

# **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**ESCUELA POLITÉCNICA DE MIERES**

**GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL Y DEL MEDIO NATURAL**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS  
ÁREA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Estudio de la diversidad micorrícica de *Betula  
celtiberica* Rothm y Vasc en zonas contaminadas por  
metales pesados.**

**AUTOR: Norma Alas Gutiérrez**

**TUTOR: Abelardo Casares Sánchez**

**COTUTOR: Elena Fernández- Miranda Cagigal**

**JULIO, 2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quería dar las gracias a mi tutor, el Dr. Abelardo Casares, por aceptarme bajo su tutela y resolver siempre mis dudas cuando fue necesario. Gracias por tus buenos consejos e indicaciones. A mí cotutora, la Dra. Elena Fernández- Miranda, ¿qué habría hecho yo sin ti? ¡Yo lo tengo muy claro! Gracias por tu infinita paciencia, por tu dedicación, por tu guía,... ¡Gracias por todo!

A todo el personal de área de Fisiología Vegetal por estar siempre disponible para cualquier cosa que necesitara.

A los compañer@s sufridores con los trabajos fin de grado y/o master por compartir dudas y reflexiones que muchas veces te ayudan a salir de los atolladeros en los que estas atrapado.

A mis amigos por apoyarme siempre en lo que decido hacer y darme ánimos cuando lo veo todo un poco negro.

A mi familia, sin ella yo no estaría haciendo esto que me gusta tanto ahora.

A Javi, lo mejor que me ha pasado en la vida. Gracias por estar ahí para mí.

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AM</b>	Micorrizas arbusculares.
<b>DSE</b>	Endófito septado oscuro.
<b>FAO</b>	Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
<b>FAA</b>	Etanol- Formol- Ácido acético.
<b>INVAM</b>	<i>International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi West Virginia University.</i>
<b>NGR</b>	Nivel genérico de referencia.
<b>PNOA</b>	Plan Nacional de Ortofotografía Aérea.
<b>PVLG</b>	Alcohol de polivinilo- Ácido láctico- Glicerol.

## ÍNDICE

1. Introducción	4
1.1. Contaminación edáfica	4
1.2. Características de la zona de estudio: Nitrastur	5
1.3. La vegetación en suelos contaminados por metales pesados	6
1.4. Caracterización del abedul	7
1.5. Importancia de los hongos micorrícicos en las zonas degradadas por metales pesados	8
1.6. Justificación y objetivos	11
2. Material y Métodos	12
2.1. Elección de la zona de muestreo	12
2.2. Inventario mediante parcelas de muestreo	13
2.3. Toma de muestras	13
2.3.1. Inventario de abedules	13
2.3.2. Selección de abedules para el estudio de la diversidad micorrícica	14
2.3.3. Cuantificación de la edad de los abedules seleccionados	14
2.3.4. Toma de muestras radiculares	15
2.4. Procesado de muestras radiculares	16
2.5. Análisis de las muestras radiculares	17
2.5.1. Estudio de ectomicorrizas	17
2.5.2. Estudio de endomicorrizas y otros endófitos	18
2.5.3. Estudio de esporas de hongos arbusculares	19
2.6. Análisis de pH del suelo	20
3. Resultados y Discusión	21
3.1. Análisis de la población de abedul	21
3.2. Análisis de la diversidad fúngica	23
3.3. Cuantificación del pH del suelo	33
4. Conclusiones	37
5. Bibliografía	38
6. Anexos	42
6.1. Anexo I	42
6.2. Anexo II	43

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. CONTAMINACIÓN EDÁFICA

Una de las consecuencias más negativas de la revolución industrial ha sido la dispersión de los contaminantes en el agua, la atmósfera y el suelo. De éstos, el suelo es el medio más estático, donde los contaminantes pueden permanecer durante mucho más tiempo. Esta permanencia a largo plazo es especialmente grave en el caso de los metales pesados, que no pueden ser degradados. Su persistencia, acumulación progresiva y/o transferencia a otros sistemas supone una amenaza para salud humana y los ecosistemas (Becerril *et al.*, 2007).

Según el Real Decreto 9/2005 se entenderá como suelo *“la capa superior de la corteza terrestre, situada entre el lecho rocoso y la superficie, compuesto por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y microorganismos vivos y que constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso. No tendrán tal consideración aquellos permanentemente cubiertos por una lámina de agua superficial”*. Así mismo, define suelo contaminado como *“aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comparte un riesgo inaceptable para la salud humana o del medio ambiente, y así se ha declarado mediante resolución expresa”*. Por lo tanto, un suelo estará contaminado si en él se encuentran sustancias químicas peligrosas derivadas de una actividad antrópica, que exista un alto índice de riesgo debido a ellas y que, además, la comunidad autónoma lo designe como tal. En la actualidad el Gobierno del Principado de Asturias tiene iniciado un expediente de declaración de suelo contaminado de la zona que ocupa la antigua fábrica de Nitrastur en Langreo (Asturias).

El suelo es un recurso finito por lo tanto la gravedad del problema generado por la contaminación con este tipo de sustancias es elevada y así lo pusieron de manifiesto los distintos países miembros de naciones Unidas durante la Conferencia sobre el Medio Ambiente y Desarrollo de Río de Janeiro, 1992, donde se reconoció la importancia de la protección de suelos y de usos potenciales en el contexto de un desarrollo sostenible, en particular contra la contaminación procedente de acciones o actividades de origen antrópico.

De los contaminantes del suelo podríamos destacar a los metales pesados, que son aquellos que poseen una densidad superior a 5 g/cm<sup>3</sup> (Weast, 1984). De los elementos de la tabla periódica, 49 son metales pesados pero no todos tienen importancia biológica negativa ya que algunos de ellos son nutrientes esenciales en el desarrollo de las especies vegetales. Entre éstos el Fe (hierro), Mn (manganeso), Mo (molibdeno) y Zn (zinc) son micronutrientes esenciales. Sin embargo, existen otros que a bajas concentraciones son muy tóxicos y no poseen una función conocida como son As (arsénico), Hg (mercurio), Ag (plata), Sb (antimonio), Cd (cadmio) o Pb (plomo) (Niess, 1999).

En la actualidad las técnicas de restauración de suelos contaminados dependen de las características del contaminante y del suelo, de la eficacia esperada con cada tratamiento, de su viabilidad económica y del tiempo estimado para su desarrollo (Reddy *et al.*, 1999). Según el Real Decreto 9/2005 “Únicamente, como último recurso, se podrán contemplar técnicas de extracción, traslado y eliminación como residuo del suelo contaminado”. Por ello, sería necesario desarrollar técnicas de biorremediación, que implicasen el uso de macroorganismos, como por ejemplo los árboles, o microorganismos, como los hongos.

## **1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO: NITRASTUR**

Nitrastur se encuentra enclavada en la localidad de La Felguera, en el Municipio de Langreo (Fig. 1). Según los datos cartográficos del mismo (Revisión Parcial del Plan General de Ordenación del Municipio de Langreo) ocupa una superficie de aproximadamente 20 hectáreas.



Fig. 1 Situación de Nitrastur (Ortofotografía: Plan Nacional de Ortofotografía Aérea, 2009)

Los orígenes de este conjunto de instalaciones se remontan a la década de los cincuenta del siglo XX, cuando la Sociedad Ibérica del Nitrógeno, renombrada Nitratos Asturianos (*Nitrastur*), diseña esta fábrica para aprovechar los gases de las baterías de cok de la Sociedad Metalúrgica Duro Felguera situada en las inmediaciones de la misma. En la década de los noventa del mismo siglo Explosivos Río Tinto adquirió la fábrica hasta su clausura en 1997. En la actualidad pertenece a la empresa Iberdrola casi en su totalidad.

Las principales líneas de trabajo de esta industria fueron la producción de abonos nitrogenados, siendo el nitrato amónico, sulfato amónico y las soluciones amoniacaes, obtenidas a partir de reacciones químicas del amoniaco con el ácido nítrico y sulfúrico fabricado in situ, los principales productos obtenidos.

Derivado de la intensa actividad industrial, el suelo que sustentó la fábrica se encuentra altamente contaminado, observando distintos tipos de vertido dependiendo de la actividad que se desarrollara en el espacio. Adicionalmente tras el cese de su actividad el emplazamiento ha sido utilizado como vertedero incontrolado, lo que intensifica el grado de contaminación allí existente.

Los primeros estudios de la contaminación presente en la zona se remontan al año 2000, derivados de la obligación de incluir en el Registro de la Propiedad una nota que refleje la declaración de suelo contaminado y declara responsable al propietario cuya actividad industrial ha generado dicha contaminación (Ley 10/1998). En el año 2009 el Servicio Ambiental de la Dirección General del Agua y la Calidad Ambiental (Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras) encarga un estudio pormenorizado del grado de contaminación existente consistente en la realización de sondeos, calicatas y análisis de puntos de agua. Dando como resultado que la contaminación presente en la parcela se debe a metales pesados.

### **1.3. LA VEGETACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS**

Atendiendo a la tolerancia o intolerancia a desarrollarse sobre un suelo contaminado por metales pesados, podemos clasificar a las plantas como metalofitas o intolerantes. Las metalofitas son aquellas que han desarrollado mecanismos fisiológicos para resistir, tolerar y sobrevivir en suelos con altos niveles de metales (Becerril *et al.*, 2007). Dentro de la metalofitas nos encontramos con las estrictas, que solo crecen en sitios contaminados, y las pseudometalofitas, poblaciones tolerantes de especies comunes (Pollard *et al.*, 2002)

No todos los metales se consideran nocivos para el desarrollo vegetal. La toxicidad de los mismos varía en función de su concentración, persistencia y forma en la que se presenten. Por lo tanto, la fitodisponibilidad de los metales puede definirse como la proporción de los metales que se encuentran en el suelo y pueden ser absorbidos por un determinado genotipo de planta (Prasad, 2004).

La habilidad de las plantas para acumular determinados metales depende tanto de la disponibilidad del metal como del genotipo de la planta analizada. Así se puede observar que utilizando el distinto tipo de planta la acumulación de metales es diferente y esto es debido a los diferentes genotipos existentes (Prasad, 2004).

Existen varios mecanismos bioquímicos y genéticos que permiten a las plantas desarrollarse en hábitats de este tipo, a priori, perjudiciales para su desarrollo. Estos mecanismos podrían resumirse de la siguiente forma (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007):

- i. Presencia de micorrizas: las plantas micorrizadas presentan una mayor tolerancia a los metales pesados debido, principalmente, a la capacidad de inmovilizarlos en la raíz e impidiendo que lleguen a la parte aérea.
- ii. Pared celular: debido a las cargas negativas que posee la raíz en sus células algunos metales pueden quedar adheridos a ella y así se evita su translocación.
- iii. Membrana plasmática: las plantas tolerantes presentan una serie de mecanismos que protegen a su membrana plasmática ante la presencia de metales pesados.
- iv. Quelación: las plantas utilizan mecanismos de complejación en el interior celular para amortiguar el efecto de los metales pesados, uniendo a ellos ligandos para formar compuestos más complejos que, no obstante, siguen formando parte del metabolismo celular y por lo tanto, siguen siendo potencialmente tóxicos.
- v. Compartimentalización vacuolar: el transporte por el interior de la vacuola reduce la concentración de ciertos metales tóxicos que quedan retenidos en el interior de la vacuola.
- vi. Biotransformación: conjunto de reacciones de descomposición, conjugación o síntesis implicadas en el correcto procesamiento de los contaminantes.
- vii. Mecanismos de reparación celular: mecanismos que en respuesta al deterioro sufrido, reestablecen las características iniciales de las plantas.

Dentro de las plantas metalofitas, algunas soportan la presencia de metales porque no permiten su entrada en la raíz y por lo tanto, su translocación hacia otras partes de la planta. Por el contrario, otras pueden acumular metales en sus tejidos aéreos. Esta acumulación depende del metal y de la especie, llegando a superar el 2% de su peso seco (Brooks, 1998). Este tipo de plantas, denominadas hiperacumuladoras, son las utilizadas en fitoextracción.

#### **1.4. CARACTERIZACIÓN DEL ABEDUL**

El abedul es considerado un árbol pionero debido a sus escasos requerimientos para su establecimiento. Al desarrollarse mejora las condiciones del lugar donde se sustenta mediante, por ejemplo, el incremento de materia orgánica como resultado de la caída de sus hojas.

De acuerdo a su caracterización taxonómica, el abedul que se encuentra presente en la zona de Nitrastur pertenece al Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Fagales, Familia Betulaceae, Género *Betula*. Cuando llegamos a la escala de especie en donde nos encontramos con un dilema. Según Díaz y Vázquez (2004) y Rivas- Martínez *et al.* (2002) sería *Betula celtiberica* la especie a la que pertenecería. Sin embargo, existen otros autores como Ceballos y Ruíz de la Torre (2001) para los cuales sería *B. pubescens* subespecie *celtibérica*. Durante el desarrollo del presente proyecto se va a seguir la caracterización dispuesta por Díaz y Vázquez (2004).

