

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE MICORRIZAS Y HONGOS MICORRÍMICOS ASOCIADOS A ESPECIES DE LA FLORA AMENAZADA DEL PARQUE NACIONAL DE SIERRA NEVADA

CONCEPCIÓN AZCÓN-AGUILAR¹; JAVIER PALENZUELA JIMÉNEZ¹;
MARIO RUÍZ GIRELA²; NURIA FERROL¹; ROSARIO AZCÓN¹;
JOSÉ MARÍA IRURITA³ Y JOSÉ MIGUEL BAREA NAVARRO¹

RESUMEN

Las micorrizas arbusculares, simbiosis hongo-planta beneficiosa para ambos organismos, han jugado un papel clave en el origen y evolución de las plantas sobre la Tierra, así como en el desarrollo de la estructura y diversidad de los ecosistemas terrestres. La mayoría de las plantas dependen de estar micorrizadas para sobrevivir, particularmente en ambientes frágiles y sometidos a estreses, como son los característicos de alta montaña. Así ocurre probablemente en Sierra Nevada, un refugio excepcional para la flora y uno de los enclaves con mayores niveles de biodiversidad de Europa. Sierra Nevada alberga 66 endemismos exclusivos, algunos de ellos en peligro de extinción. Para investigar el posible papel de las micorrizas en la conservación de flora amenazada de Sierra Nevada se han llevado a cabo estudios con los siguientes objetivos: (i) determinar el estado micorrícico de especies de plantas amenazadas de Sierra Nevada, (ii) analizar la diversidad de los hongos micorrícicos asociados a dichas especies, (iii) establecer un banco de germoplasma de hongos micorrícicos de Sierra Nevada, y (iv) verificar los efectos de la micorrización dirigida con dichos hongos autóctonos sobre la producción de plantas de calidad. Los resultados obtenidos muestran que la mayoría (76%) de las especies seleccionadas son micorrícicas. La densidad de esporas de hongos micorrícicos en la rizosfera de las plantas seleccionadas es relativamente baja. Sin embargo, la diversidad de hongos es bastante elevada. Se han detectado unos 50 morfotipos distintos, pertenecientes a los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Pacispora*, *Diversispora* y *Ambispora*. Algunos morfotipos no corresponden a ninguna especie descrita hasta la fecha. Los géneros mejor representados en Sierra Nevada son *Glomus* y *Acaulospora*. En las altas cumbres y suelos ácidos predominan las especies del género *Acaulospora*, mientras que a medida que se desciende en altitud y en suelos alcalinos y con elevado contenido en Ca y Mg predominan las especies del género *Glomus*. Estos resultados apoyan la existencia de mecanismos de adaptación de los hongos micorrícicos a determinadas condiciones edafoclimáticas, a considerar en la elección de los hongos adecuados para micorrizar plantas según especie y localización.

Palabras clave: Diversidad, hongos micorrícicos, micorrizas arbusculares, flora amenazada, endemismos, Sierra Nevada, Glomeromycota.

¹ Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, c/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada.

² Jardín Botánico Hoya de Pedraza, Centro Administrativo del Parque Nacional de Sierra Nevada, EGMASA-Consejería de Medio Ambiente-Junta de Andalucía, Carretera Antigua de Sierra Nevada km. 7, 18191 Pinos Genil (Granada).

³ Delegación provincial de la Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Marqués de la Ensenada 1, 18071 Granada.

conchi.azcon@eez.csic.es; javier.palenzuela@eez.csic.es; mario.ruiz.ext@juntadeandalucia.es; nuria.ferrol@eez.csic.es; rosario.azcon@eez.csic.es; josem.irurita@juntadeandalucia.es; josemiguel.barea@eez.csic.es

SUMMARY

Arbuscular mycorrhizal symbioses have played a key role in plant evolution on Earth as well as on the development and maintenance of the structure and diversity of terrestrial ecosystems. Most of the plants depend on mycorrhizas to thrive, particularly in fragile and stressed environments, as those in certain areas of the high Mediterranean mountains of Sierra Nevada (Granada, Spain). Sierra Nevada constitutes an exceptional refuge for the flora and one of the enclaves with higher biodiversity levels of the European continent. It presents about 2100 plant species and 66 exclusive endemisms, some of them in serious extinction danger. With the objective of ascertaining the impact of mycorrhizal associations at facilitating the conservation of species from the threatened flora of Sierra Nevada a research programme was initiated aimed at (i) determining the mycorrhizal status of selected species of the endangered flora of Sierra Nevada, (ii) analysing the diversity of the mycorrhizal fungi associated to the selected species, (iii) to establish a mycorrhizal fungi germplasm bank and (iv) to study the effect of a tailored mycorrhizal inoculation with autochthonous mycorrhizal fungi on the development of the target plants. It was found that most of the selected species (76%) form arbuscular mycorrhizas in natural conditions. The spore density of mycorrhizal fungi in the rhizosphere of the selected plants was relatively low. However, the diversity of mycorrhizal fungi was quite high. About 50 different morphotypes were detected, belonging to the genera *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Pacispora*, *Diversispora* and *Ambispora*. Some morphotypes do not correspond to any of the species described up to now. The most frequent genera in Sierra Nevada are *Glomus* and *Acaulospora*. *Acaulospora* species are the most frequent in the high mountains and in acidic soils, whereas *Glomus* species predominate at lower altitudes and in neutral and basic soils. All these results will be discussed in the context of conservation of mycorrhizal diversity as a component of the programmes for propagation and conservation of threatened plant species in Sierra Nevada National Park.

Key words: Diversity, mycorrhizal fungi, arbuscular mycorrhiza, endangered plant species, endemism, Sierra Nevada, Glomeromycota.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las plantas desarrollan en su hábitat natural las llamadas micorrizas, asociaciones simbióticas hongo-raíz mutuamente beneficiosas para el hongo y la planta. Los hongos micorrícicos colonizan las raíces, sin causarles daño alguno y desarrollan una red de hifas externas que se extienden y ramifican en el suelo. Este micelio externo actúa como un sistema radical complementario, muy efectivo y de extraordinaria importancia para la adquisición de nutrientes y agua por las plantas. Adicionalmente, las micorrizas confieren a las plantas una mayor capacidad de resistencia/tolerancia a estreses ambientales, tanto de tipo biótico como abiótico. Se ha demostrado que las micorrizas están presentes en todos los biomas y ecosistemas terrestres desde hace más de 400 millones de años, siendo la simbiosis vegetal más extendida en la naturaleza (SMITH & READ 2008).

Las micorrizas han desempeñado un papel clave en la evolución de las plantas sobre la superficie terrestre (SIMON *et al.* 1993; REDECKER *et al.* 2000), así como en el desarrollo y mantenimiento de la estructura y diversidad de los ecosistemas (VAN DER HEIJDEN *et al.* 1998). Esto es debido a la capacidad que confieren a las plantas para desarrollarse en ambientes extremos (BAREA *et al.* 2007). Particularmente, las micorrizas son importantes para el establecimiento y desarrollo de las plantas en ecosistemas frágiles y amenazados (HASSELWANDTER 1987), como son los característicos de las altas montañas Mediterráneas, particularmente en Sierra Nevada.

Sierra Nevada constituye un refugio excepcional para la flora y uno de los enclaves con mayor índice de biodiversidad del continente europeo. La diversidad florística de Sierra Nevada es debida a su aislamiento geográfico y a lo abrupto de los

gradientes ecológicos que presenta, con elevados rangos altitudinales que condicionan la existencia de una gran diversidad de nichos ecológicos. Presenta 2.100 especies vegetales catalogadas, 116 de las cuales se encuentran amenazadas, con 66 endemismos exclusivos, algunos de ellos en peligro de extinción (BLANCA *et al.* 2002).

En los hábitats de alta montaña, la flora vascular ha desarrollado numerosas adaptaciones que han sido impuestas por los factores de estrés inherentes a las rigurosas condiciones ambientales (bajas temperaturas, periodos de crecimiento reducidos, suelos poco profundos, etc.). Estas adaptaciones se manifiestan en variadas estrategias de vida y procesos fisiológicos (KÖRNER 1999). Entre tales estrategias adaptativas está la capacidad para formar asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos. En este sentido, se han descrito varios tipos de micorrizas en comunidades vegetales de montaña, como son las ectomicorrizas y las micorrizas ericoides, orquidoides y arbusculares (HASELWANDTER & READ 1980; READ & HASELWANDTER 1981; KÖRNER 1999). Entre estos tipos de micorrizas, solo las micorrizas arbusculares se han encontrado en las comunidades a mayor altitud (HASELWANDTER & READ 1980; READ & HASELWANDTER 1981).

Es conocido que la conservación *in situ* y *ex situ* de flora amenazada presenta limitantes eco-fisiológicos que dificultan la auto regeneración de las especies en su medio natural y su producción en vivero. En este sentido se pensó que uno de tales limitantes podría estar condicionado por el carácter micotrófico de muchas plantas, es decir, la necesidad que tienen de alimentarse a través de un hongo, o, en otras palabras, de formar micorrizas. Las condiciones en que se desarrollan las plantas en Sierra Nevada pueden dificultar que encuentren propágulos de micorrizas adecuados, y en número suficiente, como para permitir una micorrización optimizada de la planta, lo que en último extremo dificultaría su establecimiento y desarrollo y puede representar un obstáculo en la lucha por la conservación de dichas especies.

