewiek, P.J.A., Smant, W., van Veen, J.A. & de Boer, W.** (2005) Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology and Biochemistry* **37**(2), 349-357.
- Dilly, O., Bloem, J., Vos, A. & Munch, J.C.** (2004) Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl Environ Microbiol* **70**(1), 468-474.
- Dodd, J.C. & Krikun, J.** (1984) Observations on endogonaceous spores in the negev desert. *Trans Brit Mycol Soc* **82**(MAY), 536-540.
- Douhan, G.W., Petersen, C., Bledsoe, C.S. & Rizzo, D.M.** (2005) Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza* **15**(5), 365-372.
- Eom, A.H., Hartnett, D.C. & Wilson, G.W.T.** (2000) Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* **122**(3), 435-444.
- Estaún, V., Savé, R. & Biel, C.** (1997) AM inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions. *Appl Soil Ecol* **6**(3), 223-229.
- European-Bioinformatics-Institute** ClustalX - <http://ebi.ac.uk/clustalw>.
- European-Bioinformatics-Institute** EMBL Nucleotide Sequence Database - <http://www.ebi.ac.uk/embl/>.
- FAO** (1999) State of the World's Forests 1999. Rome: Food & Agriculture Organization of the United Nations.
- Felstein** (1993) PHYLIP, Version 3.66. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA

- Ferrol, N., Calvente, R., Cano, C., Barea, J.M. & Azcón-Aguilar, C.** (2004) Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification-threatened semiarid Mediterranean ecosystem. *Appl Soil Ecol* **25**, 123-133.
- Ferrol, N. & Pérez-Tienda, J.** (2009) Coordinated nutrient exchange in arbuscular mycorrhiza. In *Mycorrhizas: Functional Processes and Ecological Impact*, pp. 73-87. Eds. C. Azcón-Aguilar, J.M. Barea, S. Gianinazzi & V. Gianinazzi-Pearson. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Fuchs, B. & Haselwandter, K.** (2008) Arbuscular mycorrhiza of endangered plant species: potential impacts on restoration strategies. In *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. 3rd Ed*, pp. 565-579. Eds. A. Varma. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Gao, L.L., Delp, G. & Smith, S.E.** (2001) Colonization patterns in a mycorrhiza-defective mutant tomato vary with different arbuscular-mycorrhizal fungi. *New Phytol* **151**(2), 477-491.
- Gerdemann, J.W. & Nicolson, T.H.** (1963) Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting. *Transactions British Mycology Society* **46**, 234-235.
- Giovannetti, M.** (2008) Structure, extent and functional significance of belowground arbuscular mycorrhizal networks. In *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. 3rd Ed*, pp. 59-72. Eds. A. Varma. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Giovannetti, M., Fortuna, P., Citernes, A.S., Morini, S. & Nuti, M.P.** (2001) The Occurrence of Anastomosis Formation and Nuclear Exchange in Intact Arbuscular Mycorrhizal Networks. *New Phytol* **151**(3), 717-724.

- Gollotte, A., van Tuinen, D. & Atkinson, D.** (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* **14**(2), 111-117.
- González-Guerrero, M., Benabdellah, K., Ferrol, N. & Azcón-Aguilar, C.** (2009) Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhiza. In *Mycorrhizas: Functional Processes and Ecological Impact*, pp. 107-121. Eds. C. Azcón-Aguilar, J.M. Barea, S. Gianinazzi & V. Gianinazzi-Pearson. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H.R., Abubaker, J., Douds, D.D., Allen, J.W., Bucking, H., Lammers, P.J. & Shachar-Hill, Y.** (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **435**(7043), 819-823.
- Gutierrez, A., Morte, A. & Honrubia, M.** (2003) Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia claveryi* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza* **13**(6), 299-307.
- Hall, T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Hart, M.M. & Klironomos, J.N.** (2002) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning. *Mycorrhizal Ecology* **157**, 225-242.
- Hart, M.M. & Reader, R.J.** (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **153**, 335-344.
- Haug, I., Lempe, J., Homeier, J., Weiss, M., Setaro, S., Oberwinkler, F. & Kottke, I.** (2004) *Graffenrieda emarginata* (Melastomataceae) forms mycorrhizas with Glomeromycota and with a member of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate in the organic soil of a neotropical mountain rain forest. *Can J Bot* **82**, 340-356.
- He, J.Z., Xu, Z.H. & Hughes, J.** (2005) Analyses of soil fungal communities in adjacent

- natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. *Fems Microbiology Letters* **247**(1), 91-100.
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L. & Hedges, S.B.** (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**(5532), 1129-1133.
- Helgason, T., Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H. & Young, J.P.Y.** (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394**, 431.
- Helgason, T. & Fitter, A.** (2005) The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist* **19**(3), 96-101.
- Helgason, T., Fitter, A.H. & Young, J.P.W.** (1999) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Mol Ecol* **8**(4), 659-666.
- Helgason, T., Merryweather, J.W., Denison, J., Wilson, P., Young, J.P.W. & Fitter, A.H.** (2002) Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *J Ecol* **90**(2), 371-384.
- Helgason, T., Merryweather, J.W., Young, J.P.W. & Fitter, A.H.** (2007) Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *J Ecol* **95**(4), 623-630.
- Hempel, S., Renker, C. & Buscot, F.** (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environ Microbiol* **9**, 1930-1938.
- Herrera, M.A., Salamanca, C.P. & Barea, J.M.** (1993) Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **59**(1), 129-133.

Hijri, I., Sykorová, Z., Oehl, F., Ineichen, K., Mäder, P., Wiemken, A. & Redecker, D. (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Mol Ecol* **15**(8), 2277-2289.

Hildebrandt, U., Ouziad, F., Marner, F.J. & Bothe, H. (2006) The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *Fems Microbiology Letters* **254**(2), 258-267.

Hodge, A., Campbell, C.D. & Fitter, A.H. (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* **413**(6853), 297-299.

Hunter, J.M.L. & Sulzer, A. (1996) Genetic diversity. In *Fundamentals of conservation biology*, pp. 79-103. Eds. J.M.L. Hunter & A. Sulzer. Cambridge: Blackwell Science.

Husband, R., Herre, E.A. & Young, J.P.W. (2002) Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiol Ecol* **42**(1), 131-136.

Invitrogen TA Cloning® Kit, version V Handbook. Karlsruhe: Invitrogen Life Technologies.

James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., et al. (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**(7113), 818-822.

Jansa, J., Mozafar, A., Kuhn, G., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R. & Frossard, E. (2003) Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecol Appl* **13**(4), 1164-1176.

Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. & Barea, J.M. (2003) The

contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils* **37**(1), 1-16.

Johansson, J.F., Paul, L.R. & Finlay, R.D. (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol* **48**(1), 1-13.

Johnson, N.C., Rowland, D.L., Corkidi, L., Egerton-Warburton, L.M. & Allen, E.B. (2003) Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology* **84**(7), 1895-1908.

Kjoller, R. & Rosendahl, S. (2000) Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* **226**(2), 189-196.

Kovacs, G.M., Balazs, T. & Penzes, Z. (2007) Molecular study of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the sporophyte of the eusporangiate rattlesnake fern (*Botrychium virginianum*, *Ophioglossaceae*). *Mycorrhiza* **17**, 597-605.

Kowalchuk, G.A., De Souza, F.A. & Van Veen, J.A. (2002) Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol Ecol* **11**(3), 571-581.

Kruger, M., Stockinger, H., Kruger, C. & Schussler, A. (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **183**(1), 212-223.

Lanfranco, L., Perotto, S. & Bonfante, P. (1998) Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal Fungi. In *Applications of PCR in mycology*, pp. 107-124. Eds. P. Bridge, D. Arora, C. Reddy & R. Elander. CAB International.

Lee, D.H., Zo, Y.G. & Kim, S.J. (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **62**(9), 3112-3120.