*B. celtiberica* puede llegar a alcanzar los 20 m de altura, con un tronco esbelto y recto cuando crece en espesura y porte cónico-piramidal que se redondea a medida que el



árbol madura. Las ramas y el tronco presentan una corteza lisa, anillada y blanco grisácea que, con la edad se torna oscura y agrietada, desprendiéndose en tiras horizontales que dejan cicatrices negras (López *et al.*, 2012). Las hojas son simples, pecioladas, alternas con forma que oscila de romboidal a redondeada. Poseen un borde irregular y doblemente aserrado. Cuando nacen pueden tener unos pelillos que permanecen en las axilas de los nervios, se vuelven glabras al crecer. Son de color verde oscuro que se torna amarillento antes de caer.

Árbol monoico, con flores masculinas que nacen en amentos, antes de que salgan las hojas, y cuelgan al final de las ramas. Las femenina son solitarias permanecen mucho tiempo colgadas. La semilla tiene forma de nuez y poseen dos alas membranosas; su maduración va desde agosto hasta septiembre. El abedul se desarrolla sobre distintos tipos de suelo, aunque prefiere suelos ácidos, fértiles y bien drenados, con algo de humedad. En sitios secos se desarrollará un sistema radical profundo, mientras que en suelos húmedos los sistemas radicales son más someros (Montero *et al.*, 2003).

El carácter fitoextractor del abedul se aprecia en la elevada concentración de metales en el análisis foliar llevado a cabo en plantas crecidas en un suelo con una gran concentración de estos elementos. De igual forma, se apreció que la concentración elevada de ciertos contaminantes (Zn) en hojas no afectó al crecimiento de las plántulas (Artetxe *et al.*, 2001).

#### **1.5. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS MICORRÍCICOS EN ZONAS DEGRADADAS POR METALES PESADOS**

La importancia del estudio de la simbiosis micorrícica radica en que la mayoría de las plantas, que se desarrollan en el suelo, poseen algún tipo de asociación con un hongo. Según Brundrett (2009) aproximadamente el 86% de las plantas con flores poseen algún tipo de esta asociación.

El botánico alemán A. Berhhard Frank definió, en 1885, a la asociación simbiótica existente entre raíces (*rhizos*) de plantas y ciertos grupos de hongos (*mycos*) del suelo, y en la que ambos miembros de la asociación obtienen un beneficio y participan activamente en el transporte y absorción de nutrientes con el término micorriza (*Mykorhizen*). Más recientemente, Brundrett (2004) realizó una definición más completa que incluye la totalidad de la diversidad de las micorrizas incluyendo otras asociaciones hongo-planta existentes. Según este autor una micorriza es una asociación simbiótica entre un hongo (especializado para vivir en suelos o plantas) y una raíz (u otro órgano de contacto con el sustrato) de una planta viva, que es la principal responsable del transporte de nutrientes. Las micorrizas se generan en órganos especiales de las plantas donde existe un contacto íntimo generado como resultado del desarrollo conjunto de la raíz y el hongo. Las características que debe tener una micorriza se resumen a continuación (Brundrett, 2009):

- i. La estructura y el desarrollo de las hifas de los hongos micorrícicos se altera sustancialmente en presencia de las raíces de las plantas huésped. Las hifas

que habitan en las raíces son estructural y funcionalmente diferentes a las desarrolladas en el suelo del mismo hongo.

- ii. Las micorrizas requieren un contacto íntimo entre las hifas y las células de la planta en una interfaz cerrada donde se produce el intercambio de nutrientes.
- iii. La función principal de las micorrizas es la transferencia de nutrientes minerales del hongo a la planta. En la mayoría de los casos es importante la transferencia de metabolitos entre planta y hongo (mutualismo).
- iv. Las micorrizas requieren un desarrollo sincronizado entre planta y hongo para el intercambio de nutrientes ya que normalmente las hifas solo colonizan las raíces jóvenes en las asociaciones mutualistas.
- v. Las plantas controlan la intensidad de la micorrización mediante el crecimiento de nuevas raíces, la digestión de hifas viejas presentes en el interior de las células vegetales o mediante la formación de un sistema radicular alterado.

Siguiendo a Brundrett (2004), los distintos tipos de micorrizas que nos encontramos son los siguientes:

- i. Micorrizas arbusculares: formadas exclusivamente por hongos *Glomeromycota* que tienen la capacidad de desarrollar arbuscúlos, vesículas y/o hifas dentro de la raíz. Existen dos tipos principales de arbusculares (Fig. 2 A y B): tipo *Paris* y *Arum* (Gallaud, 1905). Las tipo *Paris* se caracterizan porque el crecimiento en forma de espiral de la hifa dentro de la célula, mientras que las *Arum* se caracterizan por el crecimiento lineal entre las células. Se estima que el 73,3% de las plantas presentan este tipo de asociación de manera regular y un 1,9% pueden poseerla o no (Brundrett, 2009).

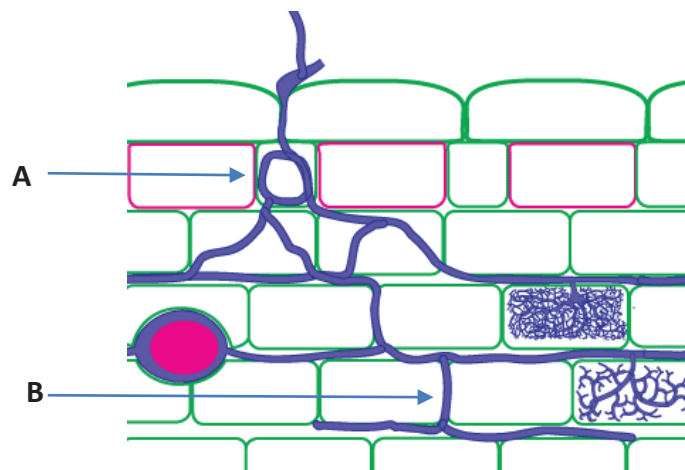


Fig. 2: Diferentes tipos de micorrizas arbusculares: A) tipo *Paris*; B) Tipo *Arum* (<http://mycorrhizas.info/vam.html>)

- ii. Ectomicorrizas: constituidas por Asco, Basidio y Zygomycetes. Se caracterizan por poseer un manto de hifas que rodea y envuelve al ápice de la raíz y que contiene en su interior una red laberíntica de hifas entre las células de la raíz

denominada Red de Hartig. Dicha red puede extenderse hasta las células corticales o bien sólo hasta las epidérmicas (Fig. 3 A y B). Actualmente se estima que el 4,5% de las plantas poseen este tipo de asociaciones (Brundrett, 2009).

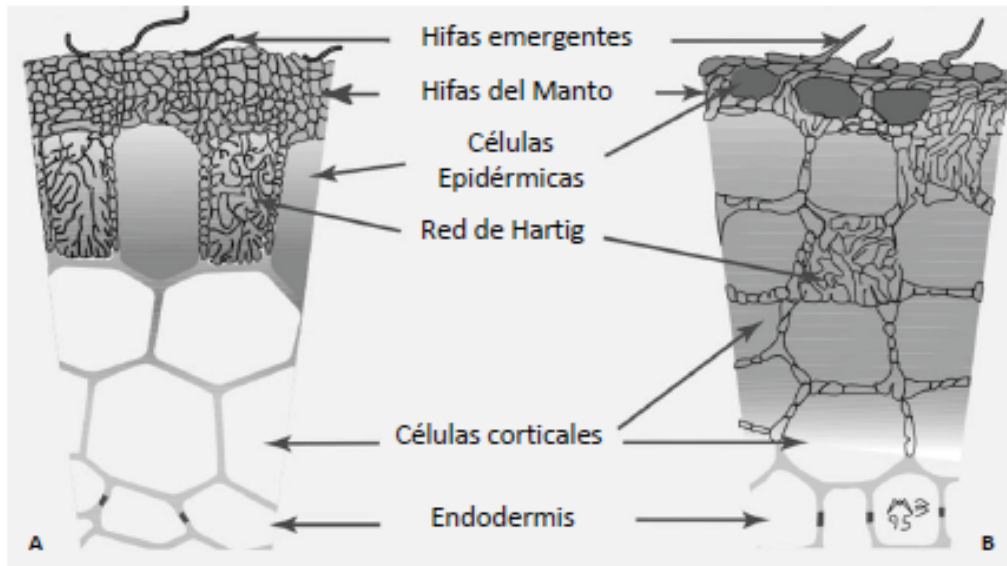


Fig 3. A) Ectomicorriza epidérmica, B) Ectomicorriza cortical. Esquema adaptado a partir de las ilustraciones del libro *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture* (Brundrett et al., 1996)

- iii. Orquidioides: constituidas por Basidiomycetes. Sólo se encuentran presentes en la familia Orchidaceae y asociadas a *Rhizoctonia*. Se caracterizan por presentar hifas que penetran en las células del córtex formando ovillos. Se estima que el 0,7% de las plantas presentan esta asociación (Brundrett, 2009).
- iv. Ericoides: constituidas por Asco y Basidiomycetes. Presentes solo en la ericáceas, se caracterizan por la penetración celular de las hifas en las raíces muy finas. Solo el 1,2% de las plantas presentan estas asociaciones (Brundrett, 2009).
- v. Sub-Epidérmicas: son un tipo de asociaciones que sólo se encuentran presentes en unos lirios australianos del género *Thysanotus* donde las hifas de los hongos crecen en una cavidad por debajo de las células epidérmicas, y de las que se desconoce la identidad del hongo formador (Brundrett y Abbott, 1991).

Además de las relaciones planta-hongo descritas en este apartado, existen otras asociaciones que, aunque no se consideran micorrizas, si pueden beneficiar a las plantas mediante el incremento de la resistencia a los herbívoros, patógenos o estrés (Saikkonen et al., 1998). A estos organismos se les llama endófitos. Existe un grupo particular de estos endófitos, los denominados *endófitos septados oscuros* (DSE), que tienen la capacidad de adoptar diferentes funciones (mutualista, patógeno o saprófito) (Peterson et al., 2008).

Las plantas obtienen numerosos beneficios de esta asociación. Las micorrizas favorecen la absorción de agua y nutrientes, la generación de reguladores de crecimiento y la protección frente a patógenos de la raíz (Álvarez, 1993).

La producción de planta forestal junto con la obtención de setas han sido las principales líneas de utilización de las ectomicorrizas (Álvarez, 1993). Esta planta de calidad será utilizada en repoblaciones forestales y para la recuperación de zonas alteradas y/o contaminadas mediante la fito y micorremediación puesto que, las micorrizas son capaces de incrementar la fitoextracción, bien directa o indirectamente, incrementando la acumulación del metal en la planta o mediante la producción de biomasa (Fernández *et al.*, 2008).

### **1.6. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El presente Trabajo Fin de Grado es un proyecto de investigación aplicada que se enmarca dentro de la asignatura Trabajo Fin de Grado encaminada a la obtención del título Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural. Así mismo, se engloba dentro del grupo de proyectos de investigación coordinados por el Área de Fisiología Vegetal (Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo) del Proyecto Life I+DARTS “Innovative and demonstrative arsenic remediation technologies for soils”.

En base a la problemática planteada se establece como objetivo general el estudio de la diversidad micorrícica en *B. celtiberica* en zona contaminadas por metales pesados. Para ello, se establecen los siguientes objetivos parciales:

- i. Caracterización de la población de abedul presente en la parcela.
- ii. Estudio de las raíces de los ejemplares de *B. celtiberica* dentro de una parcela especialmente contaminada seleccionados en función de sus características dendrológicas.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. ELECCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO

La zona de muestreo está constituida por una parcela de 21.900 m<sup>2</sup> situada en la parte central de las instalaciones de Nitrastur (Fig. 4). Según análisis realizados en el año 2009 el Servicio Ambiental de la Dirección General del Agua y la Calidad Ambiental (Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras), se trata de una zona que se encuentra altamente contaminada por metales pesados, concretamente cobre, arsénico, plomo, mercurio, cadmio y zinc.