Hasta el inicio del presente proyecto, no existía estudio alguno en el que se hubiera realizado una

prospección de micorrizas y los hongos responsables de su formación, en el Parque Nacional de Sierra Nevada, y son escasos aún los llevados a cabo en ecosistemas similares de otros países (READ & HASELWANDTER 1981; FUCHS & HASELWANDTER 2004; CRIPPS & EDDINGTON, 2005; SCHMIDT *et al.* 2008; ZUBEK *et al.* 2009). Esta falta de información sobre un aspecto clave del funcionamiento de las comunidades vegetales es crítica, ya que la no consideración del papel de las micorrizas y su impacto en la propagación y desarrollo de las plantas puede condicionar negativamente los resultados de cualquier estrategia de conservación.

En el presente estudio se propusieron las investigaciones pertinentes para, en una primera fase, determinar el estado micorrícico de las especies objeto de estudio así como la diversidad de hongos micorrícicos asociados con dichas plantas. Ello permitiría establecer un banco de hongos procedentes de rizosfera y raíz de especies amenazadas, muchas de ellas endémicas, de Sierra Nevada. Esta sería la base para que, en una segunda fase, se pueda incorporar la tecnología de la micorrización dirigida en la multiplicación y producción de plantas con vistas a su utilización en programas de recuperación, conservación y reintroducción de dicha flora en sus ambientes naturales.

De acuerdo con lo que antecede, los objetivos del presente estudio fueron los siguientes: (1) investigar el estado micorrícico de las plantas seleccionadas, pertenecientes todas ellas a la flora amenazada de Sierra Nevada; (2) analizar la diversidad de hongos formadores de micorrizas asociados a dichas plantas; (3) establecer un banco de germoplasma de hongos micorrícicos autóctonos de Sierra Nevada que facilite en un futuro la micorrización dirigida de especies amenazadas, y finalmente (iv) verificar los efectos de la micorrización dirigida con dichos hongos autóctonos sobre la producción de plantas de calidad, que facilite el éxito de su reintroducción en sus hábitats naturales, en el contexto de los programas de conservación de flora amenazada del Parque Nacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plantas objeto de estudio

Las 17 especies seleccionadas en el presente estudio, pertenecientes a un total de 13 familias botánicas, son las que se recogen en la Tabla 1. Todas ellas presentan algún tipo de amenaza de acuerdo al Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía (BLANCA *et al.* 1999; 2000), siete de ellas son endémicas de Sierra Nevada y otras dos endémicas de Sierra Nevada y Sierra de Baza (BLANCA *et al.* 2002).

Muestreos

En colaboración con los técnicos/ investigadores del Parque Nacional de Sierra Nevada y del departamento de Conservación de Flora de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, se procedió al muestreo de raíces y suelo asociado de las especies seleccionadas. Los muestreos se llevaron a cabo durante la primavera y el verano de

2007, según la altitud a la que creciera la planta y las posibilidades de acceder a las mismas.

Procesado de las muestras

Análisis fisicoquímico de los suelos: Se determinó el pH, el contenido en materia orgánica, en carbonatos totales y en los principales nutrientes, incluyendo C, N, P, K, Ca y Mg, de todos los suelos muestreados. Los análisis se llevaron a cabo en el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC, Murcia), utilizando los métodos estándar para ello. Para más información, consultar PALENZUELA *et al.* (2010).

Detección de micorrizas: Las raíces recolectadas se observaron en primer lugar a nivel macroscópico y con el microscopio de disección para analizar su estructura y detectar posibles ectomicorrizas. Posteriormente, parte de las raíces recogidas se sometieron a un proceso de digestión y tinción con azul tripán (PHILLIPS & HAYMAN 1970) y se observaron al microscopio óptico para determinar la

| Familia | Especie | Endemismo | Estado de conservación en SN |
|------------------|--|---------------------------------------|------------------------------|
| Ophioglossaceae | <i>Ophioglossum vulgatum</i> | No | EN |
| Aspidiaceae | <i>Dryopteris tyrrhena</i> | No | CR |
| Papaveraceae | <i>Papaver lapeyrousianum</i> | No | EN |
| Caryophyllaceae | <i>Arenaria nevadensis</i> | Exclusivo SN | CR |
| Plumbaginacea | <i>Armeria filicaulis</i> subsp. <i>trevenqueana</i> | Exclusivo SN | EN |
| Crassulaceae | <i>Sempervivum tectorum</i> | No | VU |
| Rosaceae | <i>Sorbus hybrida</i> <i>Sorbus torminalis</i> | No No | CR EN |
| Leguminosae | <i>Hippocrepis nevadensis</i> <i>Hippocrepis prostrata</i> | Exclusivo SN Exclusivo SN | VU VU |
| Aquifoliaceae | <i>Ilex aquifolium</i> | No | EN |
| Umbelliferae | <i>Laserpitium longiradium</i> | Exclusivo SN | CR |
| Scrophulariaceae | <i>Odontites granatensis</i> | Exclusivo SN | CR |
| Compositae | <i>Artemisia alba</i> ssp. <i>nevadensis</i> <i>Artemisia granatensis</i> <i>Artemisia umbelliformis</i> | Exclusivo SN+SB Exclusivo SN No | VU CR EN |
| Amaryllidaceae | <i>Narcissus nevadensis</i> | Exclusivo SN+SB | CR |

Tabla 1. Especies objeto de estudio con indicación de la familia botánica a la que pertenecen, la distribución geográfica (según se trate de endemismos exclusivos de Sierra Nevada –SN- o de SN y Sierra de Baza –SN+SB-), y su estado de conservación en Sierra Nevada, de acuerdo a la Lista Roja de la IUCN (CR: En peligro crítico; EN: En peligro; VU: Vulnerable).

Table 1. Target species, their botanical family, geographical distribution (depending on its character of endemism exclusive from Sierra Nevada –SN- or from SN and Sierra de Baza –SN+SB-), and conservation status in Sierra Nevada according to the IUCN Red List (CR: Critically Endangered; EN: Endangered; VU: Vulnerable).

presencia o ausencia de micorrizas y de las distintas estructuras características de la simbiosis. Otra parte de las raíces se congeló a -80°C para posteriores análisis moleculares de los hongos micorrícicos presentes.

Determinación de la diversidad de hongos micorrícicos: A partir del suelo rizosférico muestreado se procedió al aislamiento y multiplicación de los hongos micorrícicos asociados a las plantas objeto de estudio. Las esporas de los hongos se aislaron, a partir de muestras representativas de 50 g de suelo, mediante la técnica del tamizado húmedo y decantación, seguida por una centrifugación en sacarosa (SIEVERDING 1991). Las esporas aisladas se caracterizaron morfológicamente y, en los casos dudosos, también mediante el empleo de técnicas moleculares.

Establecimiento de cultivos enriquecedores

Con la finalidad de enriquecer las poblaciones de hongos micorrícicos existentes en el suelo y que se manifieste mejor la diversidad y evolución temporal de las mismas, se procedió al establecimiento de cultivos enriquecedores. Hay que recordar en este punto que los hongos formadores de micorrizas arbusculares (las únicas detectadas en el presente estudio) son simbioses estrictos incapaces de crecer y completar su ciclo de vida en ausencia de una planta hospedadora. No es posible, por tanto, hacerlos crecer en los medios habituales de laboratorio. Por lo tanto, para la multiplicación de los hongos presentes en los suelos muestreados se prepararon cultivos (macetas) con los suelos recolectados y plantas hospedadoras adecuadas con los que los hongos presentes en el suelo pudieran establecer la simbiosis y, consecuentemente, completar su ciclo de vida y multiplicarse.

Caracterización morfológica de los hongos micorrícicos

Se ha basado fundamentalmente en la ontogenia de las esporas, su morfología y la estructura de las paredes que presentan, siguiendo métodos bien establecidos al respecto (SPAIN 1990; BRUNDRETT *et al.* 1994). También se han tenido en cuenta las características de las hifas y de las micorrizas que producen. Los criterios de clasificación seguidos

coinciden básicamente con los empleados por el INVAM (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi, www.invam.caf.wvu.edu), con algunas modificaciones descritas recientemente (OEHL *et al.* 2006; PALENZUELA *et al.* 2008).

Caracterización molecular de los hongos micorrícicos

Cuando la caracterización morfológica de los hongos encontrados no permitía asignarlos claramente a una especie determinada se procedió a caracterizarlos molecularmente. Para ello se aplicaron técnicas de biología molecular basadas en la amplificación mediante PCR y posterior secuenciación de un fragmento de la subunidad pequeña (18S) de los genes ribosómicos. La metodología seguida es la descrita previamente para otros hongos micorrícicos (FERROL *et al.* 2004; PALENZUELA *et al.* 2008). Básicamente, se partía de esporas individualizadas. Los extractos de ADN se amplificaban mediante PCR anidada, empleando cebadores universales de eucariotas en el primer ciclo de PCR y específicos de hongos micorrícicos en el segundo. Los productos de la PCR se secuenciaron y las secuencias obtenidas se compararon con las incluidas en las bases de datos y se sometieron a un análisis filogenético.

