

~~T Prov. 23/138~~
T 10/37

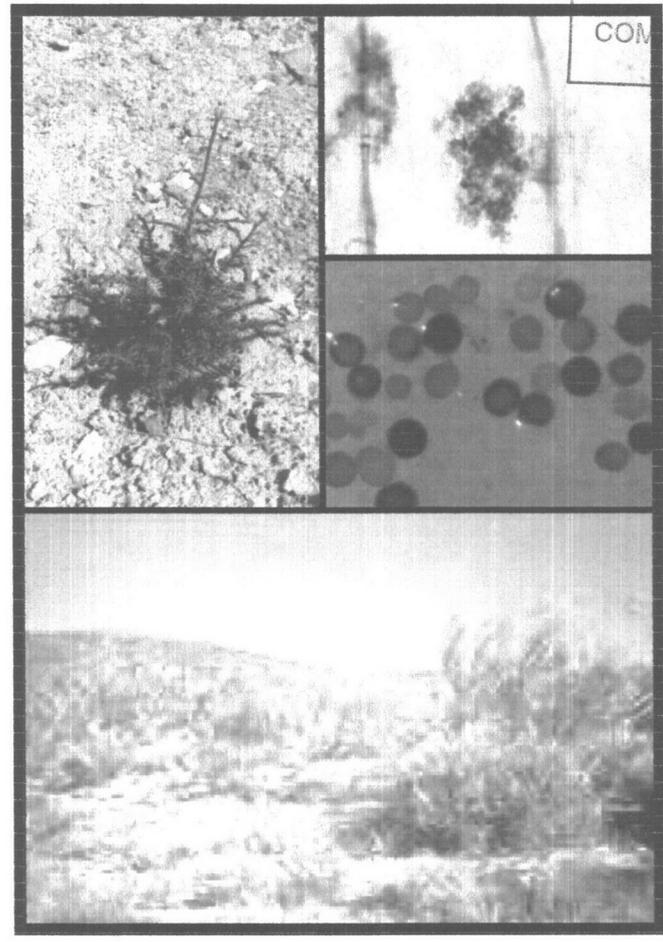


Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 22/01/01
ENTRADA NUM. 173

**Prospección y aplicación de Micorrizas en
especies vegetales autóctonas del matorral,
para favorecer la revegetación de ecosistemas
mediterráneos degradados**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
12 FEB. 2001
COMISION DE DOCTORADO

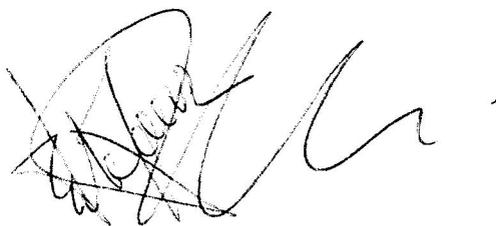


BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 13385504
N.º Copia 16347973

Estefanía Pérez Solís
2001

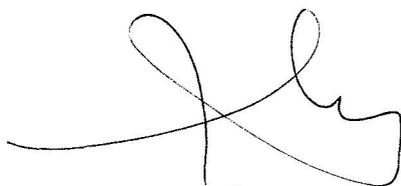
**Prospección y aplicación de Micorrizas en especies
vegetales autóctonas del matorral, para favorecer la
revegetación de ecosistemas mediterráneos degradados.**

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas
Estefanía Pérez Solís
para aspirar al Título de Doctor.



Fdo: Estefanía Pérez Solís

Director de la Tesis Doctoral



Fdo. José Miguel Barea Navarro
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada) y financiada por una Beca de Formación de Postgrado en España del Ministerio de Educación y Cultura (PN96).

A mis padres
A Alvaro

Indice

I INTERÉS Y OBJETIVOS.....3

II INTRODUCCIÓN..... 9

INTRODUCCIÓN A LA TEMÁTICA DE INVESTIGACIÓN..... 9

Biodiversidad y estabilidad de ecosistemas terrestres..... 9

Características de los Ecosistemas Mediterráneos..... 10

El fenómeno de la "erosion"..... 11

*Degradación de la cubierta vegetal y de la calidad ambiental
en ecosistemas mediterráneos..... 15*

La desertificación en ambientes mediterráneos..... 18

*Restauración/revegetación de espacios naturales degradados en ambientes
mediterráneos..... 20*

Significado de los microorganismos en los sistemas suelo-planta..... 21

*Microorganismos beneficiosos para la restauración de la calidad
ambiental en
ecosistemas mediterráneos..... 23*

HONGOS DE LA MICORRIZA.....25

Filogenia y taxonomía de las Micorrizas Arbusculares..... 28

Formación de las Micorrizas Arbusculares..... 31

Ecología de las Micorrizas Arbusculares y diversidad de hongos MA..... 33

*Prospección y aplicación de las micorrizas para favorecer la revegetación
de ecosistemas mediterráneos degradados con especies vegetales
autóctonas.....34*

III PARQUE NATURAL "SIERRA DE BAZA".....39

IV PARTE EXPERIMENTAL..... 52

CAPITULO 1..... 53

ANÁLISIS DEL POTENCIAL INFECTIVO Y DE LA DIVERSIDAD DE
HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA) EN
DIFERENTES COMUNIDADES DEL PARQUE NATURAL "SIERRA DE
BAZA".

Introducción.....53

Material y Métodos	55
<i>Muestras</i>	55
<i>Multiplicación de Hongos MA</i>	55
<i>Aislamiento de esporas de hongos formadores de micorrizas</i> <i>arbusculares</i>	
<i>de las muestras de suelo</i>	60
Centrifugación en gradiente de sacarosa	60
Cuantificación de esporas	60
Identificación de morfotipos de hongos MA	61
Obtención de inóculos puros	63
Resultados	64
<i>Identificación y caracterización morfológica de las especies de</i> <i>hongos MA aisladas en el Parque Natural "Sierra de Baza".</i>	75
<i>Glomus mosseae</i>	75
<i>Glomus claroideum</i>	77
<i>Glomus coronatum</i>	78
<i>Glomus intraradices</i>	78
<i>Glomus occultum</i>	79
<i>Glomus constrictum</i>	81
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	81
<i>Scutellospora calospora</i>	82
Discusión	84
CAPITULO 2	87
ESTUDIO DE LA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN Y DE LA COMPATIBILIDAD FUNCIONAL ENTRE DIVERSAS ESPECIES DE HONGOS Y PLANTAS NATIVAS DE LA SIERRA DE BAZA	
Introducción	87
Material y Métodos	89
<i>Ensayos de germinación</i>	89
<i>Ensayos de invernadero</i>	90
Resultados	92
<i>Ensayos de germinación</i>	92
<i>Ensayos de invernadero</i>	94
Discusión	106
CAPITULO 3	109
EFFECTOS DE LA EROSIÓN SIMULADA SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS HONGOS DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR EN SU INTERACCIÓN CON LA VEGETACIÓN	
Introducción	109
Material y Métodos	111

<i>Efecto de la erosión simulada sobre el potencial micorrícico natural de tres comunidades vegetales.....</i>	111
<i>Efecto del micelio extrarradical de los hongos MA nativos en el establecimiento de nuevas plántulas en cosistemas degradados.....</i>	112
Resultados.....	115
<i>Efecto de la erosión simulada sobre el potencial micorrícico natural de tres comunidades vegetales.....</i>	115
<i>Efecto del micelio extrarradical de los hongos MA nativos en el establecimiento de nuevas plántulas en ecosistemas degradados....</i>	117
Discusión.....	129
CAPITULO 4	133
ENSAYOS DE CAMPO	
Introducción.....	133
Material y Métodos.....	134
<i>La Fraguara (Charches).....</i>	134
<i>Narváez.....</i>	134
Resultados.....	135
<i>La Fraguara (Charches).....</i>	136
<i>Narváez.....</i>	139
Discusión.....	146
V CONCLUSIONES.....	151
VI BIBLIOGRAFÍA.....	155

I. Interés y Objetivos

Contexto, Interés y Objetivos de la investigación propuesta

El equilibrio natural que rige la estabilidad de un ecosistema puede ser perturbado cuando se producen cambios en la actividad de procesos naturales (climáticos, geomorfológicos, paleotectónicos, etc), los cuales provocan la degradación progresiva de la calidad ambiental del ecosistema. Si la perturbación es suficientemente drástica, o prolongada, puede dar lugar a un proceso de *desertización*. Cuando a la acción de agentes perturbadores de tipo "natural" se unen impactos antrópicos negativos, el proceso degradativo se conoce con el nombre de *desertificación*. Las consecuencias de la desertificación son impredecibles, ya que tras la degradación de la vegetación, ocurre la de la fauna, por depender esta de la primera, así como la del suelo que soporta al ecosistema, por lo que la degradación del mismo llega a ser irreversible.

En ambientes mediterráneos, las perturbaciones que causan la degradación de los ecosistemas están determinadas por sus peculiares características, marcadas por diversos factores específicos tales como:

- Sequía estival prolongada, que coincide con los mayores niveles térmicos.
- Relieve muy accidentado, con grandes desniveles y fuertes pendientes.
- Suelos muy disgregables e inestables.
- Precipitaciones irregulares, de gran intensidad y corta duración.
- Fragilidad de la cobertura vegetal del suelo.

Sin lugar a dudas, los procesos de desertización y desertificación están más exacerbados en ambientes mediterráneos. El debatido cambio climático tendría una mayor incidencia en el área mediterránea, ya que la sequía se hace patente en periodos cíclicos anuales, lo que conlleva a desequilibrios en vegetación, fauna, suelo etc. Si a ello se une una mala gestión de los recursos naturales, las consecuencias serán aún más trágicas.

Entre las actividades antrópicas que están contribuyendo a la degradación de los entornos mediterráneos cabe citar la deforestación, la transformación de terrenos a cultivos intensivos, la urbanización de áreas (sobre todo en zonas turísticas), y el sobrepastoreo. También están influyendo las repoblaciones forestales inadecuadas, donde han primado más los intereses económicos inmediatos (por ejemplo, plantaciones de especies exóticas de crecimiento rápido para producción maderera, como los eucaliptos), o las excesivas densidades de plantación, que generan cambios bruscos en la composición biológica, la pérdida de la diversidad y el desarrollo y expansión de plagas y enfermedades.

Es indudable que la *revegetación* es una estrategia clave para la *restauración* de ecosistemas desertificados, o amenazados de desertificación, particularmente en ambientes mediterráneos. Es por ello que *los programas de revegetación, propuestos por distintas Organizaciones, tratan de ser la respuesta al reto de la lucha contra la desertificación.*

De acuerdo con diversos autores, la estrategia de revegetación más apropiada para la Cuenca Mediterránea debe basarse en especies arbustivas, subarbustivas y herbáceas, más que en arbóreas. Los arbustos del matorral mediterráneo son, en general, especies de rápido crecimiento que poseen una alta capacidad de enraizar profundamente y de mejorar la calidad del suelo, mediante la formación de agregados estables, lo cual facilita la sucesión natural hacia comunidades más desarrolladas y hacia la etapa clímax o bosque. La implantación directa de especies climáticas puede ser difícil o de dudoso resultado en suelos poco profundos o con poca capacidad de retención de

agua. Por lo cual, es necesario la elaboración de unos modelos de restauración forestal que, sin abandonar el principio general de evolución del medio hacia ecosistemas más estables, biodiversos y productivos, considere la utilización y manejo del matorral, la conservación y mejora de los recursos naturales disponibles, así como el desarrollo sostenible de las poblaciones. En resumen, mediante el manejo del matorral en estrategias de revegetación se pretende conseguir la mayor cobertura en el menor espacio de tiempo posible y asegurar el mantenimiento y evolución hacia estructuras autoperpetuables y diversas.

Un hecho bien conocido, y fácilmente visualizable, es que además de la degradación de la cubierta vegetal, la desertificación provoca pérdida de suelo. Sin embargo, es menos obvio, aunque ampliamente demostrado, que la erosión del suelo afecta a la microbiota que en él reside. Este fenómeno es de suma importancia ya que el funcionamiento y estabilidad de un ecosistema edáfico depende, en gran medida, de la actividad microbiana asociada a las raíces de las plantas, dado que los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes de las plantas son propulsados por microorganismos. En efecto, los componentes de la microbiota del suelo protagonizan diversas acciones que producen beneficios para las plantas a las que se asocian. Así, se sabe que la microbiota facilita la captación de nutrientes, produce fitohormonas que ayudan al enraizamiento y desarrollo de las plantas, protegen a estas contra patógenos, descomponen sustancias tóxicas y mejoran la estructura del suelo.

Entre los microorganismos beneficiosos se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares (en adelante "micorrizas"). Dichos microorganismos se asocian, en forma de simbiosis, con las raíces de la mayoría de las plantas pertenecientes al matorral mediterráneo. Las micorrizas desempeñan una importante función en el establecimiento, supervivencia, captación de nutrientes, crecimiento y salud de la planta. Dadas las acciones claves que los microorganismos son capaces de desarrollar y el hecho de que su potencialidad se deteriore en un proceso de degradación, el estudio de las micorrizas en ecosistemas degradados es de suma importancia para conocer mejor su funcionamiento, lo que facilitaría su

aplicación, en programas de revegetación tras adecuados procesos biotecnológicos.

De acuerdo con las premisas que anteceden, se propuso un *Proyecto de Tesis Doctoral* cuyo **Objetivo General** era “*la prospección y manejo de las micorrizas en especies autóctonas del matorral arbustivo y subarbustivo como componente de una estrategia de revegetación de ecosistemas mediterráneos degradados*”.

Para llevar a cabo este estudio se eligió como base de investigación el Parque Natural “Sierra de Baza”, en la provincia de Granada, ya que en él se desarrollan diversas comunidades de especies autóctonas características del matorral mediterráneo, en algunos casos en proceso de degradación. Una vez seleccionadas unas comunidades modelo se propuso un Plan de Investigación con los siguientes **Objetivos Específicos**:

1. Estudiar la diversidad (trás su aislamiento y caracterización) de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a las especies vegetales previamente seleccionadas.
2. Analizar el potencial micorrícico natural en las zonas objeto de estudio, así como los efectos de una erosión simulada sobre la funcionalidad de las micorrizas.
3. Seleccionar (por criterios de "compatibilidad funcional") los ecotipos de hongos micorrícicos más eficaces para cada especie vegetal objeto de investigación.
4. Producir inóculo de hongos micorrícicos y planta con micorrización optimizada.
5. Evaluar el efecto de la micorrización sobre la implantación, supervivencia y desarrollo de plantas en áreas degradadas del ecosistema modelo elegido.



II Introducción

Introducción a la temática de investigación

Con objeto de proporcionar una visión más completa de los componentes fundamentales de la investigación propuesta, es decir los Ecosistemas Mediterráneos, sus características, proceso que causa su degradación, programas de restauración, significado e implicación de las micorrizas, etc. a continuación se ofrece un análisis más profundo de dichos componentes.

Biodiversidad y estabilidad de ecosistemas terrestres

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 (Schulze & Mooney, 1993; Tilman & Downing, 1994; Naeem *et al.*, 1994; Tilman *et al.*, 1996; Hooper & Vitousek, 1997). Sin embargo, los mecanismos ecológicos que regulan y mantienen en el tiempo la biodiversidad de especies vegetales característica de un ecosistema se conocen solo de forma fragmentaria, y en muchos aspectos, son objeto de debate. Es evidente que dichos mecanismos deben ser identificados y controlados para garantizar el manejo optimizado de un ecosistema, ya sea para propiciar su estabilidad o para proceder a su restauración, en su caso.

El hecho de que muchas especies vegetales puedan o no coexistir, y por tanto desarrollar o no una cubierta vegetal diversa y extensa, depende de la existencia de interacciones positivas/competitivas entre las especies presentes (Aarsen,

1983; Grace & Tilman, 1990), o del imperativo de tener que compartir espacial o temporalmente los recursos disponibles (Ricklefs, 1977; Tilman, 1982), o del hecho de las perturbaciones creen "manchas" de colonización que pueden no seguir las pautas de la sucesión natural (Grubb, 1977; Huston, 1989, Barea & Jeffries, 1995), o finalmente, por que ocurren interacciones entre los diferentes grupos de organismos que constituyen el ecosistema (de Ruiter *et al.*, 1995; Bever *et al.*, 1997).

En relación con este último concepto, una particularidad de interés para la presente investigación es que, *hasta ahora, se ha prestado relativamente poco interés al efecto que las interacciones microbio-planta, particularmente las simbiosis micorrícicas, ejercen sobre la variabilidad/estabilidad, diversidad y productividad de la cubierta vegetal en los ecosistemas terrestres* (van der Heijden *et al.*, 1998 a & b).