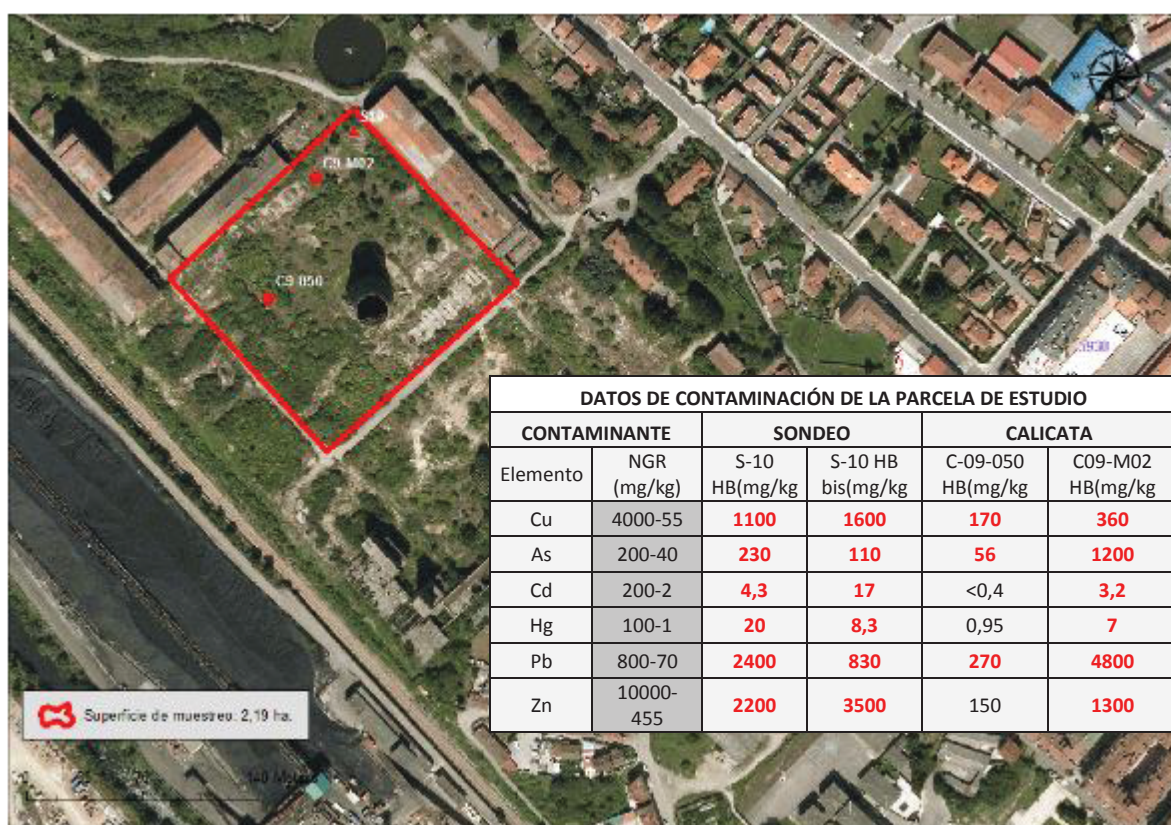


Fig. 4: Situación de la zona de estudio (Ortofoto: PNOA 2009) y niveles de contaminación de la misma. Se relaciona el valor obtenido en 2 calicatas y 2 sondeos con los niveles genéricos de referencia (NGR) para el Principado de Asturias establecidos en función del uso del suelo: uso industrial (mayor valor)- otro uso (menor valor). El valor en rojo indica que el contaminante se encuentra por encima del valor del NGR indicado para otro uso (son usos agrícolas, ganaderos o forestales).

## **2.2 INVENTARIO MEDIANTE PARCELAS DE MUESTREO.**

Las parcelas de muestreo son uno de los métodos más empleados en la realización de inventarios forestales. En el caso de la zona de estudio, ante la imposibilidad de realizar otro tipo de inventario, se procedió a la utilización de una malla de 25x25 metros (Fig. 5), resultando 36 parcelas, de 625 m<sup>2</sup> cada una.

Dentro de cada parcela se realizó el muestreo de los ejemplares de *Betula celtiberica* que se encontraban presentes en la misma.



Fig. 5: Superficie de muestreo dividida en 36 parcelas, con una superficie de 625 m<sup>2</sup> empleada para la realización del inventario de abedul.

## **2.3. TOMA DE MUESTRAS**

### **2.3.1. Inventario de abedules**

Durante el desarrollo del estudio se procedió a la caracterización dasométrica de los individuos de abedul presentes en la zona de estudio (Fig. 6). Para ello se tomaron los siguientes datos dendrológicos:

- *Diámetro.*

Se procedió a la medición del diámetro normal a 1,30 metros con la ayuda de una cinta métrica (Fig. 6 A)

- *Altura.*

Para realizar la medición de la altura de los pies se utilizó un hipsómetro Vertex®III junto con transponder. El hipsómetro realiza la medición de la altura de los árboles mediante ultrasonidos para ello se sitúa el transponder en el árbol, a una altura normal, y se procede a ejecutar la medición (Fig. 6 B)

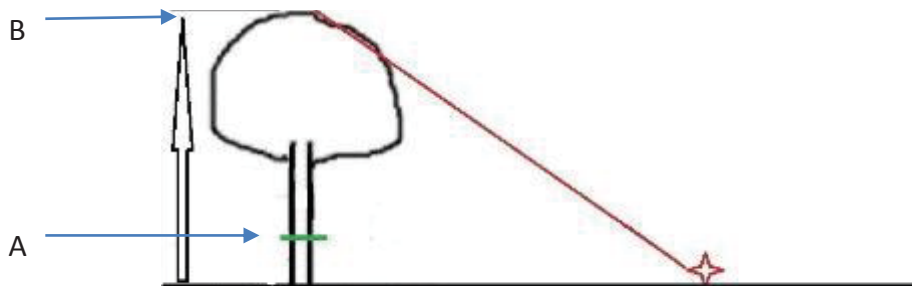


Fig. 6: Medición de diámetro (A) y altura (B) de los árboles. La estrella indica el lugar desde donde se mide la altura.

### **2.3.2. Selección de abedules para el estudio de la diversidad micorrícica.**

Para estudiar la diversidad micorrícica del abedul se seleccionaron una serie de árboles dentro de cada parcela.

Los criterios de elección de estos abedules se basan en los parámetros dendrológicos de altura y diámetro obtenidos previamente para el conjunto de los individuos presentes en la parcela. Con estos datos se realizó una caracterización de la masa distribuyéndola en tres clases diamétricas (agrupación de árboles por diámetros); de cada clase se seleccionaron 2 individuos, lo que supone un total de 6 (el 27,27% del total de los ejemplares presentes). Adicionalmente se seleccionaron 6 individuos con un diámetro inferior a 2,5 centímetros.

### **2.3.3. Cuantificación de la edad de los abedules seleccionados**

La edad de los arboles muestra se cuantificó con la ayuda de una barrena forestal o barrena Pressler®. Para ello se procedió al barrenado de los arboles a la altura normal y la extracción del canutillo interior (Fig. 7). Tras el posterior secado y lijado del mismo se realizó la cuantificación de la edad del ejemplar.

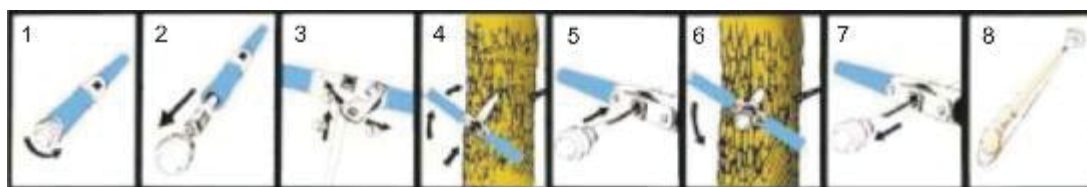


Fig. 7: Uso de la barrena forestal (<http://www.gisiberica.com/barrenas%20forestales/bs001.htm>)

### 2.3.4. Toma de muestras radiculares.

Una vez seleccionado el abedul, se procedió a la toma de la muestra de la raíz. Para ello se escogió una raíz principal del árbol, comprobándose que efectivamente pertenecía al árbol que se deseaba analizar. Sabiendo que las micorrizas se encuentran en las raíces laterales, se recorrió la raíz principal hasta llegar al lugar donde se encontraron este tipo de raíces (Fig. 8).

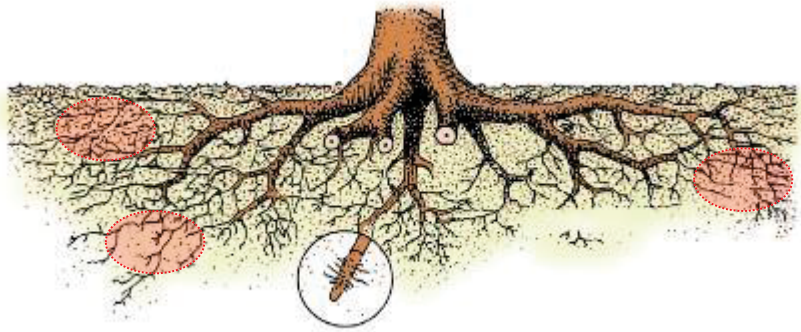


Fig. 8: Localización potencial de micorrizas en un sistema radical arbóreo. (Modificado de <http://www.castanea.es/elcastano.php>).

Una vez localizado el sistema radical de interés, con la ayuda de una tijera de podar se corta una sección de la raíz variable (Fig.9). La longitud depende de las características de la muestra en la cual se encuentran las raíces laterales que posteriormente se analizarán.

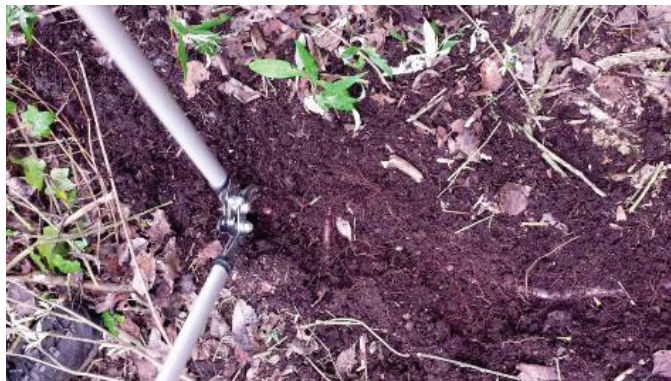


Fig. 9: Momento de extracción de muestras.

Esa muestra es introducida en una bolsa de plástico con cierre tipo zip a la cual se le añade un poco de agua para mantener la humedad. Dicha bolsa se etiqueta con el número de muestra correspondiente y se anotan los datos referentes a la distancia al tronco principal a la cual se ha tomado la muestra.



La etiquetación de la muestra sigue los siguientes criterios: **X SP NA RX**. Siendo,

- i. **X**: Número de parcela.
- ii. **SP**: Especie, en este caso *B. celtiberica* o BC.
- iii. **NA**: Número de árbol dentro de la parcela.
- iv. **RX**: Número de muestra.

Las muestras tomadas en campo se almacenan en la cámara fría, a una temperatura de 4 °C hasta su posterior análisis.

#### **2.4. PROCESADO DE LAS MUESTRAS RADICULARES**

Una vez recolectadas las muestras se realiza su acondicionamiento para el posterior análisis macro y microscópico. Para ello, se procede al lavado de las mismas con el objetivo de retirar la máxima cantidad posible de la tierra que tienen adherida (Fig. 10). Esos restos de agua con tierra se guardan para el estudio posterior de esporas de los hongos micorrícicos arbusculares (Véase 2.5.3. Esporas de hongos arbusculares).

Cuando la muestra ya se encuentra limpia, se divide en una serie de sub-muestras. Cada sub-muestra contiene unos 10 centímetros de la raíz principal y es introducida en una placa petri a la que añadimos un poco de agua para mantener la humedad, con su correspondiente identificación (Fig. 11)



Fig. 10: Muestra 02 BC 02 una vez acondicionada para su posterior procesado.

Para la identificación de las sub-muestras se emplea el siguiente código: **código de la muestra + PX SX**. Siendo:

- i. **Código de la muestra**: la etiqueta de la muestra tomada en campo.
- ii. **PX**: corresponde a la sección de la raíz principal.
- iii. **SX**: corresponde a la sección de la raíz lateral.



Fig. 11.: Sub-muestras pertenecientes a 03 BC 05 R1 P2 dentro de una placa Petri para su almacenaje

Una vez realizado el procesado de las muestras, las sub-muestras se almacenaran a 4º C hasta su análisis.

## **2.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS RADICULARES**

### **2.5.1. Estudio de ectomicorrizas**

Una vez obtenidas las sub-muestras se procedió a realizar la caracterización macroscópica de la diversidad micorrícica presente con la ayuda de una lupa Nikon modelo SMZ-U y una cámara fotográfica Nikon modelo F-601M.

Las distintas ectomicorrizas encontradas se agruparon por morfotipos siendo éstos tipificados con la ayuda de fichas identificativas (Fernández-Miranda, 2014), elaboradas en base a la sistemática empleada por Agerer (1990) y Goodman *et al.* (1996) (Anexo 1).

Para caracterizar los distintos morfotipos se realizaron las mediciones de las distintas partes que conforman una micorriza en un total de diez sistemas. Una vez realizada la medición se procedió a la recolección de cada morfotipo para su posterior análisis microscópico en un tubo eppendorf de 1,5 ml con el fijador FAA (90% etanol, 5% formol y 5% de ácido acético) (Fig. 12).



Fig. 12. Morfotipo 1 almacenado en fijador FFA dentro de un tubo eppendorf.

