



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biogeociencias

**Análisis de la diversidad fúngica en rizosferas de  
ecosistemas Cantábricos**

Tesis doctoral

Norma Alas Gutiérrez

Junio, 2024



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biogeociencias

**Análisis de la diversidad fúngica en rizosferas de  
ecosistemas Cantábricos**

Tesis doctoral

Autora:

Norma Alas Gutiérrez

Directores:

Dr. D. Pedro Álvarez Álvarez

Dra. Dña. Elena Fernández-Miranda  
Cagigal

Junio, 2024



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Análisis de la diversidad fúngica en rizosferas de ecosistemas Cantábricos.	Inglés: Root fungal diversity analysis in Cantabrian ecosystems.
2.- Autor	
Nombre: Norma Alas Gutiérrez	
Programa de Doctorado: Biogeociencias.	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado (Universidad de Oviedo).	

### RESUMEN (en español)

Los hongos juegan un papel fundamental en el buen funcionamiento de los ecosistemas. Como saprófitos son esenciales en la regulación del ciclo de los nutrientes; como patógenos influyen en la supervivencia de ciertos componentes del ecosistema y, como simbioses, se considera que son esenciales en la vida de las plantas desde el comienzo de la colonización de éstas sobre la Tierra. Algunos autores consideran que podrían existir unos 10 millones de especies de hongos, conociéndose en la actualidad unas 155.000, lo que pone de manifiesto el grado de implicación que estos organismos tienen en el desarrollo de la vida sobre la Tierra.

En este trabajo consideramos que es esencial el conocimiento de la identidad de los organismos fúngicos que tienen como nexo de unión el habitar en la rizosfera de las diversas especies vegetales que se desarrollan en ecosistemas cantábricos por ello, mediante técnicas de análisis molecular (DNA Metabarcoding) se ha realizado una identificación completa de los hongos asociados a especies de pastizal que se desarrollan en zonas alpinas de la Cordillera Cantábrica y a robledales atlánticos localizados, también, a lo largo de la Cordillera Cantábrica.

Con el objetivo de conocer la comunidad fúngica de las zonas de pastizal alpino se seleccionaron 7 especies herbáceas representativas en dos localizaciones: se recolectó el sistema radical de *Armeria duriaei*, *Luzula caespitosa* y *Thymus praecox* en comunidades ácidas localizadas en la Zona de Especial Conservación (ZEC) San Emiliano y *A. cantabrica*, *Anthyllis vulneraria*, *Carex sempervirens* y *T. praecox* en calcáreas del Parque Nacional Picos de Europa. Identificándose en la población de Picos de Europa la presencia, en menor o mayor grado, de 422 especies, 341 géneros, 173



familias, 74 órdenes, 24 clases y 7 filos siendo, en San Emiliano de 223 especies, 189 géneros, 123 familias, 63 órdenes, 24 clases y 7 filos.

En el caso de los robledales atlánticos, se seleccionaron 3 parcelas de muestreo localizadas en el Parque Natural (PN) de Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias, PN de Redes y la ZEC Ancares, estudiándose el sistema radical de 12 ejemplares de *Quercus petraea*. Se analizaron aproximadamente 28 m de raíz identificándose 11 tipos de ectomicorrizas diferentes, confirmándose, mediante los análisis moleculares la coexistencia de diversas especies fúngicas en la misma punta.

En el conjunto de los sistemas radicales de roble analizados se identificó la presencia, en menor o mayor grado, de 298 especies, 249 géneros, 141 familias, 69 órdenes, 20 clases pertenecientes a 7 filos. Siendo la parcela que presenta una mayor diversidad la localizada en la ZEC de Ancares seguida por la del PN Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias y, por último, la del PN de Redes.

### RESUMEN (en Inglés)

The role of fungi in ecosystems is essential. They help regulate nutrient cycling as saprophytes, influence the survival of certain ecosystem components as pathogens, and play a pivotal role as symbionts in plant life. Some experts estimate that there could be approximately 10 million species of fungi, with approximately 155,000 currently known species. This underscores the significant impact that these organisms have on life on Earth.

We believe that it is important to identify specific fungal organisms that live in the rhizosphere of different plant species in Cantabrian ecosystems. We used molecular analysis techniques (DNA Metabarcoding) to fully identify the fungi associated with grassland species in the alpine areas of the Cantabrian Mountains and Atlantic oak forests located in the Cantabrian Mountains.

The fungal communities in alpine grassland areas were studied by collecting the root systems of seven representative herbaceous species from two different locations. The root systems of *Armeria duriaei*, *Luzula caespitosa*, and *Thymus precox* were collected from acidic communities located in the San Emiliano Special Area of Conservation (SAC). In contrast, *A. cantabrica*, *Anthyllis vulneraria*, *Carex sempervirens*, and *T. precox* root systems were collected from calcareous areas of Picos de Europa National Park. The population of Picos de Europa contained 422 species, 341 genera, 173 families, 74 orders, 24 classes, and seven phyla, whereas the population in San Emiliano contained 223, 189 genera, 123 families, 63 orders, 24 classes, and seven phyla.





Universidad de Oviedo

In the case of the Atlantic oak forests, we conducted a study in three sampling plots located in the Natural Park (NP) of Fuentes del Narcea, Degaña and Ibias, Redes NP, and Ancares SAC. We focused on studying the root system of 12 *Quercus petraea* specimens, analyzing approximately 28 m of roots. Our analysis identified 11 different types of ectomycorrhizae and confirmed the coexistence of several fungal species at the same tip through molecular analysis.

We found a diverse range of species, genera, families, orders, and classes belonging to 298 species, 249 genera, 141 families, 69 orders, 20 classes, and seven phyla within the oak root systems studied. The plot with the greatest diversity is in the Ancares SAC, followed by the Fuentes del Narcea, Degaña, Ibias NP, and Redes NP.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN BIOGEOCIENCIAS**

## AGRADECIMIENTOS

Después de todos los inconvenientes surgidos, que no fueron pocos, llegué al final del camino. Las circunstancias han hecho que el llegar hasta aquí no haya supuesto una travesía fácil y quisiera dar las gracias a todos aquellos que me han ayudado.

En primer lugar, quería dar las gracias a mis directores, el Dr. Pedro Álvarez-Álvarez y la Dra. Elena Fernández- Miranda. ¿Qué habría hecho yo sin vosotros? Nunca os podré agradecer lo suficiente el siempre estar ahí para mí. Tengo muy claro que, sin vosotros, vuestros ánimos, consejos, desvelos, vuestra guía... no estaría escribiendo este apartado. Espero que estéis muy orgullosos de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Ordás y la Dra. Candela Cuesta por dejarme utilizar su laboratorio y solventar todas las dudas que me surgían.

Al Dr. Marcos Viejo y, por extensión, a todo el departamento del Área de Fisiología Vegetal de la USC, por su inestimable ayuda y por hacerme sentir como una más. Gracias Marcos por tu inestimable ayuda.

Al Dr. Borja Jiménez Alfaro por darme la oportunidad de colaborar en uno de sus estudios, el apoyo económico y por la confianza depositada en mí. Gracias a esto una parte de este trabajo no se hubiera llevado a cabo.

Al Dr. José Carlos Pérez por su ayuda y el estar siempre disponible para solventar dudas. Muchas gracias por atreverte a formar parte de nuestra locura.

Quería agradecer al Proyecto COMFOR-SUDOE que fue uno de los aspectos determinantes en la elaboración de esta tesis. Gracias a los recursos financieros se elaboró una parte muy importante de esta investigación. A nivel laboral, me permitió formar parte de un equipo de trabajo internacional con todos los aprendizajes que ello supone.

A la Fundación Oso Pardo por contar conmigo para formar parte de su equipo y ser una de las privilegiadas que disfrutan con su trabajo. En especial, se lo quería agradecer a Elías Suarez.

A la responsable del programa de doctorado, la Dr. Aída González. Muchas gracias por tu implicación y valiosa ayuda.

A mi familia, sin ella yo no estaría haciendo esto que me gusta tanto. A Javi, gracias por apoyarme para que mis alas sigan volando.

A Jimena, lo mejor que me ha pasado en la vida. No cambiaría nada del mundo por tus “¡Te quiero mami!”.

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AM</b>	Micorrizas arbusculares.
<b>ASV</b>	Variante de secuencia de amplicón.
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search.</i>
<b>BP</b>	Pares de bases.
<b>CE</b>	Conductividad eléctrica.
<b>CHM</b>	Modelo de cobertura de la vegetación.
<b>CICE</b>	Capacidad de intercambio catiónico.
<b>CNM</b>	<i>Common mycorrhizal network</i>
<b>DSE</b>	Endófito septado oscuro.
<b>DTM</b>	Modelo digital del terreno.
<b>EcM</b>	Ectomicorríza.
<b>ErM</b>	Micorrizas ericoides.
<b>EUNIS</b>	Sistema Europeo de Información sobre la Naturaleza.
<b>FAA</b>	Etanol- Formol- Ácido acético.
<b>INSDC</b>	<i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration.</i>
<b>ITS</b>	<i>Internal Transcribed Spacer.</i>
<b>LiDAR</b>	<i>Light Detection and Ranging.</i>
<b>MDDDB</b>	<i>MycoDiversity DataBase.</i>
<b>MO</b>	Contenido en materia orgánica.
<b>NDVI</b>	Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada.
<b>NIR</b>	Infrarrojo cercano.
<b>OrM</b>	Micorrizas orquideides.
<b>OTU</b>	<i>Operational Taxonomic Units.</i>

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PN</b>	Parque Natural.
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.
<b>SRA</b>	<i>NCBI Sequence Read Archive.</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>ZEC</b>	Zona Especial Conservación.

## ÍNDICE

1. Introducción general y definición de objetivos.....	1
1.1. Introducción general.....	2
1.2. Asociaciones Micorrícicas.....	5
1.3. Técnicas de estudios de hongos: Avances en la era Molecular.....	16
1.4. Principales bases de datos en el estudio de hongos.....	18
1.5. Definición de objetivos.....	20
1.6. Bibliografía.....	21
2. Diversidad fúngica en raíces y rizosferas de especies pertenecientes a sistemas de pastizal alpino.....	27
2.1. Introducción.....	28
2.2. Material y Métodos.....	29
2.2.1. Localización de las zonas de estudio.....	29
2.2.1.1. Características de las comunidades vegetales.....	29
2.2.1.2. Características edafológicas.....	30
2.2.2. Selección de especies para el análisis de la diversidad fúngica.....	31
2.2.3. Toma de muestras radiculares.....	31
2.2.4. Descripción microscópica.....	31
2.2.5. Extracción de DNA, DNA metabarcoding y asignación taxonómica.....	32
2.2.5.1. Extracción de DNA genómico.....	32
2.2.5.2. DNA Metabarcoding.....	32
2.2.5.3. Asignación taxonómica.....	34
2.2.6. Análisis de diversidad.....	35
2.3. Resultados.....	36
2.3.1. Diversidad fúngica.....	36
2.3.1.1. Histología.....	36

2.3.1.2. Asignación taxonómica.....	37
2.3.2. Diversidad alfa ( $\alpha$ ).....	48
2.3.2.1. Poblacional.....	48
2.3.2.2. Picos de Europa.....	50
2.3.2.3. San Emiliano.....	51
2.4. Discusión.....	52
2.5. Conclusiones.....	56
2.6. Bibliografía.....	58
3. Caracterización de las masas de roble atlántico.....	64
3.1. Introducción.....	65
3.2. Material y Métodos.....	68
3.2.1. Localización de las zonas de estudio.....	68
3.2.2. Inventario y caracterización dasométrica.....	68
3.2.3. Inventario multiespectral y LiDAR.....	69
3.2.4. Inventario de flora.....	69
3.2.5. Producción de bellota.....	70
3.2.6. Análisis de suelos.....	71
3.3. Resultados.....	71
3.3.1. Inventario y caracterización dasométrica.....	71
3.3.2. LiDAR.....	75
3.3.3. Multiespectral.....	78
3.3.4. Inventario de flora.....	79
3.3.5. Producción de bellota.....	83
3.3.6. Análisis de suelos.....	85
3.4. Discusión.....	87
3.5. Conclusiones.....	90

3.6. Bibliografía.....	92
4. Diversidad fúngica de raíces y rizosfera de especies de roble atlántico.....	97
4.1. Introducción.....	98
4.2. Material y Métodos.....	99
4.2.1. Localización de las zonas de estudio.....	99
4.2.2. Muestreo de los sistemas radicales.....	99
4.2.3. Descripción macroscópica y microscópica.....	101
4.2.4. Ectomicorrizas (EcM).....	101
4.2.5. Micorrizas vesículo arbusculares y otros endófitos.....	102
4.2.6. Extracción de DNA genómico.....	102
4.2.7. DNA Metabarcoding.....	102
4.2.8. Análisis de diversidad.....	103
4.3. Resultados.....	104
4.3.1. Ectomicorrizas (EcM).....	104
4.3.1.1. Descripción morfológica, histológica y asignación taxonómica.....	104
4.3.1.2. Análisis de la diversidad y distribución.....	117
4.3.2. Histología.....	119
4.3.3. Diversidad fúngica obtenida a través de los análisis de ADN.....	119
4.3.3.1. Caracterización taxonómica.....	119
4.3.3.2. Análisis de diversidad.....	130
4.4. Discusión.....	133
4.5. Conclusiones.....	136
4.6. Bibliografía.....	139
Conclusiones.....	146
Anexos.....	147
Anexo 1.....	148

Anexo 2.....	153
Anexo 3.....	155
Anexo 4.....	157
Anexo 5.....	158





## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL Y DEFINICIÓN DE OBJETIVOS**

## 1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El auge de las técnicas moleculares, en especial, las relacionadas con los análisis filogenéticos mostrarían que la vida en nuestro planeta podría agruparse denominados, dominios (Woese et al., 1990). Este sistema clasifica a todos los organismos vivos en tres dominios principales (Figura 1.1):

- **Bacteria:** Incluye organismos unicelulares procariotas, que son células sin núcleo definido. Son muy diversos y se encuentran en una amplia variedad de entornos, desde el suelo hasta el agua y los cuerpos de los organismos multicelulares.
- **Archaea:** También son organismos procariotas, pero difieren de las bacterias en aspectos bioquímicos y genéticos. Muchas especies de Archaea son extremófilas, lo que significa que pueden sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH o salinidad.
- **Eukarya:** Incluye todos los organismos con células eucariotas, que tienen un núcleo definido y orgánulos membranosos. Este dominio abarca una amplia variedad de organismos, desde hongos y plantas hasta animales y protistas.

### Phylogenetic Tree of Life

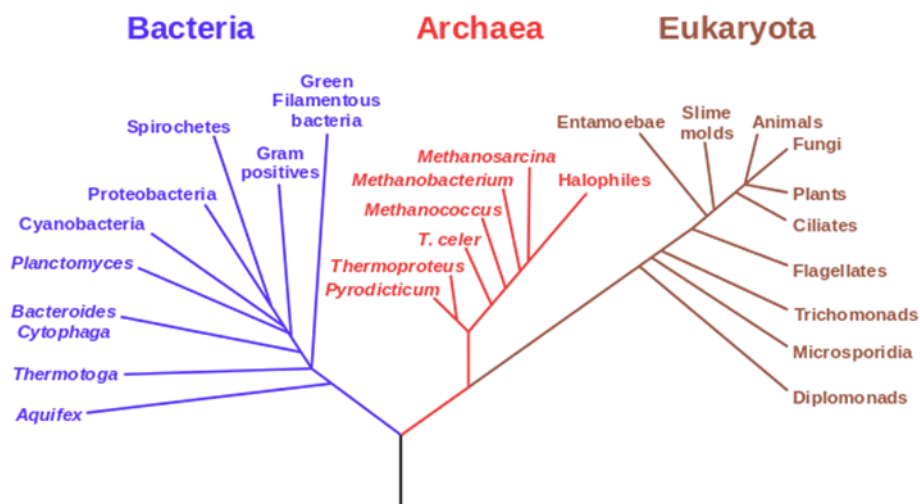


Figura 1.1: Dominios principales (Fuente: Woese et al., 1990).

Los hongos, considerados en su sentido más amplio, forman en realidad un conjunto de distintos grupos de seres vivos que no están emparentados entre sí y que pertenecen a 3 reinos distintos. En el esquema de los 7 reinos, los hongos ameboides formarían parte del Reino Protozoa (Figura 1.2). Los pseudohongos, aquellos que se creen que han evolucionado a partir de algún tipo de alga, son saprófitos o parásitos que suelen causar daños importantes en la agricultura, como el mildium, caracterizándose por poseer una pared celular compuesta mayoritariamente por celulosa (en lugar de quitina) estarían dentro el Reino Chromista (Figura 1.2) y, por último, los hongos verdaderos se agrupan dentro el Reino Fungi (Figura 1.2) y pertenecen al clado de los opistocontos (Opisthokonta), que también incluye a los animales, pero no a las plantas (Medina et al., 2003, Ocaña-Pallarès et al., 2023). Se estima que hace 1 billón de años, más menos 500

mill., una población de organismos eucariotas unicelulares acuáticos, que contenían zoosporas con flagelos posteriores se dividió en dos líneas: una dió lugar a los animales y otra a los hongos (Taylor & Berbee, 2006).

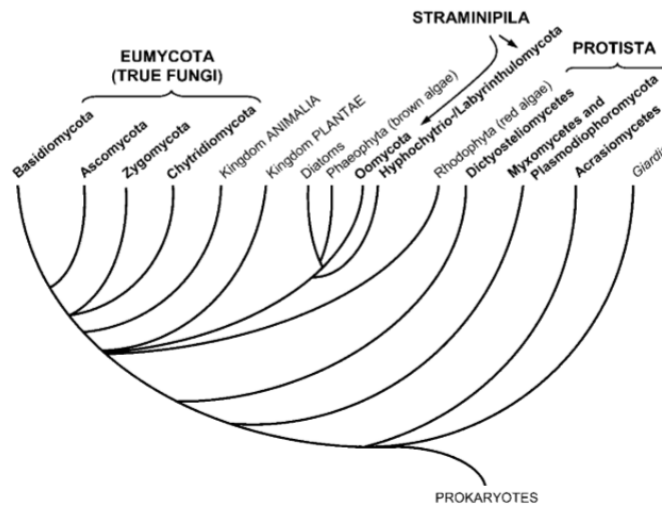


Figura 1.2: Esquema de relaciones filogenéticas de los hongos verdaderos (True fungi), pseudohongos (Straminipila) y ameboides (Protista). (Fuente: Webster & Weber, 2007).

La clasificación taxonómica de los hongos es muy compleja y está en continuo cambio (Xu, 2020). Constantemente se están datando nuevas especies, y a lo largo de la escritura del presente capítulo se ha podido constatar que entre el 26.03.2024 (Figura 1.3a) y el 20.05.2024 (Figura 1.3b) se añadieron 1335 nuevas especies al catálogo de hongos, siendo 155869 el último dato recogido (Catalogue of life, 2024). Algunos autores sugieren que podrían existir entre 1,5 – 5 mill. de especies, sin embargo, otros estiman que existirían unos 10 mill. de especies de hongos (Hawksworth & Lücking, 2017).

a Phylum	11	b Phylum	12
Class	59	Class	61
Order	268	Order	274
Family	1061	Family	1134
Genus	12578	Genus	12854
Species	154534	Section Botany	1
		Species	155869

Figura 1.3: Checklist de hongos: a) consulta del 26.03.2024; b) consulta de 20.05.2024. (Fuente: <https://www.catalogueoflife.org/>).

Los hongos juegan un papel relevante en los ecosistemas, dependiendo, en algunos casos, la supervivencia de ciertos de sus miembros de la presencia de estos organismos (Trappe & Luoma, 1992). Son los principales descomponedores de la materia orgánica muerta, devolviendo los nutrientes al ecosistema y participando de forma activa en su ciclo, en especial en elementos como el nitrógeno, fósforo y azufre (Boddy, 2016). Algunos pueden llegar a causar enfermedades en animales y plantas debido a su carácter

patógeno, lo que también influye en la dinámica del ecosistema (Boddy, 2016). Otra de las funciones principales que desempeñan los hongos en los ecosistemas es la relación endofítica que establecen con plantas, denominadas micorrizas si está es simbiótica.

Las asociaciones micorrícicas desempeñan una función determinante en la diversidad, funcionamiento y sobre todo en la estabilidad de los ecosistemas (Frank y Trappe, 2005). Por todo ello, la “capacidad” de los hongos para formar micorrizas con las plantas es una de las adaptaciones más notables y fascinantes en la vida en tierra, y gracias a ello, la presencia de micorrizas está ahora bien establecida en aproximadamente el 85% de las plantas existentes (Strullu-Derrien et al., 2018). Más de 250.000 especies de plantas presentan algún tipo de asociación simbiótica con hongos (Tedersoo et al., 2014; Martin & van der Heijden, 2024). La exploración minuciosa de las asociaciones micorrícicas, un tema de profundo interés en ciencias biológicas, ecológicas y agroforestales ha aportado conocimientos trascendentales en relación con su origen, desarrollo, diversidad tipológica y, sobre todo, los grupos de hongos que desempeñan un papel central en estas interacciones simbióticas.

Existe un amplio grupo de organismos fúngicos que habitan dentro de las raíces de diversos grupos de especies de plantas que no se consideran micorrizas, denominándose endófitos. Estos pueden encontrarse en todas las partes del sistema radicular, mientras que los hongos micorrícicos suelen limitarse a las raíces primarias no lignificadas. No es fácil categorizar con precisión sus funciones de estos hongos (Sivasithamparam, 1998), ya que este tipo de asociación puede ser beneficiosa o perjudicial para los hospedadores (Brundrett, 2004). La falta de una estructura (u órgano) específica donde se intercambien los nutrientes y la poca claridad de las funciones de la simbiosis hacen que los endófitos no se considere micorrizas (Brundrett, 2004).

Se han reconocido dos grandes grupos de hongos endófitos, que reflejan diferencias en cuanto a parentesco evolutivo, taxonomía, plantas hospedadoras y funciones ecológicas: los endófitos clavicipitáceos (endófitos C), que infectan algunas gramíneas; y los endófitos no clavicipitáceos (endófitos NC), que pueden recuperarse de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos y aliados, coníferas y angiospermas (Rodríguez et al., 2009). Dentro de la clase endófitos NC se encuentran los Endófitos Septados Oscuros (DSE), un grupo misceláneo de hongos que habitan en las raíces y que se definen como hongos ascomicetos conidiales o estériles que colonizan las raíces vivas de las plantas sin causar efectos negativos aparentes (Jumpponen, 2001).

Aunque los hongos DSE se encuentran prácticamente distribuidos globalmente y en todo tipo de plantas (Jumpponen & Trappe, 1998; Addy et al. 2005; Mandyam & Jumpponen, 2005; Sieber 2007; Sieber & Grünig, 2013; Jumpponen et al., 2017), siguen siendo sorprendentemente desconocidos. Esto se debe muy probablemente a su alta diversidad taxonómica y funcional. Son hongos polifiléticos (Ruotsalainen, 2018) y su ecología es en gran parte desconocida donde las hipótesis se basan en escasas evidencias (Jumpponen & Trappe, 1998), existiendo una controversia en cuanto a los efectos que pueden ocasionar sobre sus hospedantes, desde positivos, neutros o negativos (Jumpponen, 2001). Se han observado en familias de plantas con estrategias vitales muy



diferentes, lo que sugiere poca o ninguna especificidad de hospedador (Jumpponen & Trappe, 1998).

## 1.2. ASOCIACIONES MICORRÍMICAS.

Los hongos micorrícicos desempeñan una función importante (a veces determinante) en la absorción de macronutrientes, como fósforo, nitrógeno y azufre, así como de micronutrientes esenciales. Aunque las plantas cuentan con transportadores especializados para la absorción de macro y micronutrientes del suelo, fundamentales para su óptimo crecimiento, los socios fúngicos micorrícicos pueden desempeñar un papel significativo en este proceso, especialmente cuando las concentraciones de nutrientes en el suelo son bajas o escasas (Smith & Read, 2008).

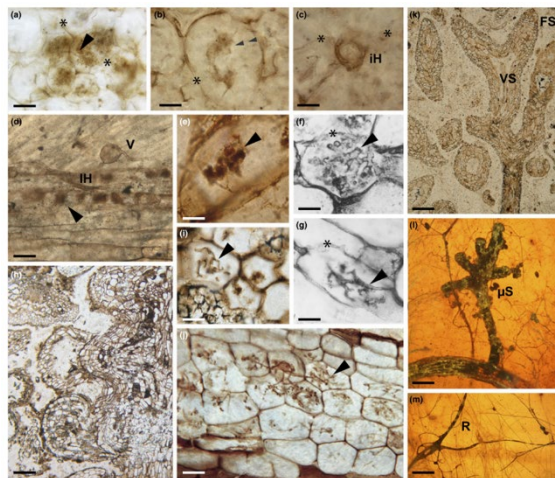


Figura 1.4: Protomicorrizas localizadas en el yacimiento de Rhynie Chert (Fuente: Strullu-Derrien et al., 2018).

Además, las asociaciones micorrícicas, desempeñan una función destacada en la resistencia de las plantas a condiciones ambientales adversas, y pueden inducir respuestas en plantas y ecosistemas ante los procesos de cambio climático (Mohan et al., 2014; Cosme, 2023). Por ejemplo, en un estudio realizado en un bosque tropical, se observó que las plantas micorrizadas presentaban una mayor supervivencia durante períodos de sequía extrema en comparación con las plantas no micorrizadas (Pereira et al, 2021). Esta investigación destacaba la importancia de las micorrizas en la mejora de la resiliencia de las plantas frente a situaciones de estrés ambiental, subrayando su relevancia en la conservación de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas.