Establecimiento del banco de germoplasma de hongos micorrícicos

Después de un año aproximadamente del establecimiento de los cultivos enriquecedores, se procedió al aislamiento de esporas de los mismos como se ha descrito anteriormente. Se clasificaron las esporas en base a su morfología y de todos aquellos morfotipos que presentaban un número aceptable (entre 20 y 50) de esporas homogéneas y aparentemente viables se establecieron cultivos puros monoespecíficos. Estos cultivos puros se mantienen en crecimiento en un invernadero protegido de posibles contaminaciones y, una vez comprobada su homogeneidad, constituyen la base del banco de germoplasma de hongos micorrícicos.

Experimentos en invernadero

Estos ensayos se han llevado a cabo con el fin de determinar el efecto de la micorrización dirigida

con los hongos autóctonos aislados a lo largo del proyecto sobre la producción de plantas de calidad con micorrización optimizada.

Multiplicación del material vegetal: Por tratarse de plantas amenazadas en peligro de extinción, la disponibilidad de material para su uso en experimentación es muy limitada. Se ha tratado de solventar este problema mediante distintas aproximaciones: enraizamiento de estaquillas, germinación de semillas cuando se disponía de ellas y germinación de esporas en el caso de los helechos.

Diseño experimental: Con aquellas especies vegetales que se consiguió un número mínimo de plántulas homogéneas (40), se procedió a evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrícicos autóctonos sobre su supervivencia y desarrollo. Para ello se utilizaron suelos con características similares a aquellos en los que se desarrolla cada especie objeto de estudio. Parte del suelo se tinalizó 1 h durante tres días consecutivos para eliminar los hongos micorrícicos que pudiera haber presentes (SE) y posteriormente se le adicionó un filtrado de suelo natural exento de propágulos de hongos micorrícicos, con objeto de reponer el resto de la comunidad microbiana original. La otra parte del suelo se mantenía como suelo natural, no esterilizado (SN). Para cada especie en concreto se seleccionaron tres hongos micorrícicos que se hubieran detectado en su rizosfera y que se hubieran logrado multiplicar en cultivos puros y formaran parte del banco de hongos establecido. Con esos tres hongos micorrícicos se elaboró un inóculo mixto, con el que se inocularon la mitad de las plántulas que se transplantaron tanto en el suelo estéril (SE+M), como en el suelo natural que retenía los propágulos micorrícicos de partida (SN+M).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estado micorrícico de las especies objeto de estudio

Trece de las 17 especies investigadas, el 76%, presentan micorrizas arbusculares en las que se podían observar la mayoría de las estructuras típicas que caracterizan la simbiosis, fundamentalmente arbuscúlos (Tablas 2 y 3, Figura 1). Tres de estas es-

pecies, *Ilex aquifolium*, *Laserpitium longiradium* y el pteridofito *Dryopteris tyrrhena*, forman micorrizas arbusculares de tipo Paris (Tabla 2, Figura 1), caracterizadas por la ausencia de hifas intercelulares, abundancia de hifas que forman lazadas dentro de las células (ovillos o *coils*) y arbuscúlos que se originan a partir de los ovillos (DICKSON *et al.* 2007). Los dos pteridofitos estudiados, *Ophioglossum vulgatum* y *Dryopteris tyrrhena* presentan micorrizas arbusculares con una estructura muy peculiar, como se ha descrito previamente para otros helechos (IQBAL *et al.* 1981; ZHANG *et al.* 2004). En especial *D. tyrrhena*, que además de presentar colonización tipo Paris, tenía células frecuentemente colonizadas con vesículas y arbuscúlos o vesículas y ovillos, simultáneamente (Figura 1).

En cuatro de las especies micorrizadas (*O. vulgatum*, *H. nevadensis*, *A. umbelliformis* y *N. nevadensis*) se detectó la presencia de endofitos finos simultáneamente con los endofitos mas gruesos, que son los mas frecuentes en la mayoría de los ecosistemas (Tabla 3). Los endofitos finos parecen estar bien adaptados a ambientes muy fríos con condiciones muy adversas. Se ha descrito un incremento de su presencia relativa tanto en gradientes altitudinales en el norte de Noruega (RUOTSA-LAINEN *et al.* 2004), como en los montes Tatra (ZUBEK *et al.* 2009), y en gradientes latitudinales en la zona ártica de Canadá (OLSSON *et al.* 2004). Estos resultados sugieren que la colonización por endofitos finos puede jugar un papel específico, aunque desconocido por el momento, en la nutrición de las plantas alpinas y árticas.

En tres de las especies investigadas (*Papaver lapeyrousianum*, *Arenaria nevadensis* y *Semprevivum tectorum*) no se detectó ningún tipo de micorriza (Tabla 2). *Arenaria nevadensis* pertenece a una familia que esta compuesta casi exclusivamente por especies no micorrícicas, la Caryophyllaceae, mientras que las otras dos pertenecen a familias integradas por especies mayoritariamente no micorrícicas, aunque con alguna excepción (HARLEY & HARLEY 1987; CRIPPS & EDDINGTON 2005). En el caso de *Papaver lapeyrousianum*, se han descrito micorrizas arbusculares en una especie próxima, *Papaver rhoeas*, aunque la intensidad de su colonización micorrícica es muy baja (WIJESINGHE *et al.* 2001). En algunas de las raíces de *P. lapeyrousianum* estudiadas

| Especie vegetal | Estado micorrícico | | DSE |
|--|--------------------|----------------|-----|
| | NM | MA | |
| <i>Ophioglossum vulgatum</i> | | ++ (especial) | + |
| <i>Dryopteris tyrrhena</i> | | +++ (especial) | |
| <i>Papaver lapeyrousianum</i> | •? | | |
| <i>Arenaria nevadensis</i> | • | | |
| <i>Armeria filicaulis</i> subsp. <i>trevenqueana</i> | | +? | |
| <i>Sempervivum tectorum</i> | • | | + |
| <i>Sorbus hybrida</i> | | ++ | + |
| <i>Sorbus torminalis</i> | | ++ | + |
| <i>Hippocrepis nevadensis</i> | | +++ | |
| <i>Hippocrepis prostrata</i> | | +++ | |
| <i>Ilex aquifolium</i> | | +++ (Paris) | |
| <i>Laserpitium longiradium</i> | | +++ (Paris) | |
| <i>Odontites granatensis</i> | | +++ | + |
| <i>Artemisia alba</i> ssp. <i>nevadensis</i> | | +++ | + |
| <i>Artemisia granatensis</i> | | ++ | |
| <i>Artemisia umbelliformis</i> | | + | + |
| <i>Narcissus nevadensis</i> | | +++ | + |

Tabla 2. Estado micorrícico de las especies objeto de estudio (NM = no micorrizadas; MA = con micorrizas arbusculares; DSE = presentando endofitos septados oscuros). El número de signos + indica la intensidad de la colonización.

Table 2. Mycorrhizal status of the target plant species (NM = non-mycorrhizal; MA = with arbuscular mycorrhizas; DSE = associated to dark septate endophytes). The number of + signs indicates the colonization intensity.

| Especie vegetal | Estructuras fúngicas | | | | |
|--|----------------------|---------------|-------------|------------|----------|
| | Coils | Hifas gruesas | Hifas finas | Arbúsculos | Vesícula |
| <i>Ophioglossum vulgatum</i> | + | + | + | + | |
| <i>Dryopteris tyrrhena</i> | + | + | | + | + |
| <i>Papaver lapeyrousianum</i> | | | | | |
| <i>Arenaria nevadensis</i> | | | | | |
| <i>Armeria filicaulis</i> subsp. <i>trevenqueana</i> | | + | | | + |
| <i>Sempervivum tectorum</i> | | | | | |
| <i>Sorbus hybrida</i> | + | + | | + | + |
| <i>Sorbus torminalis</i> | | + | | + | + |
| <i>Hippocrepis nevadensis</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Hippocrepis prostrata</i> | | + | | + | + |
| <i>Ilex aquifolium</i> | + | + | | + | + |
| <i>Laserpitium longiradium</i> | + | + | | + | + |
| <i>Odontites granatensis</i> | + | + | | + | + |
| <i>Artemisia alba</i> ssp. <i>nevadensis</i> | + | + | | + | + |
| <i>Artemisia granatensis</i> | | + | | + | + |
| <i>Artemisia umbelliformis</i> | + | + | + | + | + |
| <i>Narcissus nevadensis</i> | + | + | + | + | + |

Tabla 3. Estructuras fúngicas detectadas en las especies objeto de estudio.

Table 3. Fungal structures detected in the root of the target plant species.