Una vez realizada la caracterización macroscópica de los diferentes morfotipos encontrados se procedió a su descripción microscópica, para ello se realizaron cortes de entre 10-30  $\mu\text{m}$  de espesor con un criostato Leica modelo CM1510-1. Su caracterización histológica se realizó con la ayuda de fichas descriptivas (Fernández-Miranda, 2014) elaboradas en base a lo indicado por Goodman *et al.* (1996) e Ingleby *et al.* (1990) (Anexo 2).

Posteriormente, los cortes se tiñeron con azul de algodón al 0,06% en lactoglicerol (compuesto por glicerina, ácido láctico y agua en una proporción de 1:1:1) sobre un portaobjetos. De los cortes obtenidos se efectuaron tres medidas del manto para cuantificar el grosos del mismo.

### **2.5.2. Estudio de la endomicorrizas y otros endófitos**

Para cuantificar la presencia o ausencia de endomicorrizas u otros endófitos se procedió a la recolección de pequeñas raíces blancas y lisas, derechas o tortuosas que no presentaban signos de necrosis y con la punta redondeada (Fig. 13). Dichas raíces se almacenaron en tubos eppendorf a los que se les añadió previamente fijador FAA.



Fig. 13. Aspecto general de un sistema radical en donde se observan algunas raíces blancas.

Para su análisis se siguió el protocolo de clarificación y tinción establecido por Phillips y Hayman (1970) que consiste en los siguientes pasos:

- i. Lavar las raíces en abundante agua corriente.
- ii. Colocar las raíces en una solución de KOH al 10% dentro de una estufa a 100<sup>o</sup> C durante 10-15 minutos.
- iii. Lavar con agua corriente.
- iv. Colocar las raíces en HCL 1N durante 10 minutos.
- v. Decantar el HCL, sin lavar las raíces.
- vi. Adicionar azul de tripán al 0,05% y colocarlas a 100<sup>o</sup> C durante 10 minutos.
- vii. Retirar el colorante.
- viii. Lavar las raíces con lactoglicerol.
- ix. Colocar las raíces, lo más extendidas posibles, en un portaobjetos al que se le ha añadido lactoglicerol y cubrirlas con un cubreobjetos.

Una vez que tenemos las raíces ya colocadas en el portaobjetos se procedió a la observación de las mismas mediante microscopio Nikon modelo Optiphot y cámara fotográfica Nikon modelo F-601M.

### 2.5.3 Estudio de esporas de hongos arbusculares

Para determinar la presencia o ausencia de esporas en el suelo se siguió una mezcla de las técnicas de Gerdemann y Nicolson (1963) y Tommerup (1992). El agua de lavar las raíces, se homogenizó mediante agitación y se decantó a través de una cadena de tamices de 500, 250, 125 y 50  $\mu\text{m}$  de luz de malla (Fig. 14). Este proceso se repitió hasta que el agua que atravesaba los tamices salía limpia. El residuo en el tamiz de 500  $\mu\text{m}$  se desechó. El resto, es decir el material retenido en los tamices de 250, 125 y 50  $\mu\text{m}$ , se colocó en tubos falcon® de 50 ml. Se resuspendió en agua y se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm. Descartamos el líquido para eliminar restos y se resuspendió el precipitado en una solución de sacarosa al 50% que volvemos a centrifugar durante 1 min a 2000 rpm. De esta forma las esporas quedan en la suspensión de sacarosa separándose del resto del sustrato. Para separar las esporas de la sacarosa se filtra el sobrenadante en vacío sobre papel de filtro de 50  $\mu\text{m}$  (Whatman®), lavando después las esporas con  $\text{H}_2\text{O}$  para eliminar restos de sacarosa. Posteriormente se almacenan en placas Petri a 4<sup>o</sup> C hasta su observación.

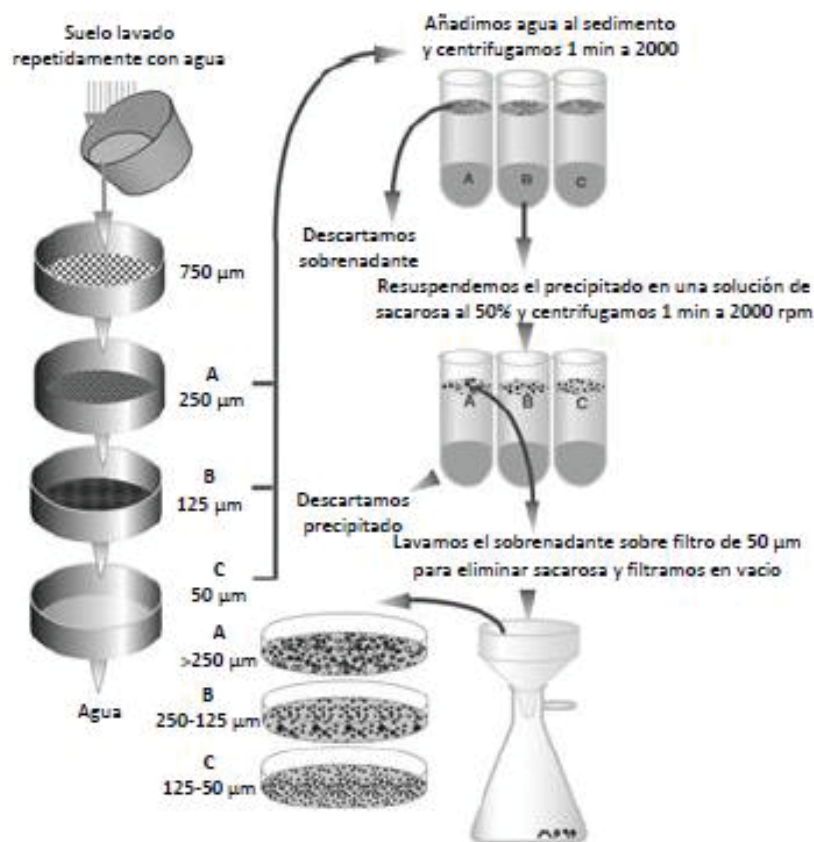


Fig. 14: Esquema de separación de esporas. (Fernández-Miranda, 2014)

Las esporas obtenidas por este proceso se examinaron y fotografiaron con la ayuda de una lupa Nikon modelo SMZ-U y una cámara fotográfica modelo F-601M.

Con los distintos tipos de esporas encontrados se realizaron preparaciones semi-permanentes en PVLG (1,66 g de alcohol de polivinilo, 10 ml de ácido láctico, 1 ml de glicerina y 10 ml de agua destilada y disuelto a 90º C durante varias horas) y PVLG con reactivo de Melzer (100 ml de hidrato de cloral, 1,5 g de KI y 100 ml de agua destilada). Estas preparaciones se examinaron con un microscopio Nikon modelo Optiphot y cámara fotográfica Nikon modelo F-601M y se caracterizaron siguiendo la metodología de Morton (1998).

Con este proceso se trató de identificar las especies de hongos a las que pertenecían las esporas encontradas de acuerdo con la clasificación consenso propuesta por Redecker *et al.* (2013) y los recursos disponibles en el INVAM (*International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi- West Virginia University*).

## **2.6. ANÁLISIS DE PH DEL SUELO**

Mediante este proceso determinamos la acidez activa del suelo, es decir, la concentración de protones existentes en una disolución de suelo.

Tamizamos la muestra de suelo con un tamiz de 2 mm y la dividimos en tres partes. Posteriormente pesamos 10 g de suelo seco y se coloca en un vaso de precipitado al cual se añaden 25 ml de agua destilada, removiéndolo de vez en cuando durante 10 min. Pasado este tiempo se realizan tres lecturas de cada muestra con la ayuda de un pHmetro.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE ABEDUL

Solo se detectaron ejemplares de abedul en 6 de las 36 parcelas de la zona de muestreo, localizadas principalmente en su periferia. (Fig. 15).

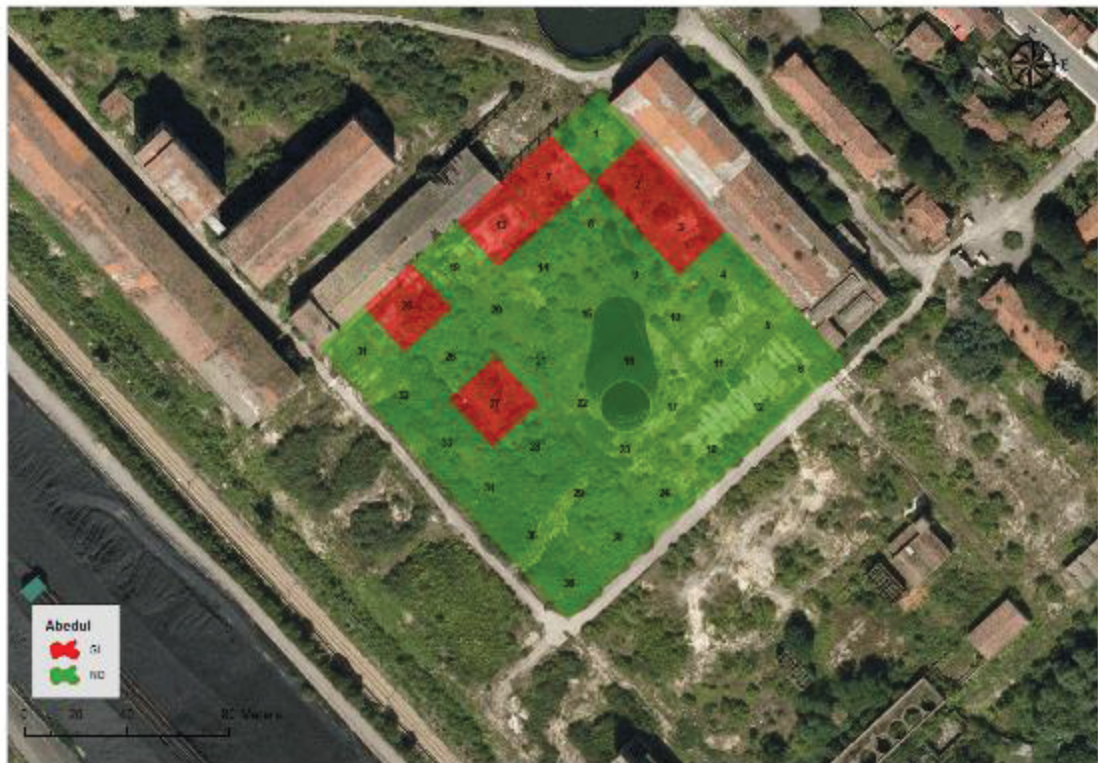


Fig. 15: Distribución del abedul en la parcela de trabajo. (Ortofoto: PNOA 2009).

Los resultados obtenidos en la medición de altura y diámetro, junto con la edad de los 12 en los que se analizaron sus micorrizas, se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados obtenidos de la medición de diámetro (cm) y la altura (m) de los árboles presentes en la parcela de estudio. En la columna de la derecha se muestra la edad de 12 ejemplares en los que se analizarán sus micorrizas.

<b>Parcela</b>	<b>Árbol</b>	<b>Diámetro (cm)</b>	<b>Altura (m)</b>	<b>Edad( años)</b>
2	1	6,8	8,1	
2	2	8,3	8,4	11
2	3	5,8	8,6	
2	4	8	8,3	
2	5	8,3	8,1	
2	6	8,9	8,8	
2	7	8,3	7	
3	1	13	11,1	
3	2	14,3	10,7	
3	3	16	12,1	
3	4	6	8,7	
3	5	5,5	10,9	10
3	6	6,5	8,2	
3	7	4,5	6,6	
3	8	5	7,1	
3	9	4,1	6,3	
7	1	4	4,4	7
7	2	0,23	0,4	<2
7	3	0,13	0,3	<2
7	4	0,08	0,3	<2
7	5	0,05	0,2	<2
7	6	0,04	0,2	<2
7	7	0,03	0,2	<2
13	1	13	7,8	15
25	1	10,3	10,7	
25	2	14,2	11,8	16
25	3	9,7	7,5	
27	1	9,3	7,6	13

A la vista de los datos obtenidos podemos decir que estamos ante una población de abedul que presenta una distribución muy baja a lo largo de la superficie de la parcela y además está concentrada en ciertas zonas de la misma. El abedul es un árbol pionero y considerado uno de los primeros pobladores de zonas que han sido degradadas por las actividades humanas (Villarino, 2012) por ello, parece inusual encontrarse con una densidad tan baja en una zona que hipotéticamente es favorable para su crecimiento. Quizá la respuesta a esta baja densidad de población se encuentra en que el abedul es una especie de luz (Villarino, 2012, López *et al.*, 2012) por lo tanto necesita la radiación solar para germinar. Además, la parcela se encuentra densamente poblada por otra vegetación arbórea (especialmente *Salix* sp.), herbácea y arbustiva. Son de destacar la gran cantidad de especies invasoras especialmente *Cortaderia selloana* y *Buddleja davidii*, que genera sombras y que por lo tanto podría dificultar el desarrollo del abedul.