La capacidad de los hongos para formar micorrizas con las plantas emerge como una de las adaptaciones más notables y fascinantes en la vida terrestre. El análisis de registros fósiles, en particular aquellos que datan hace aproximadamente 400 millones de años, ha arrojado luz sobre la existencia de asociaciones simbióticas entre las primeras plantas colonizadoras y hongos, como se ha evidenciado en estudios realizados sobre restos descubiertos en el yacimiento paleontológico de Rhynie Chert (Smith & Read, 2008; Honrubia, 2009; Brundrett & Tedersoo, 2018; Strullu-Derrien et al., 2018). En estas asociaciones, se manifiestan elementos morfológicos que guardan notable similitud con las AM contemporáneas, cuyos organismos fúngicos responsables pertenecen al filo

Glomeromycota (Figura 1.4). Por lo tanto, se postula que estas antiguas conexiones se “erigen” como los antecesores de las asociaciones endomicorrícicas (Smith & Read, 2008; Honrubia, 2009; Brundrett & Tedersoo, 2018; Strullu-Derrien et al., 2018).

El término empleado en la actualidad para denominar este tipo de relaciones simbióticas fue propuesto por el botánico alemán A. Bernhard Frank en 1885. Frank definió esta simbiosis entre las raíces (*rhizos*) de las plantas y ciertos grupos de hongos (*mycos*) del suelo como "micorriza" (*Mykorrhizen*). En esta forma de relación simbiótica, ambas partes, es decir, la planta y el hongo, obtienen beneficios importantes mutuos y participan en el transporte y absorción de nutrientes (Frank, 2005). Posteriormente, Brundrett (2004) proporcionó una definición más amplia de dicho término, la cual engloba la totalidad de la diversidad de las micorrizas, incluyendo otras asociaciones entre hongos y plantas. Según Brundrett, una micorriza “*es una simbiosis esencial para uno de sus integrantes, que implica la interacción entre un hongo especializado en la vida en el suelo y las plantas, y una raíz (u otro órgano que entre en contacto con el sustrato) de una planta viva*”. En este contexto, el hongo asume un rol principal en el transporte de nutrientes (carbohidratos), y el establecimiento de las micorrizas se efectúa en un órgano especializado de la planta, donde se genera un contacto, que podemos denominar como “íntimo”, fruto del desarrollo sincronizado de ambos simbioses (Brundrett, 2004).

En la actualidad, se reconoce la existencia de cuatro grupos primordiales de micorrizas, cada uno con características particulares y beneficios únicos: las micorrizas arbusculares (AM), las ectomicorrizas (EcM), las micorrizas ericoides (ErM) y las micorrizas orquideoideas (OrM) (Brundrett & Tedersoo, 2018). Estos grupos representan diferentes tipos de asociaciones simbióticas entre hongos y plantas, cada uno adaptado a condiciones específicas de suelo y planta hospedadora. Las EcM, como un tipo de micorriza externa a las células de la raíz, forman una red compleja de hifas alrededor de la misma, común en árboles forestales y plantas leñosas. Por otro lado, las endomicorrizas, también conocidas como micorrizas AM, establecen una asociación intracelular en las células de la raíz de las plantas hospedadoras. Basándonos en la investigación de Brundrett (2004, 2015, 2017), Smith & Read (2008) y Brundrett & Tedersoo (2018), a continuación, se detallarán las características principales de estas complejas relaciones micorrícicas, lo que permitirá comprender mejor cómo cada tipo de micorriza contribuye a la nutrición, a la salud de las plantas en diversos entornos ecológicos, y a la futura capacidad de adaptación y resiliencia de plantas, árboles y ecosistemas frente a los procesos de cambio climático:

## Micorrizas arbusculares (AM).

Las AM establecen una asociación mutualista entre los hongos y las raíces de las plantas, caracterizada por el desarrollo de una intrincada red de hifas que mejora la absorción de nutrientes, en especial fósforo en el suelo. Se caracterizan por la presencia de una colonización interna de los sistemas radicales cuyo elemento diferencial es la presencia de unos orgánulos, únicos en este tipo de asociaciones, denominados *arbusculos* que se suelen localizar dentro de las células corticales de los hospedadores. Junto con estos orgánulos, suele ser frecuente la aparición de unas estructuras de almacenamiento de recursos fúngicos denominadas *vesículas*. Las hifas desarrolladas a partir de una espora germinada producen un apresorio en la epidermis de la raíz (Figura 1.5), penetrando y produciéndose una colonización intrarradical, tanto de manera intercelular como intracelular, culminando con el desarrollo de arbusculos altamente ramificados dentro de las células corticales internas (Bonfante & Genre, 2010; Lanfranco et al., 2016).

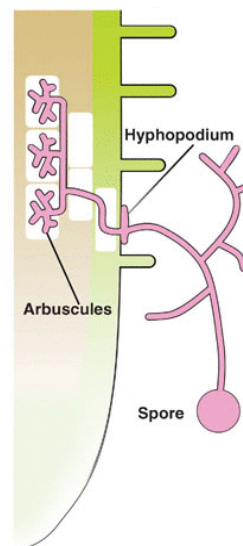


Figura 1.5: Colonización de AM. (Fuente: Lanfranco et al., 2016).

Para que este tipo de asociaciones se consideren “efectivas”, es decir, que existe realmente un intercambio de nutrientes entre hospedante y hospedador, es necesario garantizar la presencia de arbusculos, puesto que, se considera que es a través de estos orgánulos donde se produce el principal intercambio de nutrientes, aunque este hecho aún está siendo analizado y es motivo de controversia y discusión científica. En este sentido, Brundrett (2004) hizo un análisis específico de estos desacuerdos y discusiones.

Las AM son el tipo de asociaciones micorrícicas más abundantes, estando presentes en aproximadamente el 72% de las plantas vasculares, el 67% de los helechos y en el 25% de los briófitos cuyos organismos fúngicos responsables pertenecen en su totalidad al filo Glomeromycota (Hijri & Bâ, 2023). Desempeñan un papel crucial en la optimización del crecimiento y la nutrición de las plantas, especialmente en entornos donde el fósforo es limitado (Wahab et al, 2023). Estos efectos beneficiosos de las AM

en las plantas son conocidos por ser más evidentes cuando se establecen relaciones simbióticas en las etapas más tempranas del crecimiento de la planta (Niemi et al., 2004).

Estas relaciones (Figura 1.6) desempeñan un papel esencial en la comprensión de la diversidad y funciones de las micorrizas en el entorno natural, y sirven como recurso inestimable para los investigadores y estudiosos del campo. La información sobre la simbiosis AM se puede aplicar en escenarios del mundo real en agricultura sostenible y en conservación ambiental y forestal de varias formas:

- *Mejora de la absorción de nutrientes:* especialmente el fósforo, puede llevar al desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles que dependan menos de los fertilizantes químicos. Esto puede reducir el impacto ambiental de los métodos de cultivo convencionales (Allen, 2007; Backer et al, 2018; Begum et al. 2019; Bhandana et al., 2021).
- *Salud del suelo:* Promover el uso de hongos AM en sistemas agroforestales puede contribuir a mejorar la salud y fertilidad del suelo. Al mejorar la disponibilidad de nutrientes y promover la estructura del suelo, pueden apoyar prácticas de manejo de tierras sostenibles (ud din Khanday et al., 2016; Lawrence et al., 2015; Begum et al. 2019).
- *Biodiversidad y productividad del ecosistema:* Reconocer la influencia de los microbios del suelo, como las AM, en la diversidad y productividad de las plantas proporciona información relevante para orientar los esfuerzos de conservación dirigidos a preservar los ecosistemas naturales. Al comprender el papel de estas relaciones simbióticas, se pueden desarrollar estrategias de conservación destinadas a proteger y mejorar la biodiversidad (Fändriks, 2017).
- *Resiliencia climática:* La incorporación del conocimiento sobre la simbiosis AM en las prácticas agrícolas puede contribuir a disponer de cultivos con mayor capacidad de adaptación y resiliencia ante procesos climáticos adversos. Por ejemplo, al mejorar la absorción de nutrientes y la salud de las plantas, estas relaciones pueden ayudar a los cultivos a resistir los impactos ambientales asociados con el cambio climático (Sosa-Hernández et al, 2018; Mathur et al., 2023).

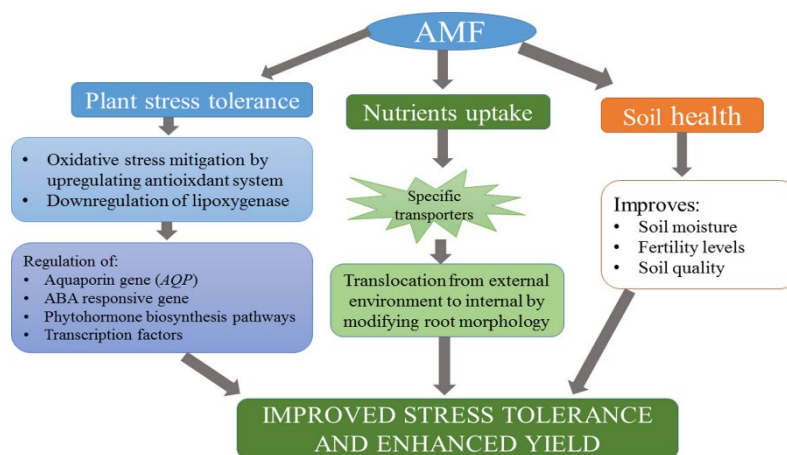


Figura 1.6: Representación diagramática de las funciones micorrícicas para regular diversos procesos en el ecosistema y promover el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés abiótico (Fuente: Begum et al., 2019).



## **Ectomicorrizas (EcM).**

Las EcM, una forma de asociación simbiótica entre hongos y las raíces de las plantas, sobresalen por su papel en la absorción de nutrientes y en el mantenimiento de la salud del ecosistema (Tibbett and Sanders, 2002). Es notable que la gran mayoría de las plantas terrestres establecen relaciones simbióticas con hongos micorrícicos para potenciar su crecimiento y desarrollo. Por todo ello, estos hongos, que residen en el suelo, desempeñan un papel clave en los ecosistemas terrestres al regular los ciclos de nutrientes y carbono, así como al influir en la estructura del suelo y en la multifuncionalidad del ecosistema.

El aporte de los hongos micorrícicos es fundamental, ya que proporcionan hasta un 80% del nitrógeno y fósforo necesarios para el desarrollo de las plantas. Muchas especies vegetales dependen intrínsecamente de estas asociaciones simbióticas para su crecimiento, adaptación y supervivencia en diferentes condiciones ambientales (van der Heijden et al., 2015). Además de facilitar la absorción de nutrientes, estas EcM contribuyen a la resistencia de las plantas ante el estrés, mejoran la estructura del suelo y favorecen la diversidad y estabilidad de los ecosistemas terrestres, especialmente en un contexto de cambio climático. De este modo, las interacciones entre las plantas y los hongos micorrícicos revelan su importancia integral en la dinámica y funcionalidad de los ecosistemas.

Las EcM establecen una “asociación exterior” a las células de la raíz, formando una red compleja de hifas alrededor de la misma. Este tipo de micorriza es especialmente común en árboles forestales y plantas leñosas. En las EcM, las hifas fúngicas rodean y penetran la capa más externa de las raíces, formando el manto y la Red de Hartig, distintiva de estas asociaciones. A través de esta extensa red de hifas, los hongos EcM pueden facilitar la absorción de nutrientes, en particular nitrógeno y fósforo, para las plantas asociadas.

Las EcM también son conocidas por la diversidad de hongos involucrados, que pertenecen a diferentes taxones dentro de los filos Basidiomycota y Ascomycota. Esta diversidad contribuye a la adaptabilidad y especificidad de estas asociaciones, ya que diferentes hongos EcM pueden asociarse con diferentes especies de plantas. Algunas de las principales aplicaciones prácticas de las EcM son (Sharma et al., 2017):

- *Silvicultura y Forestación:* Dada su asociación frecuente con árboles forestales, la comprensión de las EcM es esencial en la silvicultura, y, por supuesto, en programas de forestación. Estas micorrizas contribuyen a la salud y crecimiento de los bosques.
- *Restauración de Ecosistemas:* La introducción controlada de hongos EcM puede ser utilizada en proyectos de restauración de ecosistemas, especialmente después de disturbios ambientales o incendios forestales.
- *Agricultura de Plantas Leñosas:* En cultivos de plantas leñosas como árboles frutales, la promoción de asociaciones EcM puede mejorar la absorción de nutrientes y el rendimiento de los cultivos.
- *Suelos Degradados:* En áreas con suelos degradados, la introducción de hongos EcM puede contribuir a la mejora de la estructura del suelo y la disponibilidad de

nutrientes (Rashid et al., 2016), y además planificar estrategias de manejo sostenible y reducir el impacto negativo de los fertilizantes artificiales en el medio ambiente.

Al igual que con las AM, comprender y aplicar el conocimiento sobre las EcM tiene implicaciones significativas en la gestión sostenible de los recursos naturales, en la conservación y resiliencia de los ecosistemas forestales y, en la promoción de prácticas agrícolas y forestales más respetuosas con el medio ambiente.

### **Micorrizas ericoides (ErM).**

Las ErM representan un tipo específico de asociación simbiótica entre hongos y las raíces de plantas, particularmente adaptadas a suelos ácidos y pobres en nutrientes (Kohout, 2017; Vohník, 2020). Este tipo de micorrizas son especialmente significativas en la ecología de plantas pertenecientes a la familia Ericaceae, que incluye especies como brezos, arándanos y rododendros (Wei et al., 2022).

Estas micorrizas se han adaptado a entornos edáficos específicos, como suelos ácidos y de baja fertilidad, donde desempeñan un papel fundamental en la absorción de nutrientes esenciales, como nitrógeno y fósforo (Vohník, 2020; Wei et al., 2022). A diferencia de las descritas anteriormente, establecen una asociación intracelular en las células corticales de las raíces de las plantas hospedadoras. La formación de estructuras especializadas, como pelotas de hifas, caracteriza esta relación simbiótica. Estas pelotas de hifas penetran las células corticales, facilitando el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta (Vohník, 2020; Wei et al., 2022).

Las ErM desempeñan un papel fundamental en la adaptación de las plantas a suelos con escasos recursos, o difíciles, para las plantas. Incrementa la capacidad para mejorar la absorción de nutrientes, especialmente en condiciones de baja disponibilidad de fósforo y nitrógeno, mejora la germinación de las semillas y el enraizamiento de esquejes, además la simbiosis también aumenta la tolerancia de la planta a diversos factores de estrés abiótico (como suelos ácidos y pobres en nutrientes, así como la resistencia a infecciones patógenas (Wei et al., 2022). De esta forma promueven, y benefician significativamente el crecimiento, permitiendo a las plantas hospedadoras expandir su rango de distribución, colonizando ambientes que de otro modo serían inhóspitos.

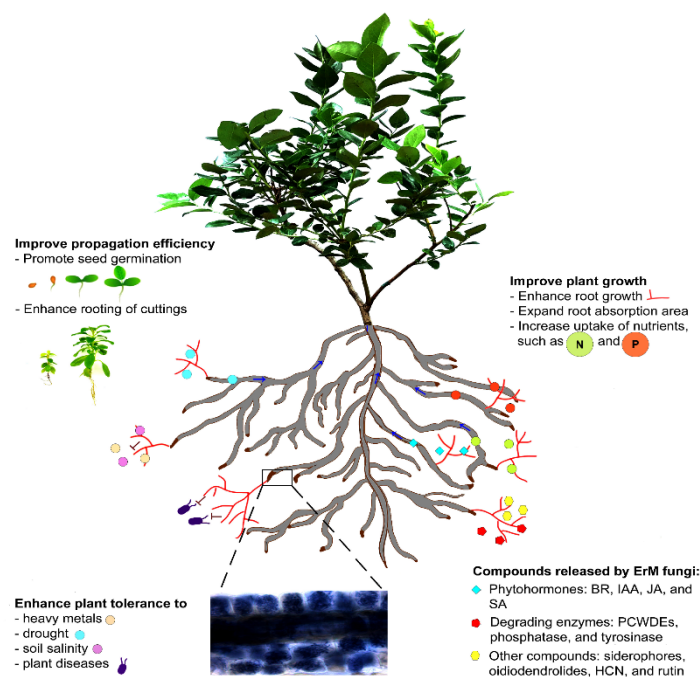


Figura 1.7: Ilustración esquemática de la simbiosis entre hongos ErM y plantas ericáceas (arándano), generando compuestos bioactivos que mejoran la germinación, enraizamiento, tolerancia a estreses y resistencia a patógenos, promoviendo el crecimiento (Fuente: Wei et al., 2022).

Las ErM tienen una serie de aplicaciones prácticas que se describen a continuación:

- *Agricultura en Suelos Ácidos*: Comprender y aplicar el conocimiento sobre las ErM puede ser beneficioso en la agricultura, especialmente en la producción de cultivos adaptados a suelos ácidos y pobres en nutrientes. Esto puede reducir la dependencia de fertilizantes químicos y mejorar la sostenibilidad agrícola.
- *Restauración de Ecosistemas Ácidos*: En proyectos de restauración de áreas degradadas o afectadas por la acidificación del suelo, la introducción controlada de ErM puede ser una estrategia efectiva para mejorar la salud del suelo y promover la recuperación vegetal.
- *Jardinería Ornamental*: En el cultivo de plantas ornamentales pertenecientes a la familia Ericaceae, como rododendros y brezos, la promoción de la asociación con ErM puede mejorar el crecimiento y la resistencia de estas plantas en entornos de jardinería.
- *Conservación de Especies Nativas*: Dada la importancia de las ErM en la adaptación de plantas nativas a suelos específicos, su conservación y promoción son determinantes en la protección de la biodiversidad y la preservación de ecosistemas naturales.

En resumen, las ErM representan una curiosa y específica forma de asociación simbiótica que influye en la adaptación, supervivencia y distribución de plantas en entornos desafiantes. El entendimiento de estas micorrizas tiene implicaciones significativas en la gestión sostenible de suelos y recursos naturales.

## Micorrizas orquideoides (OrM).

Las OrM también conocidas como micorrizas de orquídeas, constituyen una forma única de simbiosis entre hongos y plantas de la familia Orchidaceae, que incluye algunas de las flores más exquisitas y cautivadoras del reino vegetal (Smith & Read, 2008; Brundrett & Tedersoo, 2018). Estas asociaciones presentan características distintivas y propias que las diferencian de otros tipos de micorrizas, y su comprensión aporta valiosos conocimientos tanto en el ámbito científico como en aplicaciones prácticas.

Las OrM, como endosimbiosis distintiva, se caracterizan por la penetración de hifas fúngicas en las células de las orquídeas, dando lugar a estructuras fúngicas intracelulares rodeadas por la membrana de la orquídea. La interfaz planta-hongo sirve como el principal sitio de transferencia de nutrientes, un aspecto crucial en esta relación simbiótica. La investigación más reciente se centra en la transferencia de nutrientes en OrM, comparando su desarrollo y función con otros tipos de micorrizas. Sorprendentemente, se han identificado similitudes en las estructuras micorrícicas intracelulares entre las orquídeas y las plantas micoheterótrofas que forman AM, sugiriendo una posible evolución convergente, como respaldan los estudios de Dearnaley et al. (2016) y Perotto & Balestrini (2023). Esta idea gana fuerza actualmente, centrándose en el desarrollo y el funcionamiento de las estructuras fúngicas intracelulares (Figura 4), situándose en el núcleo de ambas endosimbiosis y comparando las espirales fúngicas formadas en OrM con los arbuscúlos altamente ramificados que se forman en la AM (Perotto & Balestrini, 2023).

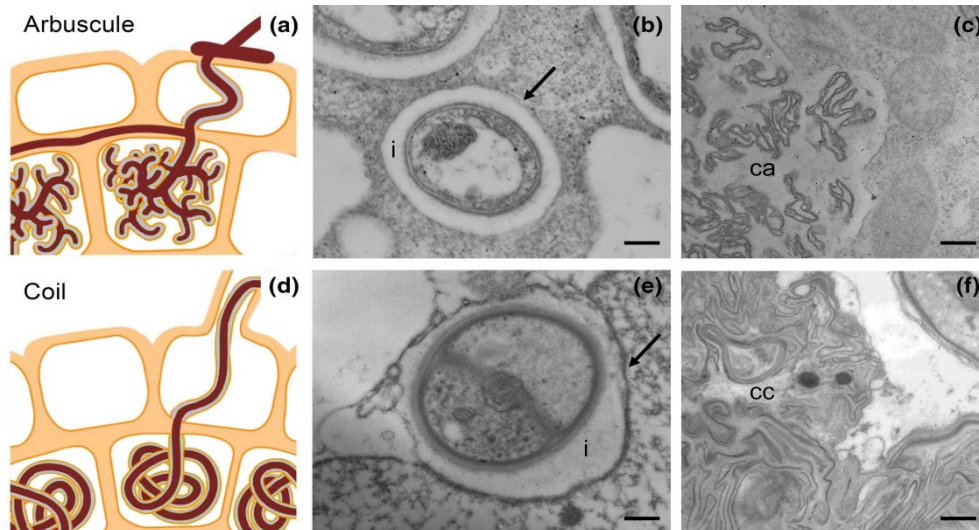


Figura 1.8: Simbiosis de AM (a,b,c) frente a estructuras intracelulares de OrM (d,e,f). (Fuente: Perotto & Balestrini, 2023).

Las principales diferencias entre las estructuras fúngicas intracelulares formadas en las OrM y las AM se destacan en Perotto & Balestrini (2023):

- **Morfología y Funcionamiento:** En OrM, las estructuras fúngicas intracelulares se conocen como *pelotones*, mientras que en AM se denominan arbuscúlos (Figura 1.8). Presentan diferencias notables en morfología y funcionamiento, por ejemplo, la más

compacta estructura de los pelotones puede estar relacionada con la eficiencia en la absorción de nutrientes y la protección de la simbiosis.

- *Intercambio de nutrientes:* La morfología y el funcionamiento de las estructuras fúngicas intracelulares en OrM y AM difieren en cuanto al intercambio de nutrientes. Aunque existen diferencias entre los pelotones de OrM y los arbusculos de tipo Arum en AM, la comparación entre las plantas de AM de tipo París y las plantas de OrM muestra más similitudes en las capacidades de transferencia de nutrientes.

- *Perspectiva Evolutiva:* Las similitudes en la forma y función de las estructuras fúngicas intracelulares en AM de tipo París y OrM sugieren una posible evolución convergente de las estructuras fúngicas en plantas micorrícicas mioheterótrofas. Se necesitan más estudios en este sentido para confirmar esta hipótesis, y explorar los mecanismos detrás del desarrollo y la función de estas estructuras

Este tipo de asociaciones presentan unas características específicas, según Smith & Read (2008) y Brundrett & Tedersoo (2018) serían: a) son conocidas por su alta especificidad donde cada especie de orquídea tiende a asociarse con un tipo particular de hongo, lo que hace que estas relaciones sean únicas; b) a diferencia de algunas otras micorrizas, la asociación no siempre es esencial para la supervivencia de la planta., pero la asociación puede ser decisiva para su desarrollo y floración, especialmente en condiciones ambientales desafiantes y c) un aspecto notable de las OrM es su papel fundamental en la germinación de las semillas de orquídeas. En muchos casos, las semillas de orquídeas requieren la presencia del hongo micorrícico para iniciar su desarrollo y establecerse como plántulas.

Las OrM desempeñan funciones complejas y trascendentales en la vida de las orquídeas, influenciando en aspectos clave como el crecimiento, desarrollo y reproducción. Además, su comprensión y estudio tienen aplicaciones prácticas y en el campo de la gestión agroforestal (Yang et al., 2023):

- *Cultivo de Orquídeas:* En la horticultura y floricultura, el conocimiento de las OrM es importante para el cultivo exitoso de orquídeas. La aplicación controlada de hongos micorrícicos específicos puede mejorar la salud y floración de las orquídeas cultivadas.

- *Conservación de Especies Amenazadas:* Dada la especialización de estas micorrizas, su conservación y comprensión son necesarias para la preservación de orquídeas en peligro de extinción. Por ejemplo, diferentes estrategias de restauración y conservación pueden incorporar la reintroducción de hongos micorrícicos específicos en hábitats de orquídeas.

- *Investigación en los campos de la biología y ecología:* El estudio de las OrM contribuye significativamente a la comprensión de la biología y ecología de las orquídeas, permitiendo avances en la investigación científica y la mejora de técnicas de propagación, entre otros aspectos.

A modo de conclusión, las OrM representan una faceta asombrosa en las asociaciones simbióticas planta-hongo, mostrando la diversidad y complejidad de las adaptaciones evolutivas en el reino vegetal. Su estudio no solo enriquece el conocimiento

científico, sino que también tiene implicaciones prácticas en la conservación y cultivo de las apreciadas orquídeas.

### **Importancia de la simbiosis.**

Las simbiosis, entendidas como las asociaciones íntimas y mutuamente beneficiosas entre organismos, desempeñan un papel activo en la evolución y la supervivencia en nuestro planeta. Al explorar los beneficios fundamentales que estas relaciones ofrecen a los simbiotes, así como sus aplicaciones prácticas, se revela su importancia en diversas disciplinas (Bonfante et al, 2010; Lamabam et al., 2011; Berbee et al., 2017; Tsai et al., 2020; Hagh-Doust et al, 2022; Petel et al., 2022; Sun et al., 2023; Garrastatxu et al, 2024). Se podría concluir que se obtienen los siguientes beneficios:

- *Cooperación Evolutiva:* Las simbiosis impulsan la evolución al permitir la cooperación entre organismos para superar desafíos ambientales. Esta colaboración ha influido significativamente en la adaptación y la diversificación de las especies a lo largo del tiempo.
- *Optimización de Recursos:* La simbiosis optimiza la utilización de recursos, ya que los organismos simbióticos pueden compartir y acceder a nutrientes de manera más eficiente, lo que resulta en un beneficio conjunto para su desarrollo y crecimiento.
- *Adaptación a Condiciones Ambientales:* Los simbiotes pueden desarrollar adaptaciones específicas que les permiten prosperar en condiciones ambientales desafiantes. Esta capacidad de coadaptación mejora la supervivencia en entornos que podrían ser inhóspitos de manera individual.
- *Resiliencia ante Factores de Estrés:* Las asociaciones simbióticas brindan resiliencia ante factores de estrés, ya que los organismos pueden apoyarse mutuamente en situaciones adversas, como cambios climáticos o eventos extremos.