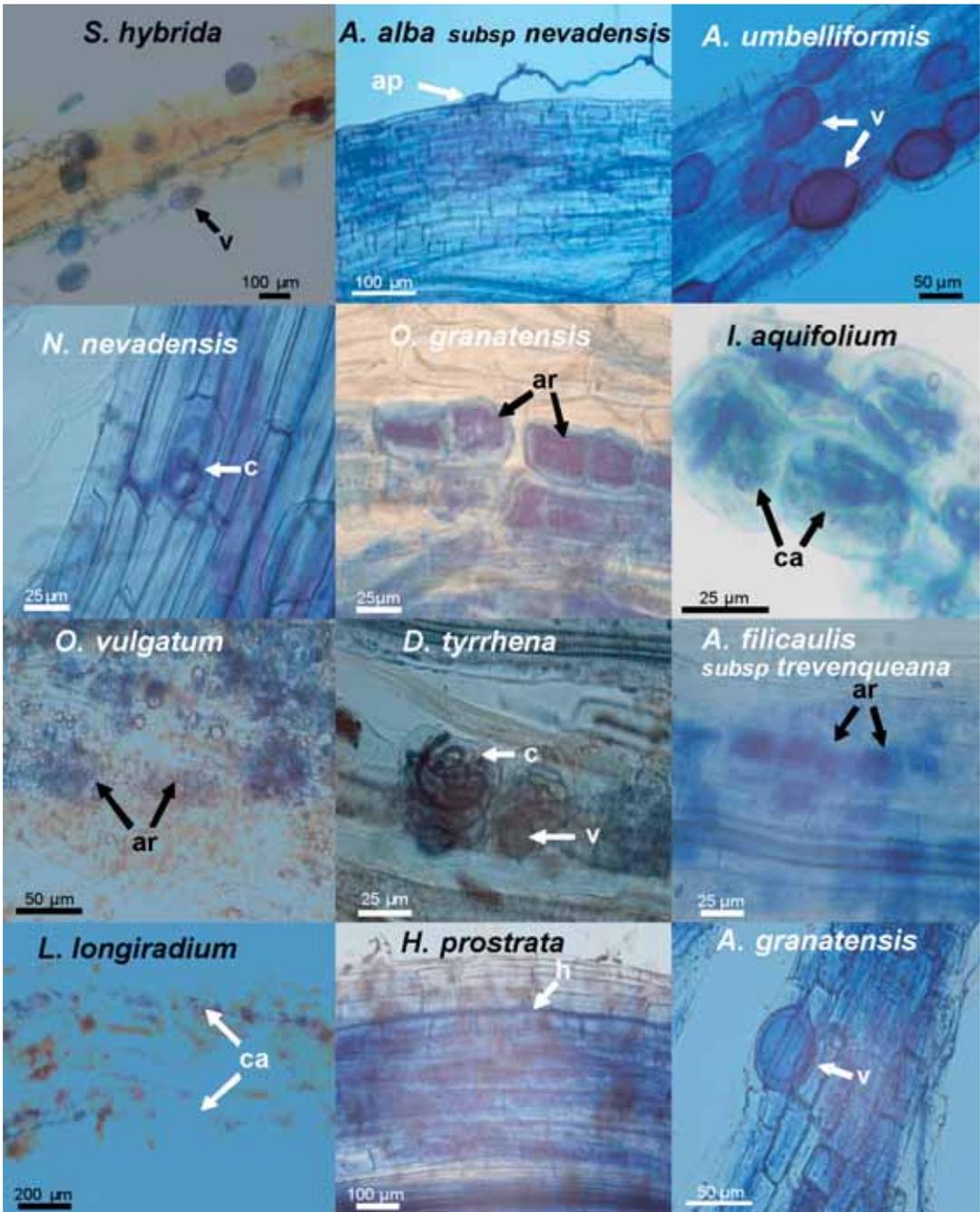


Figura 1. Raíces micorrizadas de las especies objeto de estudio, en las que pueden observarse algunas de las estructuras características de las micorrizas arbusculares. Abreviaturas: ap = apresorio; ar = arbusculo; c = ovillo o coil; ca = arbusculos que se originan a partir de ovillos o coils; h = hifa; v = vesícula.

Figure 1. Mycorrhizal roots from the target plants showing some of the characteristic structures of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Abbreviations: ap = appressorium; ar = arbuscule; c = coil; ca = arbusculate coil; h = hypha; v = vesicle.

se detectaron estructuras similares a las de las micorrizas arbusculares, aunque su frecuencia era muy reducida y no pudo precisarse su naturaleza exacta. Sería necesario un nuevo muestreo para confirmar estas apreciaciones. A falta de datos adicionales, estas especies habría que considerarlas como no micorrícicas.

En otra de las especies estudiadas, *Armeria filicaulis* subsp. *trevanqueana*, aunque en algunas de sus raíces se apreciaban estructuras, fundamentalmente hifas y vesículas, similares a las características de las micorrizas arbusculares, no se pudieron detectar arbuscúlos (Tabla 3). Esta especie probablemente se puede considerar dentro del grupo de las denominadas micotrofas facultativas, es decir "especies que pueden alcanzar su madurez reproductiva sin micorrizas, al menos en las condiciones más favorables de sus hábitats naturales" (JANOS 2007). La familia Plumbaginaceae está integrada por especies normalmente consideradas como no micorrícicas. En un estudio llevado a cabo en Europa Central sobre micorrizas en plantas halófitas, entre las cuales se encontraban especies del género *Armeria*, concretamente *A. maritima* (HILDEBRANDT et al. 2001), se mostraba que esta especie estaba micorrizada, particularmente en las marismas más secas que se investigaron. Estos resultados apoyan los aquí descritos en el sentido de considerar el género *Armeria* como compuesto por especies micotrofas facultativas.

Aproximadamente la mitad de las especies muestreadas presentaba endofitos septados oscuros (DSE, de sus siglas en inglés, *dark septate endophytes*). Estos endofitos se han descrito con frecuencia en plantas de ecosistemas alpinos (READ & HASELWANDTER 1981; FUCHS & HASELWANDTER 2004; CRIPPS & EDDINGTON 2005; SCHMIDT et al. 2008; ZUBEK et al. 2009) y en las zonas polares (NEWSHAM et al. 2009). Aunque su función continúa siendo desconocida en la actualidad, algunos estudios sugieren que ejercen un efecto beneficioso sobre el crecimiento de la planta en determinadas condiciones (MANDYAM & JUMPPONEN 2005; NEWSHAM et al. 2009).

En ninguna de las especies muestreadas se encontraron ectomicorrizas o endomicorrizas del tipo orquidoide o ericoide. Esto no es de extrañar

porque ninguna de las especies estudiadas pertenece a una de las familias que forman específicamente esos tipos de simbiosis.

Características de los suelos

Las características fisicoquímicas de los suelos en los que crecían las plantas objeto de estudio se recogen en la Tabla 4. En concordancia con la elevada diversidad de ambientes característica de Sierra Nevada, también los suelos muestran notables diferencias entre ellos. Así encontramos suelos ácidos, como son aquellos en los que crecen *D. tyrrhena*, *S. tectorum*, *S. hybrida* y *A. granatensis*, neutros como los de *S. torminalis* y *L. longiradium* y básicos como los de *A. filicaulis*, *H. nevadensis* y *A. alba*. También variaban mucho en su contenido en materia orgánica, siendo algunos bastante ricos, como los de *O. vulgatum*, *S. hybrida* y *N. nevadensis*, y muy pobres la mayoría de los que se encuentran en las altas cumbres de Sierra Nevada, como son aquellos en los que crecen *P. lapeyrousianum*, *A. nevadensis* y *A. granatensis*. Finalmente, el contenido en carbonatos y Ca también variaba mucho, siendo muy elevado en los suelos en los que crecían *A. alba*, *O. granatensis*, *H. nevadensis* y *A. filicaulis*. En los suelos correspondientes a estas dos últimas especies también era muy elevado el contenido en Mg, como corresponde a suelos dolomíticos. En general se trata de suelos bastante pobres, como suele ser habitual en los ecosistemas de alta montaña (BILLINGS 1979).