### 3.2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD FÚNGICA

#### *Ectomicorrizas*

Tras realizar el análisis, tanto macroscópico como microscópico, de los sistemas radicales de los doce árboles seleccionados, se diferenciaron ocho morfotipos diferentes que fueron los siguientes:

#### Morfotipo 1:

Ectomicorriza no ramificada o monopodial-pinnada, cuyas puntas tienden a ser tortuosas o dobladas (Fig. 16A). De color marrón oscuro mate. La textura que presentan es aterciopelada. La longitud del sistema es de  $4,32 \pm 0,78$  mm, longitud de la punta  $1,70 \pm 0,20$  mm, ancho de la punta  $0,21 \pm 0,02$  mm, ancho del eje mayor  $0,28 \pm 0,03$  mm y ancho de la base de la punta  $0,25 \pm 0,01$  mm. Aparecen en los ejemplares 07 BC 01, 13 BC 01 y 25 BC 02.

Histológicamente, sin apenas hifas emergentes, las existentes son rectas y tabicadas (Fig. 16B). El manto presenta un espesor de  $34,69 \pm 7,97$   $\mu$ m siendo su estructura de pseudoparénquima en estructura de red (Fig. 16C). La Red de Hartig no se encuentra muy desarrollada y llega hasta la capa de células epidérmicas (Fig. 16D).

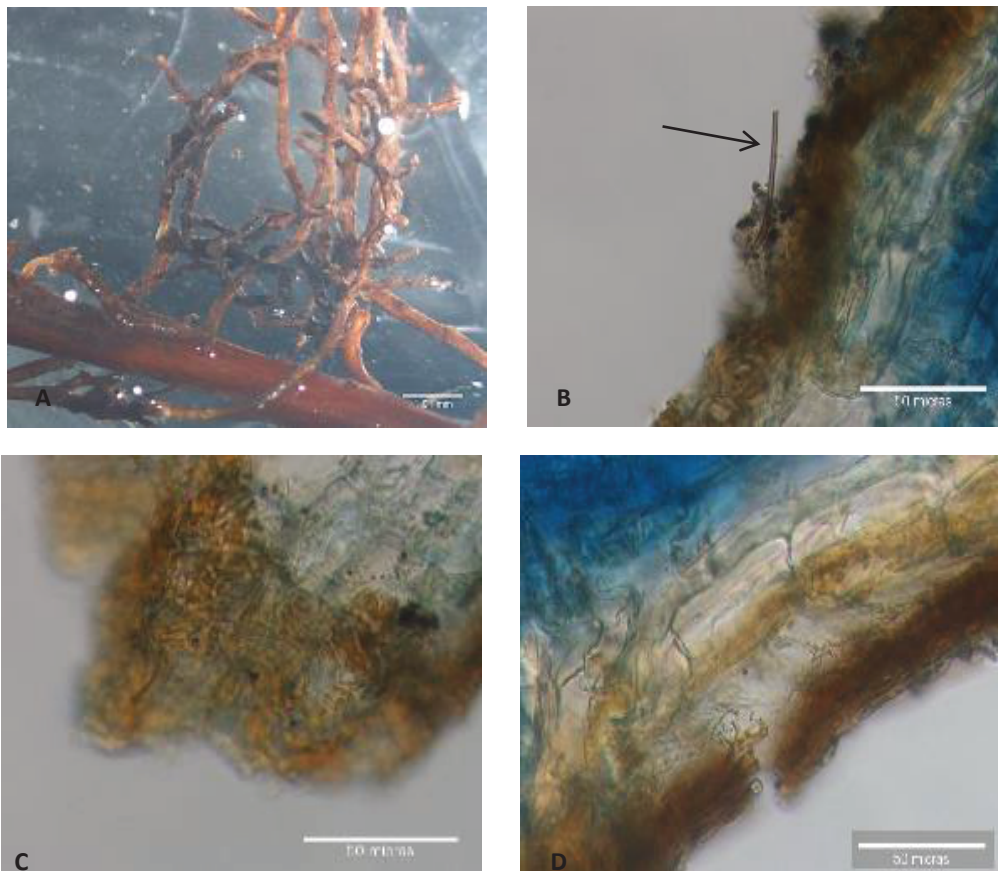


Fig. 16: A) Aspecto general del morfotipo 1; Corte transversal, teñido en azul de algodón, en el que se aprecian hifas emergentes, señalada con una flecha (B), Estructura del manto (C) y Red de Hartig (D).



### Morfotipo 2:

Ectomicorriza monopodial-pinnada o no ramificada, cuyas puntas tienden a ser tortuosas o dobladas (Fig. 17A). De color negro mate y textura reticulada. La longitud del sistema es de  $7,62 \pm 0,60$  mm, longitud de la punta  $2,04 \pm 0,29$  mm, ancho de la punta  $0,22 \pm 0,02$  mm, ancho del eje mayor  $0,36 \pm 0,06$  mm y ancho de la base de la punta  $0,23 \pm 0,01$  mm. Aparecen en los ejemplares 07 BC 01, 13 BC 01, 25 BC 02 y 02 BC 02.

Sin hifas emergentes, el manto presenta un espesor de  $51,87 \pm 2,41$   $\mu$ m siendo su estructura de prosénquima en estructura de red en una primera capa, y pseudoparénquima en red en una segunda. La Red de Hartig no se aprecia con claridad llegando hasta la capa de células epidérmicas (Fig. 17B.)

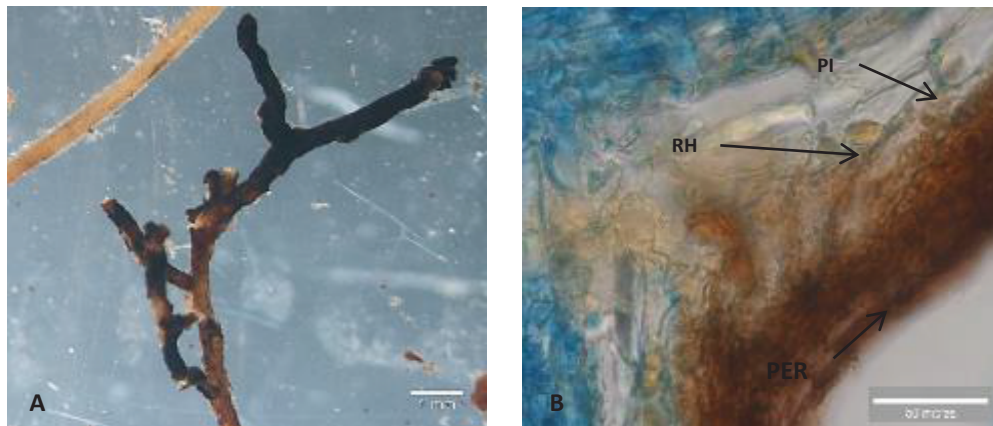


Fig. 17: A) Aspecto general del morfotipo 2. B) Corte transversal del morfotipo 2, teñido con azul de algodón en el que aprecia la Red de Hartig (RH), el prosénquima en estructura de red (PER) y el regular (PI).

### Morfotipo 3:

Ectomicorrizas no ramificadas, aunque pueden encontrarse con ramificación monopodial-pinnadas. Las puntas tienden a ser dobladas (Fig. 18A). De color crema, suelen tener hifas emergentes del mismo color a lo largo de su superficie. La textura es aterciopelada. La longitud del sistema es de  $6,83 \pm 0,79$  mm, longitud de la punta  $3,39 \pm 0,66$  mm, ancho de la punta  $0,48 \pm 0,04$  mm, ancho del eje mayor  $0,48 \pm 0,03$  mm y ancho de la base de la punta  $0,43 \pm 0,02$  mm. Aparecen en los ejemplares 07 BC 01, 07 BC 03, 07 BC 04, 07 BC 05, 07 BC 06 y 13 BC 01.

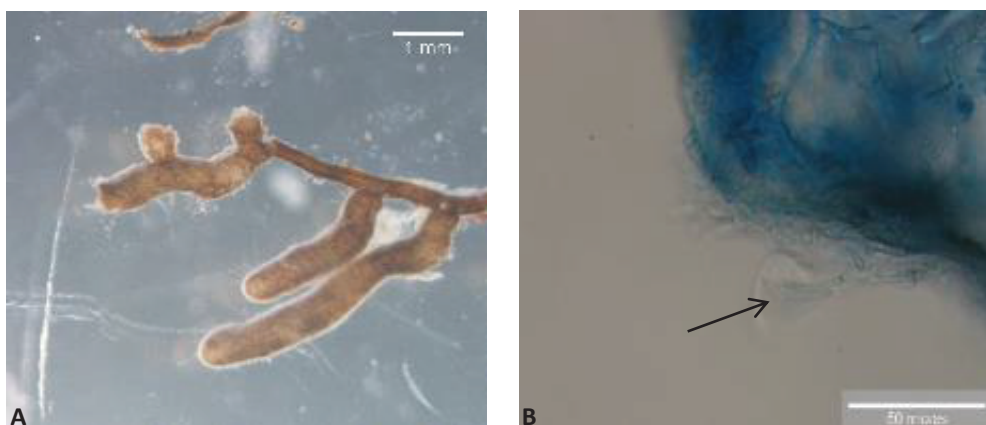


Fig. 18: A) Aspecto general del morfotipo 3. B) Corte transversal del morfotipo, teñido con azul de algodón. La flecha señala hifas emergentes.

Presenta hifas emergentes de color claro (Fig. 18B). El manto presenta un espesor de  $16,05 \pm 3,03 \mu\text{m}$  siendo su estructura de prosénquima en estructura de red en una primera capa y pseudoparénquima regular en una capa inferior. La Red de Hartig se encuentra bien definida y llega hasta la capa de células epidérmicas (Fig. 19).

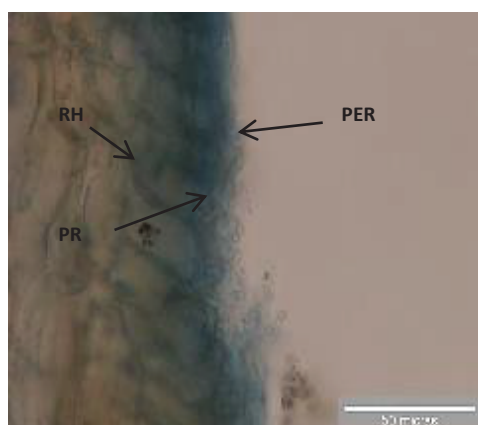


Fig. 19: Corte transversal del morfotipo 3, teñido con azul de algodón en el que aprecia la Red de Hartig (RH), el prosénquima en estructura de red (PER) y el pseudoparénquima regular (PR).

#### Morfotipo 4:

Ectomicorriza monopodial-pinnada aunque pueden encontrarse algunas no ramificadas. Las puntas suelen ser dobladas o inclinadas (Fig. 20A). Estas micorrizas presentan un color negro en su parte inferior siendo el tercio superior de las puntas de color crema. Presentan una textura aterciopelada aunque puede parecer que son algodonosas debido la gran cantidad de micelio que las rodea. La longitud del sistema es de  $3,39 \pm 0,56 \text{ mm}$ , longitud de la punta  $1,48 \pm 0,36 \text{ mm}$ , ancho de la punta  $0,24 \pm 0,05 \text{ mm}$ , ancho del eje mayor  $0,30 \pm 0,08 \text{ mm}$  y ancho de la base de la punta  $0,28 \pm 0,05 \text{ mm}$ . Aparecen en los ejemplares 02 BC 02, 03 BC 05, 07 BC 04, 07 BC 05 y 13 BC 01, 25 BC 02, 27 BC 01.

No presenta hifas emergentes. El manto presenta un espesor de  $40,71 \pm 11,20 \mu\text{m}$ , siendo su estructura pseudoparénquima regular. La Red de Hartig se encuentra bien definida y llega hasta la capa de células epidérmicas (Fig. 20B.).

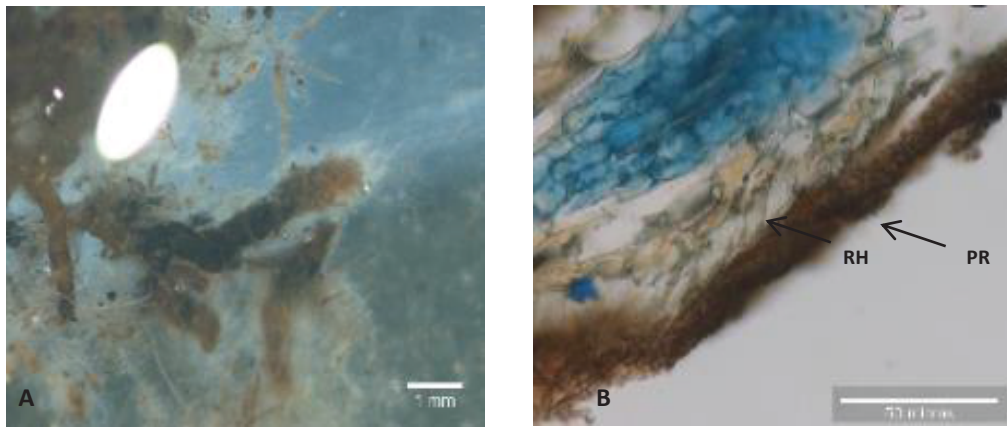


Fig. 20: A) Aspecto general del morfotipo 4. B) Corte transversal del morfotipo, teñido con azul de algodón, en el que se aprecia el pseudoparénquima regular (PR) y la Red de Hartig (RH).