- Lee, J., Lee, S. & Young, J.P.W.** (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* **65**(2), 339-349.
- Lee, P.J. & Koske, R.E.** (1994) *Gigaspora gigantea* - seasonal abundance and aging of spores in a sand dune. *Mycol Res* **98**, 453-457.
- Liang, Z.B., Drijber, R.A., Lee, D.J., Dwiekat, I.M., Harris, S.D. & Wedin, D.A.** (2008) A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **40**(4), 956-966.
- Liu, Y., He, L., An, L.Z., Helgason, T. & Feng, H.Y.** (2009) Arbuscular mycorrhizal dynamics in a chronosequence of *Caragana korshinskii* plantations. *FEMS Microbiol Ecol* **67**(1), 81-92.
- López-Bermúdez, F. & Albaladejo, J.** (1990) Factores ambientales de la degradación del suelo en el área Mediterránea. In *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*, pp. 15-45. Eds. J. Albaladejo, M.A. Stocking & E. Díaz. Murcia: CSIC.
- López-González, G.A.** (2001) *Los árboles y arbustos de la península ibérica y baleares (especies silvestres y las principales cultivadas)*. España: Edic. Mundi-Prensa.
- Lum, M.R. & Hirsch, A.M.** (2003) Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *J Plant Growth Regul* **21**, 368-382.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T.Y., Baloch, E., et al.** (2004) Assembling the fungal tree of life: Progress, classification and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* **91**(10), 1446-1480.
- Lloyd-Macgilp, S.A., Chambers, S.M., Dodd, J.C., Fitter, A.H., Walker, C. & Young,**

- J.P.W.** (1996) Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytol* **133**(1), 103-111.
- Ma, W.K., Siciliano, S.D. & Germida, J.J.** (2005) A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biology & Biochemistry* **37**(9), 1589-1597.
- Magurran, A.E.** (1988) *Ecological diversity and its measurement*. New Jersey: Princeton University Press.
- Maherali, H. & Klironomos, J.N.** (2007) Influence of Phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* **316**(5832), 1746-1748.
- Mallet, J.** (1996) The genetics of biological diversity: from varieties to species. In *Biodiversity, a biology of numbers and difference*, pp. 41-57. Eds. K.J. Gaston. Cambridge: Blackwell Science.
- Marie, D., Zhu, F., Balague, V., Ras, J. & Vaultot, D.** (2006) Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). *FEMS Microbiol Ecol* **55**(3), 403-415.
- Martínez, M.** (1997) Sistemática molecular; comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Española de México* **60**, 123-136.
- McGonigle, T.P. & Fitter, A.H.** (1990) Ecological specificity of vesicular arbuscular mycorrhizal associations. *Mycol Res* **94**, 120-122.
- Merryweather, J.W. & Fitter, A.H.** (1998) Patterns of arbuscular mycorrhiza colonisation of the roots of *Hyacinthoides non-scripta* after disruption of soil mycelium. *Mycorrhiza* **8**, 87-91.
- Michigan-State-University** (2005) RDP Chimera Check - <http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>.

- Millipore** *Montage PCR Centrifugal Filter Devices Handbook*. Billerica: Millipore Corporation.
- MoBio** *Ultrapure Soil DNA Isolation Kit Handbook*. California: MoBio Laboratories.
- Montalvo, J.** (1992) Interpretación ecológica de la erosión y desertificación. *Ecosistemas* **3**, 14-17.
- Moreno, C.E.** (2001) *Métodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza: M&T-Manuales y Tesis SEA.
- Morton, J.B. & Benny, G.L.** (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes) - a new order, glomales, 2 new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and 2 new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* **37**, 471-491.
- Morton, J.B., Bentivenga, S.P. & Bever, J.D.** (1995) Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can J Bot* **73**, S25-S32.
- Muyzer, G.** (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2**(3), 317-322.
- Muyzer, G., Dewaal, E.C. & Uitterlinden, A.G.** (1993) Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-rna. *Appl Environ Microbiol* **59**(3), 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K.** (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **73**(1), 127-141.

National-Center-for-Biotechnology-Information NCBI Blast -

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

National-Center-for-Biotechnology-Information NCBI Database -

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Newman, E.I. (1966) A method of estimating total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* **3**(1), 139-&.

Nielsen, K.B., Kjoller, R., Olsson, P.A., Schweiger, P.F., Andersen, F.O. & Rosendahl, S. (2004) Colonisation and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in southern Sweden. *Mycol Res* **108**, 616-625.

Öehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T. & Wiemken, A. (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl Environ Microbiol* **69**(5), 2816-2824.