*Favorecimiento de la Biodiversidad:* La diversidad biológica se ve favorecida a través de las simbiosis, ya que estas asociaciones contribuyen a la adaptación y la coexistencia de diversas especies en un ecosistema.

### **Aplicaciones prácticas de las simbiosis.**

- *Agricultura y Silvicultura:* Comprender y aprovechar las simbiosis en la agricultura y silvicultura puede mejorar la productividad de los cultivos, reducir la dependencia de fertilizantes y contribuir a prácticas agrícolas y forestales sostenibles.
- *Restauración de Ecosistemas:* La introducción controlada de simbiotes específicos puede ser una estrategia eficaz en la restauración de áreas degradadas, contribuyendo a la salud del suelo y promoviendo la recuperación de la vegetación.
- *Horticultura y Floricultura:* En la horticultura y floricultura, el conocimiento de las simbiosis es esencial para el cultivo exitoso de plantas ornamentales, permitiendo prácticas más eficientes y sostenibles.
- *Investigación Científica:* El estudio de las simbiosis proporciona información valiosa para la investigación científica en biología y ecología, permitiendo avances en la comprensión de las interacciones entre organismos y su impacto en los ecosistemas.

- *Conservación de Especies Amenazadas:* Dada la importancia de las simbiosis en la adaptación y supervivencia de especies, su conservación y promoción son esenciales para la preservación de la biodiversidad y la protección de especies en peligro.

En conclusión, este resumen muestra que las simbiosis no sólo son fundamentales para la evolución biológica, sino que también tienen aplicaciones prácticas significativas en la gestión sostenible de recursos naturales, la agricultura, la restauración ambiental y la conservación de la biodiversidad. Para entender por qué las simbiosis son tan relevantes en el contexto de las asociaciones micorrícicas, es importante destacar los beneficios esenciales que brindan a los seres vivos involucrados. Estas relaciones mutuamente beneficiosas no solo han dejado una huella duradera en la evolución de la vida en nuestro planeta, sino que también han generado aplicaciones útiles en campos que van desde la agricultura hasta la recuperación del medio ambiente.

### **Impacto negativo de las micorrizas invasoras en los ecosistemas.**

En el informe del IPBES (2023) sobre Especies Exóticas Invasoras y su Control, se destaca la importancia de comprender y abordar el impacto de las micorrizas invasoras en los ecosistemas. Como acabamos de ver, en general las micorrizas son simbiontes beneficiosos que establecen una relación mutualista con las raíces de las plantas, facilitando la absorción de nutrientes y agua. Sin embargo, cuando ciertas micorrizas se vuelven invasoras, pueden desplazar a las especies nativas, alterar los ciclos naturales y afectar la biodiversidad local.

Para clasificar las micorrizas invasoras, se pueden considerar varios criterios, como su origen geográfico, su capacidad de colonización y su impacto en el ecosistema receptor. Algunas micorrizas invasoras pueden ser introducidas de manera accidental a través del comercio internacional de plantas, suelo o material vegetal, mientras que otras pueden expandirse rápidamente en nuevos hábitats y competir con las especies autóctonas por recursos.

Algunas medidas prácticas para evitar la introducción de micorrizas invasoras podrían incluir: a) establecer listas de especies de micorrizas invasoras conocidas y prohibir su importación o introducción en ciertas áreas; b) implementar programas de capacitación y concientización para identificar signos de presencia de micorrizas invasoras en plantas y suelos; c) mejorar la inspección visual en los puntos de entrada para detectar posibles portadores de micorrizas invasoras y, d) fomentar la colaboración con la industria hortícola y viveros para promover prácticas de producción libres de micorrizas invasoras.

Si bien los análisis de ADN pueden ser una herramienta poderosa para la identificación precisa de especies invasoras, es importante equilibrar la efectividad con la viabilidad práctica de implementar medidas de control. La combinación de enfoques prácticos y científicos puede ayudar a abordar los desafíos de manera más eficiente y efectiva en la gestión de las micorrizas invasoras.

Es fundamental implementar estrategias de monitoreo y control de las micorrizas invasoras para prevenir su propagación y minimizar sus efectos negativos en los

ecosistemas. Esto puede incluir medidas como la restauración de hábitats afectados, la aplicación de técnicas de bioseguridad en la importación de plantas y suelos, y la promoción de prácticas sostenibles de gestión de ecosistemas. La gestión de las micorrizas invasoras requiere una acción coordinada a nivel local, nacional e internacional, involucrando a científicos, gestores de ecosistemas, responsables de políticas y la comunidad en general. Al abordar este desafío de manera integral, se puede proteger la biodiversidad de los ecosistemas y promover la sostenibilidad ambiental a largo plazo.

### **1.3. TÉCNICAS DE ESTUDIOS DE HONGOS: AVANCES EN LA ERA MOLECULAR.**

Las técnicas moleculares han transformado por completo el campo de estudio de los hongos, permitiendo una identificación precisa y detallada. A continuación, se destacan algunas de las metodologías moleculares más relevantes utilizadas en la investigación de hongos (Martorelli et al., 2020; Tedersoo et al., 2022; Nilsson et al., 2023):

#### ***Secuenciación de ADN:***

La secuenciación del ADN ha revolucionado la identificación de hongos micorrícicos al permitir una caracterización precisa a nivel molecular al comparar las secuencias obtenidas con las bases de datos de referencia. Estableciéndose la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN nuclear ribosomal como un marcador de referencia para la identificación de especies de hongos. Esta técnica ha facilitado la detección de hongos en muestras ambientales, lo que ha contribuido a una mejor comprensión de su distribución y diversidad.

Este enfoque ha revolucionado la taxonomía y clasificación de estos organismos, superando las limitaciones de los métodos morfológicos tradicionales. La secuenciación de ADN también permite estudiar la diversidad genética y la evolución de los hongos micorrícicos en diferentes ambientes.

#### ***Metabarcoding:***

La técnica de *metabarcoding* implica la secuenciación de regiones específicas del ADN de múltiples especies presentes en una muestra. En el contexto de los hongos, esta metodología posibilita la identificación de la diversidad de especies en un entorno determinado. Esta metodología ha revelado nuevas especies de hongos a un ritmo acelerado y ha proporcionado información crucial sobre la diversidad y patrones de distribución de las comunidades fúngicas.

Los estudios de *metabarcoding* han demostrado la alta diversidad fúngica en hábitats como el suelo, y los datos de secuenciación se almacenan en repositorios públicos accesibles para futuras investigaciones. La integración de datos de metabarcoding en bases de datos especializadas, como MDDDB (*MycoDiversity DataBase*), facilita la exploración de las comunidades fúngicas en diferentes hábitats y escalas geográficas.



*Metabarcoding* ofrece una visión holística de las comunidades fúngicas, revelando la complejidad de las asociaciones micorrícicas en diversos hábitats. Además, el metabarcoding permite estudiar la estructura de las comunidades fúngicas y su respuesta a cambios ambientales.

### ***Análisis Filogenético:***

El análisis filogenético de secuencias de ADN ha permitido reconstruir relaciones evolutivas entre especies de hongos, revelando patrones de diversificación y adaptación, también contribuye a la delimitación de especies y a la identificación de grupos taxonómicos dentro de los hongos.

Es una herramienta fundamental para comprender la evolución de los hongos en respuesta a cambios ambientales y factores bióticos. Al integrar datos filogenéticos con información ambiental, se pueden identificar patrones de distribución y asociaciones ecológicas en las comunidades fúngicas.

Estas técnicas han revolucionado la investigación en hongos, proporcionando herramientas poderosas para estudiar su diversidad, ecología y evolución en un contexto molecular. La combinación de estas metodologías ha permitido avanzar significativamente en el conocimiento de los hongos y ha abierto nuevas perspectivas para la investigación en este campo en la Era Molecular.

Además de las técnicas moleculares mencionadas anteriormente, existen otras técnicas utilizadas en el estudio de hongos, como la microscopía y el cultivo. La microscopía es una técnica importante para la identificación de hongos, ya que permite observar las estructuras de los hongos, como las hifas y las esporas, y determinar su morfología y características. La microscopía también se utiliza para estudiar la interacción entre los hongos micorrícicos y las plantas hospedadoras. El cultivo de hongos es otra técnica utilizada en el estudio de hongos que implica el aislamiento y cultivo a partir de muestras de suelo o raíces de plantas hospedadoras. Aunque el cultivo es una técnica útil para estudiar la fisiología y la ecología de los hongos, puede ser difícil de realizar debido a la naturaleza simbiótica de algunas especies.

En general, las técnicas moleculares han permitido una identificación más precisa y detallada de las especies de hongos, lo que ha llevado a una mejor comprensión de su diversidad, ecología y función en los ecosistemas. Además, estas técnicas han permitido la identificación de nuevas especies y han revelado la presencia de especies raras o poco conocidas en diferentes entornos.

El futuro de la metodología de secuenciación de ADN, *metabarcoding* y análisis filogenético en el estudio de hongos micorrícicos se vislumbra prometedor y lleno de posibilidades. Algunas tendencias y desarrollos potenciales incluyen:

- Avances tecnológicos en secuenciación de ADN: Se espera una continua mejora en las tecnologías de secuenciación de ADN, lo que permitirá una mayor eficiencia, precisión y reducción de costos en la obtención de datos genéticos de hongos micorrícicos.

La aplicación de técnicas de secuenciación de tercera generación, como la secuenciación de nanoporos, podría ampliar aún más nuestra capacidad para caracterizar la diversidad fúngica de manera exhaustiva y en tiempo real.

- Integración de datos multidisciplinares: Se espera una mayor integración de datos genéticos con información ambiental, geoespacial y metabólica para comprender mejor las interacciones entre los hongos micorrícicos y su entorno.

La combinación de datos de secuenciación con datos funcionales y ecológicos permitirá abordar preguntas más complejas sobre la ecología y la evolución de estos organismos.

- Desarrollo de herramientas analíticas avanzadas: Se anticipa la creación de herramientas analíticas más sofisticadas y específicas para el análisis de datos de metabarcoding y filogenéticos, lo que facilitará la interpretación de grandes conjuntos de datos y la identificación de patrones significativos.

- Aplicaciones en conservación y biotecnología: La metodología de secuenciación de ADN y metabarcoding de hongos micorrícicos tendrá un papel crucial en la conservación de la biodiversidad fúngica y en la identificación de especies clave para la restauración de ecosistemas degradados.

Además, se explorarán aplicaciones biotecnológicas de hongos micorrícicos en áreas como la agricultura sostenible, la biorremediación y la producción de compuestos bioactivos.

#### **1.4. PRINCIPALES BASES DE DATOS EN EL ESTUDIO DE HONGOS.**

**Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)** se puede utilizar para comparar las secuencias de OTUs (Operational Taxonomic Units) generadas a partir de datos de metabarcoding con secuencias de referencia en bases de datos como UNITE. Esto permite una identificación taxonómica precisa de los hongos presentes en las muestras.

Esta es la base de datos que se ha empleado en esta Tesis. BLAST se puede integrar de manera efectiva en la clasificación y análisis de datos de hongos y diversidad fúngica en general.

- Uso: Identificación taxonómica de OTUs (*Operational Taxonomic Units*) mediante comparación de secuencias con la base de datos UNITE.
- Ventajas: Precisa identificación taxonómica de hongos presentes en las muestras
- Aplicación: Clasificación y análisis efectivo de datos de hongos y diversidad fúngica.

**MycoDiversity DataBase (MDDB)** es una base de datos especializada que almacena datos de metabarcoding de hongos en muestras ambientales, lo que permite estudiar patrones de biodiversidad fúngica a gran escala.

- Uso: Almacenamiento de datos de metabarcoding de hongos en muestras ambientales.

- Ventajas: Permite estudiar patrones de biodiversidad fúngica a gran escala.
- Aplicación: Análisis de diversidad fúngica en muestras ambientales.

**UNITE Database:** UNITE es una base de datos de secuencias de ADN de hongos, especialmente centrada en secuencias de la región ITS. Proporciona información taxonómica y filogenética para la identificación de hongos.

- Uso: Base de datos de secuencias de ADN de hongos, centrada en la región ITS.
- Ventajas: Proporciona información taxonómica y filogenética para la identificación de hongos.
- Aplicación: Identificación precisa de hongos a través de secuencias de la región ITS.

**MaarjAM Database:** Aunque no incluye datos de SRA, MaarjAM es una base de datos que se enfoca en hongos micorrícicos del grupo Glomeromycota, asociando información geográfica, de hábitat y climática con secuencias de referencia.

- Uso: Enfocada en hongos micorrícicos del grupo Glomeromycota.
- Datos: Asociación de información geográfica, de hábitat y climática con secuencias de referencia.
- Aplicación: Especializada en datos de hongos micorrícicos, proporcionando contexto ambiental.

**NCBI Sequence Read Archive (SRA):** El SRA es un repositorio público que almacena datos de secuenciación de ADN de diversas especies, incluidos hongos. Es una fuente importante de datos para estudios de metabarcoding y diversidad fúngica.

- Uso: Repositorio público de datos de secuenciación de ADN de diversas especies, incluidos hongos.
- Ventajas: Fuente importante para estudios de metabarcoding y diversidad fúngica.
- Aplicación: Acceso a una amplia variedad de datos de secuenciación para análisis de diversidad fúngica.

**International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC):** INSDC es una colaboración entre DDBJ, ENA y GenBank que proporciona acceso a secuencias de nucleótidos, incluidas las secuencias de ADN de hongos, para la comunidad científica.

- Colaboración: Entre DDBJ, ENA y GenBank.
- Datos: Acceso a secuencias de nucleótidos, incluidas las de hongos, para la comunidad científica.
- Aplicación: Amplia cobertura de datos de secuenciación genética, incluyendo información sobre hongos.

Estas bases de datos son fundamentales para la investigación en micología y estudios de diversidad fúngica, ya que ofrecen acceso a secuencias genéticas, metadatos y herramientas para el análisis de datos. Al utilizar estas bases de datos, los investigadores pueden ampliar su comprensión de la diversidad, distribución y evolución de los hongos micorrícicos y otros hongos en diferentes entornos y escalas.

## 1.5. DEFINICIÓN DE OBJETIVOS.

En este capítulo introductorio, se establece el marco conceptual y metodológico genérico que servirá como base para la interpretación de los capítulos específicos de esta Tesis. En estos capítulos se adentrará en la investigación de las asociaciones micorrícicas, explorando su origen, evolución, diversidad tipológica y los principales grupos de hongos involucrados.

El objetivo principal de esta tesis es ampliar el conocimiento de estas relaciones simbióticas, de gran importancia para los ecosistemas analizados, que abarcan desde los ecosistemas montañosos de especies endémicas hasta los robledales atlánticos. Estos ecosistemas son vulnerables y sensibles a los procesos de cambio climático actuales, y los organismos fúngicos pueden desempeñar un papel significativo al proporcionar capacidad y resiliencia en este contexto.

Los objetivos específicos de esta Tesis son los siguientes:

- i)* Realizar un estudio exhaustivo de la diversidad fúngica asociada a la rizosfera de especies de pastizal alpino. Este análisis comprenderá tanto la identificación histológica como la molecular (ADN), proporcionando una visión integral de la comunidad micorrícica presente.
- ii)* Investigar en profundidad la diversidad fúngica en la rizosfera de los robledales de la cordillera cantábrica. Este objetivo incluirá técnicas avanzadas de identificación histológica y molecular (ADN), con el fin de revelar patrones específicos y contribuir a la comprensión de las interacciones micorrícicas en este particular contexto geográfico.
- iii)* Evaluar la influencia de las asociaciones en la resistencia y resiliencia de los ecosistemas estudiados frente a los desafíos planteados por el cambio climático. Esto implica la integración de datos recopilados a lo largo de la investigación para proporcionar una visión holística de la función de las asociaciones fúngicas en la ecología y la adaptación ambiental.

En resumen, estos objetivos específicos de la presente Tesis se han establecido para maximizar la comprensión de las asociaciones fúngicas en diferentes contextos, abordando aspectos tanto taxonómicos como funcionales. El resultado esperado es contribuir significativamente al conocimiento científico sobre la diversidad y ecología de las micorrizas y su papel en la resiliencia de los ecosistemas frente a los cambios climáticos actuales.

## 1.6. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdul W., Farwa B., Murad M., Wajid Z., Rafid M. M., Saif M. Q.i, Shahid U., Gholamreza A., & Saddam S. (2023). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105633>.
- Addy HD, Hambleton S & Currah RS. (2000). Distribution and molecular characterization of the rootendophyte *Phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta. *Mycol Res* 104:1213–1221
- Allen, M.F. (2007). Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone J.* 6, 291–297.
- Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S .& Smith, D.L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.*, 1473.
- Begum N, Qin C, Ahanger MA, Raza S, Khan MI, Ashraf M, Ahmed N & Zhang L (2019) Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 10:1068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>
- Bhantana, P., Rana, M.S., Sun, X.-c, Moussa, M.G., Saleem, M.H., Syaifudin, M., Shah, A., Poudel, A., Pun, A.B. & Bhat, M.A. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi and its major role in plant growth, zinc nutrition, phosphorous regulation and phytoremediation. *Symbiosis* 84, 19–37.
- Boddy, L. (2016). Fungi, ecosystems, and global change. In *The fungi* (pp. 361-400). Academic Press
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1, 48. DOI: 10.1038/ncomms1046. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>.
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(3), 473–495. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>.
- Brundrett, M. C. (2015). Evolution and Adaptation of mycorrhizas in vascular plants. January 2012.
- Brundrett, M. C. (2017). Global Diversity and Importance of Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Plants. June, 533–556. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_21).
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>.
- Catalogue of Life (2024). Fungi, Recuperada en marzo y mayo de 2024, de <https://www.catalogueoflife.org/>

- Cosme, M. (2023). Mycorrhizas drive the evolution of plant adaptation to drought. *Commun Biol* 6, 346. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04722-4>.
- Dearnaley J, Perotto S & Selosse M-A. 2016. Structure and development of orchid mycorrhizas. In: F Martin, ed. *Molecular mycorrhizal symbiosis*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. Published, 63–86. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch5>
- Fändriks, L., (2017). Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. *J. Intern. Med.* 281, 319–336.
- Frank, A. B. & Trappe, J. M. (2005). On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. frank’s classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15, 267–275. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0329-y>
- Garrastatxu, J., Odriozola, I., Esteban, R., Encinas-Valero, M., Kumazawa Morais, D., Větrovský, T., & Curiel Yuste, J. (2024). Fungal symbionts associate with holm oak tree health in declining oak savannas of the southwest of the Iberian Peninsula. *Applied Soil Ecology*, 195, 105210.
- Hagh-Doust, N., Färkkilä, S. M. A., Hosseyni Moghaddam, M. S., & Tedersoo, L. (2022). Symbiotic fungi as biotechnological tools: Methodological challenges and relative benefits in agriculture and forestry. *Fungal Biology Reviews*, 42, 34-55.
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 10-1128.
- Honrubia, M. (2009). Las micorrizas: Una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales Del Jardin Botanico de Madrid*, 66(SUPPL. 1), 133–144. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2226>.
- Hua Yang. H., Neng-Qi Li & Jiang-Yun Gao, (2023). A novel method to produce massive seedlings via symbiotic seed germination in orchids, *Frontiers in Plant Science*, 14.
- IPBES (2023). Summary for Policymakers of the Thematic Assessment Report on Invasive Alien Species and their Control of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. Roy, H. E., Pauchard, A., Stoett, P., Renard Truong, T., Bacher, S., Galil, B. S., Hulme, P. E., Ikeda, T., Sankaran, K. V., McGeoch, M. A., Meyerson, L. A., Nuñez, M. A., Ordonez, A., Rahlao, S. J., Schwindt, E., Seebens, H., Sheppard, A. W., and Vandvik, V. (eds.). IPBES secretariat, Bonn, Germany. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7430692>
- Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes - Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza*, 11(4), 207–211. <https://doi.org/10.1007/s005720100112>
- Jumpponen A. & Trappe JM. (1998). Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140: 295–310.

- Jumpponen A, Herrera J, Porras-Alfaro A, & Rudgers J. (2017). Biogeography of root-associated fungal endophytes. In: Tedersoo L, eds. Biogeography of mycorrhizal symbiosis. Springer International Publishing, pp 195–222
- Kohout, P. (2017). Biogeography of Ericoid Mycorrhiza. In: Tedersoo, L. (eds) Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Ecological Studies, vol 230. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_9).
- Lanfranco, L., Bonfante, P., & Genre, A. (2016). The Mutualistic Interaction between Plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Microbiology Spectrum, 4. DOI: 10.1128/microbiolspec.funk-0012-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0012-2016>.
- Lawrence, M.A., Friel, S., Wingrove, K., James, S.W., & Candy, S, (2015). Formulating policy activities to promote healthy and sustainable diets. Public Health Nutr. 18, 2333–2340.
- Lamabam P. S., Sarvajeet S. G., & Narendra T. (2011) Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance, Plant Signaling & Behavior, 6:2, 175-191, <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14146>
- Mandyam K. & Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. Studies in Mycology, 53: 173–189. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.173>
- Mathur, P., Kapoor, R., & Roy, S. (2023). Microbial Symbionts and Plant Health: Trends and Applications for Changing Climate. Springer Nature.
- Martin, F. M., & van der Heijden, M. G. A. (2024). The mycorrhizal symbiosis: research frontiers in genomics, ecology, and agricultural application. In New Phytologist (Vol. 242, Issue 4, pp. 1486–1506). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/nph.19541>
- Martorelli, I., Helwerda, L. S., Kerkvliet, J., Gomes, S. I. F., Nuytinck, J., van der Werff, C. R. A., Ramackers, G. J., Gulyaev, A. P., Merckx, V. S. F. T., & Verbeek, F. J. (2020). Fungal metabarcoding data integration framework for the MycoDiversity DataBase (MDDb). Journal of Integrative Bioinformatics, 17(1), 20190046. <https://doi.org/10.1515/jib-2019-0046>
- Medina, M., Collins, A. G., Taylor, J. W., Valentine, J. W., Lipps, J. H., Amaral-Zettler, L., & Sogin, M. L. (2003). Phylogeny of Opisthokonta and the evolution of multicellularity and complexity in Fungi and Metazoa. International Journal of Astrobiology, 2(3), 203-211.
- Niemi, K., Scagel, C., & Haggman, H. (2004). Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers. Plant Cell Tissue Org. Cult. 78, 83–91. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020379.52514.72>
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Wurzbacher, C., Tedersoo, L., Anslan, S., Pölme, S., Sp, V., Mikryukov, V., Svantesson, S., Hartmann, M., Lennartsdotter, C., Belford, P., Khomich, M., Rette,r A., Corcol,l N., Gómez Martínez, D., Jansson, T., Ghobad-Nejhad, M., Vu,

- D., Sanchez-Garcia, M., Kristiansson, E., & Abarenkov, K. (2023) How, not if, is the question mycologists should be asking about DNA-based typification. *Mycology* 96: 143-157. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.96.102669>
- Ocaña-Pallarès, E., Williams, T. A., López-Escardó, D., Arroyo, A. S., Pathmanathan, J. S., Baptiste, E., ... & Ruiz-Trillo, I. (2022). Divergent genomic trajectories predate the origin of animals and fungi. *Nature*, 609(7928), 747-753.
- Patel, H. K., Jhala, Y. K., Raghunandan, B. L., & Solanki, J. P. (2022). Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy. *Trends in Applied Microbiology for Sustainable Economy*, 225-251.
- Pereira, S., Santos, M., Leal, I., Tabarelli, M., & Santos, M. G. (2021). "Arbuscular mycorrhizal inoculation increases drought tolerance and survival of *Cenostigma microphyllum* seedlings in a seasonally dry tropical forest." *Forest Ecology and Management*, Volume 492, 119213. ISSN 0378-1127. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119213>.
- Perotto, S., & Balestrini, R. (2023). At the core of the endomycorrhizal symbioses: intracellular fungal structures in orchid and arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 10.1111/nph.19338.
- Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M. I., & Oves, M. (2016). Bacteria and Fungi Can Contribute to Nutrients Bioavailability and Aggregate Formation in Degraded Soils. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.
- Ruotsalainen, A.L. (2018). Dark Septate Endophytes (DSE) in Boreal and Subarctic Forests. In Pirttilä AM, Frank AC, eds. *Endophytes in forest trees: Biology and Applications*, Forestry Sciences, 80.
- Sharma, R. (2017). Ectomycorrhizal Mushrooms: Their Diversity, Ecology and Practical Applications. In: Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. (eds) *Mycorrhiza - Function, Diversity, State of the Art*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53064-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53064-2_7).
- Sieber, T.N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol Rev* 21:75–89
- Sieber, T.N & Grünig, C.R. (2013). Fungal root endophytes. In: Eshel A, Beeckman T, eds- *Plant roots—the hidden half*. Boca Raton, FL, USA. CRC Press, Taylor & Francis Group, 38.1–38.49
- Sivasithamparam, K. (1998). Root cortex – the final frontier for biocontrol of root-rot with fungal antagonists: a case study on a sterile red fungus. *Annual Review of Phytopathology* 36, 439–452



- Smith, S. E., & Read, D. (2008). Ericoid mycorrhizas. In S. E. Smith & D. Read (Eds.), *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition) (pp. 389-418). Academic Press. ISBN 9780123705266. <https://doi.org/10.1016/B978-012370526-6.50013-1>.
- Smith, S. E., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. <https://doi.org/10.1016/b978-012370526-6.50003-9>.
- Sosa-Hernández, M.A, Leifheit, E.F., Ingrassia, R., & Rillig, M.C. (2019) Subsoil Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Sustainability and Climate-Smart Agriculture: A Solution Right Under Our Feet? *Front. Microbiol.* 10:744. doi: 10.3389/fmicb.2019.00744.
- Strullu-Derrien, C., Selosse, M. A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, 220 (4), 1012–1030. <https://doi.org/10.1111/nph.15076>.
- Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). The Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Microbial Biostimulant, Sustainable Approaches in Modern Agriculture. *Plants*, 12(17), 3101.
- Taylor, J. W., & Berbee, M. L. (2006). Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia*, 98(6), 838-849.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ... & Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *science*, 346(6213), 1256688.
- Tedersoo, L., Bahram, M.; Zinger, L., Nilsson, R.H., Kennedy, P.G., Yang, T.; Anslan, S., & Mikryukov, V. (2022). Best Practices in Metabarcoding of Fungi: From Experimental Design to Results. *Mol. Ecol.* 31, 2769–2795
- Tibbett, M., & Sanders, F. E. (2002). Ectomycorrhizal Symbiosis can Enhance Plant Nutrition through Improved Access to Discrete Organic Nutrient Patches of High Resource Quality. *Annals of Botany*, Volume 89, Issue 6, 1 June 2002, Pages 783–789. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf129>.
- Trappe, J. M., & Luoma, D. L. (1992). The ties that bind: fungi in ecosystems. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. New York: Marcel Dekker, 1, 17-27.
- Tsai, H.-J., Shao, K.-H., Chan, M.-T., Cheng, C.-P., Yeh, K.-W., Oelmüller, R., & Wang, S.-J. (2020). Piriformospora indica symbiosis improves water stress tolerance of rice through regulating stomata behavior and ROS scavenging systems. *Plant Signaling & Behavior*, 15(2).
- ud din Khanday, M., Bhat, R.A., Haq, S., Dervash, M.A., Bhatti, A.A., Nissa, M., & Mir, M.R. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi boon for plant nutrition and soil health. *Soil Sci.: Agric. Environ. Prospect.* 317–332.