Características de los Ecosistemas Mediterráneos

Los ecosistemas desarrollados bajo la influencia del *Clima Mediterráneo* incluyen numerosos y diversos grupos de formaciones vegetales y comunidades animales que prosperan bajo unas condiciones ambientales muy particulares, con una historia ecológica y cultural que ha determinado una dinámica evolutiva especial.

Es importante recordar que las áreas con clima mediterráneo no se limitan a las regiones que circundan el *Mare Nostrum*, como se le denomina en la época romana. En el Planeta existen diversas zonas que comparten la alternancia climática de una estación seca y cálida con una estación más fresca y húmeda, principal característica del clima mediterráneo. También en la costa de California, en Sudáfrica, en el sudoeste de Australia y en la zona central de Chile, ocurre el clima mediterráneo. La vegetación climática predominante es el bosque esclerófilo, con especies adaptadas a la estacionalidad característica, pero de diferentes especies y/o familias, según el área geográfica concreta.

A diferencia de los países de la Europa del Norte, y de la del Centro de clima más templado, las zonas mediterráneas cuentan con una gran biodiversidad tanto en especies vegetales como animales debido a que la composición biótica, flujo de nutrientes y funcionamiento específico de dichos ecosistemas. Concretamente, la flora y la fauna, que derivan de las anteriores de clima subtropical, actualmente están enriquecidas con nuevas especies adaptadas a diferentes situaciones ecológicas. En el desarrollo de tales nuevas especies de flora y fauna han influido diversos acontecimientos históricos, desde el asentamiento de los primeros pobladores que desarrollaron la agricultura y la ganadería hacia el 8000 a.C., hasta la Revolución Industrial de finales del siglo XIX, o las sofisticadas tecnologías del s. XX.

La mayor parte de la Península Ibérica posee clima mediterráneo, sólo la franja septentrional responde a un clima templado y oceánico, es la región Eurosiberiana de los hayedos y otras especies caducifolias de la Cornisa Cantábrica y Pirineos. El resto de la Península está influenciado por el anticiclón de las Azores, que con sus altas presiones condiciona la existencia de un verano muy prolongado y seco, con abundante energía solar, y precipitaciones irregulares y esporádicas en otoño e invierno, debido a los ciclones.

El fenómeno de la "erosion"

La erosión del suelo es la consecuencia de diversos procesos que se presentan de forma permanente, modelando con lentitud el paisaje. Sin embargo en muchas y extensas zonas se pierden delicados equilibrios por la acción combinada de diversos factores físicos (condiciones climáticas adversas, características litológicas, topográficas, biológicas, etc.) y antrópicos (fuerte e inadecuada presión humana), la erosión llega a manifestarse con tal intensidad que provoca una degradación progresiva del medio natural. Este es el caso que ocurre en ambientes mediterráneos donde puede llegar a convertirse en un grave problema medio ambiental, ya que sus consecuencias y efectos se aceleran una vez iniciados, y si no se corrigen, pueden dar lugar a daños irreversibles en los recursos naturales, en especial en el suelo. La

pérdida de cantidad y calidad de suelo se traduce en un empobrecimiento de la flora, fauna y microorganismos que éste soporta, llegándose en algunos casos a la modificación biológica del medio natural.

De acuerdo con Dokuchaiev (19XX), el suelo es “el producto de las formación de una serie de factores activos, tales como clima, organismos y relieve, que actúan a través del tiempo, sobre un material pasivo, que es la roca madre, que por alteración dará lugar al suelo”. Desde un punto de vista ecológico y agronómico el suelo es un sistema mineral y orgánico, dinámico, trifásico y tridimensional, que sirve como medio natural para el crecimiento de las plantas terrestres (Ford, 1984, Donahve *et al.*, 1997). El conjunto de materiales diversos, bióticos y abióticos confiere al suelo unas propiedades biológicas, físicas y químicas que proporcionen una textura, impermeabilidad, estructura, fertilidad, etc., características y determinadas, que deciden la “calidad” del mismo.

Cuando se altera el equilibrio ecológico entre el suelo y la cubierta vegetal se inicia un deterioro del sistema lo que supone una regresión desde un estado de calidad más elevado a otro de inferior calidad, lo que conlleva a una disminución de su capacidad productiva (Ortiz-Silla, 1990). El desequilibrio puede venir desencadenado por diversos factores, climáticos y/o antrópicos.

La **erosión**, ó destrucción del manto del suelo se desencadena por la acción de factores geomórficos externos, tales como agua, nieve, hielo, viento, plantas, animales, y por supuesto, el hombre. La pérdida de vegetación deja al suelo propenso para sufrir erosión. La erosión puede cambiar las propiedades del suelo cuantitativamente (disminuye la profundidad del perfil, disminuye la zona donde se encuentran las raíces, afecta a la contracción del suelo, etc.) y cualitativamente (disminuye la fertilidad, ya que al remover las partículas del suelo, se remueven también los nutrientes, cambia la composición del suelo, se puede dar un agotamiento físico de la materia orgánica, también la estructura del suelo se deteriora por la pérdida de agregados, etc.). Según los tres tipos de agentes mas influyentes en la

degradación de ecosistemas mediterraneos, la erosión puede dividirse en:

a) Erosión hídrica. Es una de las más frecuentes e importantes. El agua puede actuar de diversos modos, pero se acepta que las gotas de lluvia, que golpean suelos desprovistos de vegetación y escorrentía superficial producida por las lluvias son los procesos que más afectan a las zonas semiáridas. Ello se debe a que las precipitaciones son de duración y distribución irregular, lo cual condiciona que no exista una vegetación suficiente que proteja al suelo, por lo que se desarrollan zonas de alta erodibilidad hídrica. La erodibilidad del suelo (o su susceptibilidad frente a la erosión) depende de sus propiedades físicas y químicas. En suelos arenosos, la lluvia provoca una gran erosión, a mayor cantidad de agregados, más resistencia a la erosión. Otro factor que interviene es la topografía, principalmente la pendiente y su inclinación, longitud y forma (según sea más o menos cóncava). A mayor inclinación y gradiente de pendiente, mayor erosión, y que la escorrentía es más fuerte. Obviamente, la vegetación actúa como un agente protector, puesto que hace de pantalla al impacto de las gotas de lluvia, frena la escorrentía, facilita la infiltración de agua en el suelo, favorece la agregación, aparte de que las propias raíces participan en la sujeción del suelo.

b) Erosión eólica, ejercida por la acción del viento. Afecta principalmente a zonas áridas, donde no existe vegetación suficiente que cubra y proteja el suelo, y a terrenos arenosos como las riberas de los ríos, mares y lagos. En lugares como bosques, matorrales y prados, es mínima ya que la buena cobertura vegetal protege al suelo. Las formas que se producen dependen de las características del viento (velocidad, intensidad, dirección, etc.) y de la configuración del paisaje. El viento actúa sobre los suelos lentamente, por lo que a veces, sus consecuencias no son fácilmente perceptibles. Los agentes condicionantes de este tipo de erosión son las lluvias escasas e irregulares, una cubierta vegetal pobre, una topografía plana y abierta, una textura fina que facilite el transporte de materiales, la falta de materia orgánica, el pastoreo abusivo y los cultivos que degeneran la estructura del suelo.

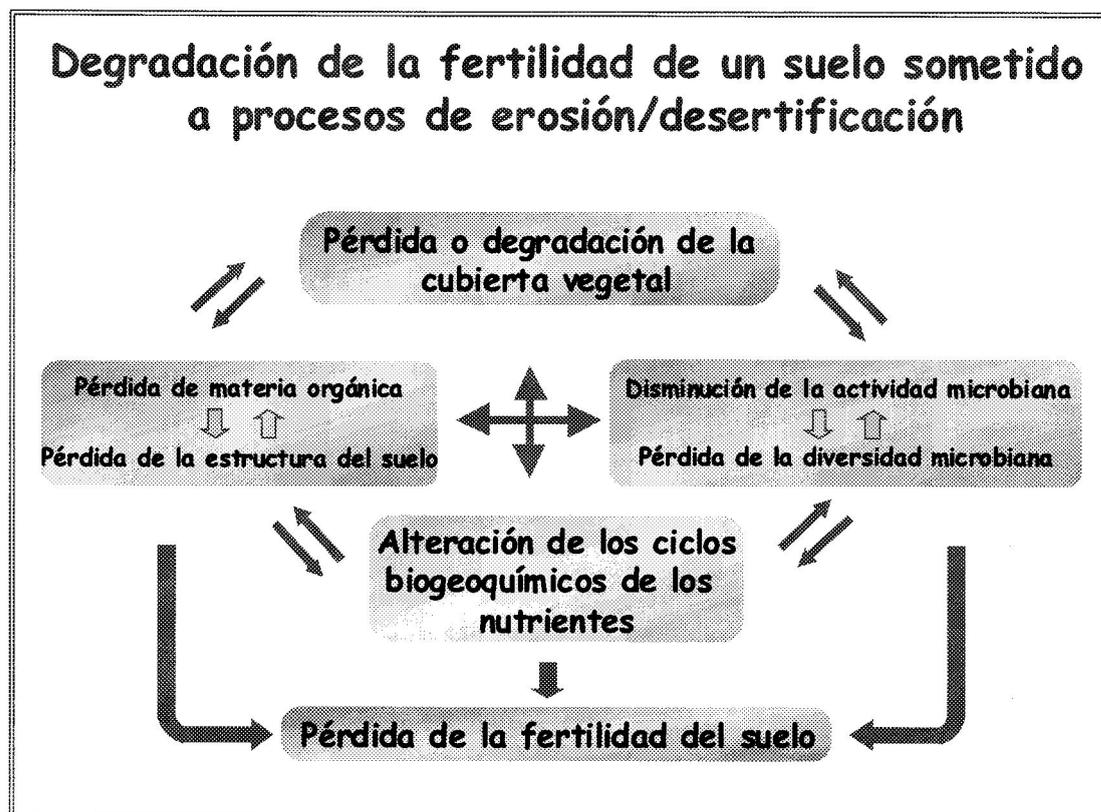
c) Erosión antropogénica, que actúa acelerando los procesos erosivos, directa o indirectamente. Si el hombre favorece la destrucción de la cubierta vegetal, para la obtención de cultivos, pastos para el ganado y deja campos abandonados, provoca una mayor acción erosiva del agua y del viento, por ello, la acción humana es realmente decisiva en procesos erosivos.

El control de la erosión implica el conocimiento detallado de la causa inicial u origen del proceso degradativo, su magnitud e importancia que justifique la realización de actividades encaminadas a su corrección. Por ejemplo, el nivel de "erosión compensativa" mide la intensidad de formación de suelo y la de la pérdida del mismo y nos da idea de cómo se puede disminuir su daño. La erosión que se permite o tolera es la que implica formación de suelo y conserva la fertilidad de este. Los factores que condicionan la erosión son diversos según las escalas; de forma global, son el clima y la topografía; a escala regional, el clima, el relieve y la litología; y a escala local, el clima, el relieve, al litología, la vegetación y el tipo de cultivo.

La vegetación proporciona una gran defensa a los suelos, por lo citado anteriormente, ya que disminuye el impacto de las gotas de lluvia, frena la escorrentía, aumenta la infiltración, reduce la energía erosiva y favorece la consistencia del suelo. Es uno de los factores que más pueden ser transformados antrópicamente, por lo que una medida de control muy eficaz es la restauración de la cubierta vegetal.

El Esquema 1 (Requena *et al.*, 1996) resume las actividades, fenómenos y procesos que conducen a la pérdida de calidad del suelo como consecuencia de la erosión/desertificación.

Esquema 1



Degradación de la cubierta vegetal y de la calidad ambiental en ecosistemas mediterráneos

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 (López-Bermúdez, 1996). Consecuente, la estructura, morfología y la *diversidad* de especies de la vegetación potencial se degrada, 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).

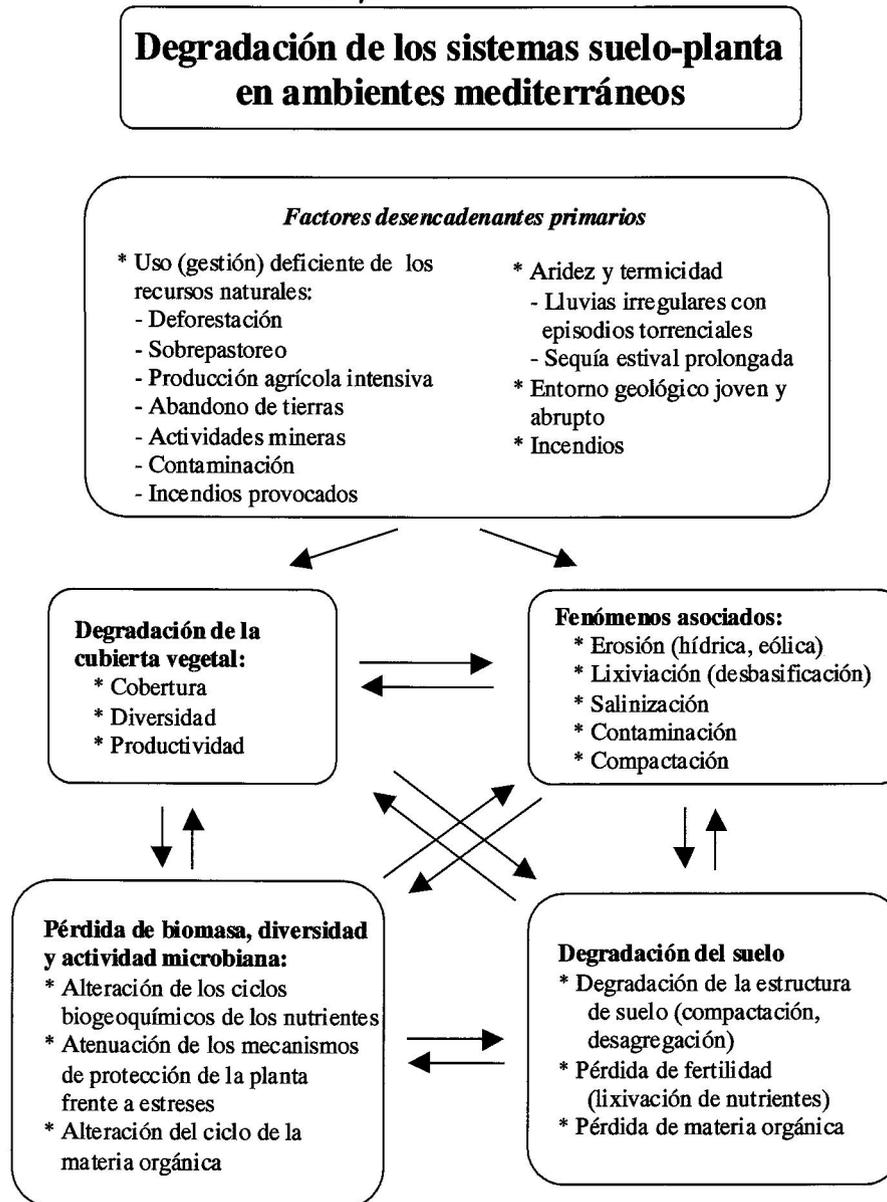
La información paleoecológica disponible no apoya la idea de que hubiese existido un paisaje mediterráneo estable, ya que éste ha estado siempre sometido a profundas transformaciones ambientales que han perdurado hasta nuestros días y que han condicionado su evolución (Puigdefábregas, 1994). Aunque el efecto antrópico generalizado en la degradación del paisaje puede ser menos dramático de los que a veces se preconiza, hay que asumir que el hombre ha ejercido un impacto considerable en la degradación del paisaje. Por ejemplo ha eliminado extensas zonas de vegetación natural para su puesta en cultivo o para implantar una ganadería extensiva, la ha sustituido por plantaciones de árboles madereros, ha ejercido actividades mineras y ha provocado incendios, directa o indirectamente (López-Bermúdez & Albaladejo, 1990). En conclusión, parece ser que, a lo largo de la historia, el hombre ha desencadenado tanto acciones destructivas y conservadoras del paisaje, pero con predominio de estas últimas (Puigdefábregas, 1994).