Diversidad de hongos micorrícicos

La densidad de esporas de hongos micorrícicos en la rizosfera de las plantas es relativamente baja (inferior a 2 esporas/g de suelo), exceptuando a *O. vulgatum* y *N. nevadensis* (Figura 2). Sin embargo, esta densidad es similar a la descrita en general en ambientes mediterráneos (AZCÓN-AGUILAR et al. 2003). Las plantas en cuya rizosfera se detectaba mayor densidad de hongos micorrícicos estaban todas micorrizadas, pero también en las que no se detectaron micorrizas se encontraron esporas de hongos micorrícicos a niveles similares a los encontrados en plantas micorrizadas. Probablemente esos hongos micorrícicos estaban asociados simbióticamente con especies acompañantes de la planta muestreada. La única excepción es *A. nevadensis*,

| Especie vegetal | pH (H ₂ O) | Materia orgánica (%) | Carbonatos totales (CO ₃ Ca) (g/100g) | C (%) | N (%) | Ca (%) | K (%) | Mg (%) |
|---|-----------------------|----------------------|--|-------|-------|--------|-------|--------|
| <i>Ophioglossum vulgatum</i> | 6.5 | 52.05 | 4,1 | 12.55 | 1.05 | 0.61 | 0.21 | 0.35 |
| <i>Dryopteris tyrrhena</i> | 5.6 | 10.95 | 3,1 | 5.89 | 0.38 | 0.44 | 0.40 | 0.58 |
| <i>Papaver lapeyrousianum</i> | 6.6 | 0.84 | 3,5 | 0.38 | 0.03 | 0.69 | 0.51 | 1.06 |
| <i>Arenaria nevadensis</i> | 6.5 | 0.93 | nd | 0.63 | 0.04 | 0.11 | 0.30 | 0.55 |
| <i>Armeria filicaulis</i> ssp <i>trevenqueana</i> | 7.8 | 6.28 | 64,4 | 13.13 | 0.06 | 15.72 | 0.05 | 12.75 |
| <i>Sempervivum tectorum</i> | 5.7 | 6.91 | nd | 9.41 | 0.65 | 0.50 | 0.71 | 0.36 |
| <i>Sorbus hybrida</i> | 6.0 | 22.71 | 3,8 | 8.77 | 0.68 | 0.35 | 0.64 | 0.52 |
| <i>Sorbus torminalis</i> | 7.1 | 4.50 | 3,0 | 2.89 | 0.24 | 0.22 | 0.48 | 0.09 |
| <i>Hippocrepis nevadensis</i> | 7.8 | 4.40 | 54,2 | 8.06 | 0.14 | 20.62 | 0.41 | 9.50 |
| <i>Hippocrepis prostrata</i> | 6.1 | 5.08 | 3,0 | 3.34 | 0.30 | 0.24 | 0.78 | 0.37 |
| <i>Ilex aquifolium</i> | 6.2 | 5.75 | 3,5 | 3.91 | 0.29 | 0.21 | 0.42 | 0.36 |
| <i>Laserpitium longiradium</i> | 7.2 | 3.25 | 5,6 | 5.42 | 0.19 | 1.45 | 1.21 | 1.29 |
| <i>Odontites granatensis</i> | 7.7 | 1.83 | 16,1 | 3.36 | 0.13 | 5.88 | 1.22 | 1.75 |
| <i>Artemisia alba</i> ssp. <i>nevadensis</i> | 7.9 | 2.54 | 48,8 | 11.25 | 0.17 | 18.86 | 0.49 | 1.42 |
| <i>Artemisia granatensis</i> | 6.0 | 0.81 | 3,2 | 2.65 | 0.17 | 0.12 | 0.49 | 0.32 |
| <i>Artemisia umbelliformis</i> | 6.2 | 1.89 | nd | 2.15 | 0.16 | 0.34 | 0.37 | 0.70 |
| <i>Narcissus nevadensis</i> | 6.4 | 19.96 | 3,3 | 17.01 | 1.34 | 1.18 | 0.46 | 0.43 |

Tabla 4. Características de los suelos en los que crecen las especies objeto de estudio. nd = no determinado.

Table 4. Characteristics of the soils where the target plant species were growing. Nd = not determined.

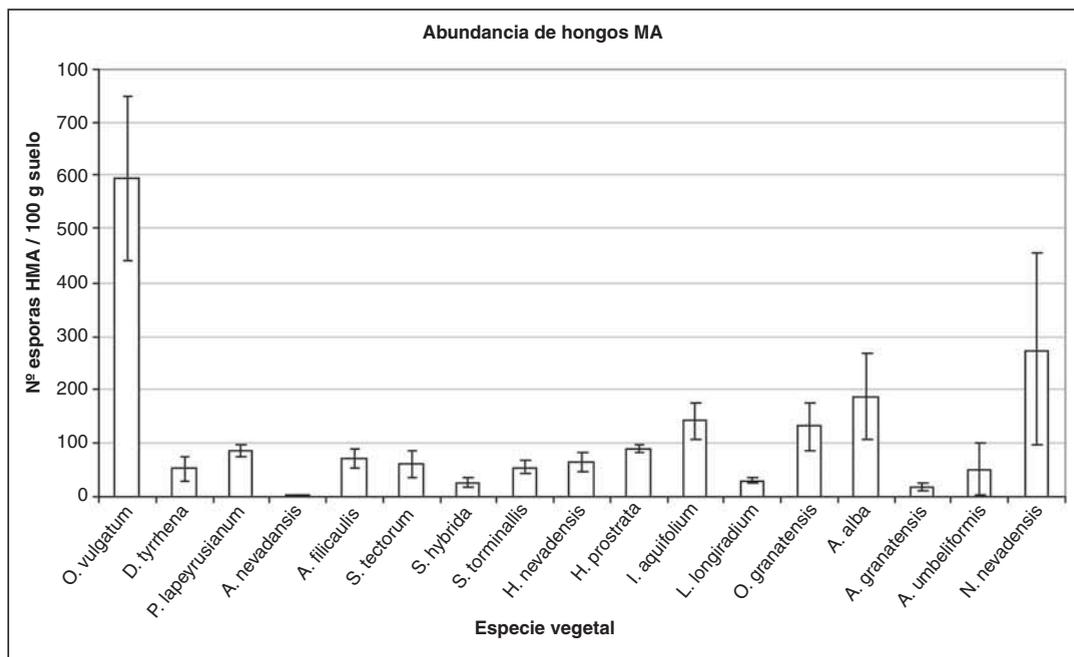


Figura 2. Número de esporas de hongos formadores de micorrizas arbusculares en la rizosfera de las plantas objeto de estudio. Los resultados se expresan como el valor medio (n=5) ± el error estándar.

Figure 2. Spore number of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of the target plant species. Results are expressed as the mean value (n=5) ± standard error.

que apenas presentaba hongos micorrícicos en su rizosfera. Se sabe que algunas plantas no micorrícicas son capaces de producir compuestos que ejercen un efecto inhibitorio sobre los hongos micorrícicos y sobre su potencial infectivo en el suelo (FONTENLA *et al.* 1999). Probablemente las duras condiciones ambientales en la zona donde crece *A. nevadensis*, junto a la presencia de algún compuesto inhibitorio en sus exudados radicales justifiquen la ausencia casi total de hongos micorrícicos en su rizosfera.

La riqueza de especies de hongos micorrícicos en las rizosferas muestreadas se recoge en la Figura 3. Con la excepción de *N. nevadensis*, que fue la que mostraba mayor riqueza y, en menor medida, *A. alba*, las especies que presentaban mayor densidad de hongos en su rizosfera no fueron las que albergaban una mayor diversidad de estos hongos. En consonancia con los resultados de densidad de esporas, la especie vegetal que presentaba una menor riqueza de hongos micorrícicos en su rizosfera fue *A. nevadensis*. Es interesante, sin em-

bargo, que una de las especies que albergaba en su rizosfera mayor riqueza de hongos micorrícicos fue *P. lapeyrouisianum*, que no estaba micorrizada en condiciones naturales. Este hecho puede tener dos explicaciones. La primera, como se ha indicado anteriormente, es que los hongos detectados estén asociados simbióticamente con alguna planta acompañante. La otra razón podría ser que *P. lapeyrouisianum* sea una especie micotrofa facultativa, pero que no se haya detectado micorrización porque el muestreo se haya realizado en una etapa no micorrícica de su ciclo de vida.

En total se detectaron más de 50 morfotipos de hongos micorrícicos diferentes, pertenecientes a los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Pacispora*, *Entrophospora*, *Ambispora*, *Diversispora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Utilizando criterios morfológicos y moleculares, algunos de estos hongos se han identificado a nivel de especie, mientras que otros solo a nivel de género. Algunos de los hongos aislados e identificados se muestran en la Figura 4. No obstante, algunos de estos hongos no

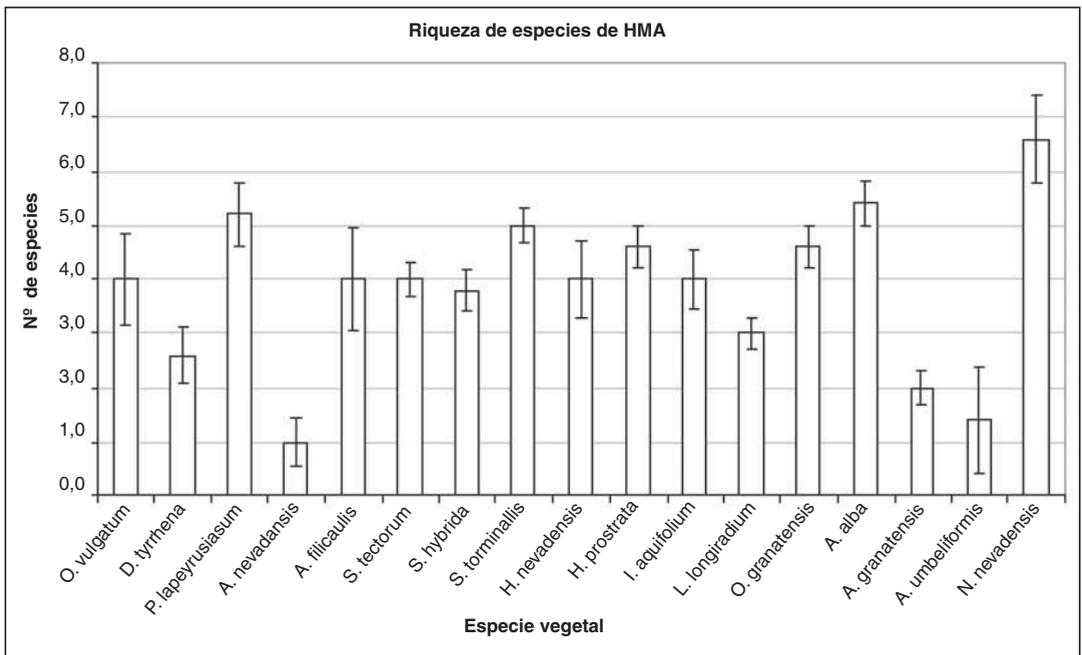


Figura 3. Riqueza de especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares en la rizosfera de las especies objeto de estudio. Los resultados se expresan como el valor medio (n=5) ± el error estándar.