- van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.-A., & Sanders, I.R. (2015), Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol*, 205: 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>.
- Vohník, M. (2020). Ericoid mycorrhizal symbiosis: theoretical background and methods for its comprehensive investigation. *Mycorrhiza* 30, 671–695. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00989-0>
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge university press.
- Wei, X., Zhang, W., Zulfiqar, F., Zhang, C., & Chen, J. (2022) Ericoid mycorrhizal fungi as biostimulants for improving propagation and production of ericaceous plants. *Front. Plant Sci.* 13:1027390. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1027390>
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Xu, J. (2020). Fungal species concepts in the genomics era. *Genome*, 63(9), 459-468.



## **CAPÍTULO 2**

### **DIVERSIDAD FÚNGICA EN RAÍCES Y RIZOSFERAS DE ESPECIES PERTENECIENTES A SISTEMAS DE PASTIZAL ALPINO**

## **2.1. INTRODUCCIÓN.**

Los ecosistemas alpinos se caracterizan por estar conformados por un estrato herbáceo y arbustivo, localizado por encima del límite altitudinal del bosque y por debajo de la zona de nieves perpetuas. Caracterizado por una vegetación adaptada a unas condiciones de bajas temperaturas, periodos vegetativos cortos y una disponibilidad de nutrientes limitada (Testolin et al., 2020, Verrall & Pickering, 2020; Testolin et al., 2021) ocupando menos de un 3% de la superficie de la Tierra (Testolin et al., 2020). En la Cordillera Cantábrica el ecosistema alpino se encuentra enmarcado dentro de la región biogeográfica Atlántica, subprovincia Orocantábrica (Rivas-Martínez et al., 2017). Altitudinalmente el piso alpino desciende hasta los 2.300 m y el subalpino hasta los 1.600 m (Rivas-Martínez, 1990).

Las comunidades vegetales que habitan estos territorios se caracterizan por la gran capacidad de adaptación a las condiciones adversas en las cuales se desarrollan, donde la nieve es uno de los principales factores de los cuales depende su desarrollo (Nagy, 2006) siendo los miembros que la conforman bastante estables, es decir, apenas hay variaciones en composición y abundancia a lo largo de los años (Nagy, 2006). Según los datos obtenidos por Jiménez-Alfaro et al. (2021) en la Cordillera Cantábrica, se encontrarían presentes unos 2.338 taxones nativos (especies y subespecies), donde la ratio de endemismos es del 2,4% siendo este territorio una de las 3 regiones de la Península Ibérica con la mayor riqueza florística (Jiménez-Alfaro et al., 2021).

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, los suelos sobre las que vegetan están comunidades tienen unas características muy concretas determinadas, en mayor o menor medida, por la historia geológica y los condicionantes ambientales del lugar donde se encuentran. Geológicamente, son suelos jóvenes debido a los efectos del periodo glacial más recientes, frágiles y sometidos a importantes amenazas como, por ejemplo, el cambio climático (Poulenard & Podwojewski, 2006).

Debido a los condicionantes bióticos y abióticos, a los cuales se tienen que enfrentar las comunidades vegetales que habitan en zonas alpinas, es necesario que forjen alianzas con otros organismos con el objetivo de obtener los máximos recursos posibles y garantizar su supervivencia. Las alianzas con las especies fúngicas que habitan en estos ecosistemas podrían ser una de las herramientas más útiles para llevar a cabo esta misión, por eso consideramos que es esencial el conocimiento de las comunidades fúngicas que habitan en los sistemas radicales de las comunidades de pastizal con el fin de determinar cuál podría ser la función que desempeñan en estos ecosistemas. Hay pocos estudios en los cuales se analicen las interacciones entre estas comunidades en nuestras latitudes siendo éste el único llevado a cabo en el entorno de la Cordillera Cantábrica.

## 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 2.2.1. Localización de las zonas de estudio.

Se identificaron dos áreas de muestreo situadas a lo largo de la Cordillera Cantábrica, una sobre sustrato calizo localizada en la zona oriental del Principado de Asturias, concretamente en el Parque Nacional de los Picos de Europa a 1.990 m (Figura 2.1) y otra sobre sustrato silíceo, en la zona central de la montaña leonesa, en la Zona de Especial Conservación del Valle de San Emiliano a 2.100 m (Figura 2.1).

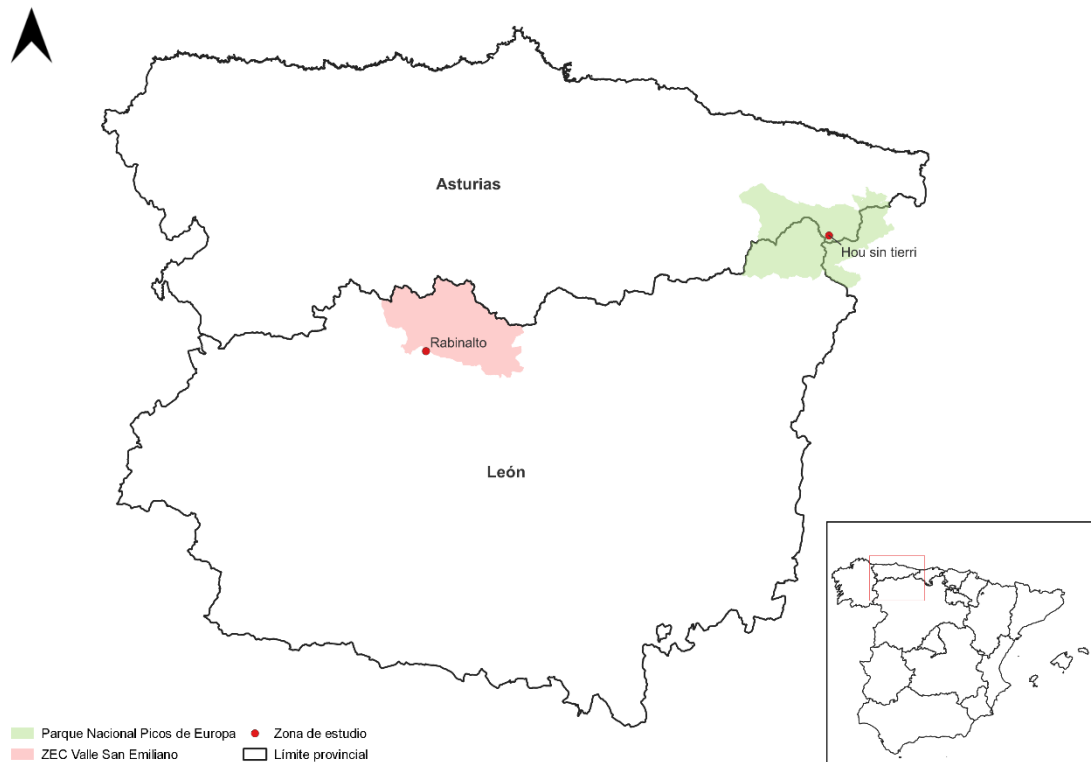


Figura 2.1: Localización de las parcelas de muestreo.

#### 2.2.1.1. Características de las comunidades vegetales.

El estudio se realizó en pastizales de alta montaña incluidos en el tipo de hábitat R4 (*Alpine and subalpine grasslands*) de la clasificación europea EUNIS (<https://eunis.eea.europa.eu/habitats.jsp>). Las localidades a estudio se corresponden con los dos principales hábitats representados en la Cordillera Cantábrica: pastizales acidófilos alpinos templados (R43) y pastizales calcáreos ártico-alpinos (R44). Estos dos grupos de hábitats se diferencian principalmente por la composición y acidez del suelo, provocando claras diferencias en la composición de especies.

Como ejemplo del hábitat R43, se muestreó un pastizal de cumbre en la Sierra de Villabandín (ZEC San Emiliano, León), a 2100 metros de altitud (Figura 2.1). Esta comunidad ocupa un pastizal permanente de cumbre dominado por especies endémicas

de las montañas ibéricas y por plantas características del arco alpino europeo que encuentran refugio en estos hábitats. La comunidad tiene un marcado carácter sub-mediterráneo debido a su posición geográfica en el límite sur de la región eurosiberiana. En un inventario florístico realizado en la comunidad de estudio, en un área de 28 m<sup>2</sup> (área circular con 3 m de radio), se identificaron las siguientes especies: *Festuca summilusitana* A. Franco & Rocha Alfonso (cobertura de 50%), *Minuartia recurva* (All.) Schinz & Thell. (15%), *Neoschischkinia truncatula* (Parl.) Valdés & H.Scholz (15%), *Agrostis tileni* G.Nieto Fel. & Castrov. (5%), *Luzula caespitosa* (J. Gay ex E. Mey.) Steud. (5%), *Phyteuma hemisphaericum* L. (5%), *Sedum brevifolium* DC. (5%), *Armeria duriaei* Boiss. (3%), *Dianthus langeanus* Willk. (3%), *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (0.1%), *Jurinea humilis* (Desf.) DC. (0,1%), *Phalacrocarpum oppositifolium* (Brot.) Willk. (0,1%) y *Thymus praecox* Opiz (0,1%).

Como ejemplo del hábitat R44, se muestreó un pastizal alpino en el macizo central de los Picos de Europa, a 1990 metros de altitud (Figura 2.1). La comunidad a estudio es representativa de los pastizales de alta montaña calcáreos de la Cordillera Cantábrica, dominados por especies termófilas del arco alpino europeo, incluyendo especies endémicas ibéricas y de la Cordillera Cantábrica. En un inventario florístico realizado en la comunidad de estudio, en un área de 28 m<sup>2</sup> (área circular con 3 m de radio), se identificaron las siguientes especies: *Anthyllis vulneraria* L. (cobertura de 15%), *Helianthemum urriense* (Lainz) Nava & Fdez. Casado (10%), *Helianthemum oelandicum* (L.) Dum.Cours. (8%), *Helictotrichon sedenense* (DC.) Holub (5%), *Carex sempervirens* Vill. (3%), *Gypsophila repens* L. (3%), *Ranunculus parnassifolius* L. (3%), *Thymus praecox* Opiz (3%), *Androsace villosa* L. (1%), *Elyna myosuroides* (Vill.) Fritsch. (2%), *Erigeron alpinus* L. (1%), *Minuartia verna* (L.) Hiern (1%), *Senecio boissieri* DC. (1%), *Silene acaulis* (L) Jacq. (1%), *Veronica nummularia* Gouan (1%), *Armeria cantabrica* Boiss. & Reut. ex Willk. in Willk. & Lange (1%), *Arenaria moehringioides* Murr (0,5%), *Arenaria moehringioides* Murr (0,5%), *Arenaria purpurascens* Ramond ex DC. in Lam. & DC. (0,5%), *Iberis carnosa* Willd. (0,5%), *Jurinea humilis* (Desf.) DC. (0,5%), *Euphorbia salisburgensis* Funck (0,5%), y *Linaria alpina* (L.) Mill. (0,5%).

#### 2.2.1.2. Características edafológicas.

Del análisis de suelo se puede observar (Tabla 2.1) que el pH de ambas localizaciones es ácido (pH < 7) siendo ligeramente ácido en Picos de Europa y extremadamente ácido en San Emiliano (Anexo 2: Tabla 1, Tabla 2.1), presentando condiciones muy desfavorables para el desarrollo de la vegetación (Anexo 2: Tabla 1 Tabla 1). La temperatura media del suelo es similar, siendo ligeramente superior en Picos de Europa (Tabla 2.1). También son significativamente superiores los días de sequía que soporta la población de San Emiliano, 53, frente a los 7 de Picos de Europa (Tabla 2.1).

El contenido en materia orgánica en ambas localizaciones se considera como muy alto (Anexo 2: Tabla 3) presentando unos valores ampliamente superiores la zona de San Emiliano frente a la de Picos de Europa (Tabla 2.1). Tanto los valores de nitrógeno (N) como de carbono (C.O) son superiores en la zona silíceo (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Parámetros de suelo. Temp.: temperatura media del suelo en grados centígrados; Sequía: días de sequía; %C.O: porcentaje de carbono orgánico; MO: contenido en materia orgánica; N: contenido en nitrógeno.

Zona	Tipo	pH	Temp.	Sequía	Clima	Altitud	%C.O	MO	N (%)
Picos de Europa	Calcáreo	6,2	7,8	7	Alpino Templado	1990	2,3	5,1	0,2
San Emiliano	Silíceo	4,2	7,2	53	Alpino Mediterráneo	2117	25	43,1	1,4

### 2.2.2. Selección de especies para el análisis de la diversidad fúngica.

Para el estudio de la diversidad fúngica se seleccionaron aquellos ejemplares a partir de los cuales se podría obtener una visión global del conjunto de las poblaciones analizadas siendo, las seleccionadas, especies frecuentes y relativamente abundantes en las comunidades locales.

Se recolectó el sistema radical de *Thymus praecox*, una de las pocas especies que prosperan en los dos tipos de vegetación, por lo que se priorizó para evaluar las posibles diferencias en las asociaciones fúngicas en diferentes condiciones ecológicas. En este sentido, también se priorizaron dos especies del mismo género, *Armeria duriaei* y *A. cantabrica*, pero con preferencias ecológicas contrastadas por lechos rocosos ácidos (San Emiliano) y calcáreos (Picos de Europa), respectivamente. Las otras especies se seleccionaron porque se encuentran entre los taxones más dominantes localmente estas son, *Luzula caespitosa* en comunidades ácidas (San Emiliano) y *Carex sempervirens* y *Anthyllis vulneraria* en calcáreas (Picos de Europa).

### 2.2.3. Toma de muestras radiculares.

Una vez efectuado el inventario florístico se seleccionaron las 3 especies más representativas por cada localidad de muestreo, sobre las cuales se realizó el estudio de la comunidad fúngica de su sistema radical. Localizado y seleccionado el ejemplar de estudio, se procedió a su extracción con cepellón de tamaño variable, en el cual se encontraba presente el sistema radical de la planta. Esa muestra fue introducida en una bolsa de plástico con cierre Zip a la cual se le añadió un poco de agua para mantener la humedad. Posteriormente las muestras tomadas en campo se almacenan en la cámara fría, a una temperatura de 4 °C hasta su posterior análisis.

### 2.2.4. Descripción microscópica.

A partir del trabajo de recolección y conservación de las muestras, se realizó su acondicionamiento para el posterior análisis microscópico en laboratorio. El primer paso que se efectuó fue el acondicionamiento de los sistemas radicales mediante un lavado con agua corriente, hasta que ésta no presentaba impurezas, con el objetivo eliminar la tierra que tenían adherida.

Para cuantificar la presencia o ausencia de asociaciones endofíticas se procedió a la selección de una serie de submuestras, de longitud variable y localizadas a lo largo del sistema radicular de estudio, que se almacenaron en tubos eppendorf, a los que se les añadió previamente fijador FAA (90% etanol, 5% formol y 5% de ácido acético), en



cámara fría a 4°C. Para su análisis se siguió el protocolo de clarificación y tinción establecido por Phillips & Hayman (1970), ligeramente modificado, que consiste en los siguientes pasos:

- Lavar las raíces en abundante agua corriente.
- Colocar las raíces en una solución de KOH al 10% dentro de una estufa a 100° C durante 10-15 minutos.
- Lavar, de nuevo, con agua corriente.
- Colocar las raíces en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% durante 10-15 minutos.
- Colocar las raíces en HCL 1N durante 10 minutos dentro de una estufa a 100°C.
- Decantar el HCL, sin lavar las raíces.
- Adicionar azul de tripán al 0,05% y colocarlas a 100° C durante 10 minutos.
- Retirar el colorante.
- Lavar las raíces con lactoglicerol.
- 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 se disponía de las raíces ya colocadas en el portaobjetos, se procedió con la observación de estas mediante un microscopio Leica DM 2000.

## **2.2.5. Extracción de DNA, DNA metabarcoding y asignación taxonómica.**

### *2.2.5.1. Extracción de DNA genómico.*

Con el objetivo de la determinación taxonómica de las especies fúngicas responsables de cada una de las asociaciones se efectuó la extracción del material genético. En este sentido, el estudio de los organismos responsables de las asociaciones endofíticas se llevó a cabo seleccionando varios trozos de raíz, con una longitud comprendida entre 2 y 4 cm, localizados a lo largo del sistema radical del ejemplar a analizar. Todas las muestras se almacenaron en tubos eppendorf de 1,5 ml congeladas a -80°C.

Tras la recolección de las muestras, se realizó su homogeneización utilizando el homogeneizador Silamat® S6, y posteriormente se extrajo el ADN empleando el GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURX), de acuerdo con los protocolos establecidos por el fabricante.

### *2.2.5.2. DNA Metabarcoding.*

Una vez obtenidas las muestras de ADN (30 µl) éstas fueron analizadas siguiendo las técnicas de DNA Metabarcoding que se describen a continuación.

En el proceso de construcción de una librería de ADN para análisis de secuenciación, se seleccionó un fragmento específico de la región ITS1 (espaciador transcrito interno) para su amplificación. Esta región, que comprende aproximadamente 280 pares de bases (bp), es altamente informativa y se utiliza comúnmente para la identificación y clasificación de especies fúngicas debido a su variabilidad entre distintas especies. Para la amplificación de este segmento, se emplearon los cebadores ITS1f e



ITS2 (Tabla 2.2). El cebador ITS1f se une al extremo 3' del gen 18S rRNA, mientras que el cebador ITS2 se une al comienzo del gen 5.8S rRNA. La combinación de estos cebadores está diseñada para flanquear la región ITS1, permitiendo la amplificación de una porción del ADN que es única para cada especie de hongo.

Tabla 2.2: Cebadores utilizados en la amplificación de la región ITS. F indica el cebador forward y R el reverse.

Región	Cebador	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS	ITS1f	F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993
	ITS2	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990

La primera amplificación se realizó sobre un volumen final de 12,5 µl conteniendo 1,25 µl de ADN, 0,5 µM de los cebadores, 3,13 µl de Supreme NZYTaq 2x Green Master Mix (NZYTech) y agua destilada hasta conseguir el volumen final. Las reacciones de PCR consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos que consisten en una desnaturalización de 95 °C durante 30 s, anillamiento a 49 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 45 s; el proceso finaliza con una extensión final de 7 min a 72 °C.

Para optimizar el proceso de preparación de bibliotecas de secuenciación, se realizó un segundo paso de amplificación para unir los índices de oligonucleótidos necesarios para la multiplexación, aplicando 5 ciclos y una temperatura de recocido de 60 °C. Se incorporó un control negativo para detectar contaminaciones. La verificación del tamaño de las bibliotecas se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, utilizando GreenSafe para la tinción y visualización UV. La purificación se llevó a cabo con Mag-Bind RXNPure Plus, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las bibliotecas se cuantificaron con QubitdsDNA HS Assay y se combinaron en proporciones equimolares para la secuenciación en NovaSeq PE250. Para asegurar la integridad de los datos al final de cada secuenciación, se empleó Cutadapt v3.5 para remover impurezas. Posteriormente, se refinaron los amplicones utilizando DADA2 (Callahan et al., 2016), una herramienta integrada en QIIME 2 (Bolyen et al., 2019). Este proceso permitió la eliminación de cebadores PCR y la filtración de lecturas por calidad. Además, se redujo el ruido, se desreplicaron las secuencias, se agruparon en Variantes de Secuencia de Amplicón (ASV), se combinaron las lecturas directas e inversas y se descartaron las secuencias quiméricas para obtener resultados más precisos. En los estudios de metabarcodificación del ADN, se ha observado que un bajo porcentaje de las lecturas de una determinada librería pueden asignarse erróneamente a otra. Este fenómeno, denominado *mistagging* (también *tag jumping*, *index hopping* o *index jumping*), es el resultado de la asignación errónea de los índices durante las etapas de preparación, secuenciación y/o multiplexación de las librerías (Bartram et al., 2016; Esling et al., 2015; Guardiola et al., 2016; Illumina, 2017). Para corregir este sesgo, se eliminaron las ASV que se producían con una frecuencia inferior al 0,01 % en cada muestra.

### 2.2.5.3. Asignación taxonómica.

La asignación taxonómica se realizó mediante dos vías: la primera utilizando el algoritmo BLASTn v2.13.0+ (Camacho et al., 2009) y posteriormente consultando cada de las secuencias con la base de datos de nucleótidos del *National Center for Biotechnology Information*, utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool – BLAST- (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que permite comparar distintas regiones de secuencias de nucleótidos, buscando similitudes entre los diferentes elementos biológicos. Se decidió realizar esta doble verificación de la taxonomía debido a que los datos incluidos en el BLAST (página web) son más recientes y actuales.

Para llevar a cabo dicha asignación, siempre que fuese posible, se siguieron los siguientes criterios: i) *Query coverage* > 80%; ii) *E-value* más próximo a 0 y iii) *Percentage of identity* > 80%. *Query coverage* indica el porcentaje de la secuencia de consulta que se superpone con la secuencia de referencia; *E-value* indica el número de coincidencias de calidad similar que podrían darse por casualidad mientras que, *Percentage of identity* indica el porcentaje bases que son iguales entre las secuencias de consulta y referencia.

Dependiendo del nivel de *Query coverage* y *Percentage of identity* se obtuvieron los niveles de identificación mostrados en la Tabla 2.3. Aquellos ASV que presentaban valores por debajo del 80% se descartaron.

Tabla 2.3: Niveles de identificación de los ASV en función a los valores de *Query coverage* (%) y *Percentage of identity* (%) obtenidos tras realizar el BLAST.

Query Coverage (%)	Percentage of identity (%)	Nivel
Mayor de 95	Mayor de 95	Muy alto
	Entre 90 y 95	Alto
	Entre 85 y 90	Medio
	Entre 80 y 85	Bajo
Entre 90 y 95	Mayor de 95	Alto
	Entre 90 y 95	
	Entre 85 y 90	Medio
	Entre 80 y 85	Bajo
Entre 85 y 90	Mayor de 95	Medio
	Entre 90 y 95	
	Entre 85 y 90	
	Entre 80 y 85	Bajo
Entre 80 y 85	Mayor de 95	Bajo
	Entre 90 y 95	
	Entre 85 y 90	
	Entre 80 y 85	

Además de lo mencionado anteriormente, se tuvo en cuenta la siguiente directriz: cuando un ASV presenta los mismos valores para varios individuos diferentes de la misma categoría taxonómica y estos datos fuesen homogéneos, este ASV se asignó al nivel taxonómico superior siempre y cuando fuese posible, de lo contrario, se descartó.

Para la representación visual de los datos, se optó por los gráficos Krona, que ofrecen una alternativa a los gráficos circulares tradicionales. Estos gráficos presentan las categorías en una disposición jerárquica, donde cada segmento mayor (madre) se

subdivide en segmentos menores (hijos), manteniendo una representación proporcional de los datos. La particularidad de Krona radica en que las magnitudes se visualizan a través del ángulo de cada segmento, evitando así la distorsión que podría surgir al representarlas por el área, como sucede en los gráficos circulares convencionales (Ondov et al., 2011).

### 2.2.6. Análisis de diversidad.

Una vez obtenidas las ASV y tras su asignación taxonómica se procedió a realizar una serie de análisis que nos permitan conocer la diversidad de los distintos organismos fúngicos que forman las comunidades analizadas. Todos los análisis se llevarán a cabo a partir de la asignación taxonómica en lugar de utilizar las ASV como fuente de información. Esto es debido a que en numerosos casos varias ASV se asignan taxonómicamente a la misma categoría y por lo tanto los consideramos como un único elemento.

Con ayuda del paquete *vegan* (Oksanen et al., 2022) y el software R (R Core Team, 2022) se realizaron los cálculos relativos a la diversidad de cada una de las categorías taxonómicas. Con el objetivo de analizar la diversidad alfa ( $\alpha$ ) se estudiaron los resultados de 4 índices: Riqueza específica; Índice de Shannon, Índice de Simpson e Índice de Pielou.

La riqueza específica es un concepto fundamental en el estudio de la biodiversidad, que se centra en cuantificar la variedad de vida en un determinado hábitat o comunidad. Este índice no solo cuenta el número de categorías taxonómicas presentes, sino que también proporciona una visión general de la complejidad ecológica de un área. En el contexto de los estudios fúngicos, la riqueza específica es especialmente valiosa, ya que los hongos juegan roles determinantes en los procesos ecológicos como la descomposición y el ciclo de nutrientes. Al analizar la riqueza de las categorías taxonómicas fúngicas, se pueden hacer inferencias sobre la salud del suelo, la presencia de especies simbióticas o patógenas y la influencia de factores ambientales en la distribución de los hongos.

El Índice de Shannon es un índice de equidad que mide la diversidad asumiendo que todos los individuos están presentes en la muestra y que éstos se muestrean aleatoriamente (Magurran, 1988). La expresión de cálculo de este índice es:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln (p_i)$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia relativa de la especie  $i$  y  $S$  es el número total de especies.