En el Esquema 2 se muestran los flujos “causa-efecto” interactuantes, implicados en la degradación de los ecosistemas mediterráneos, proceso que puede ocasionar la desertificación (desertización con intervención antrópica) de las zonas afectadas (Barea *et al.*, 1999). En resumen los aspectos clave son los siguientes:

1. Degradación cuanti y cualitativa (*diversidad*) de la cubierta vegetal, lo que conlleva,
 - Desprotección del suelo frente al impacto de agentes erosivos (lluvia, etc).
 - Cambios en las propiedades físicoquímica y biológicas del suelo.
 - Alteración de la capacidad de retención y captura de agua, sedimentos y nutrientes.
2. Incremento de la erosión del suelo, lo que significa, fundamentalmente,
 - Pérdida de nutrientes minerales.
 - Disminución del contenido en materia orgánica.
 - Degradación de la estructura del suelo (agregados hidroestables).
 - Cambios en la micromorfología del suelo.

- Otros aspectos que, junto a los anteriores, afectan la calidad del suelo.
3. Degradación de la actividad microbiana asociada a las raíces de las plantas.
 - Pérdida de la *diversidad* microbiana.
 - Disminución del número de propágulos.
 - Disminución de la actividad de la microbiota.
 - Alteración de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes de la planta.
 - Alteración del ciclo de la materia orgánica.
 - Pérdida de mecanismos (microbianos) implicados en la formación de agregados.
 - Atenuación de mecanismos de protección de la planta frente a estreses ambientales (bióticos y abióticos).
 4. Como resultado de la interacción de los factores anteriores se crea una “espiral de degradación” que acentúa el deterioro progresivo de la fertilidad del suelo, del régimen hídrico, de la vegetación y de la vida microbiana.
 5. Como resultado final de las interacciones de degradación que anteceden, se crean desajustes severos que afectan la biodiversidad, variabilidad y productividad del ecosistema.

Esquema 2



La desertificación en ambientes mediterráneos

La degradación del sistema suelo-planta en condiciones áridas, semiáridas y subhúmedas puede suponer un proceso de desertificación. Como se indicó anteriormente las actividades antrópicas que inciden son la sobreexplotación de los recursos naturales (minerales, forestales, hídricos), el uso inadecuado de tecnología en sistemas de producción y la utilización indiscriminada de agroquímicos, así como las oscilaciones

climáticas provocadas por las actividades humanas. Sin embargo, la causa fundamental que provoca la desertificación es la pérdida de la cubierta vegetal del suelo, debido a la implantación de cultivos en terrenos poco aptos, el sobrepastoreo y la expansión urbanística e industrial, por citar algunos ejemplos.

A partir de la Conferencia de Nairobi organizada por las Naciones Unidas en 1977, se empiezan a establecer planes de lucha contra la erosión y desertificación. Allí se puso de manifiesto que España era el país europeo que presentaban procesos de desertificación mas intensos. En 1978, el gobierno español pone en marcha el proyecto LUCDEME (a través del ICONA) con el fin de abordar los graves problemas de erosión en la cuenca del Mediterráneo. Se estudian los factores que determinan la desertificación y los fenómenos que de ella se derivan para buscar soluciones que puedan disminuir o frenar el avance de estos procesos. Las actuaciones propuestas incluyen la restauración de ecosistemas mediante reforestaciones, la regeneración de la cubierta vegetal mediante tratamientos selvícolas y las obras de control hidrológico, complementados con otras actividades como la adecuación de la red viaria forestal y la ordenación del pastoreo. La lucha contra la erosión/desertificación tiene sentido como restauración de aquellos factores que permitan la reimplantación de modelos de gestión sostenible en sistemas degradados.

En España un 18% del territorio está afectado por graves procesos de desertificación y la consecuente erosión del suelo. En Andalucía este porcentaje es aún superior, el 36% presenta erosión alta, muy alta y extrema. Ello se debe a que el relieve andaluz es muy accidentado, con grandes desniveles y fuertes pendientes, que elevan la energía cinética de los flujos de agua, los suelos son disragables y las precipitaciones irregulares de gran intensidad y corta duración. También influye la falta de cobertura vegetal del suelo motivada por la presencia de vegetación natural de escaso desarrollo serial y por la existencia de amplias zonas con cultivos agrícolas marginales.

En el Plan Forestal Andaluz (1989) se presenta un estudio de la realidad forestal andaluza y de la situación actual de los recursos naturales diseñando modelos de gestión para los

distintos aspectos del medio natural (ecosistemas, vegetación, fauna, ganadería, restauración agrohidrológica, etc.). Entre sus propuestas, para las que se adelantaba un plazo de 60 años, se indican entre sus principales objetivos la lucha contra la erosión y la desertificación mediante programas de revegetación.

Restauración/revegetación de espacios naturales degradados en ambientes mediterráneos

Es evidente que la estrategia más adecuada para evitar la degradación de los ecosistemas mediterráneos es la revegetación con especies autóctonas, poniendo especial énfasis en especies pertenecientes al matorral, ya que pueden proveer una suficiente densidad y cobertura que proteja al suelo en el menor tiempo posible. Mediante la restauración de la cubierta vegetal se pretenden obtener comunidades estables y persistentes que aceleren el proceso de la sucesión natural hacia el bosque mediterráneo. Si se parte de una concepción dinámica y evolutiva de los ecosistemas, las actuaciones sobre el medio natural deben ir encaminadas a favorecer las evoluciones progresivas, debe además realizarse una distribución de la revegetación adecuada a las características particulares de cada territorio, ya que con ello se obtiene un máximo aprovechamiento de los recursos del ecosistema, a la vez que se reducen las pérdidas de energía de la vegetación en su adaptación al medio al reducir la competencia con otras especies alóctonas. En efecto, el funcionamiento y estabilidad de un ecosistema depende altamente de la diversidad y composición de las especies de su cubierta vegetal.

De acuerdo con ello, la premisa fundamental de nuestra hipótesis de trabajo es que, *al hablar de "revegetación," lo que se propone es restaurar la diversidad y calidad de la cubierta vegetal.* Se trata de promover el desarrollo *de especies de la sucesión natural* en zonas en las cuales las plantas, representadas por un número subóptimo (o incluso ausencia) de individuos, no proporcionan la cobertura ideal ni responde *al nivel de diversidad* deseable.

Como ya se ha indicado, en numerosos foros, y en la literatura científica relacionada con el estudio de ese proceso dinámico y complejo que es la desertificación, que en la Cuenca Mediterránea se propone que la estrategia de revegetación más apropiada, en muchos casos, como el del sudeste ibérico, debe basarse en especies arbustivas, subarbustivas y herbáceas, mas que en arbóreas (Carreras, 1992; Herrera *et al.*, 1993; Puigdefábregas, 1994; Barea *et al.*, 1996).

Significado de los microorganismos en los sistemas suelo-planta

En general se puede decir que el funcionamiento de un ecosistema edáfico depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, dado que los microorganismos protagonizan diversas acciones que producen beneficios para las plantas a las que se asocian (Kennedy & Smith, 1995, Barea, 1998; Bowen & Rovira, 1999).

La importancia de los microorganismos en ambientes naturales deriva de su ubicuidad, diversidad y sobretodo, de su gran espectro de actividades. Entre otras acciones, los microorganismos beneficiosos facilitan la captación de nutrientes, producen fitohormonas, que favorecen el enraizamiento, protegen a la planta contra patógenos, descompone sustancias tóxicas en el ecosistema y mejoran la estructura del suelo (Barea, 1998).

El hecho de que en suelos degradados ocurra un descenso en el número de propágulos de la microbiota del suelo, su diversidad y/o de su actividad (Miller & Lodge, 1997) se debe a que la planta es la fuerza motriz de la vida microbiana en el suelo, lo cual es fundamental dado que los microorganismos, a su vez, van a compensar a la planta mediante acciones importantes para su crecimiento y nutrición. El deterioro de los sistemas suelo-planta, en cuanto que afecta a las relaciones planta-microorganismos, desencadena un círculo vicioso de efectos negativos. Si no hay plantas, se degrada la vida microbiana y si no hay propágulos microbianos, cualquier

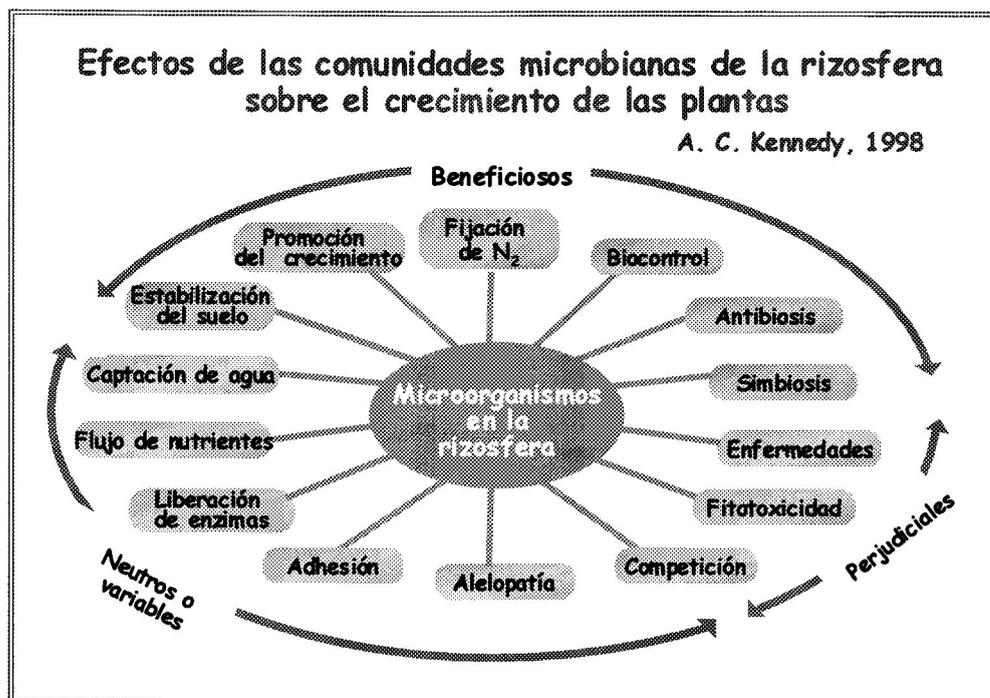
proceso natural o inducido de revegetación presentan problemas para prosperar adecuadamente.

La disminución del número de propágulos de dichos microorganismos en el suelo por procesos de erosión y desertificación, produce una alteración de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, con la consecuente pérdida de la fertilidad del suelo, lo que puede afectar al desarrollo de las plantas. El restablecimiento de la diversidad microbiana es crítico y el éxito de muchos programas de revegetación depende de un adecuado manejo de tales microorganismos. Por esta razón, en las últimas dos décadas se han incorporado a los programas de revegetación, investigaciones en el ámbito de la *microbiología* o *biotecnología del suelo* disciplina que se encarga del estudio de los microorganismo del suelo desde el punto de vista ecológico, genético, bioquímico y fisiológico, en relación con la nutrición y protección de las plantas, y de su contribución a una productividad sostenida con el mínimo deterioro del medio ambiente.

Es de destacar que la actividad de los microorganismos del suelo en cuanto favorecer el establecimiento, desarrollo, nutrición y salud de las plantas tienen lugar, fundamentalmente, alrededor de las raíces, en la llamada "rizosfera", ya que el soporte físico y nutricional para la microbiota de los suelo deriva de los exudados radicales y detritus de las raíces (Barea & Jeffries, 1995). La rizosfera se puede definir como la zona adyacente a la raíz de la planta, dando lugar al llamado "efecto rizosférico". La actividad microbiana en esa zona de suelo es muy intensa, especialmente en la "rizoplana" (superficie de la raíz) (Barea, 1998).

En el Esquema 3 (traducido de Kennedy, 1988) se resumen las actividades que pueden desarrollar los microorganismos de la rizosfera.

Esquema 3



Microorganismos beneficiosos para la restauración de la calidad ambiental en ecosistemas mediterráneos

En los sistemas suelo-planta existen tres grupos principales de microorganismos beneficiosos que son claves en el contexto de la sostenibilidad de tales sistemas: Los hongos formadores de micorrizas, especies de la familia y las rizobacterias promotoras del crecimiento. Se ha demostrado que los tres grupos son importantes en estudios de revegetación (Barea *et al.*, 1996). Obviamente, las especies de rizobiaceas contribuyen con la función que les caracteriza: *La fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico*, y que representa la entrada fundamental de N en el ecosistema (Barea & Olivares, 1998). El fenómeno es extremadamente importante dado que entre las especies arbustivas autóctonas del sudeste ibérico hay diversas leguminosas leñosas de interés en estudios de revegetación (Herrera *et al.*, 1993; Barea *et al.*, 1996). Las rizobacterias, colonizadoras de la rizosfera, destacan por sus efectos de

promoción del enraizamiento y el ciclado biogeoquímico de los nutrientes de la planta (Barea, 1997). Los hongos de la micorriza forman dicha simbiosis con las raíces de la mayoría de las plantas, beneficiándose ambos de tal asociación. La planta mejora sus propiedades para la adquisición de nutrientes y su nivel de tolerancia a situaciones de estrés (sobre todo a la sequía) y el hongo, a su vez, obtiene nutrientes fotosintéticos y un nicho ecológico protegido (Smith & Read, 1997).

En lo que se refiere a plantas de ecosistemas naturales (entre ellos, los mediterráneos), se distinguen, entre otros, dos tipos de micorrizas (Barea & Honrubia, 1993), las Micorrizas Arbusculares, típicas de las plantas de especies arbustivas y las Ectomicorrizas, presentes en la mayoría de las especies arbóreas de interés forestal (pinos, encinas, quejigos...)

Hoy día se considera que las micorrizas son claves en estrategias destinadas a frenar la erosión y la desertificación, basada en la revegetación con especies arbustivas autóctonas de ambientes mediterráneos. Se ha comprobado que las micorrizas arbusculares desempeñan un papel crucial en las primeras etapas de la vida de las plantas, sobre todo en suelos degradados por procesos erosivos, incendios forestales, laboreo excesivo, contaminación, y en suelos sometidos a condiciones de estrés (sequía, salinidad, cambios bruscos de temperatura, deficiencia de nutrientes) como las que caracterizan los ecosistemas mediterráneos del sudeste ibérico (Salamanca, 1991; Requena, 1996). Como el presente estudio se va a basar en las micorrizas arbusculares se dedica un apartado especial en esta Introducción a este tipo de micorrizas y se les refiere como "micorrizas".

De acuerdo con diversos autores (Miller & Jastrow, 1992; Marschner & Dell, 1994; Jeffries & Barea, 1994; Barea *et al.*, 1999; Carrillo-García *et al.*, 1999; Jeffries & Barea, 2000) se espera una importante contribución de las micorrizas en la formación de agregados estables y en el reinicio ó aceleración de los ciclos biogeoquímicos, particularmente P y N, así como la captación de agua.

Hongos de la Micorriza

Como se viene indicando, las micorrizas son asociaciones mutualistas que se establecen entre ciertos hongos del suelo y la mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre.

El término *micorriza* fue propuesto por vez primera en 1885 por el botánico alemán A.B. Frank para describir ciertas "infecciones" del sistema radical de las plantas vasculares. Proviene del griego *mycos-rhiza*, con un significado literal "hongo-raíz".

Es una asociación en la que se benefician ambos participantes, el hongo ayuda a la planta a obtener nutrientes del suelo ya que aumenta su capacidad de absorción al explorar mayor volumen de suelo que la raíz sola, incrementa la tolerancia de la planta a estreses (hídricos, salinos, etc), a patógenos y a metales pesados. Por su parte, el vegetal le proporciona al hongo nutrientes orgánicos y un nicho ecológico protegido.

Las micorrizas se encuentran prácticamente en todos los hábitats de la tierra, desde ecosistemas acuáticos a desiertos, en bosques tropicales, en altas latitudes y altitudes (Allen, 1991). Debido a ello, la simbiosis es establecida por una gran cantidad de especies vegetales. Solo algunas familias botánicas entre ellas como las Crucíferas, Ciperáceas, Poligonáceas, Juncáceas y Quenopodiáceas, tienen especies que no forman micorrizas. Pero se han encontrado evidencias en estos grupos no micotróficos de invasiones micorrícicas, aunque las relaciones fisiológicas no están claramente definidas (Allen, 1991). Se han encontrado micorrizas en Briófitos (Hepáticas talosas) y en Pteridófitos.

La universalidad de estos hongos se debe a que se originan y co evolucionan con las propias plantas (Pirozynski, 1981). Posiblemente la función fundamental de estos hongos era la extracción de fósforo del medio, en el cual el nitrógeno no debía ser escaso por la presencia de cianobacterias y en bacterias fijadoras de nitrógeno. También fue importante la función de estos hongos ayudando a las primeras plantas terrestres a soportar el estrés hídrico.