Oliveira, C.A., Sa, N.M.H., Gomes, E.A., Marriel, I.E., Scotti, M.R., Guimaraes, C.T., Schaffert, R.E. & Alves, V.M.C. (2009) Assessment of the mycorrhizal community in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting for phosphorus efficiency in the acid savannas of Brazil using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Appl Soil Ecol* **41**(3), 249-258.

Öpik, M., Moora, M., Liira, J., Koljalg, U., Zobel, M. & Sen, R. (2003) Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytol* **160**(3), 581-593.

Öpik, M., Moora, M., Liira, J. & Zobel, M. (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *J Ecol* **94**(4), 778-790.

Öpik, M., Moora, M., Zobel, M., Saks, U., Wheatley, R., Wright, F. & Daniell, T. (2008a) High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich

coniferous forest. *New Phytol* **179**(3), 867-876.

Öpik, M., Saks, U., Kennedy, J. & Daniell, T. (2008b) Global diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi-community composition and links with functionality. In *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. 3rd Ed, pp. 89-111. Eds. A. Varma. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Palenzuela, J., Azcon-Aguilar, C., Figueroa, D., Caravaca, F., Roldan, A. & Barea, J.M. (2002) Effects of mycorrhizal inoculation of shrubs from Mediterranean ecosystems and composted residue application on transplant performance and mycorrhizal developments in a desertified soil. *Biol Fertil Soils* **36**, 170-175.

Palenzuela, J. & Barea, J.M. (2002) Técnicas empleadas en el estudio de las micorrizas de plantas endémicas del tomillar dolomítico del Parque Natural de la Sierra de Baza. *Acta Granatense* **2**, 125-138.

Palenzuela, J. & Barea, J.M. (2009) El uso de hongos micorrícicos arbusculares en la restauración de ecosistemas amenazados de desertificación en España. In *Ecología de Micorrizas Arbusculares e Restauración de Ecosistemas*: Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**(10), 763-775.

Pawlowska, T.E. & Taylor, J.W. (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **427**(6976), 733-737.

Pearson, V. & Read, D.J. (1975) Physiology of mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trans Brit Mycol Soc* **64**(FEB), 1-7.

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

Pietikainen, A., Kytoviita, M.M., Husband, R. & Young, J.P.W. (2007) Diversity and persistence of arbuscular mycorrhizas in a low-Arctic meadow habitat. *New Phytol* **176**(3), 691-698.

Pirozynski, K.A. & Malloch, D.W. (1975) Origin of land plants - matter of mycotropism. *Biosystems* **6**(3), 153-164.

Polar-engineering-and-consulting (2008) SPSS v.17.0.

Poulsen, K.H., Nagy, R., Gao, L.L., Smith, S.E., Bucher, M., Smith, F.A. & Jakobsen, I. (2005) Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant in tomato associated with a compatible fungus. *New Phytol* **168**(2), 445-453.

Pozo, M.J. & Azcon-Aguilar, C. (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(4), 393-398.

Qiagen Dneasy® plant mini kit and Dneasy plant maxi kit handbook.

Qiagen QUIAEX® II Gel Extraction Kit Handbook.

Redecker, D. (2000) Specific PGR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* **10**(2), 73-80.

Redecker, D., Hijri, I. & Wiemken, A. (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica* **38**(2), 113-124.

Redecker, D., Morton, J.B. & Bruns, T.D. (2000) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol* **14**(2), 276-284.

Redecker, D. & Raab, P. (2006) Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* **98**(6),

885-895.

Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C. & Werner, D. (1997) Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomales. *Appl Environ Microbiol* **63**(5), 1756-1761.

Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. & Kerp, H. (1994) Four hundred-million-year-old vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(25), 11841-11843.

Renker, C., Blanke, V. & Buscot, F. (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environ Pollut* **135**(2), 255-266.

Requena, N., Jeffries, P. & Barea, J.M. (1996) Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Appl Environ Microbiol* **62**(3), 842-847.

Rillig, M.C. (2004) Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters* **7**(8), 740-754.

Rivas-Martínez, S. (1976) *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Roderic, D.M. (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.