Suele tomar valores de 0 a 5, rara vez superiores a 4,5 y normalmente comprendidos entre 1,5 y 3,5 (Magurran, 1988; Margalef, 1972). Valores superiores a 3 se considera que la diversidad es alta siendo, los valores inferiores a 2 indicativos de baja diversidad (Margalef, 1972).

El Índice de Simpson es un índice de dominancia, contrario a la equidad, indica la probabilidad de seleccionar dos ejemplares al azar y que éstos pertenezcan a la misma especie (Simpson, 1949). Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$D = \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia relativa de la especie  $i$  y  $S$  es el número total de especies.

Este índice se encuentra muy influenciado por las especies dominantes por lo que, al aumentar su valor la diversidad decrece, por lo tanto, es habitual expresarlo como (Magurran, 1988):

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

El Índice de Pielou, al igual que los anteriores, es un índice de equidad que indica cómo es la distribución de las especies que forman la comunidad, midiendo la proporción de la diversidad observada con respecto a la esperada. Su cálculo se basa en el Índice de Shannon mediante la siguiente formula:

$$J = -H' / \ln(S)$$

Donde  $H'$  es la diversidad de Shannon de la comunidad y  $S$  es el número de especies presentes en la comunidad. Toma valores de 0 a 1, indicando valores superiores que todas las especies son igual de abundantes e inferiores que ciertas especies tienen más peso en la comunidad que otras (Ludwing & Reynolds, 1988; Magurran, 1988).

## **2.3. RESULTADOS.**

### **2.3.1. Diversidad fúngica.**

#### *2.3.1.1. Histología.*

Tras la realización del proceso de clarificación y tinción se han observado distintas estructuras endófitas de origen fúngico que se localizan en el interior de los sistemas radicales de las especies de pastizal. Entre los distintos elementos observados destacan aquellos propios de una simbiosis micorrícica del tipo vesículo-arbuscular (AM) (Brundrett, 2004; Smith & Read, 2008), observándose la existencia de micorrizas AM del tipo Paris y Arum, vesículas y arbusculos (Figura 2.2a, b, f, i, j, k).

De igual forma, aparecen los denominados endófitos septados oscuros (DSE), caracterizados por la presencia de microesclerocios (Figura 2.2c, d, e, g, h), pudiendo coexistir con el resto de las asociaciones en un mismo sistema radical.

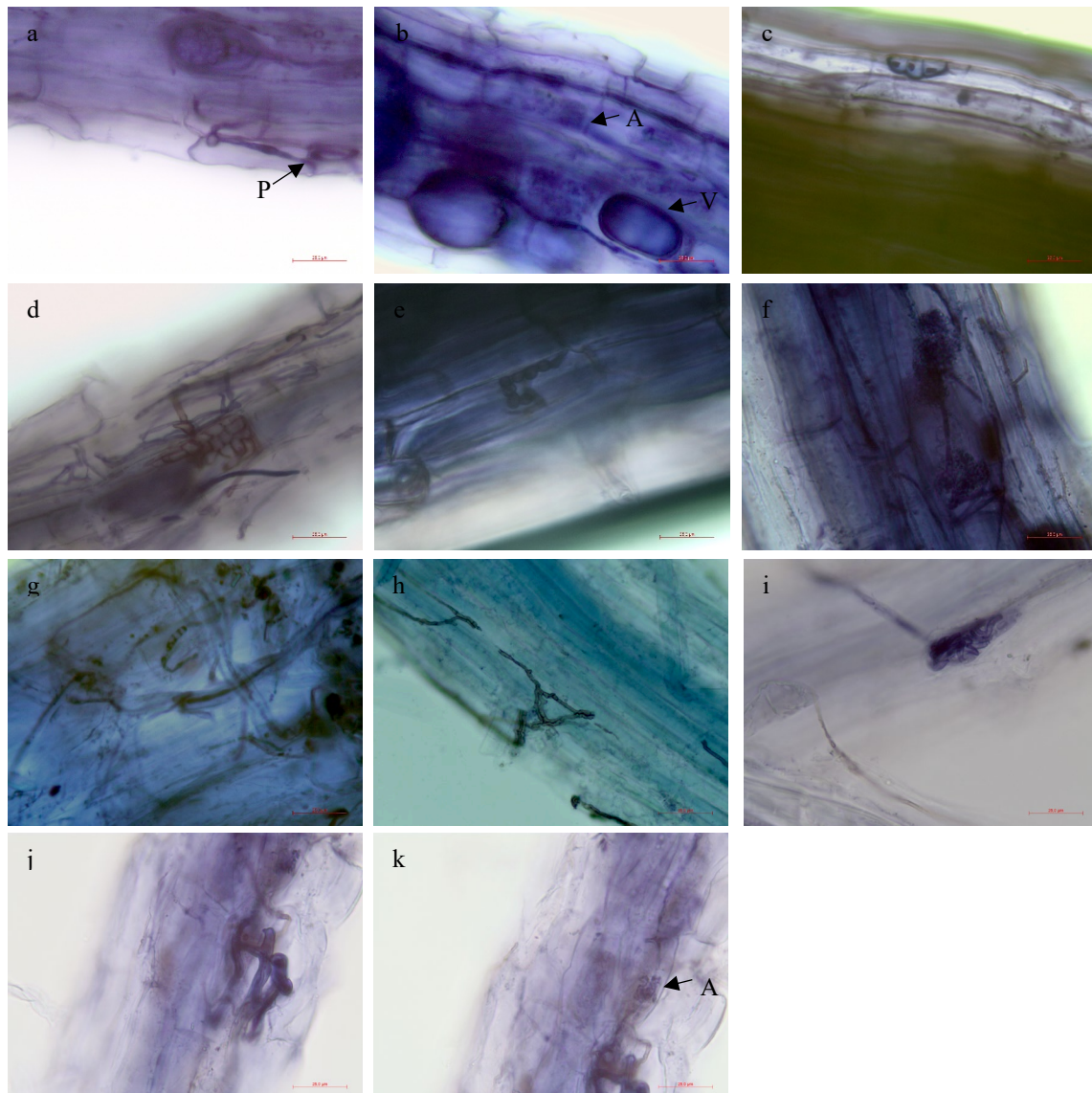


Figura 2.2: a) Hifas en ovillo (P) en *T. praecox* (Picos de Europa); b) Vesículas (V) y arbuscúlos (A) en *T. praecox* (Picos de Europa); c) DSE en *C. cantabrica* (Picos de Europa); d) y e) DSE en *C. sempervirens* (Picos de Europa); f) Arbuscúlos en *T. praecox* (San Emiliano); g) DSE en *T. praecox* (San Emiliano); h) hifas septadas en *L. caespitosa* (San Emiliano); i) hifas en ovillo en *L. caespitosa* (San Emiliano); j) hijas en ovillo en *A. duriaei* (San Emiliano) y k) Arbuscúlo (A) deteriorado en *A. duriaei* (San Emiliano).

### 2.3.1.2. Asignación taxonómica.

Tras la secuenciación de las muestras de ADN se obtuvieron un total de 1.783 ASVs de los cuales, tras el proceso de asignación taxonómica, 1.100 se englobaron dentro del filo Ascomycota Caval.-Sm, 384 del Basidiomycota R.T. Moore, 102 del Glomeromycota C.Walker & A.Schüßler, 76 del Mucoromycota Doweld, 45 se quedaron asignados a nivel de reino, 34 se descartaron, 31 dentro del filo Cryptomycota M.D.M. Jones & T.A. Richards, 8 del Chytridiomycota Doweld, 2 del Zoopagomycota

Gryganskyi, M.E. Sm., Spatafora & Stajich y 1 del Entorrhizomycota R. Bauer, Garnica, Oberw., Riess, Weiß & Begerow. A continuación, se describe cada una de las comunidades objeto de estudio.

### Picos de Europa.

#### **Población.**

En la población de zona oriental de la Cordillera Cantábrica se analizaron los sistemas radicales pertenecientes a 4 especies: *T. praecox*, *A. cantabrica*, *C. sempervirens* y *A. vulneraria*; obteniéndose un total de 1.196 ASV siendo el filo más representativo Ascomycota con 715, seguido por Basidiomycota con 289, Glomeromycota con 99, Mucoromycota con 41, Cryptomycota con 26, Chytridiomycota con 4 y Zoopagomycota con 2; 28 de los 1.196 ASV, se quedaron asignados a nivel de reino (Tabla 2.4). Se obtuvieron un total de 2.397.540 lecturas (Anexo 1: Tabla 1).

Tabla 2.4: Distribución de los ASVs en las especies analizadas en Picos de Europa y en la población global.

	<i>A.cantabrica</i>	<i>A. vulneraria</i>	<i>C. sempervirens</i>	<i>T. praecox</i>	Global
Ascomycota	202	92	392	294	715
Basidiomycota	87	44	80	151	289
Chytridiomycota	2	0	0	2	4
Cryptomycota	7	2	12	14	26
Fungi (Reino)	8	2	12	10	28
Glomeromycota	25	25	15	74	99
Mucoromycota	12	7	25	13	41
Zoopagomycota	1	0	1	0	2
Total	344	172	537	558	1196

Tras la asignación taxonómica se ha constatado la presencia, en menor o mayor grado, de 422 especies, 341 géneros, 173 familias, 74 órdenes, 24 clases y 7 filos (Figura 2.12a). En el conjunto de las muestras analizadas, las especies con mayor representación son *Byssothecium circinans* Fuckel 1861 (17,4%), seguida de *Sebacina epigaea* (Berk. & Broome) Bourdot & Galzin (11,6%) y de *Mycenella salicina* (Velen.) Singer 1951 (6,1%); siendo, *Byssothecium* Fuckel (17,4%), *Sebacina* Tul. & C.Tul. (11,6%) y *Polyphilus* D.G. Knapp, Ashrafi, W. Maier & Kovács (6,8%) los principales géneros. En cuanto a las familias, las tres más comunes son Massarinaceae Munk (17,4%), Incertae sedis (17,2%) y Sebacinaceae K. Wells & Oberw. (11,6%). En el caso de los órdenes, los más representativos son Pleosporales Luttr. ex M.E. Barr (27,1%), Helotiales Nannf. (18,7%) y, completando el grupo, Sebacinales M.Weiss, Selosse, Rexer, A.Urb. & Oberw. (12,2%). Como cabría esperar, las clases donde se engloban estos órdenes son, a su vez, las más representativas siendo éstas Dothideomycetes O.E. Erikss. & Winka (28,8%), Agaricomycetes Doweld (26,05%) y Leotiomycetes O.E. Erikss. & Winka (19,01%) (Figura 2.3).

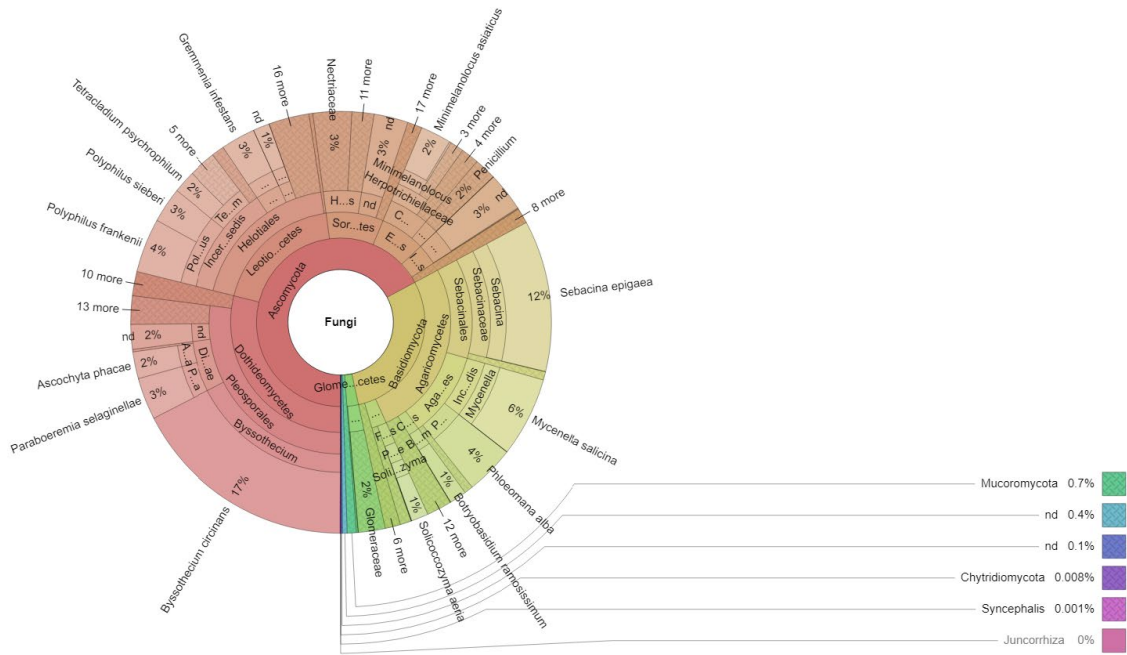


Figura 2.3: Asignación taxonómica de las lecturas de la población de Picos de Europa.

### ***Armeria cantabrica* Boiss. & Reut. ex Willk. in Willk. & Lange.**

En los análisis efectuados en *A. cantabrica* se han obtenido un total de 727.773 lecturas donde, el filo Ascomycota, con el 72,3% de las lecturas, es el más representativo (las lecturas se encuentran en el Apéndice 1 Tabla 1). El filo Basidiomycota obtiene el 24,2%, Glomeromycota el 1,8%, Mucoromycota el 1,3%, Cryptomycota y el reino Fungi el 0,2%, Chytridiomycota el 0,02% y Zoopagomycota el 0,002% (Anexo 1: Tabla 1, Figura 2.4).

Se han identificado un total de 151 especies, 143 géneros, 90 familias, 46 órdenes, 22 clases y 7 filios (Tabla 2.6, Figura 2.12a). Teniendo en cuenta el conjunto de las extracciones efectuadas, las especies con mayor representación son *Mycenella salicina* (16%), *Polyphilus frankenii* D.G. Knapp, Ashrafi, W. Maier & Kovács 2018 (11%) y, por último, *Paraboeremia selaginellae* (Sacc.) Qian Chen & L. Cai 2015 (8,1%). Los géneros de estas especies, *Mycenella* (J.E.Lange) Singer (16%), *Polyphilus* (15,1%) y *Knufia* L.J. Hutchison & Unter. (9,1%), son los dominantes. Incertae sedis (30,5%), Tricholomataceae R. Heim ex Pouzar (16%) y Didymellaceae Gruyter, Aveskamp & Verkley (9,5%) son las familias más abundantes. El orden Helotiales (24,3%) es el dominante, seguido por Agaricales Underw (16,3%) y Pleosporales (10,7%). Las clases más representativas son: Leotiomycetes (24,5%), Agaricomycetes (17,3%) y Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka (15,1%) (Figura 2.4).



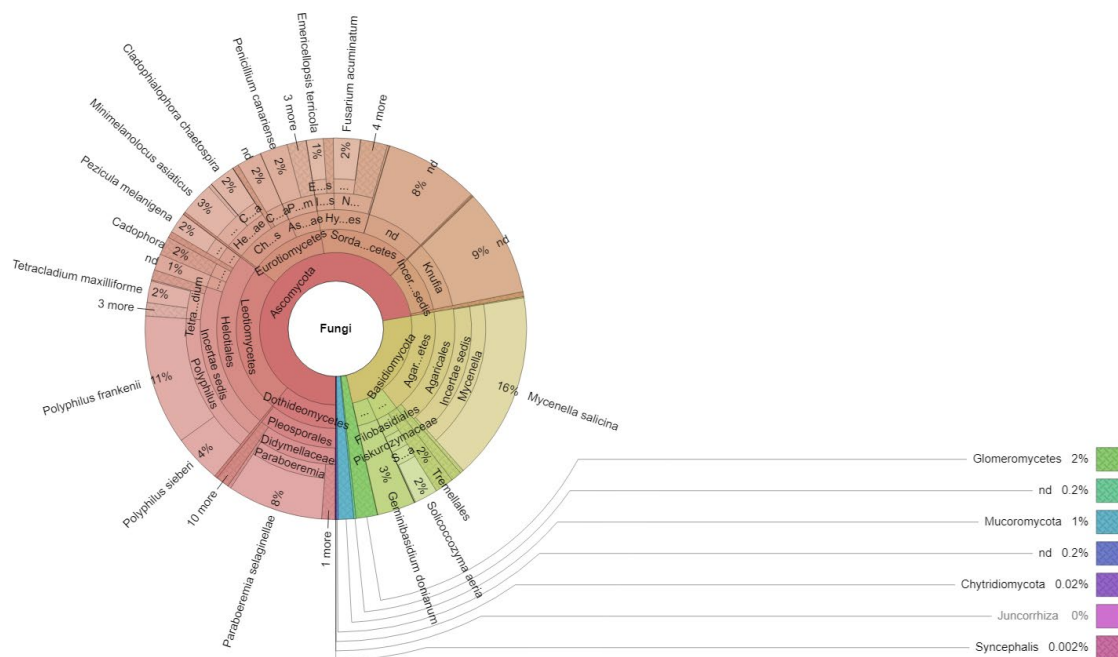


Figura 2.4: Asignación taxonómica de las lecturas de *A. cantabrica* (Picos de Europa).

### *Anthyllus vulneraria* L.

Se han obtenido un total de 340.103 lecturas de las cuales, el 82,6% pertenecen al filo Ascomycota, el 14,5% a Basidiomycota, el 2,5% a Glomeromycota, el 0,3% a Mucoromycota, el 0,1% al reino Fungi y el 0,01% a Cryptomycota (Anexo 1: Tabla 1, Figura 2.5).

Tras la asignación taxonómica se han identificado un total de 88 especies, 77 géneros, 50 familias, 31 órdenes, 15 clases y 5 filios (Tabla 2.6, Figura 2.12a) siendo, las especies principales, *B. circinans* (29,3%), *Minimelanolocus asiaticus* Hong Y. Su, Udayanga & K.D. Hyde 2015 (9,3%) y, por último, *Tetracladium psychrophilum* M.M. Wang & Xing Z. Liu 2014 (8,1%). Tanto *Byssothecium* (29,3%) como *Minimelanolocus* R.F. Castañeda & Heredia (9,4%), seguido de *Tetracladium* De Wild. (8,2%) son los géneros dominantes. Massarinaceae (29,3%), Incertae sedis (8,5%) y Herpotrichiellaceae Munk (9,9%) son las familias dominantes. Pleosporales (16%) seguido por, Helotiales (22,9%) y Chaetothyriales M.E. Barr (10,5%) son los órdenes más abundantes. Las clases más representativas son: Dothideomycetes (43,1%), Leotiomycetes (22,9%) y Eurotiomycetes O.E. Erikss. & Winka (12,4%) (Figura 2.5).





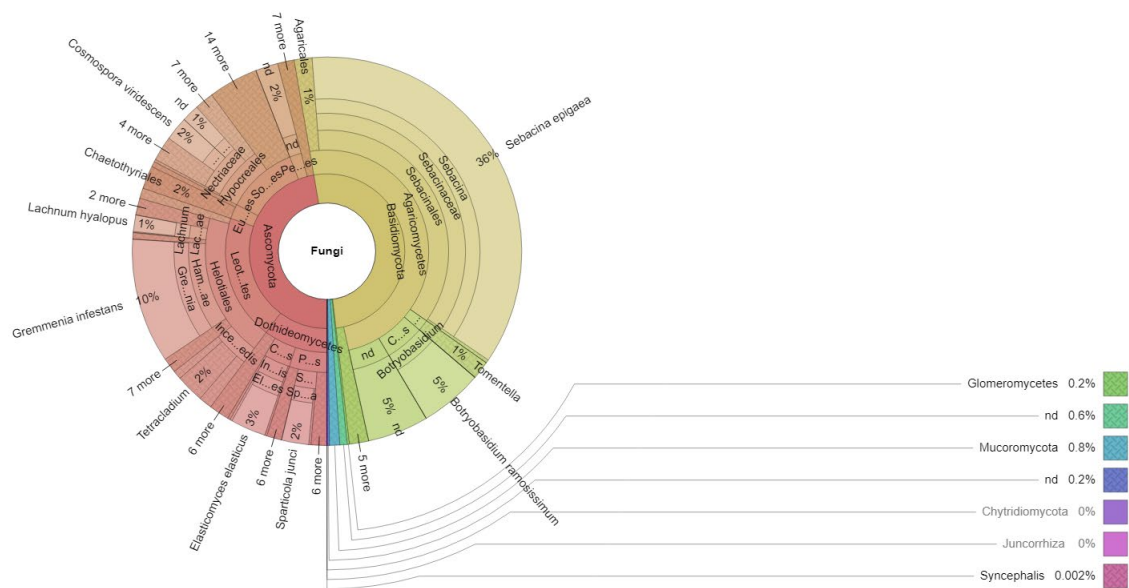


Figura 2.6: Asignación taxonómica de las lecturas de *C. sempervirens* (Picos de Europa).

### *Thymus praecox* Opiz.

De las 727.885 lecturas obtenidas para esta especie el 71,2% se asignan al filo Ascomycota, el 24% al filo Basidiomycota, el 4,1% al Glomeromycota, el 0,4% al reino Fungi, el 0,2% al Mucoromycota, el 0,06% al Cryptomycota y el 0,007% al Chytridiomycota (Anexo 1: Tabla 1, Figura 2.7).

En *T. praecox* (Picos de Europa) se ha detectado la presencia de un total de 234 especies, 213 géneros, 131 familias, 58 órdenes, 22 clases y 6 filios (Tabla 2.6, Figura 2.12a). Las especies principales, teniendo en cuenta el conjunto de las extracciones, son *B. circinans* (43,8%), *Phloeomana alba* (Bres.) Redhead (12,2%) y *S. epigaea* (8,6%), donde los géneros de estas especies son a su vez, los dominantes. Siguiendo el patrón, las familias Massariaceae (43,8%), Porotheleaceae Murrill (12,2%) y Sebacinaceae (8,7%), que albergan los géneros anteriores son las más representativas. Claramente, el orden Pleosporales (54%) es el dominante, seguido por Agaricales (14,1%) y Helotiales (7,1%). Las clases más representativas son: Dothideomycetes (55,6%), Agaricomycetes s (23,5%) y Leotiomycetes (10,8%) (Figura 2.7).

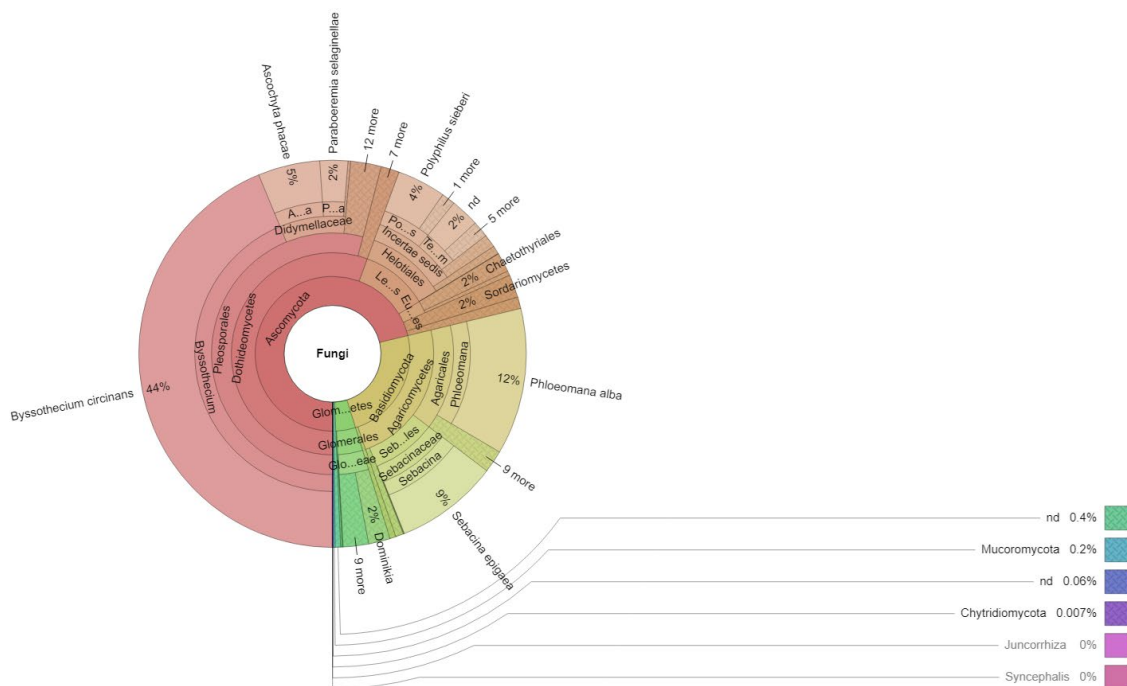


Figura 2.7: Asignación taxonómica de las lecturas de *T. praecox* (Picos de Europa).

## San Emiliano.

### Población.

En la población de zona central de la Cordillera Cantábrica se analizaron los sistemas radicales pertenecientes a 3 especies: *A. duriaei*, *L. caespitosa* y *T. praecox*. Se obtuvieron un total de 697 ASV donde, el filo más representativo, es Ascomycota con 482, seguido por Basidiomycota con 137, Mucoromycota con 42, Cryptomycota y Glomeromycota con 5, Chytridiomycota con 4 y Entorrhizomycota con 1. 21 de los 697 ASV, se quedaron asignados a nivel de reino (Tabla 2.5). Se obtuvieron un total de 1.898.440 lecturas (Anexo 1: Tabla 2).

Tabla 2.5: Distribución de los ASVs en las especies analizadas en San Emiliano y en la población global.