Existe una gran diversidad en lo que a morfología y fisiología de las asociaciones micorrícicas, lo que permite reconocer unos cinco tipos principales (Barea, 1998):

-Ectomicorrizas, en las que el hongo se desarrolla en los espacios intercelulares de la corteza radical, pero no penetra dentro de las células, formando la llamada "red de Hartig", aunque nunca penetra la endodermis de la raíz, ni produce reacciones típicas de defensa, limitándose el hongo a la colonización del córtex radical, lo cual les diferencia de los hongos patógenos (Alvarez, 1991; Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993). También es característico un manto de hifas rodea la raíz. Entre los hongos formadores de este tipo de micorriza se hallan multitud de setas de interés comercial, como las trufas (*Tuber melanosporum*), los rebozuelos (*Cantharellus sp.*), los niscalos (*Lactarius deliciosus*), las amanitas (*Amanita sp.*), los boletos (*Boletus edulis*), las rusulas (*Russula sp.*), *Laccaria*, ... pertenecientes a las clases Basidiomycetes, Ascomycetes y Zigomycetes)

Las Ectomicorrizas establecen asociación con aproximadamente el 3% de las especies vegetales. El porcentaje es bajo, aunque el interés de las plantas hospedadoras es máximo, ya que entre ellas están pinos, encinas, alcornoques, robles, hayas, abetos, cedros, eucaliptos, abedules, tilos, sauces, olmos, álamos,...

-Endomicorrizas, en las cuales el hongo coloniza de forma intracelular la raíz. Existen tres tipos que cumplen dicha condición.

Micorrizas Arbusculares en adelante "micorrizas" ya que en ellas se va a centrar el presente estudio.

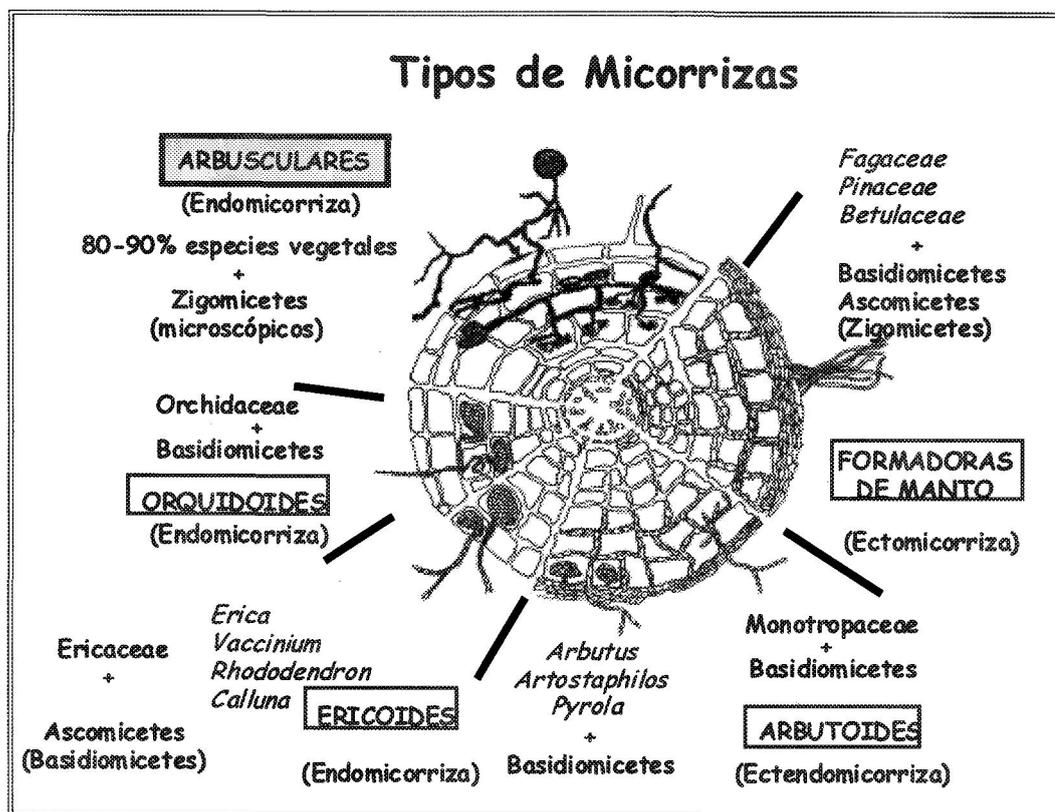
Ericoides, características de algunas especies de la familia Ericáceas, como los brezos (*Erica sp. y Calluna vulgaris*), Azaleas (*Rhododendron sp.*), Arándanos (*Vaccinium sp.*), que forman simbiosis con Ascomycetes y Basidiomycetes.

Orquidoides, propias y exclusivas de las orquídeas, cuyas semillas son tan pequeñas que requieren la presencia de estos hongos para poder germinar.

-**Ectendomicorrizas**, en las que ocurren penetraciones intracelulares y desarrollo de manto, típicas de especies como el madroño (*Arbutus unedo*) la gayuba (*Arthostaphilos uva-ursi*), *Pyrola sp.* y especies de la familia Monotropácea que establecen la simbiosis con Basidiomicetos. Cistaceas con la "Trufa del desierto".

El esquema 4 (Barea 1998) ilustra los distintos tipos de micorrizas

Esquema 4



De todos estos tipos, las **Micorrizas Arbusculares** son el más extendido en la naturaleza, formando esta asociación plantas pertenecientes al 80-90% de las familias botánicas. Los hongos formadores de micorrizas, son simbioses biotrófos obligados puesto que sólo pueden completar su ciclo de vida cuando colonizan las raíces de la planta hospedadora.

La colonización fúngica no produce alteraciones morfológicas distinguibles a simple vista, por lo que las técnicas microscópicas juegan un papel importante en el análisis de la colonización micorrícica. La colonización tiene lugar sólo en la epidermis y en el parénquima cortical de las raíces. El hongo micorrícico no penetra nunca en el cilindro vascular, ni en las regiones meristemáticas (Bonfante-Fasolo, 1984). En una micorriza activa se considera que existe una fase extraradical del hongo, el micelio externo, que incluye micelio, esporas y células auxiliares en su caso y una fase intraradical del mismo, con hifas intra e intercelulares, arbusculos y a veces vesículas (del Val, 1999). La colonización micorrícica se puede iniciar a partir de tres tipos de propágulos: esporas, fragmentos de raíz previamente colonizados y por la red de micelio que se mantenga en el suelo. De todos ellos, las esporas son los únicos propágulos que pueden ser clasificados taxonómicamente, y además por su tamaño y forma tienen una cierta capacidad para dispersarse a través del agua y del viento constituyen las estructuras de resistencia de estos hongos (Koske & Gemma, 1990; Friese & Allen, 1991; Gemma y Koske, 1992).

Filogenia y taxonomía de las Micorrizas Arbusculares

Los hongos formadores de las Micorrizas Arbusculares pertenecen a un solo orden de la clase Zigomicetos, el orden *Glomales*. Son hongos inferiores, que no llegan a formar carpóforo o cuerpo fructífero. Sus hifas, además son multinucleadas y no tabicadas. Se reproducen de forma asexual mediante esporas. Son simbioses estrictos.

Se conocen unas 150 especies pertenecientes a 6 géneros: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Scutellospora* y *Gigaspora*.

Suborden Glominae

Familia Glomaceae

Glomus. Es el género más abundante y diverso. Todas las especies forman vesículas, generalmente en los extremos terminales de las hifas.

El desarrollo ontogénico de la espora comienza con un hinchamiento en el extremo terminal de la hifa de sustentación. Las paredes se diferencian a medida que la espora se desarrolla, de forma que las paredes más externas son las primeras en formarse. Casi todas las especies presentan una capa mucilaginosa e hialina externa, que es el componente mayoritario en los estadios juveniles, desapareciendo en muchos casos, a medida que la espora madura.

Las esporas pueden producirse en el interior de esporocarpos o libres en el suelo, sólo en algunas especies las esporas se producen dentro de la raíz.

Las paredes de la hifa de sustentación se desarrollan al mismo tiempo que las capas de la pared de la espora. En algunas especies, dicha hifa se rompe debido a su delgadez y fragilidad. Estas esporas sésiles se distinguen de las pertenecientes a las de la familia *Acaulosporaceae*, por la ausencia de paredes internas flexibles y dentadas que se separan completamente de las esporas de dicha familia.

Sclerocystis. Es un género con pocas especies, que algunos incluyen dentro del género *Glomus*, ya que tienen un patrón de desarrollo y diferenciación muy parecido. La principal diferencia consiste en la producción de clamidosporas agrupadas en esporocarpos muy densos, que se ordenan en una capa alrededor de un plexo central.

Familia Acaulosporaceae

Acaulospora. Género formador de azigosporas solitarias. No forman agrupaciones de ningún tipo. La espora se origina a partir de un sáculo esporogénico que se forma al final de una hifa gruesa. El sáculo se expande y la espora comienza a desarrollarse en el cuello del sáculo, a un lado de la hifa de sustentación. Cuando la

espora alcanza su madurez, el sáculo pierde su contenido, y finalmente, la espora sésil se separa de él.

Las esporas se caracterizan por presentar una pared interna flexible de superficie dentada, que se separa del resto de capas de la pared (Gendermann & Trappe, 1973; Berch, 1985).

Entrophospora. Género que presenta muchas similitudes con el anterior. La diferencia principal está en la ontogenia de la espora sésil, que se forma dentro de la hifa parenteral, en el cuello del sáculo esporogénico. Las esporas maduras que se han separado del sáculo presentan dos cicatrices en sitios opuestos, son los lugares de unión al sáculo y a la hifa parenteral (Ames & Sneider, 1979).

Suborden Gigasporinae

Familia Gigasporaceae

Las especies de los dos géneros que forman esta familia no forman vesículas como sí hacen el resto de *Glomales*. Por ello, el antiguo término de Hongos de la Micorriza Vesículo-Arbuscular (MVA) que designaba dichos hongos fue eliminado, al comprobar que estos géneros no las producen. En cambio, poseen células auxiliares extrarradicales. Se cree que su función podría ser parecida a la de las vesículas existentes en el resto de géneros.

Gigaspora. Género de distribución no europea, cuyas esporas se originan a partir de un sáculo esporogénico que se forma en la hifa de sustentación. La espora no empieza a formarse hasta que el sáculo no alcanza su tamaño máximo y se produce simultáneamente el desarrollo de la capa externa y de la laminada interna, ya que estas especies son bilaminadas. El tubo de germinación se origina a través de unas papilas que se forman en la cara interna de la pared laminada.

Las células auxiliares que producen se diferencian de las del género siguiente por poseer una superficie espinosa.

Scutellospora. La ontogenia de sus esporas es muy similar al de *Gigaspora*. Las esporas tienen una pared bilaminada y paredes externas flexibles, pudiendo presentar alguna de ellas ornamentación (algo que no ocurre en el género anterior). Es característica, además, la presencia del escudo de germinación de forma permanente, asociado a la capa más interna de la pared.

Las células auxiliares del micelio externo presentan una superficie con papilas.

Formación de las Micorrizas Arbusculares

El micelio de hongos MA presente en un suelo o los tubos de germinación de las esporas se desarrollan en el suelo afectado fundamentalmente, por las condiciones físico-químicas (CO₂, temperatura, pH, humedad, etc.) y biológicas del suelo (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986 a,b; Hectrik y Wilson, 1989).

Cuando las hifas producidas no encuentran una raíz susceptible de ser colonizada, entran en fase de degeneración, comienzan a tabicarse por sus extremos y retraen el citoplasma hacia la espóra madre entrando de nuevo en reposo y así sucesivamente hasta que el hongo encuentre una raíz que pueda colonizar con éxito o degenerar para siempre (Koske, 1981; Azcón-Aguilar *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando alguna hifa llega a la rizosfera de una planta hospedadora, se ramifica cerca de la superficie de la raíz dando lugar a una estructura de preinfección con forma de abanico. Esta es la fase de crecimiento independiente del hongo. Finalmente alguna hifa contacta con la raíz, forma el apresorio y a partir de esta estructura se produce la colonización de la raíz (Barea *et al.*, 1991; Giovannetti *et al.*, 1993). Una vez que ha producido el contacto, la adhesión de la hifa con la raíz y el apresorio, el hongo penetra en la epidermis e inicia la colonización después de 2 ó 3 días (Bécard & Fortin, 1988; Giovannetti *et al.*, 1993; Peterson & Bonfante, 1994).

La hifa de penetración atraviesa la epidermis y coloniza la corteza de forma intercelular. Después ocurre la colonización intracelular formándose unas estructuras típicas, que denominan

ovillos “*coils*”. Se forman mediante circunvoluciones de hifas intracelulares y aunque no se conoce su función, se ha propuesto que pueden estar implicados en una toma inicial de compuestos hidrocarbonados por parte del hongo (Smith & Smith, 1997). A continuación la hifa colonizadora se ramifica y extiende a través del “cortex” medio e interno (Cox & Sanders, 1974). Finalmente, las hifas colonizan células en las zonas más internas del cortex donde se ramifican repetidamente de forma dicotómica, para dar lugar a la estructura típica de la simbiosis, el *arbusculo*.

La formación de los arbusculos se inicia a los 2-3 días después de la penetración inicial del hongo en la raíz. La hifa colonizadora no perfora el plasmalema de la célula hospedadora, aunque sí induce su invaginación por lo que el arbusculo es una estructura de doble membrana (hongo y célula vegetal) creándose una interface entre ellas. Esta interface hongo-planta es de gran importancia para el funcionamiento de la simbiosis y es en donde se acepta que tiene lugar el flujo bidireccional de nutrientes (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988). Normalmente los arbusculos tienen un tiempo de vida corto, de 4 a 10 días, después de los cuales degeneran, así la célula hospedadora vuelve a su función normal (Scanerini & Bonfante-Fasolo, 1983; Bonfante-Fasolo, 1984).

Al mismo tiempo, o poco después de que se produzca la formación de los arbusculos, algunos hongos de las micorrizas forman vesículas inter y/o intracelulares (Abbott, 1982). Las vesículas, son estructuras de formas diversas según la especie y de paredes finas, que se producen por el hinchamiento terminal ó intercalar las hifas. Estas estructuras almacenan gran cantidad de lípidos y actúan como órganos de reserva del hongo durante situaciones de estrés, como es la falta de carbohidratos. Ninguna de las especies pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* forman vesículas dentro de la raíz, aunque sí producen células auxiliares en el micelio externo (del Val, 1999).

Simultáneamente a la colonización intrarradical del hongo, se produce el desarrollo del micelio externo en el suelo que rodea a la raíz. Este micelio externo funciona como un sistema radical complementario que se extiende más allá de la zona de agotamiento en nutrientes cercana a la raíz. Su función es la

búsqueda, absorción y transporte de nutrientes a la planta, especialmente aquellos de lenta difusión en la solución del suelo como son el fósforo, zinc, cobre y amonio (Sieverding, 1991; Burkert & Robson, 1994). Además, como se ha indicado anteriormente, el micelio externo juega un papel importante como fuente de inóculo para continuar la colonización en el mismo sistema radical ó en algún otro próximo (Barea *et al.*, 1991).

Ecología de las Micorrizas Arbusculares y diversidad de hongos MA

En micorrizas arbusculares no hay especificidad en sentido estricto. En general, cualquier hongo puede colonizar cualquier planta susceptible de ser micorrizada por hongos micorrícicos, y a la vez, una misma raíz puede albergar diversas especies de hongos micorrícicos. De hecho, se cree que todas las plantas de un ecosistema tienen sus sistemas radicales comunicados a través de una red de micelio fúngico (Barea, 1991; Requena, 1996). Esto es clave para el funcionamiento de ecosistemas naturales, ya que supone un flujo de nutrientes canalizado por los hongos.

Se cree que unas 225.000 especies de plantas forman simbiosis con los hongos micorrícicos (MA), lo cual comparado con la escasa diversidad de dichos hongos, sólo 150 especies agrupadas en 6 géneros, da idea de la mínima divergencia evolutiva de éstos. Aunque no existe especificidad en el sentido estricto del término diversos estudios han demostrado la existencia de una *compatibilidad funcional*, para indicar la expresión fenotípica de un hongo micorrícico como resultado de las influencias del ambiente sobre la expresión genotípica de ambos simbiosistas, planta y hongo (Smith & Gianninazzi-Pearson, 1998). Es decir, la planta muestra una diferente susceptibilidad a los diversos hongos MA presentes en el medio. Concretamente en ecosistemas naturales, los hongos nativos demuestran una adaptación a la zona, que no existe en hongos alóctonos a la hora de reportar beneficios a la planta hospedadora (Requena *et al.*, 2000).