Figure 3. Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of the target plant species. Results are expressed as the mean value (n=5) ± standard error.

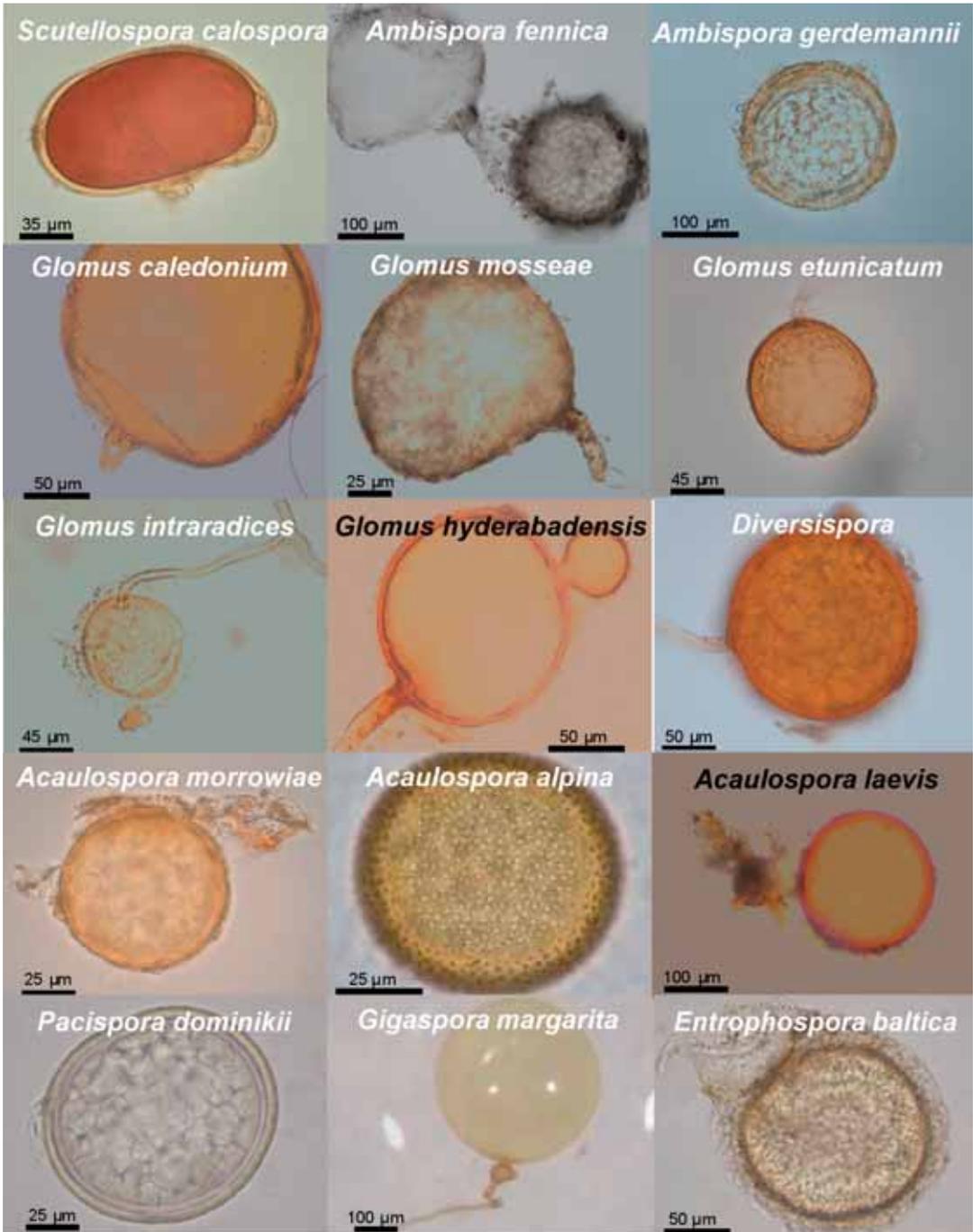


Figura 4. Esporas de algunos de los hongos formadores de micorrizas arbusculares encontrados en la rizosfera de las plantas objeto de estudio.

Figure 4. Arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the rhizosphere of the target plants.

se corresponden con ninguna de las especies descritas hasta la fecha, por lo que probablemente se trate de especies nuevas. Uno de estos hongos, al que se ha designado *Entrophospora nevadensis*, por haber sido descrito por primera vez en Sierra Nevada, ya ha sido descrito en la literatura científica (PALENZUELA *et al.* 2010). En la Figura 5 se muestran algunos de los hongos aislados que probablemente corresponden a especies nuevas no descritas con anterioridad.

Glomus, con casi 30 especies distintas, es el género mejor representado en las rizosferas muestreadas. Las especies más frecuentes son *G. constrictum* y *G. etunicatum*. Estas dos especies se han descrito entre las más frecuentes en ambientes mediterráneos (REQUENA *et al.* 1996; AZCÓN-

AGUILAR *et al.* 2003; FERROL *et al.*, 2004; ALGUACIL *et al.*, 2009) y podrían ser consideradas como ubicuas en Sierra Nevada, puesto que se han encontrado en suelos con características diferentes, a distintas altitudes y en la rizosfera de plantas diversas.

El siguiente género en cuanto a su distribución es *Acaulospora*, con un total de 10 especies diferentes detectadas, la más frecuente de ellas *A. laevis*. Las especies de *Acaulospora* suelen encontrarse en suelos ácidos (MORTON 1986; SIEVERDING 1991; MOUTOGLIS & WIDDEN 1996; CLARK 1997; CASTILLO *et al.* 2006). Este hecho se ha confirmado en el presente estudio, ya que, con la excepción de *A. thomii*, que se encontró en la rizosfera de plantas crecidas en suelos básicos, todas las demás

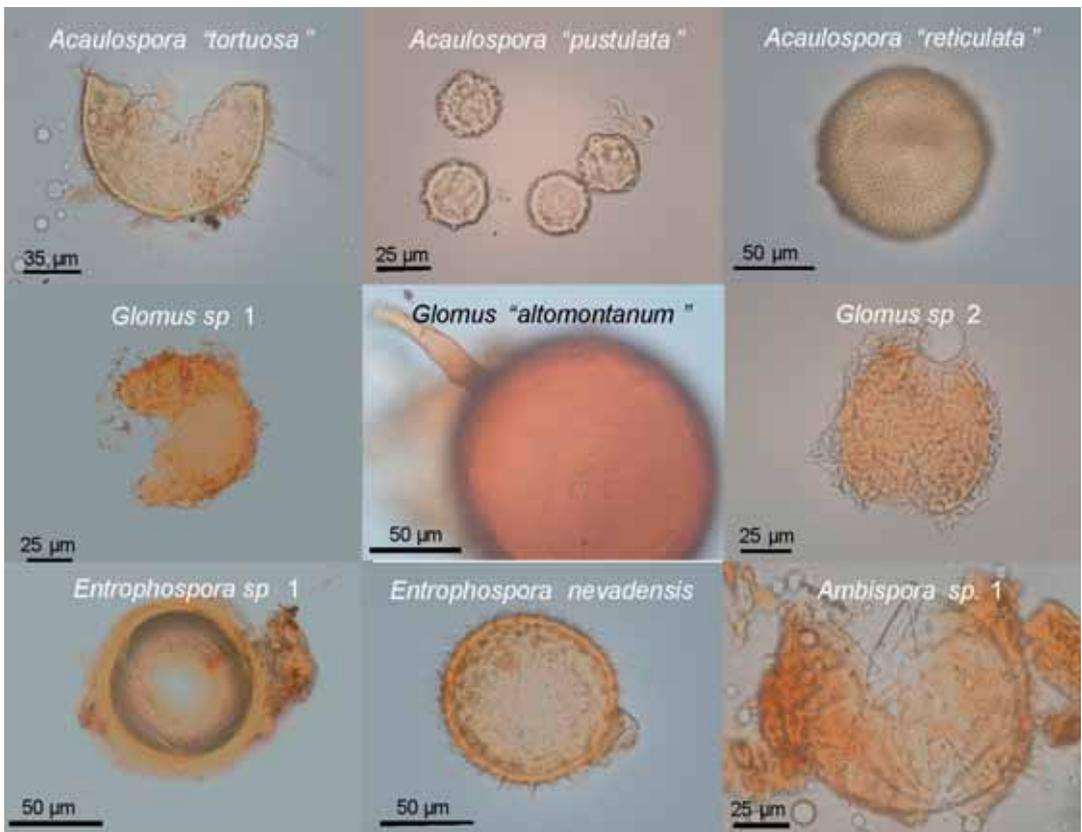


Figura 5. Esporas de hongos formadores de micorrizas arbusculares encontrados en la rizosfera de las plantas objeto de estudio y que tentativamente corresponden con especies nuevas, no descritas previamente.