	<i>A.duriaei</i>	<i>T. praecox</i>	<i>L. caespitosa</i>	Global
Ascomycota	220	256	179	482
Basidiomycota	77	333	43	137
Chytridiomycota	3	2	0	4
Cryptomycota	3	2	2	5
Entorrhizomycota	0	0	1	1
Fungi (Reino)	9	11	6	21
Glomeromycota	4	2	0	5
Mucoromycota	29	16	19	42
Total	345	340	250	697

Tras la asignación taxonómica se ha constatado la presencia, en menor o mayor grado, de 223 especies, 189 géneros, 123 familias, 63 órdenes, 24 clases y 7 filos (Figura 2.12b). En el conjunto de las muestras analizadas, las especies con mayor representación son *Coniochaeta angustispora* D. Hawksw. & H.Y. Yip 1981 (6,7%), seguida de *Gremmenia infestans* (P. Karst.) Crous 2014 (4,4%) y de *Renatobasidium notabile* Hauerslev 1993 (2,3%); siendo, *Phialocephala* W.B. Kendr. (8%), *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke (7,4%) y *Gremmeria* Korf (4,4%) los principales géneros. En cuanto a las familias, las tres más comunes son Mollisaceae (8%), Coniochaetaceae Malloch & Cain (7,7%) y Leptodontidiaceae Hern.-Restr., Crous & Gené (7,2%). En el caso de los órdenes, los más representativos son Helotiales (37,4%), Sordariales Chadef. ex D. Hawksw. & O.E. Erikss. (21,3%) y Coniochaetales Huhndorf, A.N. Mill. & F.A. Fernández (7,7%). Las clases donde se engloban estos órdenes son, a su vez, las más representativas siendo éstas Leotiomycetes (39,6%) y Sordariomycetes (30,7%), completando el grupo, Agaricomycetes (19,01%).

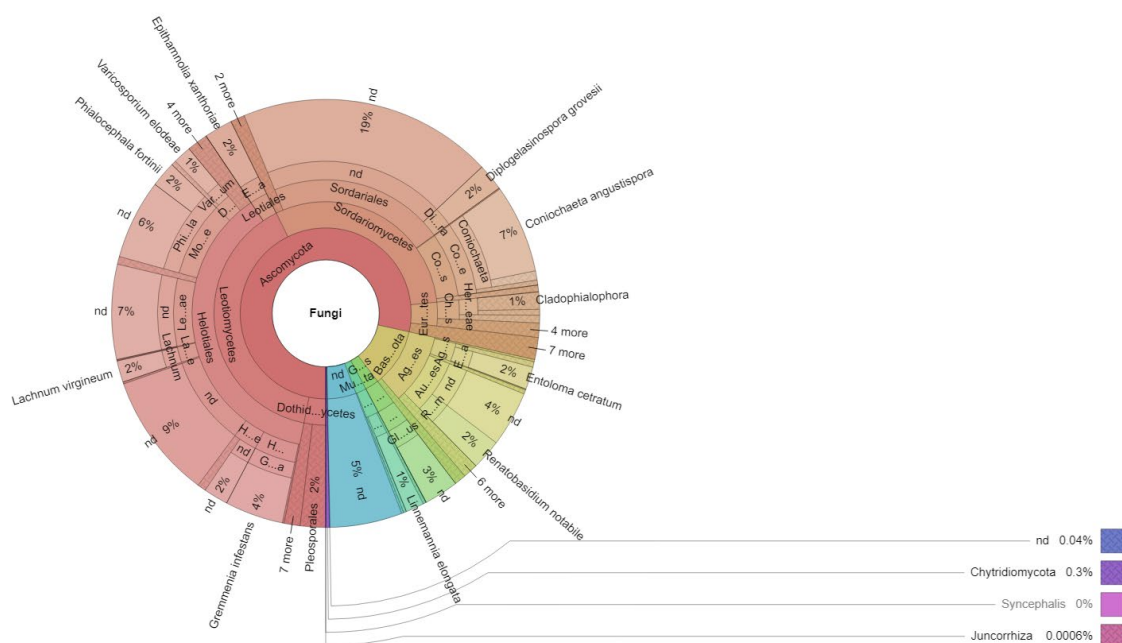


Figura 2.8: Asignación taxonómica de las lecturas de la población de San Emiliano.

### *Armeria duriaei* Boiss.

Tras la asignación taxonómica, el 85,8% de las 641.948 lecturas obtenidas se enmarcan en el filo Ascomycota, el 7% en el Basidiomycota, el 3,8% al Mucoromycota, el 2,9% se quedó asignado a nivel de reino, el 0,4% al filo Chytridiomycota, el 0,1% Cryptomycota y el 0,04% al Glomeromycota (Anexo 1: Tabla 2, Figura 2.9).

En el sistema radical de este ejemplar se han localizado un total de 132 especies, 120 géneros, 85 familias, 47 órdenes, 20 clases y 6 filos (Tabla 2.6, Figura 2.12b). *Diplogelasinospora grovesii* Udagawa & Y. Horie 1972 (6%), *Phialocephala fortinii* C.J.K. Wang & H.E. Wilcox 1986 (5,7%) y *Varicosporium elodeae* W. Kegel 1906 (4,1%) son las especies dominantes; *Phialocephala* W.B. Kendr. (22,5%),





Figura 2.10: Asignación taxonómica de las lecturas de *L. caespitosa* (San Emiliano).

### *Thymus praecox* Opiz.

En los análisis efectuados en *T. praecox* (San Emiliano) se han obtenido un total de 628.211 lecturas donde, el filo Ascomycota, con el 83,1% de las lecturas, es el más representativo. El filo Glomeromycota obtiene el 7,8%, Basidiomycota el 6,7%, Mucoromycota el 1,1%, al reino se le asignan el 0,7% Chytridiomycota el 0,4% y el 0,003% al filo Cryptomycota (Anexo 1: Tabla 2, Figura 2.11).

Se han identificado un total de 110 especies, 108 géneros, 78 familias, 43 órdenes, 16 clases y 6 filios (Tabla 2.6, Figura 2.12b). Teniendo en cuenta el conjunto de las extracciones efectuadas en el sistema radical las especies con mayor representación son, *G. infestans* (8,9%), *Lachnum virgineum* (Batsch) P. Karst. 1871 (3,7%) y por último *R. notabile* (2,8%). Los géneros *Gremmenia* (8,9%), *Glomus* Tul. & C. Tul. (7,8%) y *Lachnum* Retz. (3,7%), son los dominantes. Hamatocanthoscyphaceae Ekanayaka & K.D. Hyde (8,9%), Glomeraceae Piroz. & Dalpé (7,8%) y Leptodontidiaceae (4,9%) son las familias más abundantes. El orden Sordariales (45,6%) es el dominante, seguido por Helotiales (28,7%) y Glomerales J.B. Morton & Benny (7,8%). Las clases más representativas son: Sordariomycetes (47,3%), Leotiomycetes (28,7%) y Glomeromycetes Caval.-Sm. (7,8%) (Figura 2.11).



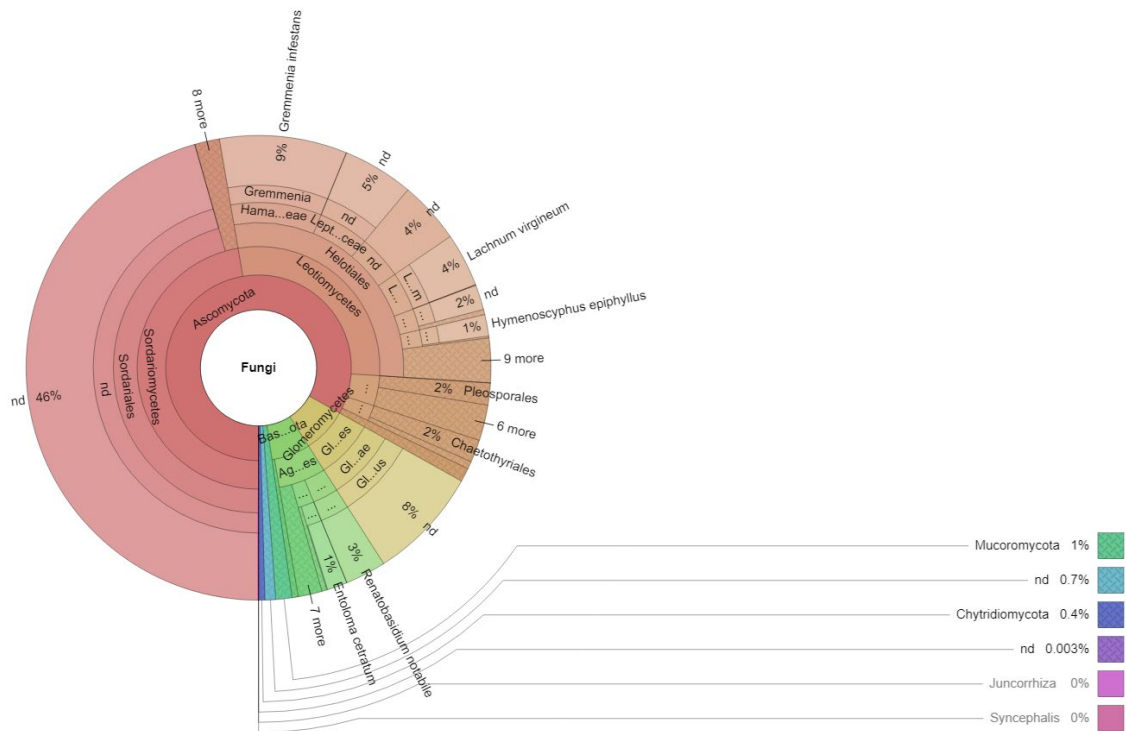


Figura 2.11: Asignación taxonómica de las lecturas de *T. praecox* (San Emiliano).

### Resumen global.

En la población de Picos de Europa se identificó la presencia, en menor o mayor grado, de 422 especies, 341 géneros, 173 familias, 74 órdenes, 24 clases y 7 filos siendo, la especie que presentan unos mayores valores de abundancia *T. praecox*, seguida de *A. cantabrica*, *C. sempervirens* y, por último, *A. vulneraria* (Tabla 2.6, Figura 2.12a). Los valores tanto de la población, como de las especies que la conforman, son menores en San Emiliano donde se han constatado la presencia, en mayor o menor grado, de 223 especies, 189 géneros, 123 familias, 63 órdenes, 24 clases y 7 filos y, al igual que en la población anterior, *T. praecox* es la especie que presenta una mayor abundancia seguida de *A. duriaei* y *L. caespitosa* (Tabla 2.6, Figura 2.12b).

La distribución de las lecturas de los principales filos en cada una de las localizaciones se encuentra recogidas en el Anexo 1.

Tabla 2.6: Resumen de la asignación taxonómica de los miembros de las comunidades de pastizal (el valor entre paréntesis indica los valores únicos de esa categoría para esa especie en esa localización).

Zona	Especie	Reino	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
San Emiliano	<i>A. duriaei</i>	1 (0)	6 (0)	20 (4)	47 (9)	85 (23)	120 (34)	132 (52)
	<i>L. caespitosa</i>	1 (0)	5 (1)	15 (2)	36 (6)	65 (14)	88 (26)	101 (41)
	<i>T. praecox</i>	1 (0)	6 (0)	16 (1)	43 (7)	78 (12)	108 (31)	110 (35)
Picos de Europa	<i>A. vulneraria</i>	1 (0)	5 (0)	15 (0)	31 (0)	50 (1)	77 (5)	88 (15)
	<i>A. cantabrica</i>	1 (0)	7 (0)	22 (0)	46 (1)	90 (9)	143 (28)	151 (36)
	<i>C. sempervirens</i>	1 (0)	6 (0)	19 (0)	49 (10)	105 (20)	188 (70)	206 (110)
	<i>T. praecox</i>	1 (0)	6 (0)	22 (1)	58 (9)	131 (34)	213 (81)	234 (112)

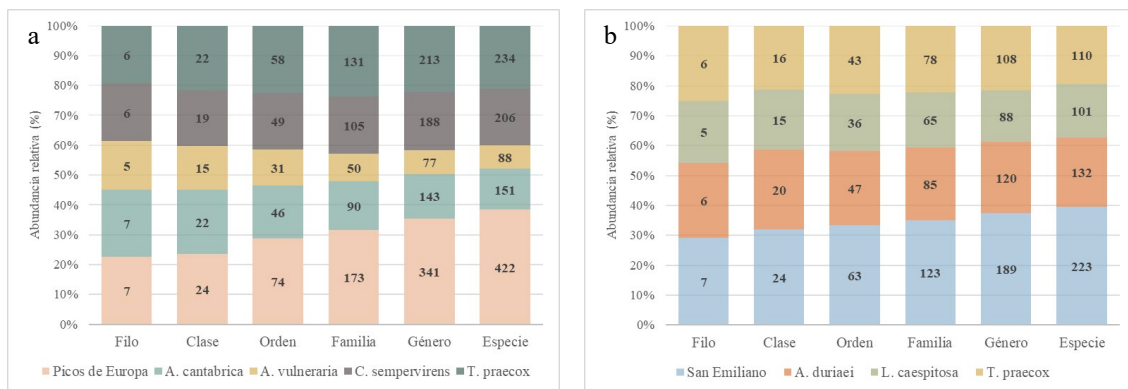


Figura 2.12: Resumen de la asignación taxonómica. a) Picos de Europa, b) San Emiliano.

### 2.3.2. Diversidad alfa ( $\alpha$ ).

Se realizó el estudio de la  $\alpha$  diversidad en dos niveles: poblacional y específico dentro de las poblaciones.

#### 2.3.2.1. Poblacional.

A nivel poblacional, se puede observar como el Índice de Shannon en Picos de Europa aumenta al hacerlo el nivel taxonómico, es decir, es mayor a nivel de especie que de filo (Figura 2.14) siendo significativamente superiores que en la zona de San Emiliano. En esta zona, el nivel máximo se encuentra a nivel de familia, disminuyendo para género y especie (Figura 2.14). Salvo a nivel de filo, en ambas poblaciones los valores son normales, encontrándose entre 1,5 y 3,5 (Figura 2.14), siendo altos ( $>3$ ) a nivel de género y especie en Picos de Europa y, bajos ( $< 2$ ) en el filo y clase en ambas poblaciones y especie en San Emiliano (Figura 2.14).



En los Picos de Europa, el Índice de Pielou muestra valores de 0,4 y 0,5, lo que sugiere una dominancia moderada de ciertos parámetros analizados en la comunidad, excepto a nivel de filo, donde un valor de 0,6 indica una mayor equidad entre los grupos (Figura 2.13a). Por otro lado, en San Emiliano, los valores oscilan entre 0,5 y 0,7, lo que implica una dominancia menos pronunciada de algunas especies o grupos en comparación con los Picos de Europa (Figura 2.13a).

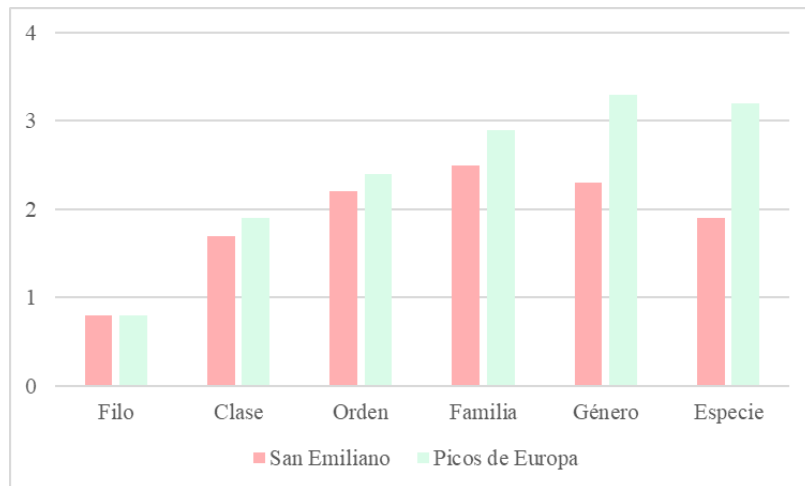


Figura 2.14: Valores del Índice de Shannon a nivel poblacional.



Figura 2.13: a) Índice de Pielou a nivel poblacional; b) Índice de Simpson a nivel poblacional.

Los datos del Índice de Simpson indican que, en Picos de Europa en todos los niveles taxonómicos salvo en filo, existe una distribución equitativa de los grupos o especies (Figura 2.13b). En San Emiliano los valores, aunque inferiores, también reflejan esta tendencia (Figura 2.13b).

Teniendo en cuenta los valores de los 3 índices se podría indicar que la población de Picos de Europa presenta unos valores de diversidad altos, ésta no está dominada por unas pocas especies o grupos existiendo una cierta equitatividad en la distribución de sus miembros. San Emiliano, por el contrario, presenta unos valores de diversidad más moderados y, al igual que el caso anterior, no dominada por unas pocas especies o grupos y, donde existe una cierta equitatividad.

### 2.3.2.2. Picos de Europa.

El Índice de Shannon revela que, con excepción del nivel familiar, los valores de diversidad más altos corresponden a *A. cantabrica*, como se muestra en la Figura 2.14. Estos valores varían entre las distintas especies herbáceas. A excepción de los niveles de filo en *A. cantabrica* y clase en *T. praecox*, los índices se mantienen en un rango normal, entre 1,5 y 3,5 (Figura 2.15). Es importante destacar que ninguna especie exhibe valores altos, definidos como mayores a 3, en ningún nivel taxonómico (Figura 2.15). Los valores más elevados de diversidad se registran específicamente a nivel de género y clase (Figura 2.15). En las especies el Índice de Pielou toma valores entre 0,3 y 0,7. Se puede observar cómo los valores varían dependiendo del nivel analizado (Figura 2.16a). *A. cantabrica* presenta los valores más bajos, lo que indicaría la presencia de cierta dominancia (Figura 2.16a), lo contrario ocurre con *T. praecox*, cuyos valores indican un cierto grado de equitatividad (Figura 2.16a). Al igual que el índice anterior, los datos del Índice de Simpson indican que, en todos los niveles taxonómicos salvo en filo, no existe dominancia por parte de unos grupos o especies frente a otros (Figura 2.16b).

Teniendo en cuenta los valores de los 3 índices se podría indicar que, *A. vulneraria* posee unos valores de diversidad medios, salvo a nivel de filo que son bajos, no estando la comunidad dominada por unas pocas especies o grupos existiendo una cierta uniformidad en la distribución de sus miembros. *A. cantabrica* presenta unos valores de diversidad moderados y, al igual que el caso anterior, no hay dominancia por unas pocas especie o grupos, existiendo una cierta equitatividad. Los valores de diversidad de la comunidad fúngica de *C. sempervirens* son moderados y, donde todos sus miembros se reparten de forma equitativa y uniforme. La comunidad fúngica de *T. praecox* presenta unos valores de diversidad normales donde existe una cierta equitatividad en la distribución de sus miembros.

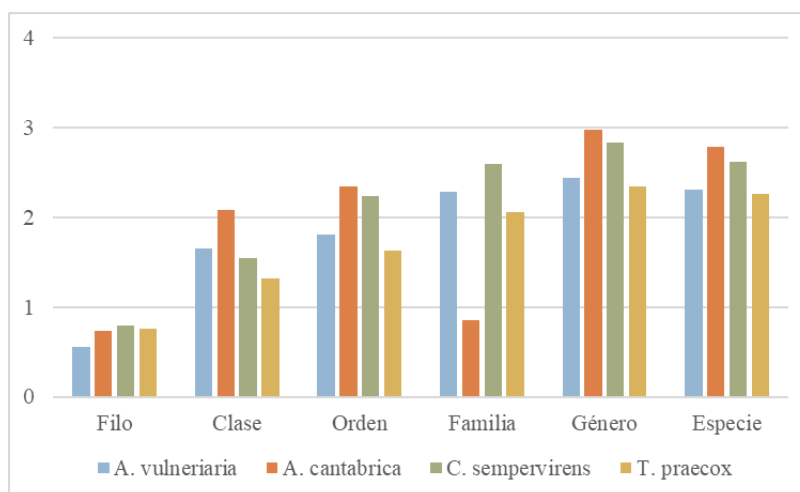


Figura 2.15: Valores del Índice de Shannon para las especies de la población de Picos de Europa.

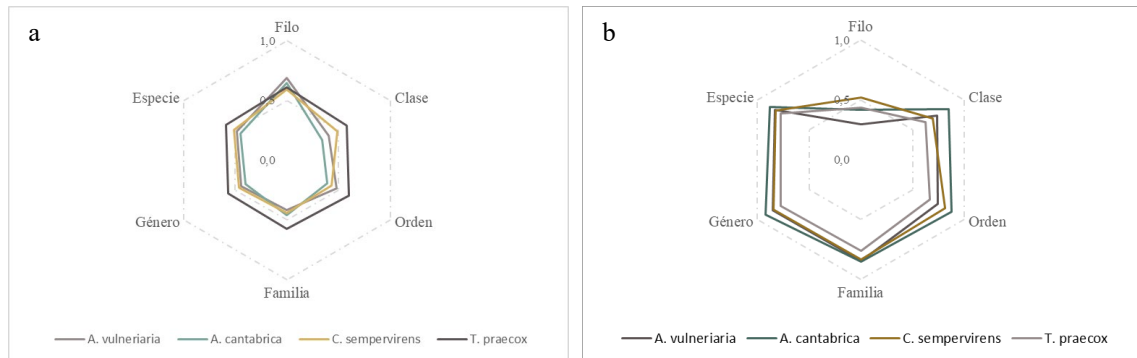


Figura 2.16: a) Índice de Pielou a nivel poblacional; b) Índice de Simpson de las especies de la población de Picos de Europa.

### 2.3.2.3. San Emiliano.

Como se expuso previamente, la diversidad biológica en la comunidad de San Emiliano, medida a través del Índice de Shannon, es inferior a la observada en los Picos de Europa. Dentro de San Emiliano, *A. duriaei* destaca por presentar los índices de diversidad más elevados, mientras que *T. praecox* muestra los más bajos. Los valores típicamente se sitúan en un rango de 1,5 a 3,5, aunque hay excepciones; específicamente, a nivel de filo y especie en *T. praecox*, donde los índices descienden por debajo de 1,5 (Figura 2.17). El Índice de Pielou en las especies muestra valores que oscilan entre 0,4 y 0,7, variando según el nivel taxonómico analizado (Figura 2.18a). Esto sugiere que, en términos generales, los miembros de las comunidades presentan una distribución bastante uniforme (Figura 2.18a). Por otro lado, el Índice de Simpson revela que, exceptuando el nivel de filo, no se observa una tendencia hacia la dominancia de ciertos grupos o especies sobre otros en los distintos niveles taxonómicos, lo cual es un patrón común (Figura 2.18b).

Teniendo en cuenta los valores de los índices se podría indicar que, *A. duriaei* posee unos valores de diversidad medios, salvo a nivel de filo que son bajos, presentando unos valores de dominancia moderados y con una cierta uniformidad en la distribución de sus miembros. *L. caespitosa* presenta unos valores de diversidad medios, salvo a nivel de filo que son bajos, no estando su comunidad fúngica dominada por unas pocas especies o grupos donde las especies o grupos no tienden a estar distribuidos de forma equitativa. La comunidad fúngica de *T. praecox* presenta unos valores de diversidad normales, salvo a nivel de filo y especie que son bajos, donde unas especies o grupos de especies no suelen dominar frente a otros y existe una cierta equitatividad en la distribución de sus miembros.

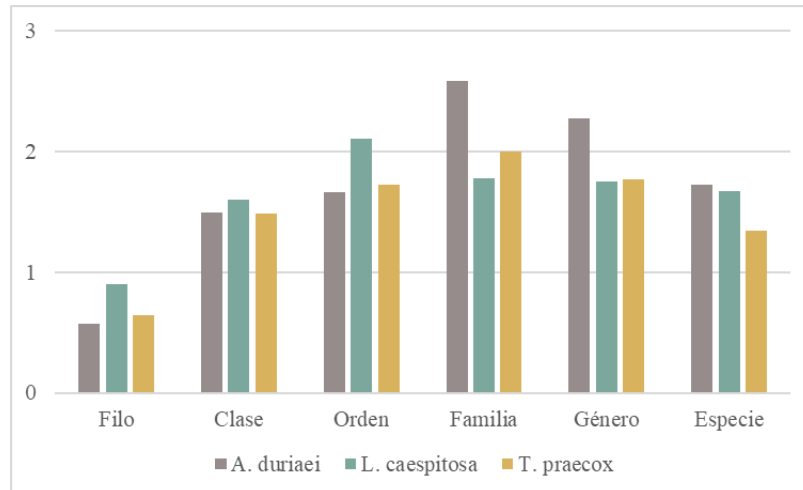


Figura 2.17: Valores del Índice de Shannon para las especies de la población de San Emiliano.

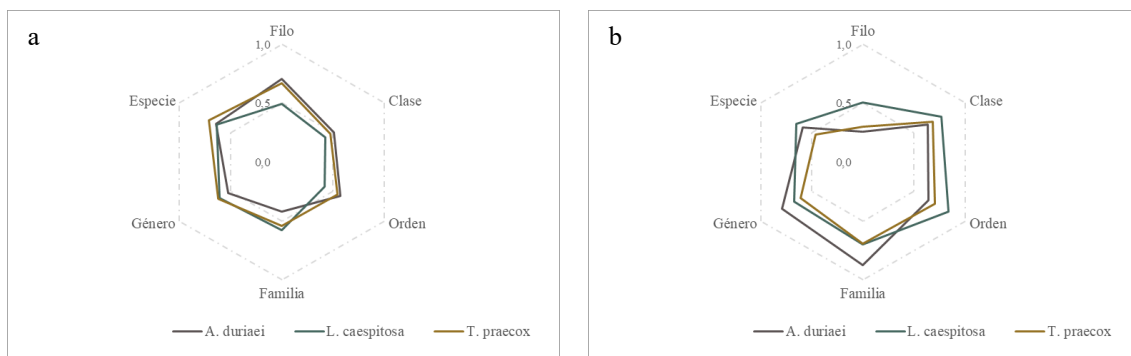


Figura 2.18: a) Índice de Pielou a nivel poblacional; b) Índice de Simpson de las especies de la población de San Emiliano.

## 2.4. DISCUSIÓN.

La investigación de la rizosfera en dos comunidades vegetales situadas por encima del límite forestal en la Cordillera Cantábrica —Hou sin Tierri en el Parque Nacional de Picos de Europa (Asturias) y Rabinalto en la Zona de Especial Conservación San Emiliano (León)— ha revelado la rica diversidad y complejidad de las comunidades fúngicas asociadas a especies de pastizales. Estas especies se desarrollan en entornos extremos, donde su ciclo de vida está fuertemente condicionado por factores litológicos, edáficos y climáticos. Las dos localizaciones se diferencian principalmente en el tipo de sustrato y las condiciones bioclimáticas.