La biodiversidad de los hongos es considerada como una de las mayores dentro de los grupos de organismos que forman los seres vivos (Hawksworth, 1991). La contribución de los hongos micorrícicos a la diversidad de los ecosistemas ha recibido muy poca atención a pesar de su ubiquidad (Hawksworth, 1991) y del reconocido papel que juegan en su funcionamiento (Smith & Smith, 1995).

La biodiversidad de los hongos micorrícicos se ha estudiado principalmente desde el punto de vista taxonómico, considerando la estructura y morfología de sus esporas (Sanders *et al.*, 1995). Ello representa diversos inconvenientes como son la presencia de hongos que no esporulan o la existencia de ecotipos entre las esporas (Sanders *et al.*, 1995). Aún así, la identificación y recuento de esporas es el punto de partida necesario para cualquier intento de comprensión de los patrones de diversidad de estos hongos en cualquier ambiente (Allen *et al.*, 1995). En los últimos años se ha intentado compaginar los estudios de diversidad con estudios de dinámica de poblaciones, análisis molecular, de evolución y de conservación de los ecosistemas (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994).

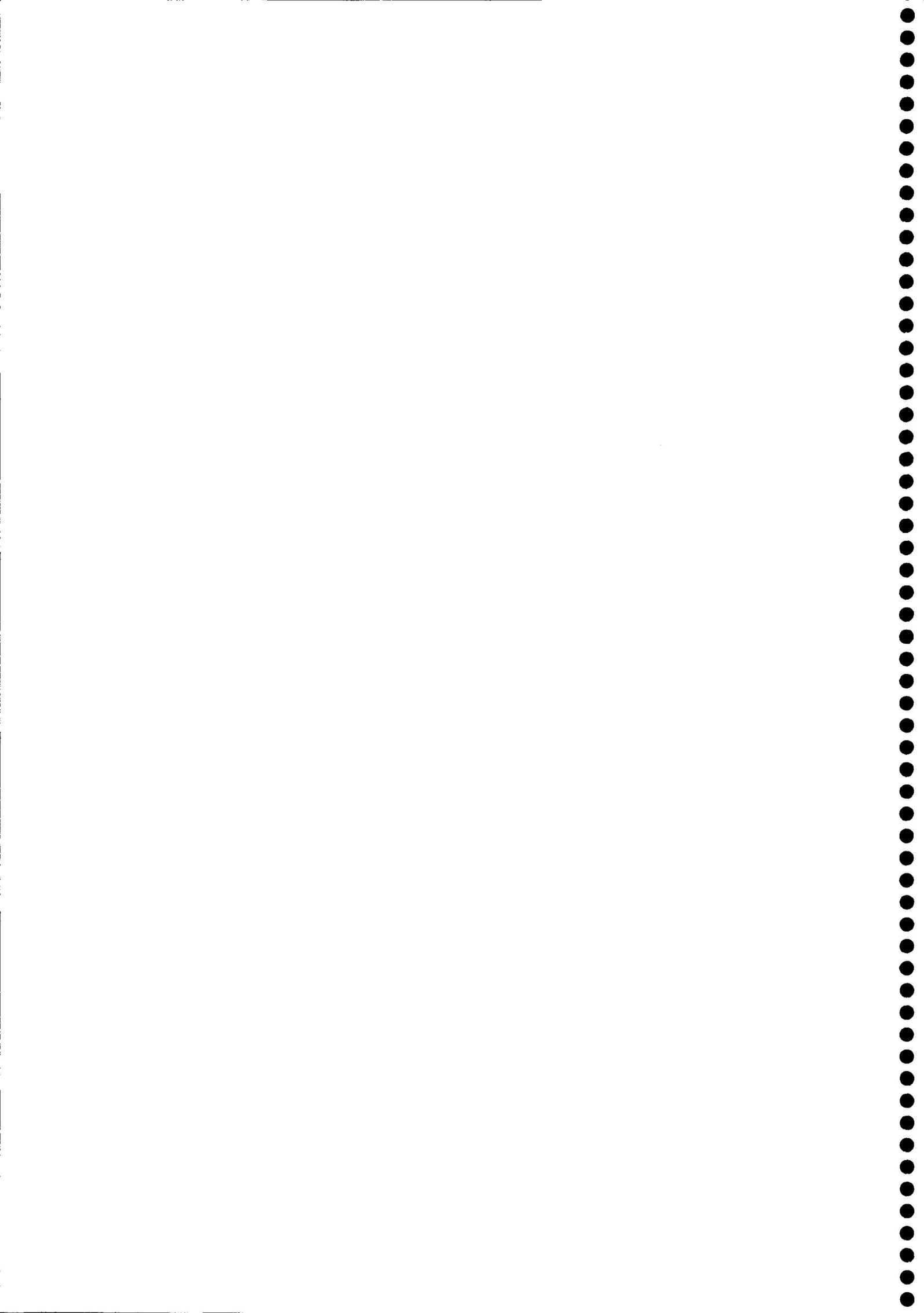
Prospección y aplicación de las micorrizas para favorecer la revegetación de ecosistemas mediterráneos degradados con especies vegetales autóctonas.

En estudios anteriores (Herrera *et al.*, 1993; Requena *et al.*, 1996; 1997), se han aislado hongos MA y *Rhizobium* de las rizosferas de especies arbustivas de interés en ecosistemas mediterráneos, y aunque estos aislados han sido estudiados en ensayos de campo, falta mucha información en cuanto a estudios que permitan evaluar y explotar su diversidad y obtener el máximo beneficio de estos sistemas simbióticos en programas de revegetación mediante una selección adecuada. Puesto que la erosión, especialmente la que sufre el sudeste ibérico, produce una importante pérdida, e incluso la desaparición, de propágulos microbianos del suelo, la reintroducción de dichos hongos

autóctonos puede ser clave en un programa de revegetación (Weinbaum *et al.*, 1996; Requena *et al.*, 1996; 1997; 2000).

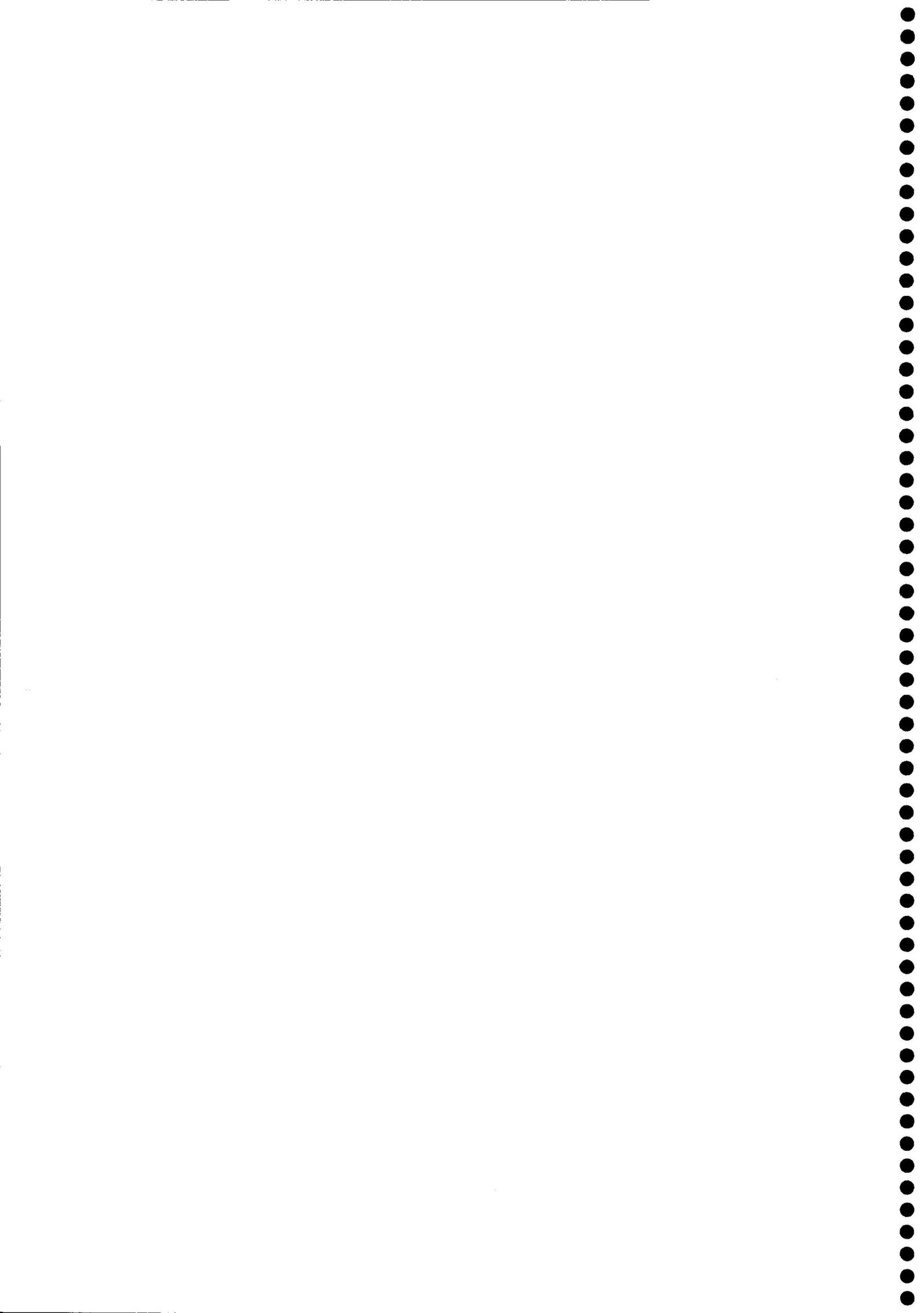
En este contexto hay que decir que los avances en las técnicas de selección y preparación de inoculantes de hongos de la micorriza (Jarstfer y Sylvia, 1992; Dodd y Thomson; 1994, Barea *et al.*, 1997; Azcón-Aguilar *et al.*, 1999) pueden ser aplicadas para la reproducción de los hongos de interés en revegetación y mantenerlos en un "stock" disponible, lo que facilitaría la confección de viveros de plantas autóctonas con micorrización (y nodulación en el caso de leguminosas) optimizada. *Es preciso indicar, sin embargo, que el máximo beneficio de la inoculación con hongos de las micorrizas arbusculares solo se consigue después de una selección muy controlada del hongo más idóneo (el que demuestre mas alto nivel de compatibilidad funcional y ecológica para cada sistema planta-suelo) o una mezcla de los que conforman la diversidad natural del ecosistema, si se va a trabajar con comunidades.*

Una vez revisada la literatura científica relacionada con el tema se procede con un siguiente apartado en el que se ofrece una visión resumida del Parque Natural "Sierra de Baza" con descripción de sus características generales y de sus comunidades de plantas, con especial énfasis en las que van a ser objeto de estudio.





III. Parque Natural

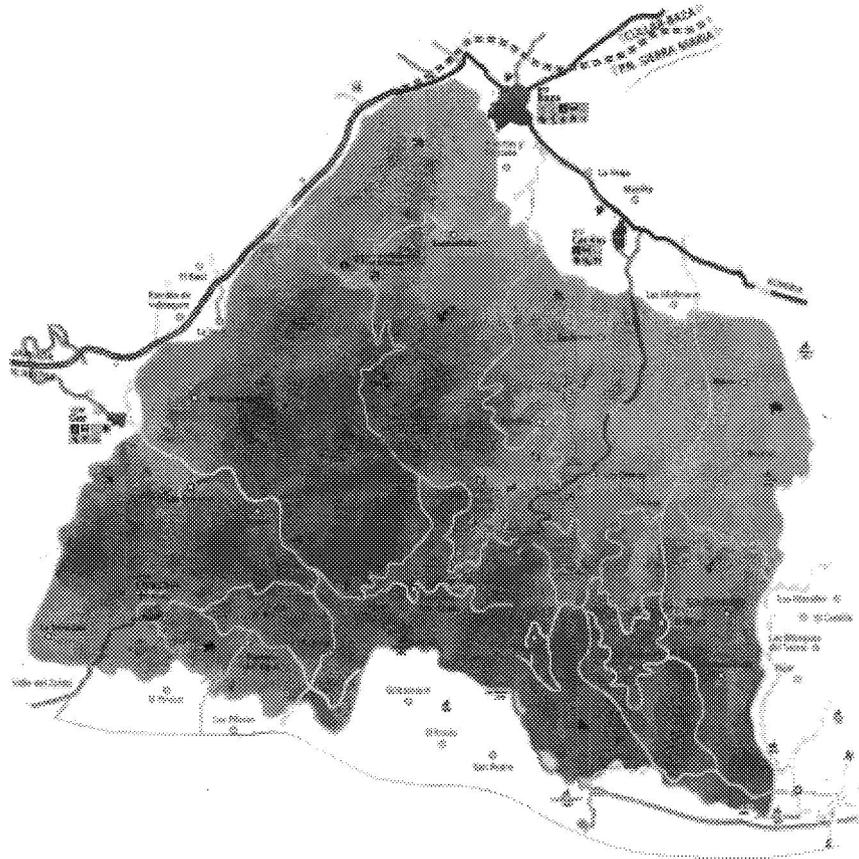


El Parque Natural Sierra de Baza

La Sierra de Baza fue declarada Espacio Natural Protegido con la figura de Parque Natural en base a la ley autonómica 2/89 con el fin de conservar el patrimonio natural, conseguir el desarrollo socioeconómico de la zona del parque y la comarca y el disfrute ciudadano de la naturaleza.



El Parque Natural está situado en el extremo nororiental de la provincia de Granada, entre los 37° 12'N y 37° 29'N de latitud y entre los 2° 44'O y los 3° 2'O de longitud. Forma parte de las Cordilleras Béticas, pero es un macizo individualizado al estar rodeado de las depresiones de Guadix y Baza, sólo se continúa con la Sierra de Los Filabres, ya en la provincia de Almería. Consta de una superficie de 52.337 ha pertenecientes a los municipios de Baza, Caniles, Gor, Valle del Zalabí y Dólar.



El paisaje es abrupto, con abundantes barrancos que contrastan con las altiplanicies que lo rodean, esta variedad de relieves determinará la existencia de los más diversos ecosistemas mediterráneos, desde las formaciones heliófilas de retamales y romerales, hasta las comunidades de especies arbóreas y arbustivas de caducifolios que se localizan en los barrancos umbríos. La diferencia de cotas es, además, muy marcada, oscilando entre los 847 m de Baza y los 2269 m. del Calar de Santa Bárbara.

La Sierra pertenece al Sistema Penibético de las Cordilleras Béticas. Se originó durante el plegamiento Alpino de la Era Terciaria, cuando el levantamiento de la placa tectónica africana produjo un levantamiento y posteriores plegamientos de los materiales marinos de la placa europea debido a las fuertes compresiones. También cuenta el macizo con elementos del Neógeno y Cuaternario, de carácter postorogénico, que se disponen en los bordes de la sierra. Abundan las margas, arcillas, yesos, conglomerados y arenas.

Entre los materiales de edad más antigua se distinguen las siguientes unidades geológicas :

- Complejo Nevado-Filábride, formado por rocas metamórficas, tales como micaesquistos feldespáticos, cuarcitas, mármoles y gneises ricos en silicatos, los cuales confieren al suelo un carácter ácido cuando se erosionan y disgregan. Aflora en la zona meridional del Parque.
- Complejo Alpujarride, con rocas sedimentarias y carbonatadas, que proporcionan un pH básico a los suelos. Ocupa aproximadamente los 2/3 de la extensión del parque, con brechas, dolomías y calizas. Ello condiciona que las cumbres sean alomadas. Son los "calares".
- Complejo Maláguide de filitas, metapelitas basales, areniscas, calizas y conglomerados, muy poco metamorfizados.

En cuanto a la edafología, la sierra presenta una serie de suelos, de los cuales los más abundantes son los cambisoles y litosoles. Las características litológicas de la roca, la climatología, la vegetación y la actividad antrópica condicionan a lo largo del tiempo los aspectos químicos y físicos de los horizontes del suelo y su evolución.

- Litosoles, suelos muy poco desarrollados; que se dan principalmente sobre dolomías y calizas alpujarrides. La principal característica es el rejuvenecimiento constante de los suelos, debido a la erosión que sufren por su accidentada orografía. Son suelos de perfil tipo A-R, en los que la roca suele estar situada a menos de 10 cm de la superficie.
- Regosoles, suelos de desarrollo A-C, con horizonte A ócrico, se ha desarrollado sobre rocas poco cementadas (margas, arenas,

conglomerados, esquistos, filitas,...), son suelos poco potentes, con poca materia orgánica y bastante pedregosos.