Figure 5. Putative new species of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the rhizosphere of the target plants.

especies de *Acaulospora* se encontraron en suelos ácidos, en los que, con frecuencia, era el género mejor representado. En consonancia con esto, es el género que predomina en la rizosfera de las plantas muestreadas pertenecientes al termoclima criomediterráneo, ya que éstas se desarrollan fundamentalmente sobre un sustrato litológico de micaesquistos, en suelos pobres en bases. También, y por la misma razón, las especies de *Acaulospora* eran frecuentes, aunque en menor medida, en las rizosferas de plantas muestreadas pertenecientes al termoclima oromediterráneo. A medida que se desciende en altitud, lo que normalmente implica un aumento del pH del suelo en Sierra Nevada, las especies de *Acaulospora* van disminuyendo su presencia relativa y aumenta la de especies pertenecientes al género *Glomus* y, en menor medida, especies de *Pacispora*, *Ambispora* e individuos de la única especie detectada de *Scutellospora*, *S. calospora*.

Es interesante mencionar también el aislamiento en Sierra Nevada de *Acaulospora alpina*, especie que hasta la fecha tan solo ha sido descrita en los Alpes Suizos (OEHL *et al.* 2006). Finalmente, destacar que es al género *Acaulospora* al que pertenecen muchas de las especies nuevas que no han sido descritas previamente. Al igual que ocurre con la flora, parece ser que también a nivel de los hongos formadores de micorrizas arbusculares es en la zona de las altas cumbres donde podría haber una mayor densidad de especies endémicas.

El resto de géneros encontrados estaba representado por un bajo número de especies: cuatro en el caso de *Pacispora* y *Ambispora*, tres *Entrophospora* (una de ellas, *E. nevadensis*, endémica de Sierra Nevada), y tan solo una especie de cada uno de los géneros *Diversispora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*.

Las distintas especies encontradas tienen un comportamiento muy distinto en cuanto a su distribución, tanto en relación al tipo de suelo en el que se encuentran, como al número de plantas con el que están asociadas. En cuanto al tipo de suelo, mientras algunas especies, fundamentalmente del género *Glomus*, han mostrado ser bastante ubicuas encontrándose tanto en suelos ácidos, como básicos o neutros (como por ejem-

plo *G. etunicatum*, *G. constrictum*, *G. macrocarpum*, *G. intraradices* y *A. gerdemannii*), otras solo se encontraban en suelos ácidos (como la mayoría de las especies de *Acaulospora* y *E. nevadensis* o *E. baltica*) o básicos (como *G. badii*, *G. coronatum* y *A. thomii*). En cuanto a que un mismo hongo se encuentre asociado a varias especies de plantas o a un número limitado de estas, los resultados indican que la mayoría de los hongos se encontraba en rizosferas de plantas diferentes, aunque algunos otros parecen estar restringidos a una única especie, como es el caso de *Gigaspora margarita* que solo se encontró en la rizosfera de *D. tyrrhena*. En cualquier caso, sería necesaria una prospección mayor para poder estar seguros de esta distribución tan reducida.

Banco de germoplasma

Se han conseguido aislar 36 hongos micorrícicos en cultivo puro: 24 especies de *Glomus*, seis de *Acaulospora*, dos de *Pacispora*, y una de cada uno de los géneros *Entrophospora*, *Diversispora*, *Scutellospora* y *Ambispora*. De todas las plantas que estaban micorrizadas en condiciones naturales se han conseguido cultivos puros de algunos de los hongos presentes en su rizosfera. Todos estos cultivos se han incorporado a la Colección de Hongos Micorrícicos de la Estación Experimental del Zaidín y constituyen la base a partir de la cual desarrollar inoculantes micorrícicos apropiados para cada una de las especies vegetales objeto de estudio.

Efectos de la micorrización sobre la supervivencia y desarrollo de las plantas

Para verificar los efectos de la micorrización dirigida con los hongos autóctonos aislados sobre la producción de plantas de calidad se diseñaron experimentos de invernadero. El principal problema ha sido la obtención de un número suficiente de plántulas de calidad y homogéneas que permitieran llevar a cabo estos estudios. Se han seguido distintas aproximaciones (multiplicación a partir de esporas, semillas o estaquillas) con resultados dispares.

Multiplicación a partir de esporas: Ha sido efectiva en el caso de *Dryopteris tyrrhena*, obteniéndose

gran cantidad de gametofitos. En cualquier caso, estos son de tamaño muy pequeño y habrá que esperar a tener los esporofitos para poder plantear los experimentos diseñados.

Multiplicación a partir de semillas: Ha dado resultado con *Artemisia alba* y con *Delphinium nevadensis*, aunque las plántulas de *A. alba* obtenidas son aún demasiado pequeñas y el experimento definitivo no podrá plantearse hasta la primavera.

Multiplicación a partir de estaquillas: Ha dado buenos resultados con *Artemisia granatensis*.

En el otoño de 2009 se establecieron los experimentos correspondientes con *A. granatensis* y *D. nevadensis* y los resultados obtenidos hasta la fecha son tan solo preliminares. Las plantas de *A. granatensis* muestran una supervivencia de, aproximadamente, el 60%, y de momento no se observan diferencias significativas debido a la inoculación con los hongos micorrícicos ni en la supervivencia ni en el desarrollo de la planta. Con respecto a *D. nevadensis*, la inoculación con hongos micorrícicos aislados de su rizosfera ha mejorado significativamente la supervivencia de las plántulas crecidas en suelo estéril, pasando esta de ser del orden del 30% en las plantas control al 50% en las micorrizadas. También se observa que el desarrollo es notablemente mayor en las plantas inoculadas con los hongos micorrícicos. En cualquier caso, en necesario esperar para tener resultados más definitivos y poderlos ampliar al resto de las especies vegetales estudiadas.

CONCLUSIONES

Un porcentaje importante de las plantas amenazadas estudiadas (76%) presentan micorrizas arbusculares. En aproximadamente la mitad de ellas se ha apreciado también la presencia de endofitos septados oscuros. Por tanto, al igual que ocurre en otros ecosistemas similares, la micotrofia parece ser una característica de las plantas que viven en Sierra Nevada y probablemente juega un papel importante en la adaptación de estas es-

pecies a las rigurosas condiciones ambientales que tienen que soportar.

El elevado nivel de diversidad de la flora presente en Sierra Nevada parece reflejarse también a nivel de las poblaciones de hongos formadores de micorrizas arbusculares ya que se ha detectado una elevada diversidad de estos microorganismos en la rizosfera de las plantas estudiadas. Algunos de los hongos aislados parecen ser especies nuevas ya que no coinciden en sus características con ninguna de las especies descritas previamente. Concretamente, se han encontrado hasta 8 morfotipos de hongos que, aparentemente, no coinciden con ninguna de las especies descritas, por lo que se están caracterizando en profundidad, utilizando criterios morfológicos y moleculares, para proceder a su clasificación y descripción definitiva. Uno de estos hongos (*Entrophospora nevadensis*) ha sido ya descrito y clasificado como una especie nueva.