#### Morfotipo 5:

Ectomicorriza monopodial-pinnada tendiendo a irregular. Las puntas suelen ser dobladas o inclinadas (Fig. 21A). Estas micorrizas presentan un color negro en su parte inferior siendo, al menos, una de sus puntas de color crema o blanco. La textura es aterciopelada. La longitud del sistema es de  $4,64 \pm 1,18 \text{ mm}$ , longitud de la punta  $1,27 \pm 0,24 \text{ mm}$ , ancho de la punta  $0,30 \pm 0,05 \text{ mm}$ , ancho del eje mayor  $0,33 \pm 0,07 \text{ mm}$  y ancho de la base de la punta  $0,29 \pm 0,04 \text{ mm}$ . Aparece en los ejemplares 02 BC 02, 07 BC 0413 BC 01, 25 BC 02 y 27 BC 01.

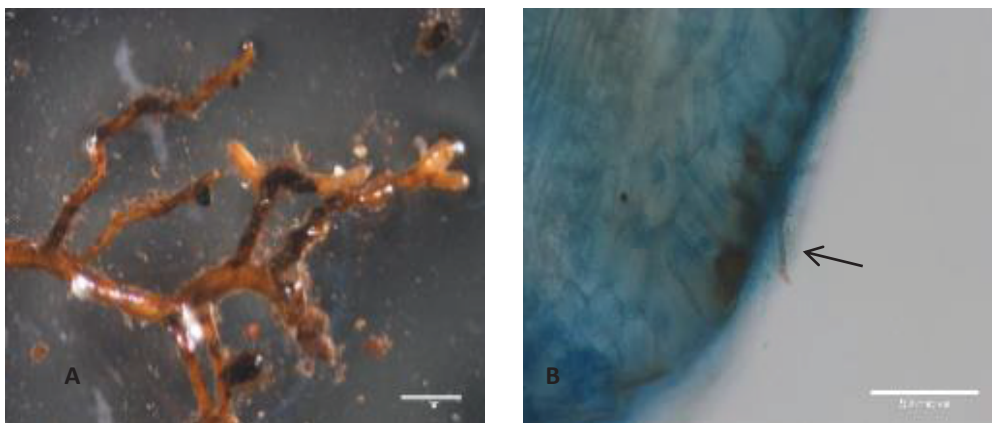


Fig. 21: A) Aspecto general del morfotipo 5. B) Corte transversal del morfotipo, teñido con azul de algodón, en el que se puede observar una hifa emergente.

Presenta hifas emergentes pero estas son muy escasas, no están ampliamente distribuidas por la superficie del manto (Fig. 22B). El manto presenta un espesor de  $17,81 \pm 2,20 \mu\text{m}$ , siendo su estructura pseudoparénquima regular y en una capa superior pseudoparénquima en red. La Red de Hartig se encuentra bien definida y llega hasta la capa de células epidérmicas (Fig. 23).



Fig. 23: Corte transversal del morfotipo 5, teñido con azul de algodón, en el que se aprecia el pseudoparénquima regular (PR), el pseudoparénquima en estructura de red (PER) y la Red de Hartig (RH).

### Morfotipo 6:

Ectomicorriza que suele tener una ramificación irregular aunque puede ser monopodial-pinnada o no ramificada. Las puntas suelen ser tortuosas y en algunos casos inclinadas o derechas (Fig. 24A). Estas micorrizas son de color blanco y en algunos casos grisáceas en su tercio inferior. Tienen textura aterciopelada. La longitud del sistema es de  $5,20 \pm 0,81$  mm, longitud de la punta  $2,66 \pm 0,36$  mm, ancho de la punta  $0,40 \pm 0,04$  mm, ancho del eje mayor  $0,34 \pm 0,04$  mm y ancho de la base de la punta  $0,38 \pm 0,03$  mm. Aparecen en los ejemplares 02 BC 02, 03 BC 05, 07 BC 02, 07 BC 03, 07 BC 04, 07 BC 05, 07 BC 06, 07 BC 07, 25 BC 02 y 27 BC 01.

No se observan hifas emergentes. El manto presenta un espesor de  $28,72 \pm 2,60$   $\mu\text{m}$ , siendo su estructura pseudoparénquima en estructura de red. La Red de Hartig se encuentra bien definida y llega hasta la capa de células epidérmicas (Fig. 24B).



Fig. 24: A) Aspecto general del morfotipo 6. B) Corte transversal del morfotipo, teñido con azul de algodón, en el que se observa la Red de Hartig (RH) y la estructura del manto (PER)

### Morfotipo 7:

Ectomicorriza monopodial-pinnada aunque puede ser no ramificada. Las puntas suelen ser derechas y en algunos casos dobladas (Fig. 25A). Estas micorrizas son de color negro y presentan hifas emergentes del mismo color. Tienen textura aterciopelada. La longitud del sistema es de  $4,48 \pm 0,57$  mm, longitud de la punta  $2,57 \pm 0,48$  mm, ancho de

la punta  $0,59 \pm 0,08$  mm, ancho del eje mayor  $0,51 \pm 0,10$  mm y ancho de la base de la punta  $0,53 \pm 0,06$  mm. Aparecen en los ejemplares 02 BC 02, 03 BC 05, 07 BC 02, 07 BC 03, 07 BC 05, 07 BC 06, 07 BC 07, 25 BC 02 y 27 BC 01.

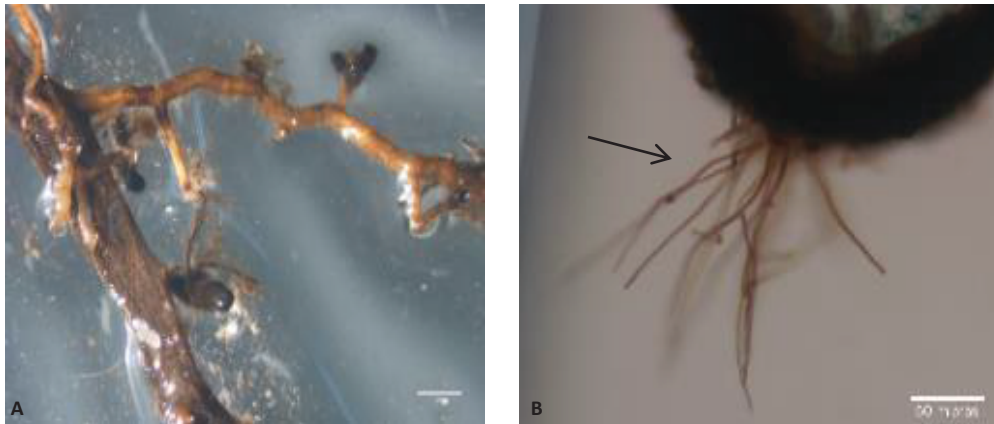


Fig. 25: A) Aspecto general del morfotipo 7. B) Corte transversal del morfotipo, teñido con azul de algodón, en el que se observan las hifas emergentes.

Existen abundantes hifas emergentes tabicadas, dispuestas a lo largo de la superficie del manto (Fig. 25B). El manto presenta un espesor de  $78,90 \pm 20,02$   $\mu\text{m}$ , siendo su estructura pseudoparénquima en estructura de red en una capa superior y pseudoparénquima irregular en una inferior. La Red de Hartig se encuentra bien definida y llega hasta la primera capa de células epidérmicas (Fig. 26).

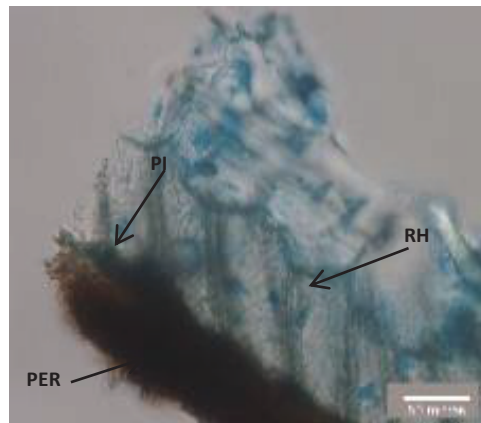


Fig. 26: Corte transversal del morfotipo 7, teñido con azul de algodón, en el que se aprecia la Red de Hartig (RH), la estructura del manto en pseudoparénquima irregular (PI) y en pseudoparénquima en estructura de red (PER).

### Morfotipo 8:

Ectomicorrizas monopodiales-pinnadas aunque puede ser irregulares en algunos casos. Las puntas pueden ser derechas o dobladas (Fig. 27A). Estas micorrizas son de color anaranjado y textura aterciopelada. La longitud del sistema es de  $5,93 \pm 1,20$  mm, longitud de la punta  $1,24 \pm 0,13$  mm, ancho de la punta  $0,20 \pm 0,01$  mm, ancho del eje

mayor  $0,30 \pm 0,04$  mm y ancho de la base de la punta  $0,24 \pm 0,01$  mm. Aparecen en los ejemplares 02 BC 02, 03 BC 05, 25 BC 02 y 27 BC 01.

No se observan hifas emergentes. El manto presenta un espesor de  $26,85 \pm 6,03$   $\mu\text{m}$ , siendo su estructura pseudoparénquima regular. La Red de Hartig se encuentra bien definida y llega hasta la capa de células epidérmicas (Fig. 27B).

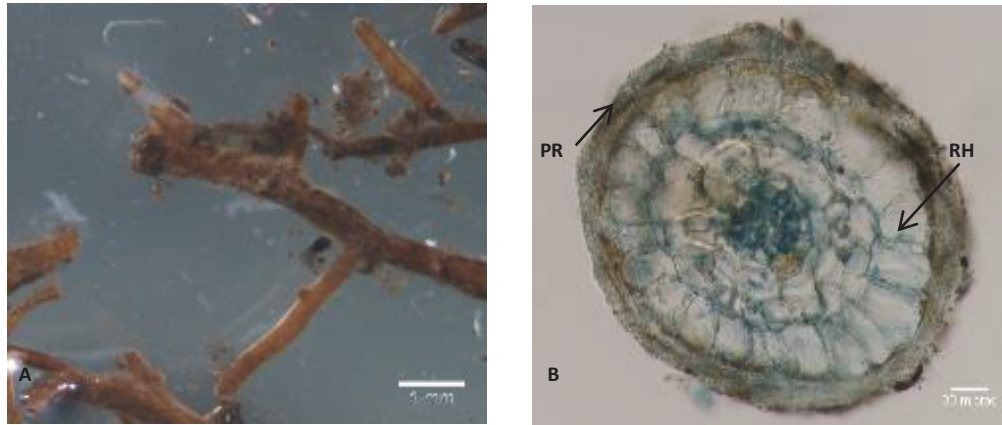


Fig. 27: A) Aspecto general del morfotipo 8. B) Corte transversal del morfotipo, teñido con azul de algodón, en el que se observa la Red de Hartig (RH) y la estructura del manto (PR).

Se observaron ocho morfotipos diferentes de ectomicorrizas, encontrándose más de un morfotipo distinto en cada sistema radical. Una de las características más remarcables es que seis de los ocho morfotipos descritos tienen tonalidades oscuras. Los hongos que se desarrollan en zonas contaminadas por metales pesados tienen esta característica debido al contenido de melanina, que desempeña un papel importante en la inmovilización de metales y en la capacidad que poseen los hongos en actuar como biosorbentes (Gadd, 2007).

#### ***Endomicorrizas y otros endófitos.***

Cuatro de los seis ejemplares adultos estudiados presentaron endomicorrizas y/u otros endófitos, es decir, el 66,67%. Los resultados que se exponen a continuación fueron obtenidos tras el proceso de clarificación de las raíces blancas encontradas en sus sistemas radicales y su posterior observación microscópica.