- Fluvisoles son suelos creados a partir de materiales aluviales. Son suelos poco profundos , pero estratificados y con bajo contenido en materia orgánica. Son suelos fértiles, propios de ramblas.

- Cambisoles son suelos más evolucionados con los horizontes A-B-C. siendo el A ócrico y el B cámbico. Se asientan sobre los materiales del Neógeno y sobre los del Complejo Nevado-Filábride. Son suelos, por tanto de las zonas altas de la sierra, a menos de 2000m. Suelen estar cultivados en las zonas más llanas.

- Luvisoles crómicos se dan en el sureste de la sierra, sobre sustratos Nevado-Filábrides. Poseen horizontes Ap con mucha materia orgánica y B argílico, de textura arcillosa y coloración pardo rojiza. Se localizan por debajo de la cota de 1000m.

- Vertisoles, con gran cantidad de arcillas, sólo aparece en las cercanías de Gor (Blanca & Morales, 1991).

La red hidrográfica de la Sierra de Baza pertenece a la cuenca del Guadiana Menor, salvo parte de las ramblas situadas en la vertiente sur, que vierten sus aguas al río Andarax. Destacan las cuencas del río Baza, afluente del Guadiana Menor, y la cuenca del río Gor, al cual desembocan diversos arroyos de la sierra. La mayor parte de los barrancos, ramblas y arroyos llevan agua casi todo el año, sobretodo los de la zona norte, a pesar del carácter árido del clima, ya que se da un aporte procedente del deshielo de las nieves que cubren las cimas en invierno.

Además la sierra cuenta con una serie de acuíferos bajo los diversos materiales que la forman.

El clima es mediterráneo con una acusada continentalidad, la cual se refleja en una gran amplitud térmica, con diferencias de temperaturas entre invierno y verano de más de 15°C. La orografía del Parque es la que condiciona dicha continentalidad, así como el régimen de precipitaciones, las cuales aumentan de sur a norte y de oeste a este, debido a que los macizos que rodean las Hoyas de Guadix y de Baza impiden el paso de las masas húmedas hacia el oeste y el sur. El balance entre

precipitación y evapotranspiración determina la regeneración de la cubierta vegetal, siendo mayor en el norte y oeste del parque. Las precipitaciones, en forma de nieve, que se dan en las altas cumbres durante el invierno constituyen una importante reserva de agua para la vegetación que puebla las zonas de mayor altitud.

Las altas temperaturas que se dan en verano son consecuencia de la influencia del Anticiclón de las Azores, que además produce una severa sequía.

Los Pisos Bioclimáticos son unos peldaños altitudinales caracterizados por unas temperaturas (termoclima) y precipitaciones (ombroclima) en intervalos, a los que corresponde un tipo de vegetación (Navarro, 1995).

Según Navarro (1995), en el Parque están representados 3 termoclimas de los 6 definidos para la región Mediterránea, con unas oscilaciones en altitud, dependientes de la orientación:

Mesomediterráneo (se da desde los 900 m hasta los 1400 m)

Supramediterráneo (de 1450 m a 1800 m)

Oromediterráneo (de 1800-2269 m).

A su vez, se dan 3 ombroclimas, según la precipitación anual:

Seco (350-500 mm).

Subhúmedo (500-900 mm).

Húmedo (900-1800 mm).

Por lo cual, la configuración de los pisos bioclimáticos según los cuales quedará definido el tipo de vegetación presente en cada uno es la siguiente :

Mesomediterráneo Seco, de las zonas basales

Supramediterráneo Seco, de zonas más elevadas expuestas a las desecación.

Supramediterráneo Subhúmedo, de barrancos umbríos.

Oromediterráneo Húmedo de las altas cumbres.

El encuadre biogeográfico de la Sierra permite su localización en cuanto a distribución de especies tanto vegetales como animales. Está situada dentro de la Región Mediterránea, en la provincia Bética, dentro de la cual en el Parque aparecen representados

dos sectores : Guadiciano-Bacense (la mayor parte de la Sierra) y Nevadense (la zona más meridional).

Dentro del primer sector se distinguen, el subsector Serranobacense del macizo propiamente dicho, sobre elementos alpujárrides, calizas, dolomías y calizo-dolomías, y el subsector guadiciano-bastetano de la zona basal de la Sierra (sobre materiales del Neógeno y Cuaternario).

El sector Nevadense corresponde a los sustratos del Complejo Nevado-Filábride, con el subsector Filábrico (Blanca & Morales, 1991).

La vegetación actual del Parque está lógicamente influenciada por los diferentes factores climáticos, edafológicos, topográficos, geológicos, geográficos y antrópicos que analizan Gómez Mercado & Valle (1988). A continuación se hace un breve análisis de las comunidades más representativas de los ecosistemas mediterráneos en estudio.

-Romeral, se encuentra entre los 1000 y 1350 m de altitud, alcanzando en laderas muy soleadas los 1450 m. La topografía sobre la que se da es variada, siendo frecuentes las laderas inclinadas con elevado número de afloramientos rocosos: calizas principalmente. Se asientan sobre suelos poco evolucionados tales como litosoles o regosoles-litosólicos. El romeral está muy extendido como etapa de degradación de la serie del encinar : Serie Mesomediterránea Bética Basófila de la Encina (*Paeonio coriaceae-Querceto rotundifoliae* S.), lo cual se debe a la fuerte acción antrópica del territorio, la alta xericidad, la erosión de los suelos y al presión ganadera, lo que imposibilita una regeneración de masas boscosas. Presentan unas coberturas del 40-60%, y el tamaño de la vegetación alcanza los 40-100 cm. Las especies dominantes son plantas aromáticas, como : *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula latifolia*, *Thymus mastichina*, *Thymus zygis subsp. gracilis*, *Thymus orospedanus*, *Phlomis lychnitis*. Otras son : *Genista cinerea subsp. speciosa*, *Genista scorpius*, *Cistus clusii*, *Helianthemum lavandulifolium*, *Stipa tenacissima*, *Brachypodium retusum*, *Dactylis glomerata*.

-**Salviar**, se extienden desde 1450 m a 1900 m, es decir en el piso Supramediterráneo, constituyendo una comunidad serial degradativa del encinar de alta montaña como es la Serie Supramediterránea Bética Basófila de la Encina (*Berberido hispanicae-Querceto rotundifoliae* S.). Debido a la gran deforestación que ha sufrido la sierra y a la constante erosión a la que están sometidos estos suelos, es aún más difícil la regeneración de estos encinares potenciales. Se asientan sobre laderas inclinadas, a veces abruptas, con rocas calizas, calizodolomías, margo-calizas, filitas sobre las cuales se dan litosoles. Esta comunidad posee una cobertura media de 50-75% y el tamaño de las especies varía entre los 35-50 cm.

Predominan especies como la *Salvia lavandulifolia* subsp. *oxyodon*, *Lavandula latifolia*, *Satureja intricata*, *Echinopartium boissieri*, *Erinacea anthyllis*, *Teucrium webbianum*, *Salvia phlomoides*, etc.

-**Retamal**, es una comunidad muy frecuente en el Parque, ya que la ganadería de la Sierra ha sometido a los primitivos encinares a un adehesamiento extremo, donde las comunidades retamoides de elevada altura han resultado favorecidas. Con una densidad alta en algunas ocasiones, 80-90%, se asienta sobre suelos no muy erosionados y aún profundos tales como regosoles o cambisoles sobre calizas, en zonas de poca pendiente soleadas, con gran xericidad. De la Serie Mesomediterránea bética Basófila de la Encina (*Paeonio coriaceae-Querceto rotundifoliae* S.).

Las especies típicas son la *Retama sphaerocarpa* y *Genista cinerea* subsp. *speciosa*, *Genista umbellata*, *Cytisus reverchonii*, *Genista scorpius*, *Stipa tenacissima*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, etc. así como las especies nitrófilas: *Artemisia campestris*, *Santolina canescens*, *Carlina corimbosa*, *Eryngium campestre*, *Marrubium vulgare*, etc.

-**Escobonal**, matorral arbustivo tipo retamoide sobre suelos esquistosos, procedente de la primera degradación del encinar como es serie Supramediterránea Filábrica y Nevadense Silicícola de la Encina (*Adenocarpo decorticanti-Querceto rotundifoliae* S.).

Al ser la humedad insuficiente no se establecen los espinales, sino plantas como *Adenocarpus decorticans*, *Cytisus scoparius*, *Genista cinerea subsp. speciosa*, *Cistus laurifolius*, *Halimium viscosum*, etc.

La cobertura suele ser alta, y los suelos profundos, ya que a veces aparecen restos de encinas, y pinares de repoblación.

-Espinal, comunidad que se sitúa en barrancos y zonas umbrías del piso supramediterráneo, donde la humedad es elevada (ombroclima subhúmedo) y la topografía palia la xericidad. Se desarrolla sobre suelos profundos, frescos y carbonatados. Es un matorral de 2-3 m de altura con una cobertura media de 70-80%. Suelen convivir formaciones mixtas de caducifolios del bosque y arbustos espinosos también caducifolios. Puede pertenecer a la Serie Supramediterránea Bética Basófila de la Encina (*Berberido hispanicae-Querceto rotundifoliae* S.) o bien a la serie Supramediterránea Bética Basófila del quejigo (*Daphno latifoliae-Acereto granatensis* S.).

Las especies más frecuentes son : *Crataegus monogyna*, *Rosa canina*, *Rosa pouzinii*, *Berberis hispanica*, *Prunus ramburii*, *Amelanchier ovalis*, *Cotoneaster granatensis*, así como *Acer granatense*, *Acer monpessulanus*, *Sorbus aria*, *Sorbus domestica*, *Prunus mahaleb*, etc.

-Sabinar de alta montaña, comunidad presente en las cotas más altas de la Sierra, por encima de los 1900 m, por ello, las plantas están adaptadas a las severas condiciones típicas de la alta montaña mediterránea. Las especies dominantes son gimnospermas tales como pinos, enebros y sabinas, que no han podido ser desplazadas por las fanerógamas menos competitivas en estos medios inhóspitos. Son comunidades que crean ecosistemas mediterráneos de gran importancia ecológica.

Se asientan sobre suelos ricos en bases tipo litosuelos, o rendsinas, sobre los cuales se desarrollan de forma circular enebros y sabinas, de porte almohadillado, como adaptación principal a la xericidad del verano y a las bajas temperaturas y las nieves del invierno. Conforman la Serie Oromediterránea Bética Basófila de la Sabina rastrera (*Daphno oleoidi-Pineto sylvestris* S.).

El pino laricio (*Pinus nigra subsp. salzmannii*) y el pino albar (*Pinus sylvestris subsp. nevadensis*) forman en estas cotas bosques muy abiertos, junto con las sabinas y enebros: *Juniperus sabina var. humilis* y *Juniperus communis subsp. hemisphaerica* respectivamente. También aparecen *Daphne oleoidis*, *Prunus postrata*, *Ononis aragonensis*, *Lonicera splendida*, *Polygala boissieri*, y piornos como *Astragalus granatensis*, *Astragalus semprevirens subsp. giennensis*, *Erinacea anthyllis*, *Vella spinosa*, etc. e incluso algunos espinales caducifolios presentes en el espinal.

Especies vegetales seleccionadas para el presente estudio

Las especies elegidas para realizar los ensayos de invernadero y de campo pertenecen todas al matorral mediterráneo y se encuentran de forma natural en el Parque Natural de la Sierra de Baza.

A continuación se hace una breve descripción de las mismas.

***Lavandula latifolia* Medicus.**

Arbusto tomentoso de hasta 1 m. de altura, con hojas lineares gris tomentosas. Inflorescencia con flores de color morado de 8-10 mm.

Se da en matorrales heliófilos sobre sustratos calizos de los piso Meso y Supramediterráneo Secos.

***Salvia oxyodon* Vahl.**

Es un pequeño arbusto que no sobrepasa los 60 cm de altura, con tallos erectos y pubescentes. Hojas simples, pecioladas y tomentosas. Inflorescencias con 6-8 flores de color púrpura-rojizo. Corola bilabiada de color azul o azul-violeta.

Forma parte de los matorrales heliófilos supramediterráneos, asentados sobre sustratos calizos y dolomíticos.

***Genista cinerea* (Vill.) in Lam. & DC.**

(*Genista cinerea subsp. speciosa* Rivas Goday & Losa).

Es un arbusto de 0.25 a 1.5 m muy ramificado desde la base, con aspecto retamoide. Hojas alternas estipuladas unifoliadas. Flores en grupos de 2 a 3 rodeadas por hojas y bracteolas. Caliz campanulado bilabiado y corola amrailla y marcescente. Fruto oblongo y seríceo con 1-5 semillas ovoideas, negras y biconvexas. Se encuentran formando parte del matorral basófilo de los pisos bioclimáticos Meso y Supramediterráneos secos del sur de la península Ibérica.

Genista umbellata subsp. equisitiformis (Spach) Rivas Goday & Rivas.

(*Genista umbellata* (L'Hér.) Dum. Cours., Bot.

Es un arbusto que llega a 1.5 m de altura, pulviniforme y muy ramificado desde la base. Tallos blanquecinos debido al denso indumento que poseen. Flores en grupos de 10 a 20 muy pequeñas (11-14 mm.) con bracteolas. Caliz, estandarte y quilla vilosos. Fruto viloso y aplanado con 2-4 semillas verde amarillentas con máculas o líneas negras concéntricas.

Se localiza en colinas calcáreas o pedregosas y en taludes margosos o esquistosos, formando parte del matorral en el piso Mesomediterráneo Seco o semiárido del sur de la península.

Retama sphaerocarpa (L.) Boiss., Voy.Bot.

Arbusto de 2 a 3 m de altura, con ramas cuadrangulares plateadas cuando son jóvenes y con indumento cuando son maduras. Hojas muy pequeñas con foliolos. Inflorescencias con 8-17 flores con brácteas y bracteolas. Caliz bilabiado subgloboso y corola amarillas. Fruto ovoideo monospermo.

Forma parte de encinares o sobretodo del matorral de degradación sobre margas, calizas o pizarras, que se da entre los 0-1400 m de altitud, en el piso Mesomediterráneo seco. Es una especie iberonorteafricana.

Rosa canina L. Sp. Pl.

Arbusto de 1 a 3 m con elevado número de tallos más o menos erectos o arqueados verdosos. Hojas con 5-7 foliolos con dientes y estípulas. Flores solitarias o en cimas, de pétalos rosa pálido-blanco. Fruto esférico-elipsoidal, muy carnosos y de color rojo oscuro.

Es una especie muy polimorfa, perteneciente al matorral espinoso de los pisos Meso y Supramediterráneos secos y subhúmedos.

Crataegus monogyna Jacq., Fl. Austriac.

Crataegus monogyna subsp. brevispina (G. Kunz).

Arbusto de hasta 5 m, con espinas de hasta 2.5 cm. en sus ramas. Hojas lobuladas de forma característica y con estípulas. Inflorescencias con 4-11 flores de pétalos blancos, con brácteas caducas. Pomo subgloboso o cilíndrico rojo.

Se da formando parte de la orla de bosques caducifolios o encinares, como matorral espinoso de los pisos Meso y Supramediterráneos secos y subhúmedos, en suelos carbonatados.

Berberis vulgaris L. subsp. australis (Boiss.) Heywood.

Berberis hispanica Boiss & Reuter.