Se seleccionaron seis especies para el estudio: *Armeria cantabrica*, *Anthyllis vulneraria*, *Carex sempervirens* y *Thymus praecox* en los Picos de Europa, y *A. duriaei*, *Luzula caespitosa* y *T. praecox* en San Emiliano. Este conjunto de especies es representativo de la subprovincia Orocantábrica de la Cordillera Cantábrica e incluye un endemismo notable, *A. cantabrica*, como se documenta en el trabajo de Jiménez-Alfaro et al., 2021. Tras el estudio histológico se determinó una infección generalizada por parte de organismos fúngicos endofíticos entre ellos, endófitos septados oscuros (DSE),

observándose la presencia de microesclerocios e hifas septadas oscuras y micorrizas vesículo-arbusculares mediante la observación de arbusculos (orgánulo principal mediante el cual se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre un hongo y su hospedador) y vesículas (estructuras de almacenamiento de recursos para los hongos) (Tabla 2.7), confirmando en ambos casos esta diversidad con los análisis moleculares llevados a cabo.

Tabla 2.7: Estructuras observadas en los sistemas radicales.

Especie	DSE	Arbusculos	Vesículas
<i>A.cantabrica</i>	X	--	X
<i>A.duriaei</i>	X	X	--
<i>A.vulneraria</i>	X	X	X
<i>C.sempervirens</i>	X	--	X
<i>L.caespitosa</i>	X	--	--
<i>T.praecox</i> Picos	X	X	X
<i>T.praecox</i> San Emiliano	X	X	X

Estos resultados son coincidentes con los llevados a cabo en zonas alpinas, como en Haselwandter & Read (1980), Read & Haselwander (1981), Ruotsalainen et al. (2002), Schmidt et al. (2008) o Bueno de Mesquita et al. (2018), donde se constata la presencia tanto de micorrizas vesículo-arbusculares como de DSE en las comunidades herbáceas, generalmente coexistiendo en un mismo ejemplar. Es innegable la aportación que este tipo de asociaciones tienen en el desarrollo de las comunidades herbáceas en ambientes fríos donde los hongos arbusculares jugarían un papel crucial en la adquisición de N y fósforo (P) mientras que, los DSE en el ciclo del N (Bueno de Mesquita et al., 2018).

Durante el proceso de análisis molecular no se realizó ningún tipo de proceso de esterilización previo puesto que el interés de este estudio es determinar los organismos que conviven en la rizosfera de las especies analizadas, tanto dentro como fuera de las raíces.

La asignación taxonómica de los organismos fúngicos se basó en la determinación (taxonómica) de las secuencias de ADN obtenidas mediante técnicas de DNA Metabarcoding. En la población de Picos de Europa se identificó la presencia, en menor o mayor grado, de 422 especies, 341 géneros, 173 familias, 74 órdenes, 24 clases y 7 filos siendo, la especie que presentan unos mayores valores de abundancia *T. praecox*, seguida de *A. cantabrica*, *C. sempervirens* y, por último, *A. vulneraria* (Figura 2.12a). Los valores tanto de la población, como de las especies que la conforman, son menores en San Emiliano donde se han constatado la presencia, en mayor o menor grado, de 223 especies, 189 géneros, 123 familias, 63 órdenes, 24 clases y 7 filos y, al igual que en la población anterior, *T. praecox* es la especie que presenta una mayor abundancia seguida de *A. duriaei* y *L. caespitosa* (Figura 2.12b).

Los valores obtenidos durante el cálculo de la diversidad alfa mediante el Índice de Shannon también muestran unos valores medios-bajos para la zona de San Emiliano siendo ligeramente superiores en Picos de Europa (Figura 2.14). Las principales características diferenciales entre las dos zonas son: i) el tipo de sustrato sobre el que se

sustenta la población, silíceo en San Emiliano y calcáreo en Picos de Europa, ii) la altitud, 2.117 m en San Emiliano y 1.990 m en Picos de Europa y iii) los días en los cuales el suelo tiene condiciones de sequía, 53 en San Emiliano y 7 en Picos de Europa.

Tal y como se reflejó en párrafos anteriores y se puede observar en la Tabla 2.6, existen notables diferencias en la composición de las comunidades fúngicas que conviven en la rizosfera de las especies estudiadas.

El principal filo, tanto en número de secuencias como de lecturas totales, es el Ascomycota siendo, las clases principales Leotiomycetes y Sordariomycetes en San Emiliano, y Dothideomycetes y Leotiomycetes, en Picos de Europa.

En cuanto a Leotiomycetes, el orden más importante es Helotiales, principal en San Emiliano y secundario en Picos de Europa, siendo este uno de los órdenes más importantes dentro del filo, incluyendo entre sus miembros, patógenos, saprófitos, endófitos, micorrícicos ericoides y ectomicorrícicos (Vrålstad et al., 2002). En cuanto a las poblaciones, en San Emiliano el 47,7% de las lecturas del filo se asignan a este orden, lo que da una idea del peso que este grupo de organismos tiene en la comunidad. Mollisacea, donde destacan los miembros del género *Phialophela*, entre ellos, *P. fortinii* (DSE), Leptodontiaceae e Hamatocanthoscyphaceae, con *G. infestans* (patógeno) como representante más destacado, son las familias más representativas. En Picos de Europa, este orden representa el 27,8% de las lecturas siendo el segundo en importancia dentro del filo, destacando los miembros de la familia Incertae sedis, entre ellos *Polyphilus frankenii* y *P. sieberi* (ambos DSE) junto con, *Tetracladium* spp. (DSE), Hamatocanthoscyphaceae, con *G. infestans* y la familia Hyaloscyphaceae. Tanto en San Emiliano, como en Picos de Europa, no existen variaciones reseñables en cuanto a la diversidad de este orden en de los ejemplares analizados siguiendo el patrón derivado del conjunto de la comunidad.

En ambas localizaciones, los individuos más importantes del orden son DSE siendo estos organismos comunes en los hábitats alpinos, por lo tanto, nuestros resultados irían en consonancia con los estudios previamente mencionados. Otra de las especies destacadas dentro el orden es *G. infestans*, conocido por ser *snow blight* o *snow mold pathogens* cuyas condiciones de desarrollo incluyen la formación de un manto permanente de nieve afectando, principalmente, a especies del género *Pinus* (Zerouki et al., 2023). Merges et al. (2017) detectaron esta especie por encima del límite de los árboles en un estudio realizado en los Alpes Suizos, por lo tanto, no es inusual su presencia en las comunidades analizadas.

En Picos de Europa la clase más representativa es Dothidiomycetes, siendo Pleosporales el orden más relevante dentro el filo en cuanto a número de lecturas. Los Pleosporales, al igual que los Helotiales, son un grupo muy abundante y ecológicamente diverso (Zhang et al., 2012). En este caso existen variaciones entre los distintos miembros de la comunidad siendo, Didymellaceae (*Paraboeremia selaginellae* -DSE-) dominante en *A. cantabrica*, Massarinaceae (*Byssothecium circinans* -saprófito- encontrado en registros polínicos en los Alpes Franceses – Dietre et al., 2012-) en *A. vulneraria* y *T. praecox* y Sporormiaceae (*Sparticola junci* -saprófito- Thambugala et al., 2017-) en *C. sempervirens*.

Sordariomycetes es la segunda clase en importancia dentro de la población de San Emiliano, y también dentro del filo Ascomycota (Maharachchikumbura et al., 2016). La mayoría de las lecturas asimilables a esta clase taxonómicamente se quedan asignadas a nivel de orden, Sordariales, en el caso de *A. duriaei* y *T. praecox* y a nivel de familia, Coniochaetaceae (Coniochaetales) en *L. caespitosa*. Sordariales, al igual que los órdenes indicados anteriormente, es abundante y ecológicamente diverso (Charria-Girón et al., 2022), Tanto Coniochaetales como Sordariales fueron aislados en zonas alpinas (Alpes Centrales) en Italia (Praeg et al., 2020) concordando con los resultados obtenidos en este trabajo.

El filo Basidiomycota está dominado, en ambas poblaciones, por miembros de la clase Agaricomycetes y Tremellomycetes (ambas clases presentes en zonas de pastizal alpino - Praeg et al., 2020-) existiendo diferencias en cuanto a los órdenes dominantes dependiendo de la población y la especie. En Picos de Europa los máximos representantes de la clase Agaricomycetes son los Agaricales en *A. cantabica*, *A. vulneraria* y *T. praecox* y, los Sebaciniales en *C. sempervires*; siendo, en San Emiliano, Auriculares en *L. caespitosa* y *T. praecox* y Agaricales en *A. duriaei*. Dentro de los principales grupos de hongos pertenecientes a estos órdenes se encuentran el género *Sebacina* (Sebaciniales) y *Entoloma* (Agaricales) ambos categorizados como ectomicorrícicos (Tedersoo et al., 2010), asociados con *A. duriaei* y *C. sempervirens* respectivamente. Debido al auge de las técnicas de análisis de DNA Metabarcoding cada vez más se están encontrando este tipo de hongos asociados a comunidades herbáceas en ambientes alpinos (Schön et al., 2022), por lo que, los resultados obtenidos concuerdan con estudios realizados previamente.

Dentro de los Tremellomycetes, destacan, en todas las especies y poblaciones la dominancia de géneros englobados dentro de las denominadas *yeast* (levaduras), entre ellos, *Bulleribasidium* spp. (Kurtzman & Fell, 2011), *Cryptococcus* spp. (Kurtzman & Fell, 2011), *Solicocozyma* spp. (Yurkov, 2017) o *Vishiacozyma* spp. (Yurkov, 2017) siendo estos grupos de especies usualmente aislados en zonas frías de Europa (Sannino et al., 2017). Al no haber hecho una esterilización previa de las raíces no se puede determinar realmente si forman parte de algún tipo de asociación con las plantas pudiendo ser dichos sus efectos mutualistas, comensales, antagonistas o patógenos (Mittelbach & Vannette, 2017).

En el caso de los hongos arbusculares (filo Glomeromycota), Geml (2017) hace un análisis en el cual cita varios trabajos en los que se hacen estudios de como varían las comunidades fúngicas a lo largo de gradientes altitudinales donde se reflejan las variaciones existentes en este aspecto; por ejemplo, cita a Geml et al. (2014) donde concluyen que la riqueza de los hongos AM disminuye con la altitud o Ruotsalainen et al. (2004) en cuyas conclusiones no aprecian tal disminución. En los resultados obtenidos en las poblaciones de estudio muestran que a este filo le corresponde un 2,6% de las lecturas totales de San Emiliano y un 2,2% de las totales de Picos de Europa, por lo tanto, no habría una disminución significativa en este aspecto en cuanto a la localización, sin embargo, hay diferencias notables en cuanto a la composición de este. En San Emiliano apenas hay variabilidad, siendo la gran mayoría de secuencias asignadas a nivel de género (*Glomus*) mientras que, en Picos de Europa existe una mayor diversidad en los niveles

taxonómicos detectado. En el caso de las poblaciones de estudio la diversidad estaría determinada por la altitud y los condicionantes edáficos, lo que concordaría con lo expuesto en Davison et al. (2015). En cuanto a las especies salvo el *L. caespitosa* en el resto, los análisis moleculares mostraron la presencia de individuos de este filo, siendo menor la diversidad en los ejemplares localizados en San Emiliano.

Principalmente, los representantes del filo Mucoromycota pertenecen a la clase Mortierellomycetes, orden Mortierellales, familia Mortierellaceae, siendo éste el tercer filo con mayores lecturas en *A. duriaei*, *C. sempervirens* y *L. caespitosa* (en el resto de las especies es Glomeromycota). Estos resultados son concordantes con Li et al. (2023) donde reflejan como este filo gana importancia con la altitud en ecosistemas alpinos siendo común encontrar especies del género *Linnemannia*, *Mortierella* o *Podila* (Telaghoti et al., 2022), dominantes en las comunidades de estudio. Los miembros de Mortierellaceae son considerados como saprófitos de suelo, sin embargo, algunas especies del género *Mortierella* son endófitos en raíces de diversas especies con funciones similares a los hongos AM (Johnson et al., 2019), lo que podría estar sucediendo en el caso de *A. duriaei*, *C. sempervirens* y *L. caespitosa*.

Chytridiomycota, Cryptomycota, Zoopagomycota y Entorrhizomycota son el resto de filo que se encuentran presentes. Salvo, Entorrhizomycota, individuos del resto de filos se aislaron en estudios sobre diversidad fúngica en ambientes alpinos (Li et al., 2023). Entorrhizomycota, género *Juncorrhiza*, aparece de forma residual asociado a *L. caespitosa*, concordando con las especificaciones descritas para este género (Van Steenwinkel & Vanderweyen, 2022).

## 2.5. CONCLUSIONES.

Las conclusiones derivadas del estudio sobre la diversidad fúngica de raíces y rizosfera de especies pertenecientes a sistemas de pastizal alpino ofrecen una visión detallada de las complejas interacciones entre las plantas hospedadoras y los hongos asociados en estos ecosistemas de alta montaña. Además, la investigación ha permitido profundizar en la importancia de las alianzas simbióticas entre las especies vegetales y fúngicas en entornos alpinos, donde las condiciones ambientales extremas y los suelos jóvenes generados por eventos glaciares recientes plantean desafíos únicos para la supervivencia de las plantas.

A través de análisis taxonómicos, índices de diversidad y asignación precisa de especies fúngicas, se ha podido explorar la riqueza, dominancia, uniformidad y distribución de los hongos en la rizosfera y raíces de las plantas estudiadas. En este contexto, se destacan hallazgos significativos que revelan la diversidad taxonómica, los patrones de dominancia y uniformidad, la estructura de las comunidades fúngicas y las adaptaciones específicas de los hongos a las diferentes especies de plantas hospedadoras en los sistemas de pastizal alpino analizados.

A continuación, se detallan las principales conclusiones que sobresalen de este estudio sobre la diversidad fúngica en ambientes alpinos.



- **Riqueza Taxonómica:** La diversidad taxonómica en las comunidades fúngicas de las especies de pastizal alpino estudiadas reveló la presencia de diversos filos, géneros y especies. Por ejemplo, se identificaron filos como Glomeromycota, Zygomycota, y Ascomycota, con géneros como *Rhizophagus*, *Mortierella*, y *Cladosporium*, y especies como *Rhizophagus intraradices* y *Mortierella elongata*, demostrando la amplia variedad de taxones presentes en la rizosfera y raíces de las plantas analizadas.

- **Dominancia y Uniformidad:** Los análisis de dominancia y uniformidad en las comunidades fúngicas destacaron patrones interesantes. Por ejemplo, en *Armeria cantabrica* se observó una dominancia de hongos micorrícicos arbusculares, como *Glomus* spp., mientras que en *Thymus praecox* se encontró una mayor diversidad de hongos ectomicorrícicos, como *Laccaria* spp. y *Suillus* spp., lo que sugiere adaptaciones específicas de los hongos a las especies de plantas hospedadoras.

- **Índices de Diversidad:** Los índices de diversidad alfa ( $\alpha$ ) proporcionaron valores detallados sobre la diversidad fúngica en las especies de pastizal alpino estudiadas. *Anthyllis vulneraria* mostró una diversidad fúngica alta con una equitativa distribución de especies, incluyendo hongos del género *Fusarium* y *Trichoderma*, mientras que *Luzula caespitosa* presentó una diversidad más baja, pero con una dominancia de hongos del género *Penicillium*, indicando diferencias en la estructura de las comunidades fúngicas entre las especies analizadas.

- **Asignación Taxonómica Precisa:** La asignación taxonómica basada en DNA Metabarcoding permitió una identificación precisa de los taxones presentes en las poblaciones de Picos de Europa y San Emiliano. En Picos de Europa, se encontraron especies como *Tuber melanosporum* y *Lactarius deliciosus* en asociación con las plantas hospedadoras, mientras que en San Emiliano se destacaron especies como *Amanita muscaria* y *Boletus edulis*, evidenciando una diversidad taxonómica única en cada localización.

En resumen, la diversidad taxonómica en las comunidades fúngicas asociadas a las especies de pastizal alpino estudiadas refleja la complejidad de las interacciones planta-hongo, con la presencia de diversos filos, géneros y especies que contribuyen a la estructura y función de estos ecosistemas de alta montaña.

## 2.6. BIBLIOGRAFÍA.

- Bartram, J., Mountjoy, E., Brooks, T., Hancock, J., Williamson, H., Wright, G., Moppett, J., Goulden, N., & Hubank, M. (2016). Accurate sample assignment in a multiplexed, ultrasensitive, high-throughput sequencing assay for minimal residual disease. *The Journal of Molecular Diagnostics* 18, 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.02.008>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., & others (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(3), 473–495. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>
- Bueno de Mesquita, C. P., Sartwell, S. A., Ordemann, E. v., Porazinska, D. L., Farrer, E. C., King, A. J., Spasojevic, M. J., Smith, J. G., Suding, K. N., & Schmidt, S. K. (2018). Patterns of root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes across a mostly-unvegetated, high-elevation landscape. *Fungal Ecology*, 36, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.07.009>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., & Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T.L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Charria-Girón, E., Surup, F. & Marin-Felix, Y. (2022). Diversity of biologically active secondary metabolites in the ascomycete order Sordariales. *Mycol Progress* 21, 43 <https://doi.org/10.1007/s11557-022-01775-3>
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Bâ, A., ... & Zobel, M. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349(6251), 970-973.
- d'Errico, G., Aloj, V., Flematti, G. R., Sivasithamparam, K., Worth, C. M., Lombardi, N., Ritieni, A., Marra, R., Lorito, M., & Vinale, F. (2021). Metabolites of a *Drechslera* sp. endophyte with potential as biocontrol and bioremediation agent. *Nat Prod Res. Nov*;35(22):4508-4516. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1737058>
- Dietre, B., Gauthier, É., & Gillet, F. (2012). Modern pollen rain and fungal spore assemblages from pasture woodlands around Lake Saint-Point (France). *Review of Palaeobotany and Palynology*, 186, 69-89.

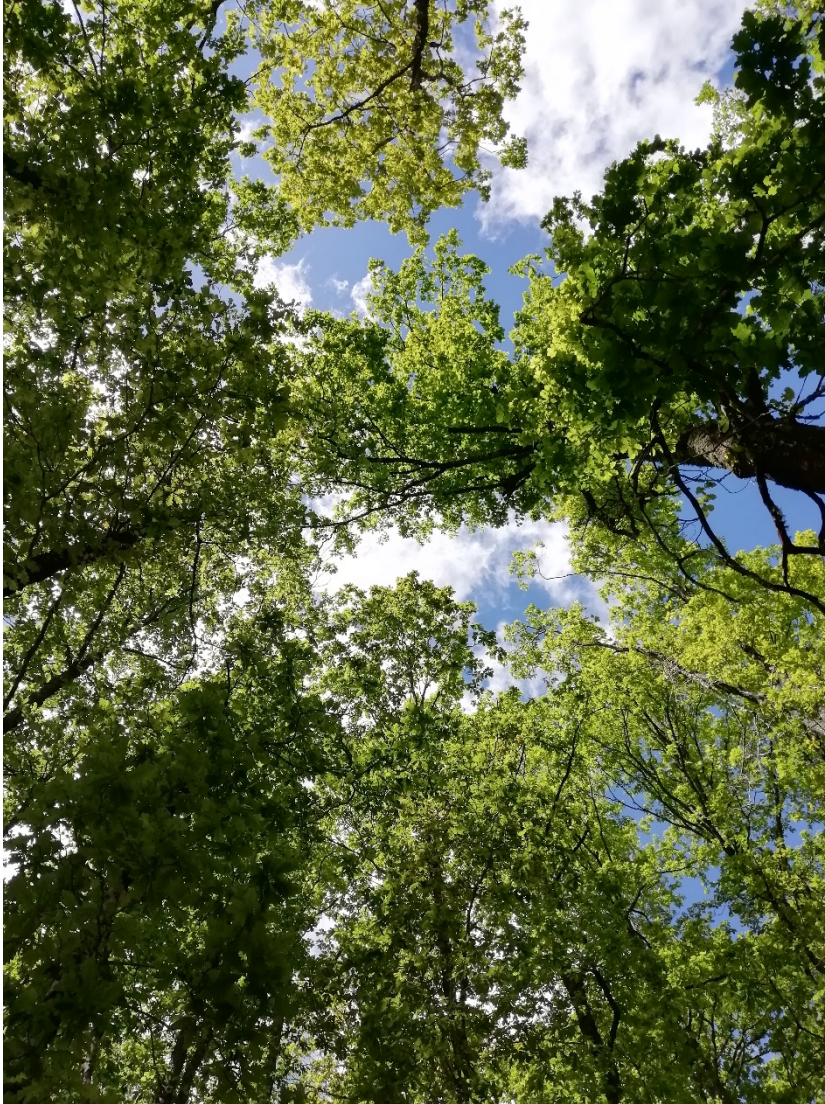
- Esling, P., Lejzerowicz, F., Pawlowski, J. (2015). Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. *Nucleic Acids Research* 43, 2513–2524. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv107>
- França, L., Sannino, C., Turchetti, B. et al. (2016). Seasonal and altitudinal changes of culturable bacterial and yeast diversity in Alpine Forest soils. *Extremophiles* 20, 855–873. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0874-2>
- Gardes, M., Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- Geml, J., Pastor, N., Fernandez, L., Pacheco, S., Semenova, T. A., Becerra, A. G., ... & Nouhra, E. R. (2014). Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Molecular ecology*, 23(10), 2452-2472.
- Geml, J. (2017). Altitudinal gradients in mycorrhizal symbioses: The current state of knowledge on how richness and community structure change with elevation. *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*, 107-123.
- Guardiola, M., Wangenstein, O.S., Taberlet, P., Coissac, E., Uriz, M.J., Turon, X. (2016). Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ* 4, e2807. <https://doi.org/10.7717/peerj.2807>
- 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. In *Oecologia (Berl.)* (Vol. 45).
- Hibbett, D. S., Bauer, R., Binder, M., Giachini, A. J., Hosaka, K., Justo, A., ... & Thorn, R. G. (2014). 14 Agaricomycetes. *Systematics and evolution: part A*, 373-429.
- Illumina, I. (2017). Effects of index misassignment on multiplexing and downstream analysis.
- Jiménez-Alfaro, B., Carlón, L., Fernández-Pascual, E., Acedo, C., Alfaro-Saiz, E., Alonso Redondo, R., Cires, E., del Egido Mazuelas, F, del Río, S., Díaz-González, T.E., García-González, M.E., Lence, C., Llamas, F., Nava, H., Penas, A., Rodríguez Guitián, M.A. & M. Vázquez, V. (2021). Checklist of the vascular plants of the Cantabrian Mountains. *Mediterr. Bot.* 42, e74570. <https://dx.doi.org/10.5209/mbot.74570>
- Johnson, J. M., Ludwig, A., Furch, A. C., Mithöfer, A., Scholz, S., Reichelt, M., & Oelmüller, R. (2019). The beneficial root-colonizing fungus *Mortierella hyalina* promotes the aerial growth of *Arabidopsis* and activates calcium-dependent responses that restrict *Alternaria brassicae*-induced disease development in roots. *Molecular plant-microbe interactions*, 32(3), 351-363.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2010). *The yeasts* (Vol. 2354). Elsevier.

- Ludwig, J. A., & Reynolds, J. F. (1988). *Statistical ecology: a primer in methods and computing* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Jones, E. G., McKenzie, E. H. C., Bhat, J. D., Dayarathne, M. C., ... & Wijayawardene, N. N. (2016). Families of sordariomycetes. *Fungal diversity*, 79, 1-317.
- Margalef, R. (1972). Homage to E. Hutchison, or why is there an upper limit to diversity. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences* 44: 21-235
- Mittelbach, M & Vannette, R. L. (2017). Mutualism Yeast. In *Yeasts in natural ecosystems: ecology*, 155-178.
- Merges, D., Bálint, M., Schmitt, I., Böhning-Gaese, K., & Neuschulz, E. L. (2018). Spatial patterns of pathogenic and mutualistic fungi across the elevational range of a host plant. *Journal of Ecology*, 106(4), 1545-1557.
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. M&T–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84 pp.
- Nagy, L. (2006). European High Mountain (Alpine) Vegetation and its Suitability for Indicating Climate Change Impacts. *Biology and Environment-proceedings of The Royal Irish Academy*
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F.,..., Ter Braak, C., & Weedon, J. (2022). *\_vegan: Community Ecology Package\_*. R package version 2.6-4, <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H. & Phillippy, A.M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12, 385 <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing root and stainin parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*: 55(1), 158-IN18.
- Pielou, F. C. (1975). *An Introduction to Mathematical Biology*. John Wiley and Sons USA
- Poulenard, J., & Podwojewski, P. (2006). Alpine soils. *Encyclopedia of Soil Science*. New York: Marcel Dekker, 7579.
- Praeg, N., Seeber, J., Leitinger, G., Tasser, E., Newesely, C., Tappeiner, U., & Illmer, P. (2020). The role of land management and elevation in shaping soil microbial communities: Insights from the Central European Alps. *Soil Biology and Biochemistry*, 150, 107951.
- R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Read, D. J., & Haselwandter, K. (1981). Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytologist*, 88(2), 341-352.
- Rivas-Martínez, S. (1990). Los pisos subalpino y alpino de los Pirineos y de la Cordillera Cantábrica: relaciones y diferencias. In Villar, L. (ed.). *Botánica pirenaico-cantábrica. Actas del II Coloquio Internacional de Botánica pirenaicocantábrica: 577-595*. Huesca y Jaca.
- Rivas-Martínez, S., Penas, Á., Díaz González, T. E., Cantó, P., del Río, S., Costa, J. C., ... & Molero, J. (2017). Biogeographic units of the Iberian Peninsula and Balearic Islands to district level. A concise synopsis. *The Vegetation of the Iberian Peninsula: Volume 1*, 131-188.
- Ruotsalainen, A. L., Väre, H., & Vestberg, M. (2002). Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs. *Mycorrhiza*, 12(1), 29-36. <https://doi.org/10.1007/s00572-001-0145-6>
- 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(2), 239-243.
- Sannino, C., Tasselli, G., Filippucci, S., Turchetti, B., & Buzzini, P. (2017). Yeasts in nonpolar cold habitats. *Yeasts in natural ecosystems: Diversity*, 367-396.
- 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(3), 576-583. [https://doi.org/10.1657/1523-0430\(07-068\)](https://doi.org/10.1657/1523-0430(07-068))
- Schön ME, Abarenkov K, Garnica S. Host generalists dominate fungal communities associated with alpine knotweed roots: a study of Sebaciniales. *PeerJ*. 2022 Oct 5;10:e14047. doi: 10.7717/peerj.14047. PMID: 36217381; PMCID: PMC9547586.
- Simpson, E (1949). Measurement of Diversity. *Nature* 163, 688 <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Smith, S. E., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic press.
- Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. In *Mycorrhiza* (Vol. 20, Issue 4, pp. 217-263). <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x>
- Telagathoti, A., Probst, M., Mandolini, E., & Peintner, U. (2022). Mortierellaceae from subalpine and alpine habitats: new species of *Entomortierella*, *Linnemannia*, *Mortierella*, *Podila* and *Tyroliella* gen. nov. *Studies in Mycology*, 103(1), 25-58.
- Testolin, R., Attorre, F., & Jiménez-Alfaro, B. (2020). Global distribution and bioclimatic characterization of alpine biomes. *Ecography*, 43(6), 779-788.