En los individuos 07 BC 01, 13 BC 01, 25 BC 02 y 27 BC 01 se observó la presencia de endomicorrizas del tipo *Paris* (Fig. 28A y B) y *Arum*. Aparecen numerosas vesículas intercelulares de distinta morfología (Fig. 28C y D) tendiendo a ser su forma globosa o elipsoide, y en menor medida se encuentran presentes arbuscúlos (Fig. 28D y F). También se observó la presencia de esporas en el interior celular

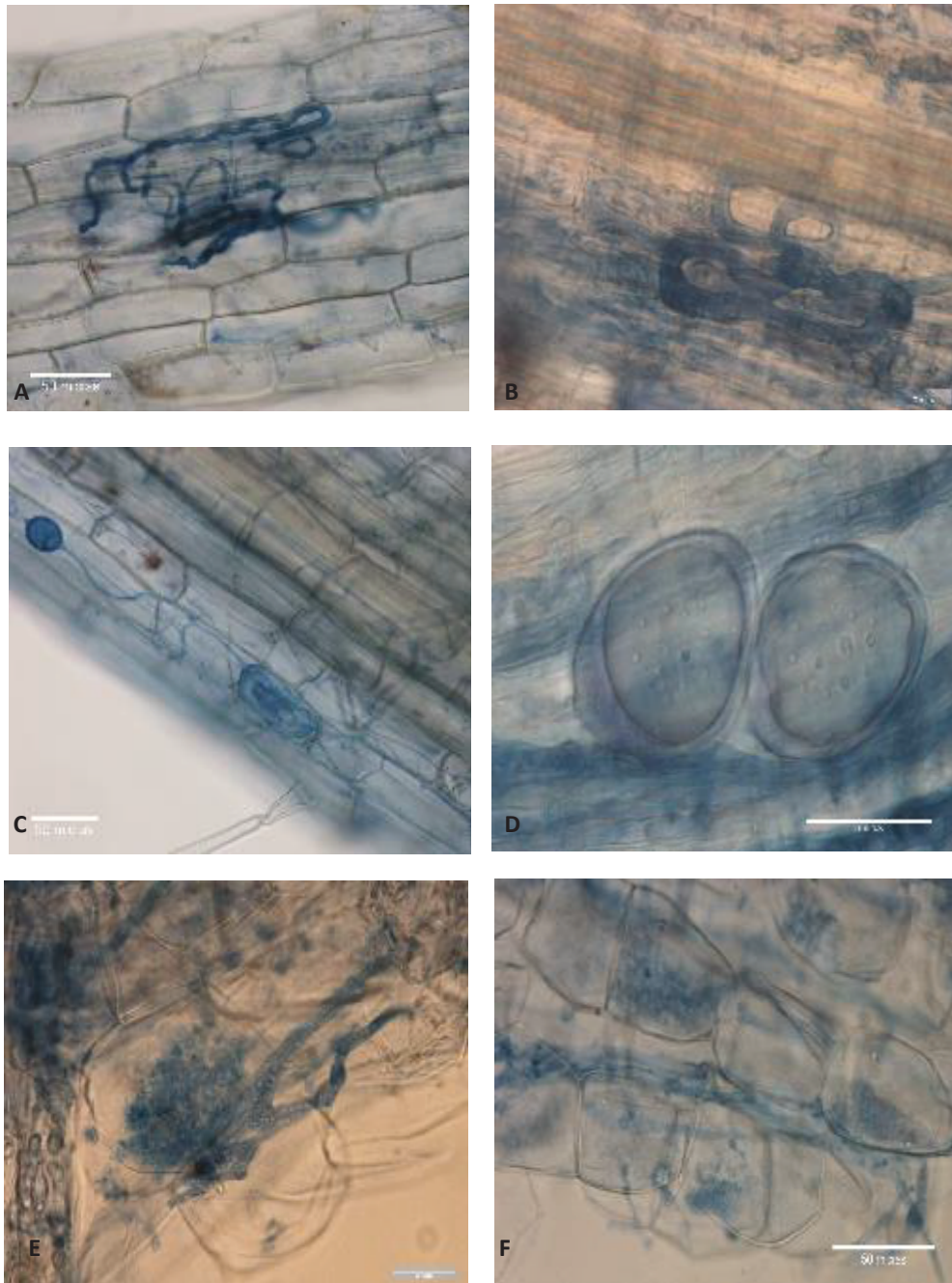


Fig 28.A) y B) Endomicorrizas tipo *Paris*, C) y D) Conjunto de vesículas; D) y E) Arbusculos.

De igual manera se observó, en los mismos ejemplares, la presencia de otros endófitos, denominados endófitos septados oscuros (DSE), caracterizados por la presencia de microesclerocios (Fig. 29).



Fig. 29: Microesclerocios característicos de los endófitos septados oscuros.

Existe una gran abundancia de endomicorrizas dentro de los sistemas radicales estudiados. En general, la forma más común fue la tipo *Paris*, observándose numerosos ovillos inter e intracelulares así como abundantes vesículas y esporas con diferente morfología los que supondría la presencia de diferentes especies. Las estructuras menos observadas fueron los arbusculos.

#### ***Esporas de hongos endomicorrícicos***

Las esporas encontradas pertenecen a los siguientes géneros:

##### *Glomus*

Esporas de forma globoide que poseen hifa de sustentación, que puede ser recta (Fig. 30A) o curvada (Fig. 30B). De tonalidad anaranjada en las preparaciones con PVLG y PVLG: Melzer. En la pared de la espora se diferencian, de forma muy tenue, una doble banda. Diámetro variable, oscilando entre la 40 y 140  $\mu\text{m}$ . Aparecen en la rizosfera del individuo 13 BC 01 y del 25 BC 02.

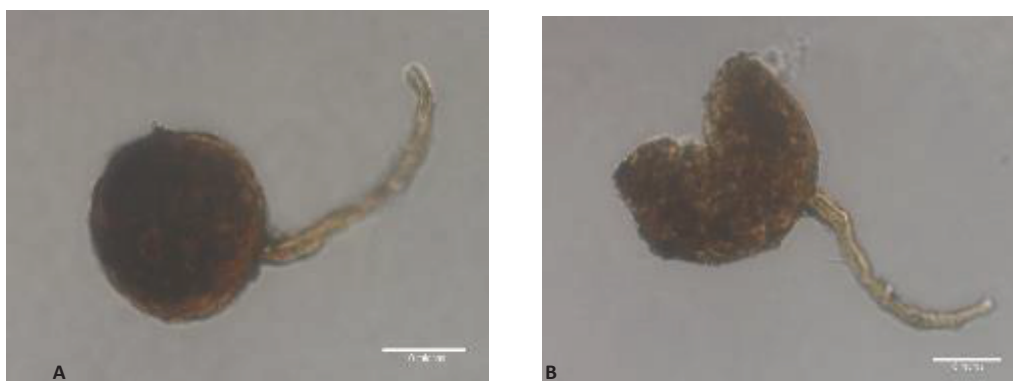


Fig 30: Esporas de *Glomus* en PVLG+ Reactivo de Melzer. A) Espora entera, B) Espora rota.



### *Acaulospora*:

Espora globosa que no presenta hifa de sustentación. De tonalidades amarillentas en las preparaciones con PVLG y PVLG: Melzer. Diámetro que oscila entre las 70 y 90  $\mu\text{m}$ . Se encuentran presentes en la rizosfera de los ejemplares 07 BC 01, 13 BC 01, 25 BC 02 y 27 BC 01.

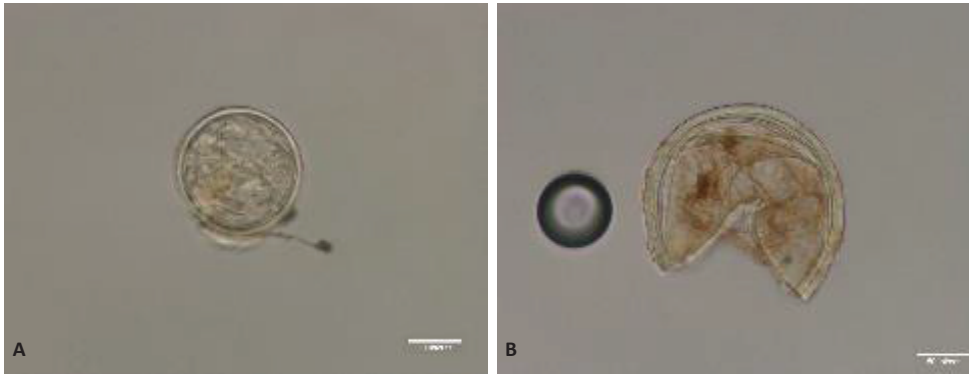


Fig. 31: Esporas de *Acaulospora* en PVLG. A) Espora entera, B) Espora rota

### *Archeospora*

Esporas globosas o subglobosas. De color blanco cremoso o hialino, que se va oscureciendo cuando se comienzan a degradar. Sin cambios de coloración en las preparaciones con PVLG y PVLG: Melzer. Presentan la peculiaridad de que son muy sensibles, es decir, se desintegran a la más mínima presión de contacto. Diámetros entre 50 y 90  $\mu\text{m}$ . Es el tipo de espóra más común ya que se encontró en la rizosfera de cada sistema radical estudiado.



Fig. 32: Espora entera de *Archeospora* en PVLG.

Mediante esta caracterización macroscópica se trató de realizar un análisis preliminar de la diversidad fúngica presente en la rizosfera e intentar determinar los individuos que forman las distintas endomicorrizas encontradas. De esta manera se constató la existencia de una elevada cantidad de esporas, pero el conjunto de las mismas se puede agrupar en tan solo los tres géneros anteriormente expuestos.

La determinación de la especie de hongo, incluso de su género, basándose solo en los caracteres macroscópicos, observados con ayuda de lupa y microscopio, es muy

complicada por lo tanto, actualmente, en su caracterización se suelen utilizar análisis moleculares.

La escasa diversidad encontrada puede deberse a que solo los ecotipos que se encuentran mejor adaptados a los condicionantes son capaces de completar su ciclo de vida (Del Val *et al.*, 1999). Sería beneficioso el conocimiento de estos ecotipos especialmente adaptados para su posterior empleo en técnicas de biorremediación.

### **3.3. CUANTIFICACIÓN DEL PH DEL SUELO**

Los resultados de la medición de pH son los que se muestran a continuación (Tabla 3):

Tabla 3. Resultados de la medición del pH en las distintas parcelas.

<b>Parcela</b>	<b>pH</b>
<b>2</b>	7,69±0,03
<b>3</b>	5,16±0,02
<b>7</b>	5,75±0,04
<b>13</b>	6,69±0,02
<b>25</b>	7,15±0,19
<b>27</b>	7,68±0,03

Una vez realizada la medición del pH se observa que esta varía entre 5,16±0,02 y 7,69±0,03 es decir, son unos niveles de ligeramente ácidos a neutros.

Tabla 4. Cuadro resumen en el que se observan las distintas asociaciones (ectomicorrizas, AM o endomicorrizas y DSE o endófitos septados oscuros) encontradas en cada abedul junto con las características de edad, altura y diámetro del árbol. También se incluyen los datos relativos al pH de la parcela.

Individuo	Ectomicorrizas								AM	DSE	Edad (años)	Altura (m)	Diámetro (cm)	pH
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8						
07 BC 02			X			X	X				<2	0,23	0,4	5,75±0,04
07 BC 03			X			X	X				<2	0,13	0,3	5,75±0,04
07 BC 04			X	X	X	X	X				<2	0,08	0,3	5,75±0,04
07 BC 05			X	X		X	X				<2	0,05	0,2	5,75±0,04
07 BC 06			X			X	X				<2	0,04	0,2	5,75±0,04
07 BC 07						X	X				<2	0,03	0,2	5,75±0,04
07 BC 01	X	X	X						X	X	7	4,4	4	5,75±0,04
03 BC 05						X	X	X			10	10,9	5,5	5,16±0,02
02 BC 02		X			X	X	X	X			11	8,4	8,3	7,69±0,03
27 BC 01				X	X	X	X	X	X	X	13	7,6	9,3	7,68±0,03
13 BC 01	X	X	X	X	X				X	X	15	7,8	13	6,69±0,02
25 BC 02	X	X		X	X	X	X	X	X	X	16	11,8	14,2	7,15±0,19

En la Tabla 4 se muestran todos de los resultados obtenidos durante el examen de los sistemas radicales de los abedules seleccionados. En él se puede observar la complejidad de la diversidad fúngica asociada a los árboles que nos encontramos en la parcela de Nitrastur. Observando como en un mismo individuo conviven distintos tipos de asociaciones (ectomicorrizas, endomicorrizas y endófitos septados oscuros).

De los ocho morfotipos, son el morfotipo 6 y el 7 los que se encuentran de forma más repetitiva, estando presentes en el 83% de las muestras radicales. El menos frecuente es el morfotipo 1 que solo se encuentra en el 25%. Como podemos ver el desarrollo de ectomicorrizas no se ve afectado por el nivel de pH en la zona de estudio.

En todos los casos nos encontramos con más de un morfotipo distinto en un árbol, observándose en algunos hasta un máximo de siete diferentes. En anteriores trabajos (Baxter y Dighton, 2001) relativos a otra especie del mismo género (*B. populifera*) se indica que la diversidad ectomicorrícica favorece el crecimiento y la absorción de nutrientes. En el caso de la población de estudio podría ocurrir una situación similar ya que presenta una amplia variedad de morfotipos por sistema radical y el crecimiento de los árboles es bueno.