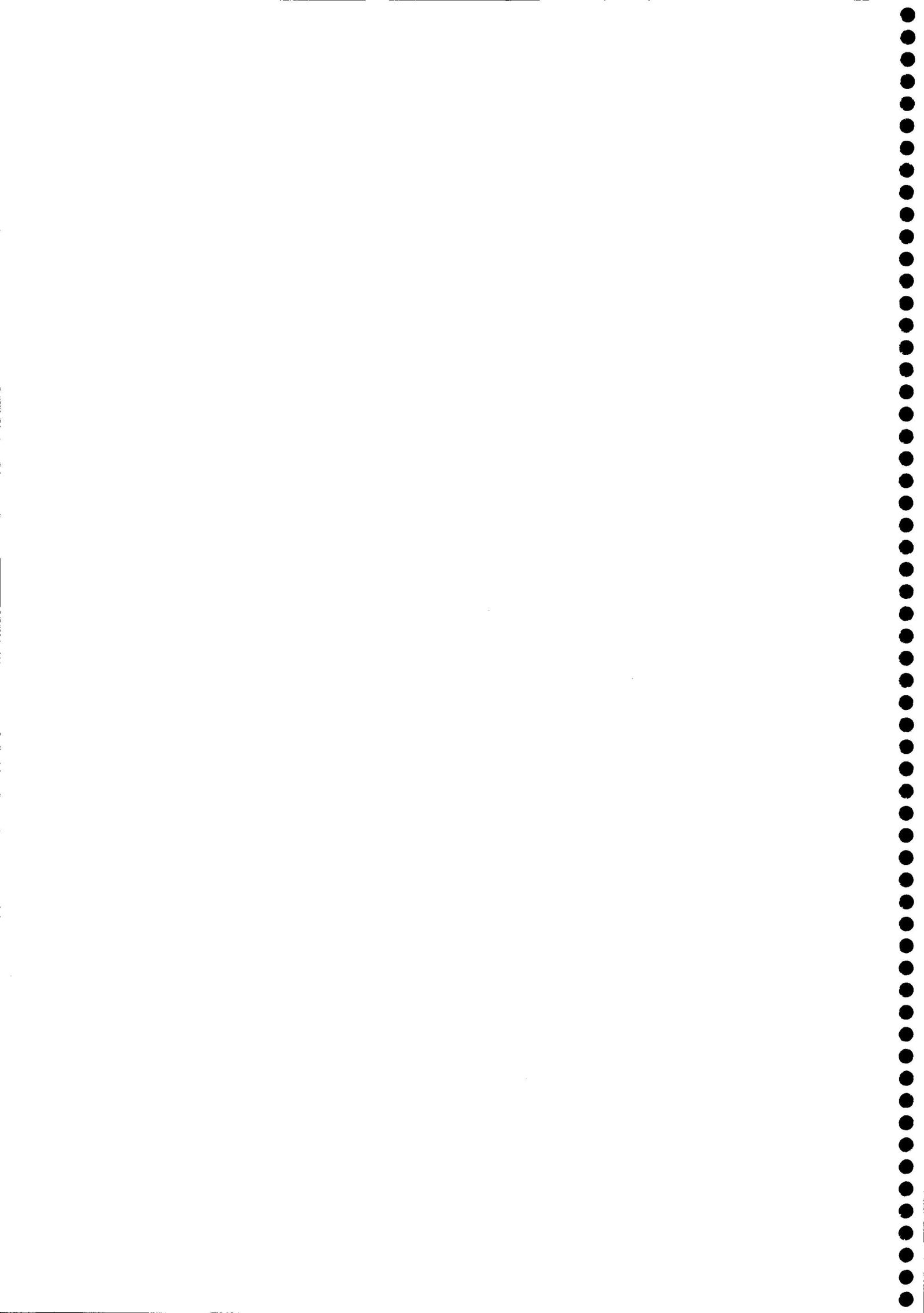
Arbusto de 0.7 a 2 m glabro, con tallos de color púrpura oscuro. Las espinas son amarillas simples o con 3 ramas. Racimos de 10-18 mm, con 3-9 flores muy pequeñas (4-6 mm). Bayas negro azuladas más o menos alargadas.

Pertenece al matorral espinoso de los pisos Supra y Oromediterráneo seco y subhúmedo del sur de la península y norte de África.

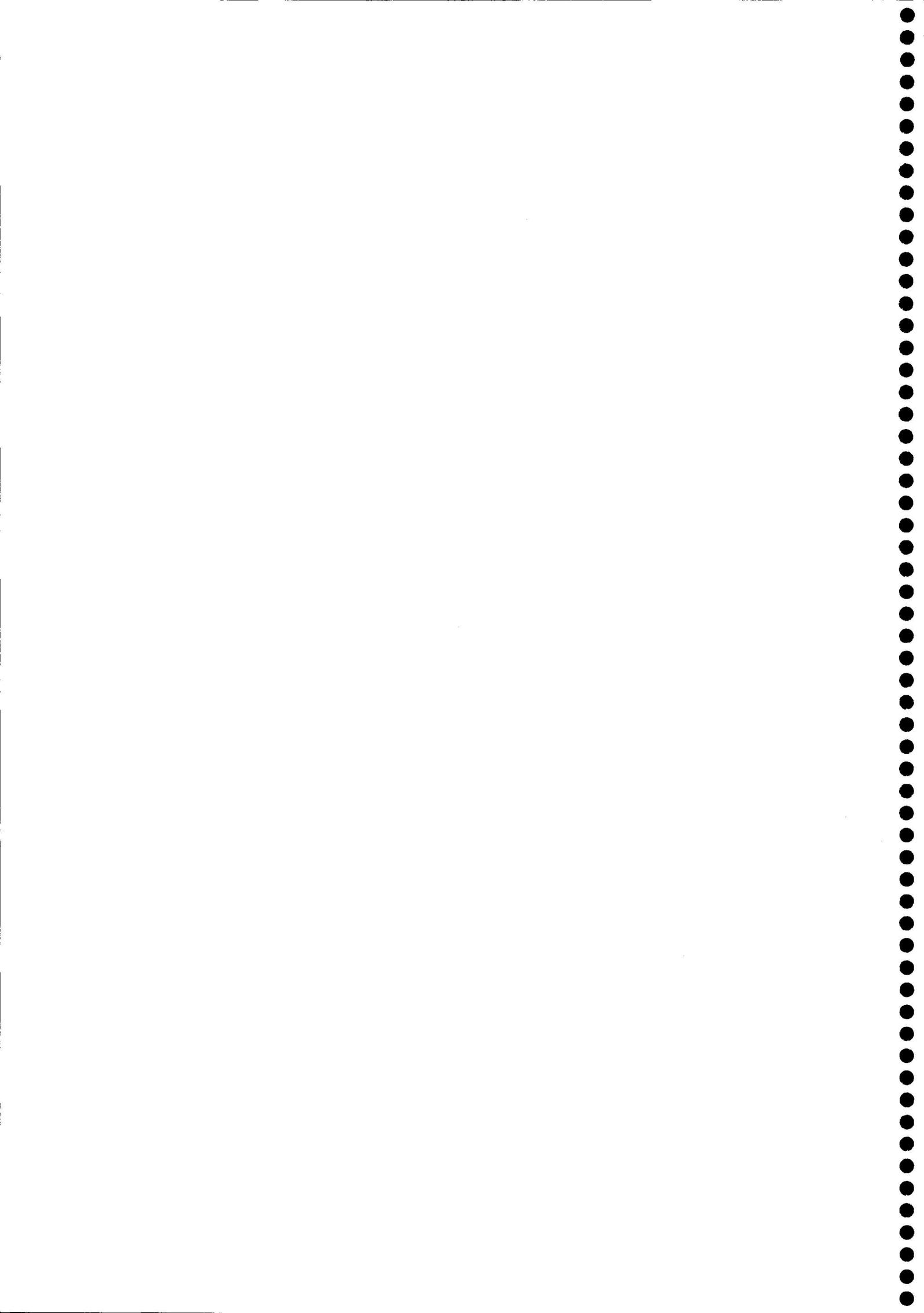
Juniperus phoenicea L. subsp. phoenicea.

Arbusto postrado en lugares venteados o más o menos erecto de hasta 8 m de altura. Con hojas juveniles ternadas agudas y mucronadas, mientras que las hojas adultas son muy imbricadas de 0.7-1 mm de tamaño. Especie monoica, con gábulos de 8-10 mm, globoso y rojo oscuro, que madura a los 2 años. Contiene 3-9 semillas.

Pertenece a matorrales xerofíticos que se dan sobre sustratos pedregosos del piso Mesomediterráneo de ombroclima seco, de los 0-1400m. de altitud.



IV Parte Experimental



Capítulo 1

ANÁLISIS DEL POTENCIAL INFECTIVO Y DE LA DIVERSIDAD DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA) EN DIFERENTES COMUNIDADES DEL PARQUE NATURAL “SIERRA DE BAZA”

Introducción

Los estudios sobre *diversidad biológica*, o tal como se conoce por su contracción *biodiversidad*, adquieren un interés considerable en los años 80. Se entiende por *biodiversidad*, "la variabilidad entre los diversos organismos vivos de todo origen, incluidos el sistema terrestre, el marino y otros sistemas acuáticos, así como los complejos ecológicos de los que dichos sistemas forman parte" (Wilson, 1988).

Los hongos MA forman parte de la mayoría de los ecosistemas terrestres, y se acepta que su diversidad influye de forma determinante en las comunidades de plantas a las que viven asociados (Francis & Read, 1994). Una reducción de la riqueza de poblaciones de hongos de la micorriza o una disminución de su diversidad funcional podría tener consecuencias en el equilibrio de la comunidad vegetal (Read *et al.* 1991; Martins *et al.*, 1993). Según los estudios de van der Heijden *et al.* (1998 a y b), a mayor riqueza de especies de hongos MA, mayor diversidad, capacidad de captación de nutrientes y productividad de la comunidad vegetal. Estos últimos autores también observaron que existe un elevado grado de selectividad o "preferencia específica" entre las comunidades micorrícicas naturales y las plantas hospedadoras. Como ya se ha indicado no se puede hablar de especificidad en sentido estricto en MA. Es más, sólo se han descrito 150 especies de *Glomales*, los cuales se asocian con más de 200.000 especies

vegetales. En una comunidad vegetal tipo, se podrían encontrar de 10 a 20 táxones de hongos MA, lo cual sugiere que las diversas especies de hongos juegan papeles diferentes en la simbiosis, lo cual explica la multifuncionalidad y la preferencia de los hongos por determinadas especies vegetales (Newsham *et al.*, 1995; Daniell *et al.*, 1999).

En el caso de los ecosistemas mediterráneos, sometidos a particulares condiciones ambientales, la influencia de la diversidad funcional en hongos MA puede ser aún mayor. Por ello, el primer objetivo de este estudio fue conocer la diversidad de los hongos MA en las diferentes comunidades propias de ecosistemas mediterráneos en estudio y su relación con la diversidad vegetal existente en el Parque Natural "Sierra de Baza". Para ello, se propuso el aislamiento de los hongos MA nativos de la zona y su identificación. La consecuencia final sería el establecimiento de cultivos puros de hongos MA de la zona, para su uso como inóculos en programas de revegetación con plantas autóctonas del matorral mediterráneo.

De acuerdo con ello se propuso el siguiente Esquema de Trabajo:



Material y Métodos

Muestreos

Se llevaron a cabo dos tipos de muestreos en el Parque Natural de la Sierra de Baza, destinados a estudiar la diversidad de hongos MA. En el primero se tomaron muestras de rizosfera de las especies vegetales seleccionadas en cada comunidad. Se practicaron tres tomas por especie, a una profundidad de 0-25 cm en zonas próximas a las raíces, incluyendo fragmentos de éstas. Las submuestras se mezclaron para obtener una sola muestra por especie vegetal. Los suelos se tamizaron por una malla de 2 mm. Del total de suelo, se tomó 1/3 para realizar la extracción de esporas, y el resto se destinó al crecimiento de “planta trampa” (Ensayo I).

En el segundo tipo de muestreo se tomó la propia planta del campo, representativa de cada comunidad, con el objeto de usarla como fuente viva de inóculo nativo presente en éstas. Se tomaron tres repeticiones por especie, en tres comunidades situadas en diversas zonas del Parque. La toma se hizo con el máximo cuidado de no dañar raíces (Ensayo II).

Multiplicación de Hongos MA

La escasez de propágulos presentes en campo de forma natural dificultó la obtención de un número suficiente de esporas requerido para iniciar la producción de inóculos puros, o para realizar un estudio sobre la diversidad de estos propágulos. La utilización de “plantas trampa” (Sieverding, 1991) permitió incrementar el número de propágulos de los hongos presentes en el suelo y por tanto, la obtención de material suficiente para realizar el estudio. Posteriormente se obtuvieron inóculos puros a partir de cultivos multiespóricos o de raíces micorrizadas (Walker, 1991).

Las “plantas trampa” permiten la multiplicación de los hongos MA presentes en el suelo natural. La técnica consiste en mezclar

la muestra de campo con sustratos inertes y estériles, y hacer crecer una planta en dicha mezcla, con objeto de que se micorrice con los propágulos que lleve la muestra de campo (esporas, micelio, raíces micorrizadas). Las plantas usadas fueron sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), maíz (*Zea mays* L.), trébol (*Trifolium pratense* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), y puerro (*Allium porrum* L.), elegidas por su rápido crecimiento y rápida proliferación de las raíces. Las semillas se esterilizaron en superficie durante 10 minutos con lejía al 10 %, que se eliminaba tras varios lavados consecutivos con agua estéril. Las semillas se sembraron en bateas con vermiculita estéril en el invernadero hasta se producía su germinación, de 3 a 6 días, según la especie.

Al suelo natural tomado en campo, se le adicionó una proporción igual en volumen de arena de cuarzo y vermiculita lavadas y esterilizadas en autoclave a 120°C, durante 20 minutos. Esta mezcla evita la compactación excesiva de los suelos y favorece su aireación. Las macetas fueron desinfectadas previamente con lejía diluida en agua al 5% para evitar otros propágulos de micorrizas. En un volumen de suelo de 0.5 L se hizo crecer un cultivo mixto de "plantas trampa" (sorgo y trébol, cebolla y trébol, maíz y trébol) durante 4-6 meses en invernadero.

El suelo natural muestreado contenía también raíces micorrizadas, ya que el muestreo se hacía cercano a las raíces de la planta. Dichas raíces podían llevar micelio interno y externo, así como esporas de hongos MA en algunas ocasiones, con el objetivo de conseguir la multiplicación del mayor número posible de hongos MA presentes en campo de forma natural. Para facilitar la micorrización, las raíces se cortaron en fragmentos pequeños que se depositaron en la mezcla de suelo, arena y vermiculita ambas estériles (1:1:1) y en ese sustrato se sembraron semillas esterilizadas en superficie y pregerminadas como se ha explicado anteriormente. Las esporas y micelio presentes en el suelo colonizaron el sistema radical de la planta trampa y completaron su ciclo vital con la esporulación. Como resultado se obtuvieron poblaciones de esporas de nueva formación, consistentes en una mezcla de las especies de hongos

MA nativos de la zona. Las “plantas trampa” se hicieron crecer en el invernadero durante 4 -6 meses, al cabo de los cuales los cultivos se evaluaron mediante la tinción de una alícuota de la raíz y el estudio del número y tipo de esporas producidas. Tras los cortes realizados de las plantas trampa, éstas se reponían mediante nuevas semillas esterilizadas y pregerminadas, continuando la multiplicación del hongo.

Para la multiplicación de los hongos MA procedentes del segundo tipo de muestreo, la planta viva tomada del campo constituyó la fuente de inóculo nativo. Dichas plantas se transplantaron a macetas de 1 l de volumen, usando como sustrato sepiolita y arena de cuarzo en igual proporción de volumen (1:1). Ambos sustratos fueron esterilizadas en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. En cada maceta también se hizo crecer sorgo (*Sorghum bicolor*) y trébol (*Trifolium pratense*) como plantas trampa, con objeto de que la micorriza nativa existente en las raíces de la “planta madre” colonizara también las raíces de sorgo y trébol.

Las raíces de sorgo y de trébol fueron cortadas para la cuantificación de la micorrización existente en ellas, dejando siempre intacta a la “planta madre”, conservando así la fuente de inóculo nativo viva. Tras cada corte se repusieron nuevas semillas pregerminadas de trébol y de cebolla, para alternar la “planta trampa”.

Las condiciones de cultivo en el invernadero fueron de un fotoperíodo de 16 horas, con una intensidad lumínica de alrededor de 800 micromoles/ m.seg. La humedad relativa fluctuó entre el 50 al 70 % y la temperatura diurna de 20 a 30 °C, mientras la nocturna lo hizo entre 15 y 25°C. El riego se realizó cada dos días, según los requerimientos hídricos de la planta. Una vez al mes se aplicaron 10 ml por planta de solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966), con la siguiente composición:

Compuesto	Solución madre (g/l)	Para un litro (ml)
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	18.4	20.0
(NO ₃) ₂ Ca	70.8	20.0
EDTA-Fe	2.5	10.0
NO ₃ K	30.3	10.0
PO ₄ NaH ₂ 2 H ₂ O	20.8	10.0
SO ₄ Mn	2.2	1.0
SO ₄ Cu 5 H ₂ O	2.4	0.1
SO ₄ Zn 2 H ₂ O	2.9	0.1
BO ₃ H ₃	18.6	0.1
Na NH ₄ MoO ₄	0.4	0.1
H ₂ O	-	c.s.