Presumiblemente los hongos micorrícicos aislados juegan un papel importante en la supervivencia y desarrollo de estas plantas amenazadas en sus hábitats naturales. Por ello, se propone implementar las estrategias adecuadas para optimizar la micorrización de las especies micotrofas amenazadas, en el contexto de los programas de conservación de flora amenazada del Parque Nacional de Sierra Nevada.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado, en gran medida, por el Organismo Autónomo Parques Nacionales, del Ministerio de Medio Ambiente (proyecto 70/2005). Los autores agradecen a las autoridades y técnicos del Parque Nacional de Sierra Nevada por las facilidades prestadas y al personal de EGMASA por su ayuda en la realización de los muestreos, en especial a Santiago Ferrón Moraleda. Igualmente, queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Fritz Oehl, de la Agroscope Reckenholz-Tänikon Research Station ART (Zurich, Suiza) por su ayuda en la identificación de algunos de los hongos aislados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO CAMPOS, G., PINEDA, F.D., DE PABLO, C.L. & MARTÍN DE AGAR, P. 1999. Evaluación ecológica del Plan Rector de Uso y Gestión (PRUG) de la Reserva de la Biosfera de Urdaibai. V Jornadas de Desarrollo Sostenible en Urdaibai. Mundaka (Vizcaya). 11 pp.
- ALGUACIL, M.M., ROLDÁN, A. & TORRES, M.P. 2009. Assessing the diversity of AM fungi in arid gypsophilous plant communities. *Environmental Microbiology* 11: 2649–2659.
- AZCÓN-AGUILAR, C., PALENZUELA, J., ROLDAN, A., BAUTISTA, S., VALLEJO, R. & BAREA, J.M. 2003. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology* 22: 29-37.
- BAREA, J.M., PALENZUELA, J., CORNEJO, P., SÁNCHEZ, I., NAVARRO, C., QUIÑONES, P.B., AZCÓN, R., FERROL, N., AZCÓN-AGUILAR, C. 2007. Significado, diversidad e impacto de los hongos de las micorrizas arbusculares en ambientes mediterráneos. En: J.M. Barea-Azcón, M. Molesón, R. Travesí, E. Ballesteros, J.M. Luzón & J.M. Tierno (eds.) Biodiversidad y Conservación de Fauna y Flora en Ambientes Mediterráneos. pp. 155-185. Sociedad Granatense de Historia Natural. Granada, España.
- BILLINGS, W.D. 1979. High mountain ecosystems: evolution, structure, operation and maintenance. En P.J. Webber (ed.) High Altitude Geocology. pp. 97–125. AAAS Selected Symposium 12. Boulder, Colo.: Westview Press.
- BLANCA, G., HERNÁNDEZ BERMEJO, J.E., HERRERA, C.M., MOLERO MESA, J., MUÑOZ, J. & VALDÉS, B. 1999. Libro rojo de la flora silvestre amenazada de Andalucía. Vol. I: Especies en peligro de extinción. Sevilla, España: Junta de Andalucía. 302 p.
- BLANCA, G., HERNÁNDEZ BERMEJO, J.E., HERRERA, C.M., MOLERO MESA, J., MUÑOZ, J. & VALDÉS, B. 2000. Libro rojo de la flora silvestre amenazada de Andalucía. Vol. II: Especies vulnerables. Sevilla, España: Junta de Andalucía. 375 p.
- BLANCA, G., LÓPEZ ONIEVA, M.R., LORITE, J., MATÍNEZ LIROLA, M.J., MOLERO MESA, J., QUINTAS, S., RUÍZ GIRELA, M., VARO, M.A. & VIDAL, S. 2002. Flora Amenazada y Endémica de Sierra Nevada. Editorial Universidad de Granada, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 407 p.
- BRUNDRETT, M., MELVILLE, L. & PETERSON, L. 1994. Practical methods in mycorrhizal research. Guelph, Ontario: Univ. Guelph, Mycologue Publications. 161 p.
- CASTILLO, C.G., BORIE, F., GODOY, R., RUBIO, R. & SIEVERDING, E. 2006. Diversity of mycorrhizal plant species and arbuscular mycorrhizal fungi in evergreen forest, deciduous forest and grassland ecosystems of Southern Chile. *Angewandte Botanik* 80: 40-47.
- CLARK, R.B. 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192: 15–22.
- CRIPPS C.L. & EDDINGTON L.H. 2005. Distribution of mycorrhizal types among alpine vascular plant families on the Beartooth Plateau, rocky mountains, USA, in reference to large-scale patterns in arctic-alpine habitats. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 37: 177-188.
- DICKSON, S., SMITH, F.A. & SMITH, S.E. 2007. Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza* 17: 375–393.
- FERROL, N., CALVENTE, R., CANO, C., BAREA, J.M. & AZCÓN-AGUILAR, C. 2004. Analyzing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification-threatened semi-arid Mediterranean ecosystem. *Applied Soil Ecology* 25: 123–133.
- FONTENLA, S., GARCÍA-ROMERA, I. & OCAMPO, J.A. 1999. Negative influence of non-host plants on the colonization of *Pisum sativum* by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1591-1597.
- FUCHS, B. & HASELWANDTER, K. 2004. Red list plants: colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Mycorrhiza* 14: 277–281.
- HARLEY, J.L. & HARLEY, E.L. 1987. A check-list of mycorrhiza in the british flora. *New Phytologist* 105: 1-102.

- HASELWANDTER, H. 1987. Mycorrhizal infection and its possible ecological significance in climatically and nutritionally stressed alpine plant-communities. *Angewandte Botanik* 61: 107–114.
- HASELWANDTER, K. & READ, D.J. 1980. Fungal associations of roots of dominant and sub-dominant plants in high-alpine vegetation systems with special reference to mycorrhiza. *Oecologia* 45: 57–62.
- HILDEBRANDT, U., JANETTA, K., OUZIAD, F., RENNE, B., NAWRATH, K. & BOTHE, H. 2001. Arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes in Central European salt marshes. *Mycorrhiza* 10: 175–183.
- IQBAL, S.H., YOUSAF, M. & YOUNUS, M. 1981. A field survey of mycorrhizal associations in ferns of Pakistan. *New Phytologist* 87: 69–79.
- JANOS, D.P. 2007. Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* 17: 75–91.
- KÖRNER, C. 1999. *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Alpine Plant Life Mountain Ecosystems*. Berlin, Springer-Verlag. 338 p.
- MANDYAM, K. & JUMPPONEN, A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* 53: 173–189.
- MORTON, J.B. 1986. Three new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminum, low pH soils in West Virginia. *Mycologia* 78: 641–648.
- MOUTOGLIS, P. & WIDDEN, P. 1996. Vesicular-arbuscular mycorrhizal spore populations in sugar maple (*Acer saccharum* marsh. L.) forests. *Mycorrhiza* 6: 91–97.
- NEWSHAM, K.K., UPSON, R. & READ, D.J. 2009. Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology* 2: 10 – 20.
- OEHL, F., SYKOROVA, Z., REDECKER, D., WIEMKEN, A. & SIEVERDING, E. 2006. *Acaulospora alpina*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species characteristic for high mountainous and alpine regions of the Swiss Alps. *Mycologia* 98: 286–294.
- OLSSON, P.A., ERIKSEN, B.E. & DAHLBERG, A. 2004. Colonization by arbuscular mycorrhizal and fine endophytic fungi in herbaceous vegetation in the Canadian High Arctic. *Canadian Journal of Botany* 82: 1547–1556.
- PALENZUELA, J., BAREA, J.M., FERROL, N., OEHL, F. & AZCÓN-AGUILAR, C. 2010. *Entrophospora nevadensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from Sierra Nevada National Park (Southeastern Spain). *Mycologia* 102: 624–632.
- PALENZUELA, J., FERROL, N., BOLLER, T., AZCÓN-AQUILAR, C. & OEHL, F. 2008. *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub-land in the Natural Park of Sierra de Baza (Granada, Spain). *Mycologia* 100: 296–305.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of the infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158–161.
- READ, D.J. & HASELWANDTER, K. 1981. Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytologist* 88: 341–352.
- REDECKER, D., KODNER, R. & GRAHAM, L.E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920–1921.
- REQUENA, N., JEFFRIES, J. & BAREA, J.M. 1996. Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 842–847.
- RUOTSALAINEN, A.L., VÄRE, H., OKSANEN, J. & TUOMI, J. 2004. Root fungus colonization along an altitudinal gradient in North Norway. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 36: 239–243.
- SCHMIDT, S.K., SOBIENIAK-WISEMAN, L.C., KAGEYAMA, S.A., HALLOY, S.R.P. & SCHADT C.W. 2008. Mycorrhizal and dark-septate fungi in plant roots above 4270 meters elevation in the Andes and Rocky Mountains. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 40: 576–583.
- SIEVERDING, E. 1991. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems*. GTZ, Eschborn, Germany, 371 p.
- SIMON, L., BOUSQUET, J., LEVESQUE, R.C. & LALONDE, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67–69.

- SMITH, S.E. & READ, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Elsevier, New York. 780 p.
- SPAIN, J.L. 1990. Arguments for diagnoses based on unaltered wall structures. *Mycotaxon* 38: 71–76.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., KLIRONOMOS, J.N., URSIC, M., MOUTOGLIS, P., STREITWOLF-ENGEL, R., BOLLER, T., WIEMKEN, A. & SANDERS, I.R. 1998. Mycorrhizal diversity determines plant diversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69–72.
- WIJESINGHE, D.K., JOHN, E.A., BEURSKENS, S. & HUTCHINGS, M.J. 2001. Root system size and precision in nutrient foraging: responses to spatial pattern of nutrient supply in six herbaceous species. *Journal of Ecology* 89: 972–983.
- ZHANG, Y., GUO, L.D. & LIU, R.J. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with common pteridophytes in Dujiangyan, southwest China. *Mycorrhiza* 14: 25–30.
- ZUBEK, S., BŁASZKOWSKI, J., DELIMAT, A. & TURNAU, K. 2009. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte colonization along altitudinal gradients in the Tatra Mountains. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 41: 272–279.