Rodríguez-Echeverría, S., de la Pena, E., Moens, M., Freitas, H. & van der Putten, W.H. (2009) Can root-feeders alter the composition of AMF communities? Experimental evidence from the dune grass *Ammophila arenaria*. *Basic and Applied Ecology* **10**(2), 131-140.

Rodríguez-Echeverría, S. & Freitas, H. (2006) Diversity of AMF associated with

- Ammophila arenaria* ssp *arundinacea* in Portuguese sand dunes. *Mycorrhiza* **16**(8), 543-552.
- Ruíz-Lozano, J.M.** (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* **13**(6), 309-317.
- Saito, K., Suyama, Y., Sato, S. & Sugawara, K.** (2004) Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* **14**(6), 363-373.
- Sanders, I.R.** (2004) Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity - are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques? *New Phytol* **164**(3), 415-418.
- Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T. & Wiemken, A.** (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales - application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* **130**(3), 419-427.
- Santos-González, J.C.** (2007) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grasslands and arable fields. Ecological factors related to community composition and dynamics. Thesis. In *Faculty of natural resources and agricultural sciences* Uppsala (Suecia): Swedish University of Agricultural Sciences.
- Santos-González, J.C., Finlay, R.D. & Tehler, A.** (2006) Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytol* **172**(1), 159-168.
- Santos-González, J.C., Finlay, R.D. & Tehler, A.** (2007) Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Appl Environ Microbiol* **73**(17), 5613-5623.
- Schechter, S.P. & Bruns, T.D.** (2008) Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol*

Ecol **17**(13), 3198-3210.

Scherwinski, K., Grosch, R. & Berg, G. (2008) Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* **64**(1), 106-116.

Scheublin, T.R., Ridgway, K.P., Young, J.P.W. & van der Heijden, M.G.A. (2004) Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl Environ Microbiol* **70**(10), 6240-6246.

Schussler, A. (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**(1-2), 75-83.

Schussler, A., Gehrig, H., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001) Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol Res* **105**, 5-15.

Schwarzott, D., Walker, C. & Schussler, A. (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Mol Phylogenet Evol* **21**(2), 190-197.

Schwieger, F. & Tebbe, C.C. (1998) A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16s rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* **64**(12), 4870-4876.

Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C. & Lalonde, M. (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**(6424), 67-69.

Simon, L., Lalonde, M. & Bruns, T.D. (1992a) Specific amplification of 18s fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* **58**(1), 291-295.

Simon, L., Levesque, R.C. & Lalonde, M. (1992b) Rapid quantitation by PCR of

- endomycorrhizal fungi colonizing roots. *PCR Methods Appl* **2**(1), 76-80.
- Simon, L., Levesque, R.C. & Lalonde, M.** (1993) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism polymerase chain-reaction. *Appl Environ Microbiol* **59**(12), 4211-4215.
- Smith, S.E.** (1966) Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol* **65**(4), 488-&.
- Smith, S.E. & Read, D.J.** (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. New York: Elsevier, Academic Press.
- Solbrig, O.T.** (1991) *From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity*. Cambridge: IUBS-SCOPEUNESCO.
- Sonjak, S., Beguiristain, T., Leyval, C. & Regvar, M.** (2009) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with selected plants from saline and metal polluted environments. *Plant and Soil* **314**(1-2), 25-34.
- Stjohn, B.J., Smith, S.E., Nicholas, D.J.D. & Smith, F.A.** (1985) Enzymes of ammonium assimilation in the mycorrhizal fungus *Pezizella-ericae* Read. *New Phytol* **100**(4), 579-584.
- Stukenbrock, E.H. & Rosendahl, S.** (2005) Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. *Mol Ecol* **14**(3), 743-752.
- Sykorová, Z., Wiemken, A. & Redecker, D.** (2007) Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl Environ Microbiol* **73**(17), 5426-5434.
- Tehler, A., Farris, J.S., Lipscomb, D.L. & Kallersjo, M.** (2000) Phylogenetic analyses of