Tinción de raíces micorrizadas

Para evaluar la extensión del sistema radical colonizado por los hongos MA, la parte central del sistema radical se cortó en fragmentos de 1 cm de longitud aproximadamente y se tomó un alícuota. Estos fragmentos se trataron de acuerdo a una modificación de los métodos de Phillips & Hayman (1970) y Merryweather & Fitter (1996). Ambos métodos consisten en

sumergir las raíces en KOH al 10 %, de 30 a 60 minutos a 90 °C, dependiendo del tipo de raíz. Una vez que se han digerido las cubiertas celulósicas radicales, los fragmentos se lavan repetidamente con agua para eliminar los restos de KOH. Seguidamente se clarifican con H₂O₂ al 10% durante 30 minutos. Posteriormente, las raíces se lavan de nuevo con agua y se sumergen durante unos minutos en HCl 0,1 N a temperatura ambiente, antes de hervirlas de nuevo en un baño de agua durante 10 minutos con el colorante elegido. En el presente estudio se empleó el Azul Tripán al 0,05 % en ácido láctico que es un colorante que presenta una gran afinidad por la quitina de la pared fúngica y se usa de forma rutinaria para cuantificar la colonización micorrízica de las raíces (Phillips & Hayman, 1970).

Cuantificación del porcentaje de raíz micorrizada

La cuantificación se realizó según el método de intersección magnificada de McGonigle (1990). Las raíces teñidas se colocan en portaobjetos con glicerol. Es necesario un mínimo de tres portaobjetos por cada muestra de raíz a analizar. Una vez montadas las raíces en el portaobjetos se cubren y colocan en el microscopio que lleva incorporado un ocular con retícula. A continuación la muestra se recorre de forma metódica. Hay que tomar la precaución de que un eje de la retícula debe estar alineado con el eje longitudinal de la raíz visualizada. Para calcular el porcentaje de longitud de raíz colonizada, cada vez que la retícula se cruza con una raíz se anota si hay presencia o ausencia de alguna de las estructuras características del hongo. El porcentaje de intersecciones que muestran micorrización con respecto al total de intersecciones contabilizadas se considera el porcentaje de raíz colonizada. Es necesario evaluar un mínimo de 100 intersecciones por portaobjetos para obtener un mayor grado de fiabilidad.

Aislamiento de esporas de hongos formadores de micorrizas arbusculares de las muestras de suelo

Centrifugación en gradiente de sacarosa

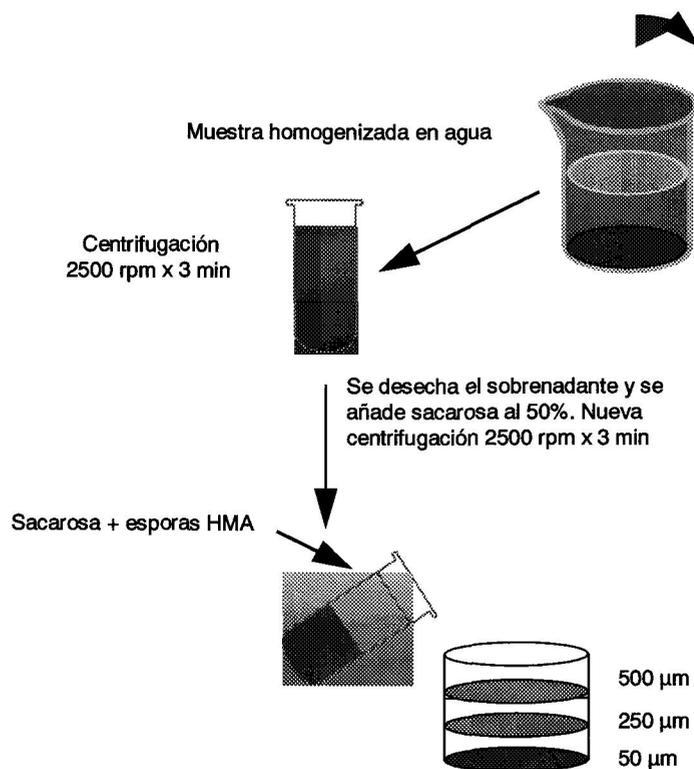
Existen distintas variaciones del método del tamizado húmedo tradicional para la extracción de esporas de hongos formadores de micorrizas del suelo. Entre ellas una de las más comunes es la de extracción en gradiente de sacarosa (Walker *et al.*, 1982). Sin embargo, después de varias comprobaciones se eligió una modificación de la técnica descrita por Walker, que resultó ser muy efectiva en los suelos de textura arcillosa y/o con gran cantidad de materia orgánica.

Para ello se toma una muestra de 25 g de suelo que se mezcla vigorosamente con 100 ml de agua para deshacer los agregados. La mezcla resultante se reparte en tubos de centrífuga que se equilibran con agua. Una vez calibrados los tubos, se vuelve a homogeneizar la mezcla antes de centrifugar 3 minutos a 2500 r.p.m. El sobrenadante obtenido se desecha y al sedimento de cada tubo se le añade sacarosa al 50 % p:v. Se agita vigorosamente y se centrifuga de nuevo 3 minutos a 2500 r.p.m. El sobrenadante obtenido, que contiene las esporas de hongos MA, se decanta a través de una batería de tamices de distinta luz de malla (0.500, 0.250 y 0.050 mm respectivamente). El material retenido en cada tamíz se lava repetidamente con agua para eliminar los restos de sacarosa y posteriormente se transfiere a placas de Petri para su observación al microscopio estereoscópico.

Cuantificación de esporas

El contenido de cada uno de los tamices se vierte en una placa de Doncaster y las esporas se cuantifican con el estereomicroscopio a 40 aumentos.

Una vez recogidas todas las esporas de la muestra, las de morfología similar se separaron utilizando bien unas pinzas finas o capilares de vidrio, dependiendo del tamaño de la espora. Cuando se trataba de esporocarpos o micelio, éstos se colocaron sobre un disco de papel de filtro humedecido en el interior de una placa de Petri y con ayuda de una aguja enmangada se separaron las esporas. Una vez contabilizadas las esporas, el resultado se expresaba como número de esporas por 100 g de peso seco. Para ello, se pesaba un alícuota de cada suelo y se secaba en la estufa a 100 °C. Una vez seco se determinaba el grado de humedad del mismo.



Identificación de morfotipos de hongos MA

Una vez separadas las esporas por morfotipos, se examinan con la ayuda de un microscopio estereoscópico con luz reflejada. Se anotan las características referentes a la morfología de las esporas (globosa, subglobosa, ovoide, elipsoide, fusiforme, etc...), color, tipo de organización (aisladas, en grupos, en esporocarpos), apariencia del contenido lipídico de la espora, etc..

El uso de preparaciones de los distintos tipos de esporas es necesario tanto para la posterior identificación, como para mantener un registro en el laboratorio de los hongos estudiados. Como medio para montar en las preparaciones se utiliza PVLG (alcohol polivinilo-ácido láctico-glicerol) y PVLG con reactivo de Meltzer (1:1, v:v) (Walker, 1991; Meltzer, 1924). La composición de estos reactivos es la que se indica en la siguiente tabla:

PVLG		Reactivo de Meltzer	
Alcohol polivinilo (APV)	de 1,66 g	IK	1,5 g
Ácido láctico	10 ml	Yodo	0,5 g
Glicerina	1 ml	Hidrato cloral	de 100 g
H ₂ O	10 ml	H ₂ O	22 ml

El APV no se disuelve fácilmente en agua, por lo que hay que mantenerlo durante 6 horas en un baño a 80°C. Una vez disuelto se guarda en un frasco oscuro y se mezcla con el glicerol y el ácido láctico y se deja reposar un mínimo de 24 horas antes de su uso.

Una vez agrupadas las esporas por morfotipos bajo el microscopio estereoscópico, las preparaciones permanentes se realizan depositando parte de las esporas con las pinzas sobre una gota de PVLG en un extremo del portaobjetos y otro grupo del mismo morfotipo sobre una gota de PVLG con Meltzer en el otro extremo del portaobjetos. Con cuidado se colocan los cubreobjetos sobre cada una de las gotas y se almacenan.

En el microscopio se examinaron las características de la espora intacta en ambos medios de montaje (color, diámetro, forma, grosor de la pared, etc.). Cuando las esporas están en el reactivo

de Meltzer, en algunos casos se puede observar un cambio de color de rosa pálido a rojo intenso en la pared externa.

Mediante la aplicación de una leve presión al cubreobjetos se rompen las esporas, permitiéndonos el estudio de la estructura de su pared. El tipo de paredes se identificó según los criterios establecidos por Walker (1983,1986), Berch & Koske (1986) y Morton (1986,1996). Se contó el número de paredes, su disposición en grupos y la existencia o no de ornamentación.

La morfología de la hifa de sustentación se examinó teniendo en cuenta forma, color, diámetro, paredes y mecanismo de separación del contenido de la espora del de la hifa.

También la morfología del esporocarpo es diferente según las especies que lo poseen. La disposición de las esporas en el mismo, grosor y estructura del peridio, número de esporas que contiene, color y textura de la superficie.

Una vez obtenidos estos datos se utilizaron las claves de Schenck & Pérez (1987) y del INVAM (Morton, 1997), así como el BEG Expert System (Banque Européene de Glomales) para completar la identificación, generalmente hasta género y cuando fue posible hasta especie.

Obtención de inóculos puros

Como propágulos de partida para la producción de inóculo de los endofitos autóctonos de la Sierra de Baza se utilizaron esporas aisladas de las "plantas trampa" de los muestreos en campo, ya que la mayoría de las esporas procedentes de las muestras tomadas de la Sierra no eran viables. El establecimiento de cultivos multiespóricos es una de las formas más eficaces de obtener inóculo puro a partir de un suelo. Las esporas se obtienen mediante extracción en gradiente de sacarosa. Posteriormente se observan al estereomicroscopio y se separan por morfotipos, eliminando aquellas que estén dañadas o parasitadas. Como inicio del inóculo se suelen utilizar al menos de 15 a 30 esporas de apariencia similar que se colocan sobre las raíces de una planta hospedadora, sorgo o maíz, pregerminada

en condiciones estériles, con la ayuda de unas pinzas. El sustrato en el que se pone a crecer la planta fue vermiculita estéril. Se usa un tubo de ensayo de cristal de 25 cm de longitud, donde crece la plántula durante 4 semanas. A continuación se procede al trasplante a maceta de 0.5 L de volumen, con arena de cuarzo y sepiolita estériles (120°C durante 20 minutos en el autoclave). Tras 6 meses de crecimiento se comprueba la pureza del inóculo tanto a nivel de esporas, como de colonización en las raíces. Cuando se obtuvo una producción masiva de esporas en estos inóculos puros, después de 12 meses, se procedió a la multiplicación del mismo. Para ello se tomaron muestras de rizosfera de éstos inóculos y se usaron como inóculo de nuevas plántulas, repitiéndose todo el proceso.

Resultados

Tras la cuantificación del grado de micorrización existente en las raíces de todas las “plantas trampa”, así como el número de esporas, se obtuvieron los siguientes datos resumidos en gráficas, que muestran las variaciones que presenta el ciclo de vida de los hongos MA, en las diferentes comunidades.

Como indica la Figura 1.1, el porcentaje de micorrización que presentaban las “plantas trampa” correspondientes al muestreo del Romeral, presenta una clara variación estacional, coincidiendo los mínimos de micorrización con los meses de diciembre y junio, mientras que los máximos coinciden con la primavera y con el final del verano, épocas de floración y fructificación de la mayoría de las plantas nativas.

La tendencia es la misma para las tres rizosferas muestreadas, excepto en diciembre de 1998 para la genista, que incrementa la colonización de sus raíces, debido a la baja micorrización existente al inicio .

En el caso de las esporas la variación estacional es la opuesta, descendiendo en primavera, lo que coincide con el máximo de micorrización en raíz, y disminuye al final del verano.

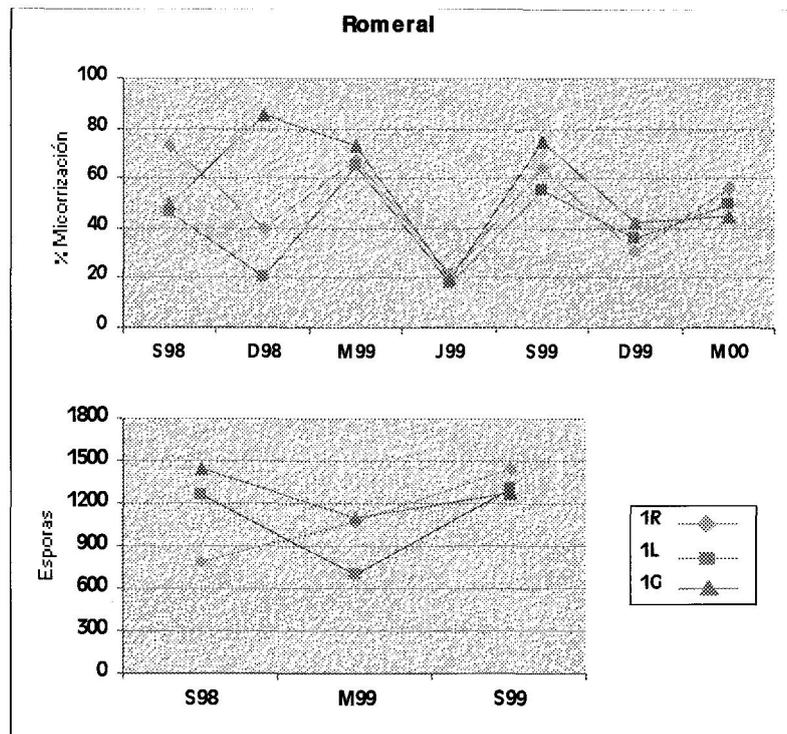


Figura 1.1. Porcentaje de micorrización y número de esporas/100g a lo largo del tiempo en el Romeral (1). Incluye rizosferas de Romero (R), lavanda (L) y genista (G).

Los resultados de la Figura 1.2 indican que la micorrización en raíz de las “planta trampa” de rizosfera de Espinal también muestran una variación estacional clara. Los mínimos vuelven a darse en los meses de diciembre y junio, mientras que los máximos ocurren en marzo y septiembre. Entre las especies ocurren diferencias, ya que en rizosfera de majuelo y agracejo se sigue el mismo patrón, y la rizosfera de rosál y endrino siguen otro.

El número de esporas aumenta progresivamente con el tiempo, sin que ocurra la variación estacional como otras comunidades muestreadas.

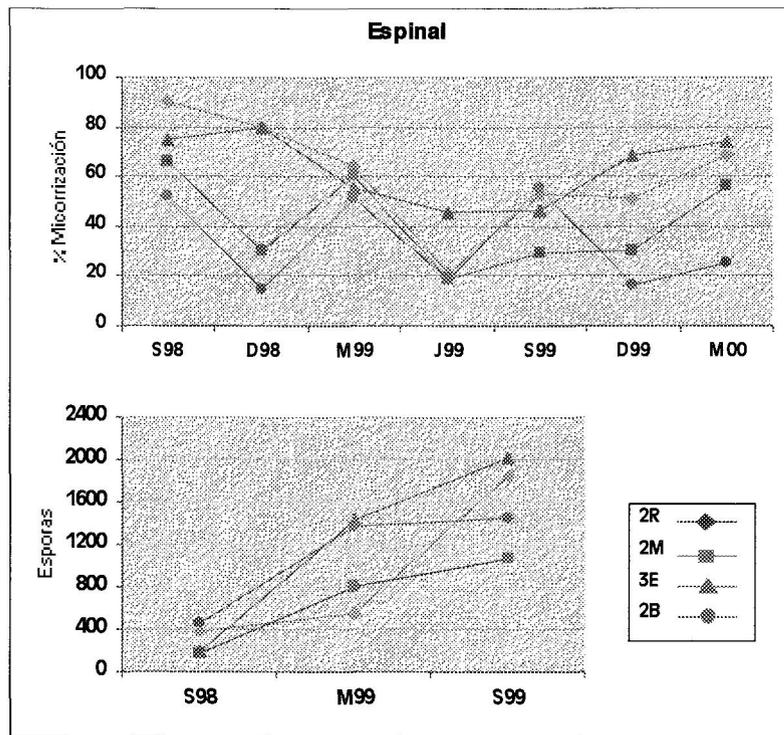


Figura 1.2. Porcentaje de micorrización y número de esporas/ 100g a lo largo del tiempo en el Espinal (2). Se incluyen rizosferas de rosales (R), majuelo (M), endrino (E) y agracejo (B).

En el caso de las “plantas trampa” correspondientes a Retamal (Figura 1.3), el patrón de variación estacional es el mismo en las dos rizosferas muestreadas, retama y tomillo. La colonización de la raíz decrece en invierno e inicio del verano, y aumenta en primavera y final de verano.

El número de esporas cumple la variación estacional contraria, el máximo de esporas coincide con el mínimo en la micorrización de las raíces.