La determinación exacta de la especie de hongo que está generando una ectomicorriza concreta sólo puede estipularse con la ayuda de análisis moleculares a partir de una extracción de ADN. Esto es debido a que pueden existir similitudes físicas entre morfotipos causados por diferentes hongos en el mismo huésped o grandes diferencias entre morfotipos generados por el mismo hongo en diferentes huéspedes (Egger, 1995). Por ello, no se pueden determinar de manera precisa las distintas especies que forman cada asociación. Sin embargo, atendiendo a las características macro y microscópicas del morfotipo 7, que coinciden con las descritas por Agerer (1987-2012), podríamos decir que se trata de *Cenococcum geophilum* Fr. Aunque deberíamos tomar esta afirmación con cautela puesto que existen otros individuos, como el *Meliniomyces bicolor* que forman ectomicorrizas en *B. pubescens* muy parecidas a la de *C. geophilum* (Vrålstad *et al.*, 2002a).

Al igual que Becerra *et al.* (2005) en *Alnus* spp., en el caso concreto de esta parcela podemos afirmar que las ectomicorrizas son dominantes frente a las endomicorrizas, que solo están presentes en el 33% de los ejemplares estudiados. Esto puede ser consecuencia, como se comentó en párrafos anteriores, al grado de adaptación que los hongos arbusculares necesitan para desarrollarse. Los hongos arbusculares son mucho más sensibles a las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo (Becerra *et al.* 2005) y la parcela de trabajo presenta unas características de contaminación edáfica que sugieren que las especies que allí se desarrollan tienen un alto grado de especialización.

Podemos observar que en todos los ejemplares que se encontraron endomicorrizas también se observaron endófitos septados oscuros. Sería necesario la realización de otros estudios para comprobar si este fenómeno es específico de este tipo de ecosistemas y como afectan al desarrollo de la vegetación. Si se observan los ejemplares en los que existe esta doble asociación, tres de ellos son los más longevos y los que

presentan el mayor crecimiento en diámetro. Se podría decir que este parámetro no se ve afectado por la presencia de estas asociaciones, pero esta afirmación es una hipótesis que necesitaría ser verificada.

Como se comentó en párrafos anteriores, el 33% de los ejemplares estudiados presentaron asociaciones endomicorrícicas. La presencia de este tipo en *Betula* sólo se encuentra documentada por Fernández-Miranda (2014), que las localizó en un solo individuo en este mismo emplazamiento. Sí que existe la constancia de la existencia de estas asociaciones en la Familia Betulacea (Becerra y Cabello, 2008), en *Alnus acuminata*. Con este hallazgo se confirma la presencia de endomicorrizas en los abedules que vegetan bajo las condiciones concretas que se dan en esta parcela.

Se constata la abundante presencia de DSE coexistiendo con los demás tipos de asociaciones micorrícicas. Los DSE comprenden un grupo heterogéneo de Ascomicetes que colonizan los tejidos celulares e intracelulares cuyos efectos sobre sus huéspedes pueden ser positivos o negativos (Jumpponen, 2001). Esta coexistencia está documentada en numerosos estudios que tienden a analizar cada elemento por separado, siendo muy pocos los que analizan ambos componentes juntos (Pérez Naranjo, 2009). Massenssini et al. (2013) comprobaron que en un ecosistema alterado, 27 de 29 especies analizadas presentaban ambas asociaciones, lo que incita a pensar que el conjunto de esta asociación puede tener consecuencias favorables para la especie hospedante, aunque no se disponen de datos suficientes en el presente proyecto para confirmar esta hipótesis.

La mayor diversidad individual se concentra en el individuo 25 BC 01. En él nos encontramos con siete morfotipos distintos de ectomicorrizas, con endomicorrizas y endófitos septados oscuros. Cabe mencionar que es el árbol más viejo del conjunto de la muestra estudiada y el que presenta mayor crecimiento en diámetro y altura. Esto puede ser debido al aumento de la diversidad y a cambios en la dominancia que sufren los hongos ectomicorrícicos con la edad (Palacios *et al.* 2012)

#### **4. CONCLUSIONES**

---

El abedul es capaz de desarrollarse sobre terrenos generados por residuos industriales altamente contaminados por metales pesados.

El sistema radical de los abedules que se desarrollan en Nitrastur posee una amplia diversidad fúngica estableciendo diversas asociaciones micorrícicas.

Se han descrito 8 morfotipos de ectomicorrizas, 2 de los cuales se encuentran presentes en el 83% de los individuos.

No se han detectado endomicorrizas ni otros endófitos en árboles de menos de 2 años. En aquellos con un rango de edad comprendido entre los 7 y los 16 años, se han encontrado en un 66% de las raíces. Encontrándose en la misma proporción los endófitos septados oscuros.

El presente trabajo fin de grado es un proyecto de investigación aplicada que pone las bases para la utilización de estos organismos en zonas contaminadas por metales pesados.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

---

Agerer, R. (1987-1995). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn, Schwäbisch Gmünd. Munich.

Álvarez Fernández, I. (1993). Micorrizas. I Congreso Forestal Español. Tomo V Lourizán.

Artetxe, U., Barrutia, O., & Duñabeitia, M. K. (2001). Empleo del abedul en la recuperación de terrenos contaminados por metales pesados. III Congreso Forestal Español. Tomo III. Granada.

Barragán, C., Espiñeira, M.F, & Casares, A. (2001). Uso de hongos ectomicorrícicos en la recuperación arbórea de escombreras procedentes de minas de carbón. Congreso Forestal Español. Tomo III. Granada.

Baxter, J. W., & Dighton, J. (2001). Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host–symbiont culture conditions. *New Phytologist*, 152(1), 139-149.

Becerra, A., & Cabello, M. (2008). Hongos micorrícico arbusculares presentes en bosques de *Alnus acuminata* (Betulaceae) de la yunga argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 43(3-4), 197-203.

Becerra, A., Zak, M. R., Horton, T. R., & Micolini, J. (2005). Ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* from Calilegua National Park (Argentina). *Mycorrhiza*, 15(7), 525-531.

Becerril, J. M., Barrutia, O., Plazaola, J. G., Hernández, A., Olano, J. M., & Garbisu, C. (2007). Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Revista Ecosistemas*, 16(2).

B.O.E. (1998). Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos.

B.O.E. (2005). Real Decreto 9/2005, de 14 de enero por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y sus criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

B.O.P.A. (2014). Resolución de 20 de marzo de 2014, de la Consejería de Fomento, ordenación del Territorio y Medio Ambiente, por la que se establecen los niveles Genéricos de Referencia para metales pesados en suelos del Principado de Asturias.

Brooks R.R. (1998) *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. Oxon, UK: CAB International.

Brundrett, M.C. & Abbott, L.K. (1991). Roots of jarrah forest plants. I. Mycorrhizal associations of shrubs and herbaceous plants. *Austral J Bot.* 39:445-457.

Brundrett, M.C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 79:473-495.

Brundrett, M.C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil.* 320:37-77.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Groveg, T., & Malajczuck, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *ACIAR Monograph* 32. 374 pp.

Ceballos, L & Ruíz de la Torre, J. 2001. Árboles y Arbustos. Fundación Conde del Valle Salazar. Madrid. 512 pp.

Del Val, C., Barea, J. M, & Azcon-Aguilar, C. (1999). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microb.* 65:718-723.

Díaz, T.E. y Vázquez, A. (2004). Guía de los bosques de Asturias. Ed. Trea SL.

Egger, K.N. (1995). Molecular analysis of ectomycorrhizal fungi communities. *Can J Bot.* 73:1415-1422.

Fernández-Miranda Cagigal, E. (2014). Hongos ectomicorrícicos de plantas leñosas en terrenos degradados de Asturias por actividad minera e industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.

Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., Tamés, RS. (2008). Cadmiun accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environ Pollut.* 152:522-529.

Frank, A.B. (1885). Uber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäum durch unterirdische Pilze. *Ber Dstch Bot Ges* 3:128-145.

Gadd, G.M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 3:3-49.

Gallaud, I. (1905). Études sur les mycorrhizes endophytes. *Rev Gén Bot.* 17:5-48.

Gerdemann, J.W. & Nicolson, T.H. (1963). Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc.* 46:235-244.

Goodman, D.M., Durall, D.M., Trofymow, J.A., & Berch, S.M. (1996). A manual of concise descriptions of north american ectomycorrhizae. Mycologue Publications, and the Canada -BC Forest Resource Development Agreement, Pacific Forestry Centre, Victoria, B.C.

Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes-are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza.* 11:207-211.



López, M. J. F., Álvarez, P. Á., Anta, M. B., & Cámara, A. (2012) *Betula celtiberica* Rothm. et Carvalho et Vasc., *Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.

Espiñeira, M. F., Navarro-Aviñó, J. P., Alonso, I. A., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista Ecosistemas*, 16(2).

Massensini, A.M., Bonduki, V.H.A., Tótola, M.R., Ferreira, F.A., & Costa, M.D. (2014). Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants. *Mycorrhiza*. 24:53-159.

Montero, G., Cisneros, O. & Cañellas, I 2003. Manual de selvicultura para plantaciones de especies productoras de madera de calidad. 284 pp.

Morton J.B. (1988). Taxonomy of mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon*. 32:267-324.

Niess, D.H. (1999). Microbial heavy resistance. *Applied Microbio. Biotech.* 51.730-750.

Palacios, Y. M; Palfner, G. & Hernández, C.E. (2012) Comunidad ectomicorrícica en una cronosecuencia de *Pinus radiata* (Pinophyta: Pinaceae) de la zona de transición climática mediterráneo-templada de Chile central. *Rev. chil. hist. nat.* vol.85, n.1

Perez-Naranjo, J. C. (2009). Dark septate and arbuscular mycorrhizal fungal endophytes in roots of prairie grasses. Doctoral dissertation, University of Saskatchewan Saskatoon.

Peterson R.L., Wagg, C., Pautler, M. (2008). Associations between microfungi endophytes and roots: do structural features indicate function?. *Botany*. 86:445-456.

Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). of infection. *Transactions of the British mycological Society*: 55(1), 158-181.

Pollard, JA, Powell, KD, Harper, FA & Smith, JAC. (2002) The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 539-566.

Prasad, M N V (Editor). (2004). *Heavy Metal Stress in Plants. From biomolecules to ecosystems*. Second edition. Springer.

Reddy, K. R., Admas, J. F., & Richardson, C. 1999. Potential technologies for remediation of Brownfield. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 3 (2): 61-68.

Rivas-Martínez, S., Díaz, T.E., Fernández- González, J., Izco, J., Loidi, M.L. & Penas, A. (2002). Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. *Itinera Geobotanica*, 15(2): 433 – 922.

Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 319-343.

Tommerup, I.C. (1992). Methods for the study of the population biology of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K. (Eds.). *Methods in Microbiology*. Vol. 24. *Techniques for the Study of Mycorrhiza*. Academic Press, London, pp. 23-51.








Villarino Urtiaga, J.J. (2012). El abedul. Guía de silvicultura. Producción de madera de alto valor. AFG

Weast, R. C., Astle, M. J., & Beyer, W. H. (1984): *CRC handbook of chemistry and physics*. Florida.






## 6. ANEXOS

### 6.1. ANEXO I

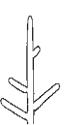








#### Tipo de ramificación:

						
Monopodial-pinnada	Monopodial-piramidal	Dicotomicas	Tuberosas	Irregular	No ramificada	Coraloides

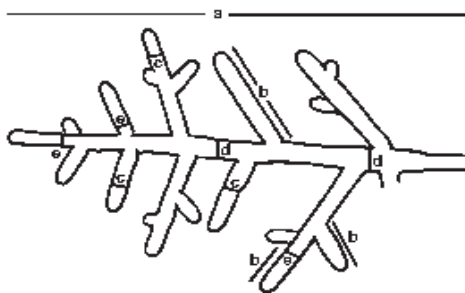
#### Forma:

				
Derecha	Moldeada	Club-shaped	Tortuosa	Doblada, inclinada

#### Textura:

								
Lisa	Reticulada	Granulosa	Tuberculosa	Lanosa	Algodonosa	Aterciopelada	Fibrosa	Espinosa

#### Dimensiones:



- a = longitud del sistema =
- b = longitud de la punta =
- c = ancho de la punta =
- d = ancho del eje mayor =
- e = ancho de la base de punta =

#### Color:

#### Lustre:




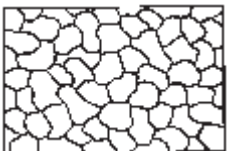
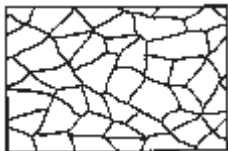
- Mate:
- Brillante:
- Reflectante:

#### Observaciones:

(Agerer, R. (1990) y Goodman, D.M. *et al.* (1996))

**6.1. ANEXO II**

**Estructura del manto:**

				
Prosenquima deshilachado	Prosénquima en estructura de red	Pseudoparenquima en estructura de red	Pesudoparenquima irregular	Pseudoparenquima regular

**Extensión de la red de Hartig:**

**Ornamentación:**

- Cristaloide:
- Verrucosa:
- Globular:

**Observaciones:**

(Goodman, D.M. *et al.* (1996) e Ingleby, K. *et al.* (1990))