- the fungi based on large rDNA data sets. *Mycologia* **92**, 459-474.
- Tehler, A., Little, D.P. & Farris, J.S.** (2003) The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosomal sequences of chitinous fungi, Fungi. *Mycol Res* **107**, 901-916.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G.** (1997) The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**(24), 4876-4882.
- Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T.L. & Flynn, S.J.** (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol* **13**(2), 109-122.
- Tisdall, J.M., Smith, S.E. & Rengasamy, P.** (1997) Aggregation of soil by fungal hyphae. *Australian Journal of Soil Research* **35**(1), 55-60.
- Tobar, R., Azcon, R. & Barea, J.M.** (1994) Improved nitrogen uptake and transport from n-15-labeled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytol* **126**(1), 119-122.
- Trappe, J.M.** (1986) Mycorrhizal fungi as determinants of plant successional patterns. *American Journal of Botany* **73**(5), 694-694.
- Trouvelot, S., van Tuinen, D., Hijri, M. & Gianinazzi-Pearson, V.** (1999) Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* **8**(4), 203-206.
- University-of-Georgia** Analytical Rarefaction Program v.1.3 -
<http://www.uga.edu/strata/software>.
- Vallino, M., Massa, N., Lumini, E., Bianciotto, V., Berta, G. & Bonfante, P.** (2006) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. *Environ Microbiol* **8**(6), 971-983.
- van der Heijden, M.G.A.** (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for

seedling establishment in grassland. *Ecology Letters* 7(4), 293-303.

van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I.R. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396(6706), 69-72.

van der Heijden, M.G.A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I.R. (2006) The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytol* 172, 739-752.

van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. & Gianinazzi-Pearson, V. (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7(7), 879-887.

Vandenkoornhuise, P., Husband, R., Daniell, T.J., Watson, I.J., Duck, J.M., Fitter, A.H. & Young, J.P.W. (2002) Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol Ecol* 11(8), 1555-1564.

Vandenkoornhuise, P., Ridgway, K.P., Watson, I.J., Fitter, A.H. & Young, J.P.W. (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Mol Ecol* 12(11), 3085-3095.

Vasquez, A., Ahrne, S., Pettersson, B. & Molin, G. (2001) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Letters in Applied Microbiology* 32(4), 215-219.

Walker, C. (1992) Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (glomales) - a possible way forward. *Agronomie* 12(10), 887-897.

- Walker, C. & Schüßler, A.** (2004) Nomenclatural Clarifications and New Taxa in the Glomeromycota *Pacispora*. *Mycol Res* **108**(9), 981-982.
- Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., Nishimura, I. & Schubler, A.** (2007) Molecular phylogeny and new taxa in the *Archaeosporales* (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycol Res* **111**, 137-153.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sininsky & T.J. White. San Diego: Academic Press, Inc.
- Whitfield, L., Richards, A.J. & Rimmer, D.L.** (2004) Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonisation in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza* **14**(1), 55-62.
- Wirsel, S.G.R.** (2004) Homogenous stands of a wetland grass harbour diverse consortia of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* **48**(2), 129-138.
- Wolfe, B.E., Mummey, D.L., Rillig, M.C. & Klironomos, J.N.** (2007) Small-scale spatial heterogeneity of arbuscular mycorrhizal fungal abundance and community composition in a wetland plant community. *Mycorrhiza* **17**(3), 175-183.
- Wubet, T., Weiss, M., Kottke, I. & Oberwinkler, F.** (2003) Morphology and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultivated yew (*Taxus baccata*). *Can J Bot* **81**(3), 255-266.
- Wubet, T., Weiss, M., Kottke, I., Teketay, D. & Oberwinkler, F.** (2006) Phylogenetic analysis of nuclear small subunit rDNA sequences suggests that the endangered African Pencil Cedar, *Juniperus procera*, is associated with distinct members of *Glomeraceae*. *Mycol Res* **110**, 1059-1069.

- Yu, T., Egger, K.N. & Peterson, R.L.** (2001) Ectendomycorrhizal associations - characteristics and functions. *Mycorrhiza* **11**(4), 167-177.
- Yuan, X.L., Xiao, S.H. & Taylor, T.N.** (2005) Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science* **308**(5724), 1017-1020.
- Zachow, C., Berg, C., Mueller, H., Meincke, R., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. & Berg, G.** (2009) Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *Isme Journal* **3**(1), 79-92.