- Testolin, R., Carmona, C. P., Attorre, F., Borchardt, P., Bruelheide, H., Dolezal, J., ... & Jiménez-Alfaro, B. (2021). Global functional variation in alpine vegetation. *Journal of Vegetation Science*, 32(2), e13000.
- Thambugala, K. M., Wanasinghe, D. N., Phillips, A. J. L., Camporesi, E., Bulgakov, T. S., Phukhamsakda, C., ... & Hyde, K. D. (2017). Mycosphere notes 1–50: grass (Poaceae) inhabiting Dothideomycetes. *Mycosphere*, 8(4), 697-796.
- Van Steenwinkel, C., & Vanderweyen, A. (2022). Two interesting Juncorrhiza (Entorrhizaceae) found in Belgium.
- Verrall, B., & Pickering, C. M. (2020). Alpine vegetation in the context of climate change: A global review of past research and future directions. *Science of the Total Environment*, 748, 141344.
- Vrålstad, T., Myhre, E., & Schumacher, T. (2002). Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytologist*, 155(1), 131–148. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00444.x>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs*, 30(3), 279-338.
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2-3), 213-251.
- Yurkov, A. (2017). Yeasts in forest soils. In *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity* (pp. 87–116). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_3)
- Zerouki, C., Chakraborty, K., Kuittinen, S. et al (2023). Whole-genome sequence and mass spectrometry study of the snow blight fungus *Phacidium infestans* (Karsten) DSM 5139 growing at freezing temperatures. *Mol Genet Genomics* 298, 1449–1466 <https://doi.org/10.1007/s00438-023-02073-7>
- Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., & Hyde, K. D. (2012). Pleosporales. *Fungal diversity*, 53, 1-221.





## **CAPÍTULO 3**

### **CARACTERIZACIÓN DE LAS MASAS DE ROBLE ATLÁNTICO**

### 3.1. INTRODUCCIÓN.

Históricamente, los robledales siempre han tenido un peso muy importante en el desarrollo de la vida rural siendo una fuente fundamental de materias primas para la construcción, leñas y alimento, tanto para el ganado como para los propios pobladores del entorno.

Los robledales atlánticos son aquellas masas boscosas dominadas por especies pertenecientes a *Quercus robur* L. y/o *Q. petraea* (Matt) Liebl. Generalmente, *Q. robur* (carbayo, “*carbayu*” o “*carballo*”) se desarrolla sobre sustratos profundos y frescos, de naturaleza silíceo en climas templados sin periodo seco o siendo este corto, desde el nivel del mar hasta los 1000 (1300) m de altitud (do Amaral Franco, 1990). Su distribución se limita principalmente a la cornisa cantábrica y la costa atlántica, llegando hasta la Sierra de Sintra en Portugal (Fernández-López et al., 2013).

A igual que el carbayo, el *Q. petraea* (roble albar, “*carbayu montes*” o “*carballo albar*”) se adapta a una variedad de condiciones ecológicas, ya que no es exigente con el tipo de suelo y puede crecer en suelos con pH entre 3 y 7, así como en ambientes que van desde secos hasta húmedos. Aunque los mejores bosques de esta especie se encuentran en terrenos calcáreos, también puede prosperar en suelos silíceos, incluso en condiciones de relativa sequedad. Este árbol es capaz de crecer en terrenos pedregosos o rocosos si las precipitaciones son suficientes, aunque prefiere suelos sueltos y bien aireados, por lo que no se desarrolla bien en terrenos arcillosos. No es frecuente en fondos de valles y barrancos, donde los suelos son más fértiles y la competencia con otras especies es mayor. Se encuentra comúnmente en las laderas de montañas y en los valles interiores, pudiendo llegar a altitudes superiores a los 1,500 metros e incluso alcanzar el límite superior del bosque (Fernández et al. 2012). Ocupan un 1% de la superficie forestal de España (MITECO, 2024), localizándose, el grueso de la población en la zona norte peninsular la que corresponde con la Región Eurosiberiana (Rivas-Martínez et al., 2017) tal y como se puede observar en la Figura 3.1.





Figura 3.1: Distribución de los robledales atlánticos en España (Fuente: <https://sig.mapama.gob.es/geoportal/>).

A lo largo del cuaternario, los robles han demostrado una notable capacidad de adaptación a cambios ambientales drásticos, debido a su alta capacidad para la hibridación e introgresión genética entre diferentes especies de robles (Kramer, 2010). Durante el Holoceno medio, con temperaturas más cálidas que las actuales, *Q. robur* mantenía una distribución amplia y estable (Vila-Viçosa et al., 2020). El cambio climático actual podría favorecer a *Q. petraea* y *Q. robur*, expandiendo su rango de distribución en Europa, aunque en el sur de Europa podría haber una reducción debido a la fragmentación del hábitat (Dyderski et al., 2018; Kramer, 2010), como podría suceder a lo largo de la Cordillera Cantábrica. En este contexto, los robles marcescentes y esclerófilos podrán colonizar hábitats actualmente ocupados por los robledales atlánticos, teniendo en cuenta sus preferencias por ciertos tipos de suelos (Villar-Salvador et al., 2013; Fernández-López et al., 2013, Lucas-Villar et al., 2013). En la clasificación de hábitats del Sistema Europeo de Conservación de la Naturaleza (EUNIS habitat classification), los bosques de *Quercus robur* y/o *Quercus petraea* en suelos ácidos se encuentran catalogados bajo la tipología G1.8. Estos bosques pertenecen a varias alianzas botánicas, como *Genisto germanicae-Quercion*, *Quercion petraeae*, *Quercion roboris* y *Quercion pyrenaicae*. Las especies más representativas de su cortejo florístico incluyen *Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Castanea sativa* Mill., *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin., *Vaccinium myrtillus* L., *Pteridium aquilinum* (L.) Trin., *Lonicera periclymenum* L., *Holcus mollis* L., *Maianthemum bifolium* (L.) F.W.Schmidt, *Convallaria majalis* L., *Hieracium sabaudum*

L., *Hypericum pulchrum* L., *Luzula pilosa* (L.) Willd., *Polytrichum formosum* Hedw. y *Leucobryum glaucum* (Hedw.) Ångstr. (EEA, 2024a).

En la actualidad, la clasificación de hábitats del Sistema Europeo de Conservación de la Naturaleza (EUNIS habitat classification) está siendo revisada, aunque no todos los grupos han sido actualizados. Sin embargo, los robledales atlánticos, anteriormente incluidos en la tipología G1.8, ahora se clasifican bajo la tipología T1B: Bosques acidófilos de *Quercus* (EEA, 2024b). Este hábitat está incluido dentro de la Lista Roja de Hábitats de la Unión Europea con el código G1.8, categorizado como vulnerable (Janssen et al., 2016).

A pesar de que los bosques acidófilos de *Quercus* L. tienen una gran área de distribución y su superficie se mantiene relativamente estable, se ha observado una significativa reducción en la calidad del hábitat, con más del 60% de disminución en su calidad (EIONET, 2024). Esta disminución en la calidad del hábitat se debe a diversos factores, como la fragmentación del territorio, la contaminación, el cambio climático y prácticas de manejo forestal inadecuadas.

Esencialmente, este tipo de ecosistemas tiene dos fuentes de amenazas: antrópicas y/o naturales. Entre las principales amenazas antrópicas se encuentran las relativas a la destrucción de ecosistema, bien debido al desarrollo de plantaciones de crecimiento rápido en zonas anteriormente dominadas por el roble, la incidencia de incendios forestales (de origen antrópico) cada vez más severos, o los efectos que el cambio climático pueda tener en la supervivencia de este tipo de ecosistemas. De forma natural, cabe destacar la competencia que ejerce el haya (*Fagus sylvatica* L.), cuya dinámica natural es la colonización del nicho ocupado por los robledales (González et al., 2008).

La inclusión de este hábitat en la Lista Roja de Hábitats de la Unión Europea subraya la necesidad urgente de implementar medidas de conservación y restauración. A pesar de su amplia distribución, la vulnerabilidad de estos bosques reside en la pérdida de su integridad ecológica y funcional. Las acciones de conservación deben enfocarse no solo en preservar la superficie actual, sino también en mejorar la calidad del hábitat, restaurando áreas degradadas y promoviendo prácticas de manejo sostenible.

Para una gestión y conservación efectiva de estos bosques complejos, es esencial un conocimiento exhaustivo de su biodiversidad, tanto inherente como asociada. Este conocimiento comienza con la catalogación y análisis de la diversidad fúngica, un factor que puede ser determinante para evaluar la resiliencia de estos ecosistemas frente a las amenazas y riesgos derivados de la alteración de su hábitat óptimo. En este contexto, el capítulo en cuestión se enfocará en el estudio y caracterización dasométrica, florística y edáfica de las poblaciones de roble situadas en tres espacios naturales protegidos en la región noroccidental de la Península Ibérica. Esta región representa el límite suroeste de distribución de las especies *Q. robur* y *Q. petraea*, lo que hace que estos ecosistemas sean únicos y vulnerables (Benito Garzón et al., 2008).

## 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 3.2.1. Localización de las zonas de estudio.

Se seleccionaron 11 parcelas de muestreo situadas en robledales atlánticos localizadas en espacios naturales protegidos a lo largo de la Cordillera Cantábrica, distribuidas de la siguiente manera (Figura 3.2).

- 5 en el Parque Natural de Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias (PN Fuentes).
- 3 en el Parque Natural de Redes (PN Redes).
- 3 en la Zona de Especial Conservación de Ancares (ZEC Ancares).

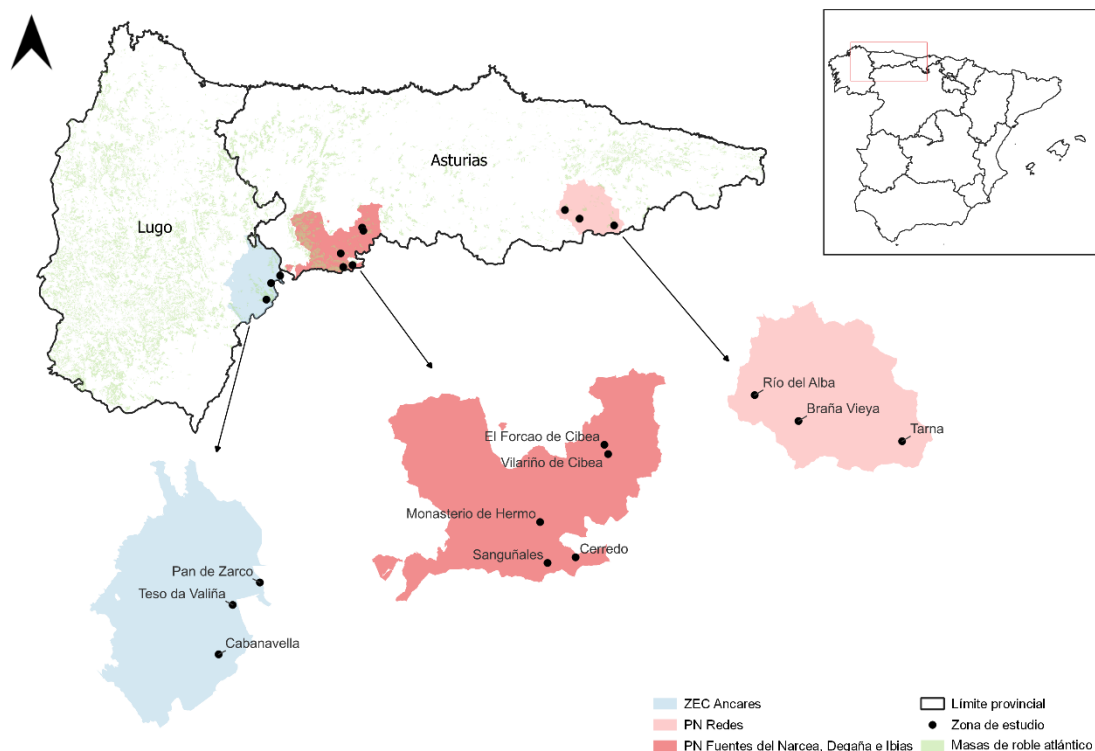


Figura 3.2: Localización de las parcelas de inventario.

### 3.2.2. Inventario y caracterización dasométrica.

En cada una de las parcelas de inventario, de 15 metros de radio, se tomaron los siguientes datos:

- Altitud (en el centro de la parcela), pendiente y orientación de esta.
- Datos dasométricos: identificación de cada pie; diámetro normal en cruz medido con forcípula; altura primera rama viva y altura total medido con distanciómetro Vertex IV.

- Determinación de la clase sociológica para cada árbol: Dominante (D); Codominante (C); Intermedios (I) y Sumergido (S) (Serrada Hierro, 2011).
- Estado sanitario.

A partir de los datos recogidos en campo se calcularon una serie de variables para proceder a la caracterización de las masas. Dichas variables fueron: densidad de pies (N/ha), área basimétrica(G), diámetro medio (d), diámetro medio cuadrático (dg), diámetro dominante (do), altura media (H), altura dominante (Ho), coeficiente de esbeltez (CE), porcentaje de copa (%Copa), altura de copa (Hcopa), espaciamiento medio (a), Índice de Hart-Becking (S (%)) e índice de forma.

### 3.2.3. Inventario multiespectral y LiDAR.

Se realizó la adquisición de datos con sensores remotos montados en dron (LiDAR y multiespectral) en 9 cuadrículas seleccionadas de los 11 recintos de los espacios seleccionados naturales.

Los vuelos se realizaron entre Mayo de 2021 y Octubre de 2021 con un dron multirrotor equipado con un sensor LiDAR, asegurando una densidad media de 100 puntos /m<sup>2</sup>. En el caso del vuelo multiespectral se realizó con una resolución de 10 cm con un sensor modelo Sequoia (Parrot), montado en un dron de ala fija, intentando incluir el mayor porcentaje de superficie de las 9 zonas de estudio seleccionadas. Utilizando los datos obtenidos de los vuelos LiDAR, se empleó RStudio y el paquete lidR (Roussel et al., 2021) para calcular el Modelo Digital del Terreno (DTM) y la Cobertura de la Vegetación (CHM). Por otro lado, los datos multiespectrales se aplicaron en el cálculo del Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI), utilizando la función ‘Vegetation Index’ de la herramienta SAGA, implementada en QGIS.

### 3.2.4. Inventario de flora.

En cada parcela se realizó un inventario florístico conforme metodología de Braun-Blanquet (1979) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Escala de Braun-Blanquet (1979).

Código	Descripción
r	Solitarios
+	Pocos, cobertura pequeña
1	Numerosos, pero cubren menos del 5% del área o dispersos con cobertura superior al 5%.
2	Cualquier número de individuos, con cobertura del 5% al 25% del área estudiada
3	Cualquier número de individuos, con cobertura del 25% al 50% del área estudiada
4	Cualquier número de individuos, con cobertura del 50% al 75% del área estudiada
5	Cualquier número de individuos, con cobertura mayor del 75% del área estudiada

El índice de sociabilidad y dispersión (Tabla 3.2) valora la forma en que están dispuestos los individuos de una especie con relación a las otras dentro de una comunidad (Rivas-Martínez, 1987), es decir, mide la estructura social de cada especie. Depende de la forma de propagación de cada especie y de los factores externos (Lacoste & Salanon,

1973). Al igual que el anterior, este índice también se calcula visualmente teniendo en cuenta la Tabla 3.2 (Lacoste & Salanon, 1973; Rivas-Martínez, 1987; Ferreras Chasco & Fidalgo, 1999; Alcaraz Ariza, 2008):

Tabla 3.2: Índice de sociabilidad y dispersión.

Código ISD	Descripción
1	Los individuos de la especie crecen solitarios, aislados.
2	Los individuos de la especie crecen en matojos, en pequeños grupos de pocos individuos o en pequeños céspedes.
3	Los individuos de la especie crecen en grupos, en pequeñas manchas, pequeños rodales, cojines o grandes céspedes.
4	Los individuos crecen en colonias, manchas extensas, alfombras o matas rotas.
5	Los individuos crecen en grandes poblaciones o matas muy densas, extendidas, cubriendo completamente la parcela de estudio, son poblaciones puras.

Las muestras se recolectaron en una parcela con un radio de 15 metros, donde se determinó la cobertura siguiendo la metodología establecida. Cada planta en la parcela fue etiquetada con un código único que referenciaba tanto a la parcela como al número de planta, y se registró la fecha de recolección. Además, se midió la altura de cada planta en centímetros y se tomaron fotografías para facilitar su posterior identificación.

### 3.2.5. Producción de bellota.

El diseño del inventario que se llevó a cabo se basó en los trabajos de Gysel, 1956, Zulueta & Cañellas, 1989 y Perry & Thill, 1999, éste se describe a continuación:

- Se procedió a la colocación de una serie de trampas de recolección de bellotas distribuidas por las parcelas de inventario. Las trampas consistían en cajas de madera de una dimensión aproximada de 30x30x10 cm recubiertas con una malla metálica cuyo fin es permitir el paso del fruto y dificultar la penetración de la fauna salvaje que se alimenta de las bellotas (Figura 3.3a).
- Se colocaron 6 trampas por parcela mediante las cuales se recolectó la producción en 3 de los árboles representativos de la parcela, colocándose a una distancia de entre  $\frac{1}{2}$  y  $\frac{3}{4}$  del tronco principal al radio de copa, que es el lugar donde la producción de bellota es más cuantiosa (Figura 3.3b).
- La recolección de la producción se cuantificó con una frecuencia de 21 días y consistió en el pesaje de las bellotas localizadas dentro de la trampa. Tras el pesaje, las bellotas fueron depositadas en el campo.



Figura 3.3: a) Trampas de recolección; b) Localización de las trampas.

### 3.2.6. Análisis de suelos.

Se realizó una calicata por parcela de aproximadamente 70 cm donde se podían observar los diferentes horizontes, posteriormente, de cada horizonte se tomó una muestra de suelos para llevarla a analizar al laboratorio de ingeniería agroforestal, analizándose los siguientes parámetros: textura, pH actual, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), nitrógeno total (N), fósforo asimilable (P), capacidad de intercambio catiónico (CICE) y cationes de cambio.

## 3.3. RESULTADOS.

### 3.3.1. Inventario y caracterización dasométrica.

En las parcelas de inventario se han localizado un total de 6 especies arbóreas, siendo la predominante el *Q. petraea* o roble albar (Tabla 3.3). Ocho de las 11 parcelas podrían considerarse como masas monoespecíficas de roble albar ya que, ésta es la única especie presente o más del 90% de los individuos que la conforman lo son (Madrigal, 1994) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Relación de especies arbóreas inventariadas. n: nº de pies/parcela.

Parcela	Especie	n	%
Pan do Zarco	<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	3	9,7
	<i>Betula celtiberica</i> Rothm. & Vasc	4	12,9
	<i>Fraxinus</i> sp.	1	3,2
	<i>Ilex aquifolium</i> L.	5	16,1
	<i>Quercus petraea</i>	8	25,8
	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	9	29,03
Moreira	<i>Quercus petraea</i>	21	91,3
	<i>Quercus pyrenaica</i> Willd.	2	8,7
Cabana Vella	<i>Quercus petraea</i>	66	100
Forcao	<i>Quercus petraea</i>	102	100
Villarino	<i>Castanea sativa</i> Mill.	1	0,7
	<i>Quercus petraea</i>	138	99,3
Mon. Hermo	<i>Fagus sylvatica</i>	4	7,3
	<i>Quercus petraea</i>	44	80
	<i>Quercus pyrenaica</i>	5	9,1
	<i>Quercus</i> spp. L	2	3,6
Cerrodo	<i>Quercus petraea</i>	41	100
Sanguñales	<i>Quercus petraea</i>	47	100
Tarna	<i>Quercus petraea</i>	75	100
Braña Vieya	<i>Fagus sylvatica</i>	14	35
	<i>Quercus petraea</i>	26	65
Río del Alba	<i>Quercus petraea</i>	35	100

Los resultados presentados en la Tabla 3.4 muestran que la densidad de las parcelas varía entre los 325 pies/ha de Moreira y los 1965 pies/ha de Villarino. Estas últimas, junto con Forcao, son las parcelas que exhiben una mayor densidad y valores más bajos de diámetro (medio, cuadrático y dominante) y altura (media y dominante). A falta de un análisis de la edad, estas parecen ser parcelas jóvenes, donde la mayoría de los pies pertenecen a clases diamétricas bajas (latizal). Por otro lado, Moreira presenta una densidad menor y valores más altos de diámetro y altura, lo que sugiere que podría ser una de las parcelas de mayor edad (Tabla 3.4). En cuanto al porcentaje de copa, los valores fluctúan entre el 39% de Villarino y el 53,4% de Braña Vieya (Tabla 3.4). El Índice de Hart-Becking proporciona una visión general de cuanto espacio tienen los árboles para desarrollarse; parcelas con un S (%) < 26 implican una densidad alta de pies y S (%) > 26 una densidad baja (Reque Kilchenmann, 2004). Según los resultados obtenidos, salvo Río del Alba, Moreira, Cabana Vella y Pan do Zarco el resto de las parcelas presentan unos valores del índice de Hart-Becking por debajo de 26 lo que implica una densidad alta (Tabla 3.4).

El coeficiente de esbeltez ofrece información sobre la estabilidad de las masas forestales. Los valores normales se encuentran por debajo de 80, mientras que los valores críticos superan los 100. En el conjunto de las masas estudiadas, se observan valores de E inferiores a 80, lo que permite concluir que las masas son estables frente al viento y a



fenómenos climáticos adversos (Tabla 3.4). Adicionalmente, se calculó el índice de forma para masas monoespecíficas, es decir, en 8 de las 11 parcelas, con valores que oscilan entre 9,2 en Forcao y 18,2 en Sanguñales (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Variables dasométricas calculadas. "N (pies/ha)": nº de pies por ha; "d (cm)": diámetro medio en cm; "dg (cm)": diámetro medio cuadrático en cm; "do (cm)": diámetro dominante en cm; "G (m<sup>2</sup>/ha)": área basimétrica en m<sup>2</sup>/ha; "H (m)": altura media en m; "Ho (m)": altura dominante en m; "Hprv (m)": altura de la primera rama verde mediada desde la base en m; "%Copa": relación entre la altura en m y la altura de copa "Ind. For.": índice de forma; "a": espaciamiento medio; "S (%)": Índice de Hart-Becking; "E": coeficiente de esbeltez.

Parcela	N (Pies/ha)	d (cm)	dg (cm)	do (cm)	G (m <sup>2</sup> /ha)	H (m)	Ho (m)	Hprv (m)	% Copa	Ind. For.	a	S (%)	E
Pan do Zarco	438	24,9	29,2	47,5	29,3	12,16	18,3	7,6	47,5	--	5,1	28,03	42
Moreira	325	42,9	44,3	54,4	50,1	19,2	21,4	10,3	47,2	15,8	5,9	27,8	43
Cabana Vella	933	19,8	21,4	36,1	33,7	10,2	16,6	8,5	41,4	13,7	3,5	21,2	48
Forcao	1442	13,4	13,7	28,9	21,2	8,8	10	5,2	41,6	9,2	2,8	28,3	64
Villarino	1965	13,5	14,5	27,0	32,6	8,4	10,3	6,0	39,0	9,9	2,4	23,4	58
Mon. Hermo	778	27,1	28,9	41,1	51,3	12,8	16	7,4	44,3	--	3,8	24,1	44
Cerredo	580	30,1	31,7	46,7	45,6	16,6	20,5	9,0	49,8	15,6	4,4	21,7	53
Sanguñales	665	24,3	25,2	35,7	33,03	17,2	21,9	10,8	42,2	18,2	4,2	19,0	69
Tarna	1061	25,2	26,1	37,7	56,6	16,7	20,6	9,9	42,1	16,7	3,3	15,9	64
Braña Vieya	565	32,3	36,9	48,6	60,4	21,2	27,7	10,6	53,4	--	4,5	16,3	58
Río Alba	495	25,7	28,1	43,2	30,8	17,8	17,8	10,2	41,5	13,9	4,8	27,1	63

La Figura 3.4 muestra la distribución de los pies en función de su clase sociológica. Según estos datos, se puede observar que en Braña Vieya (Figura 3.4c) no se incluye ningún pie dentro de los sumergidos, mientras que Villarino (Figura 3.4b) y Cabana Vella (Figura 3.4a) son las que presentan un mayor número en este grupo. Forcao (Figura 3.4b) y Tarna (Figura 3.4c) son las parcelas que aglutinan un mayor número de pies catalogados como sociológicamente dominantes. La distribución diamétrica de 5 de las 11 parcelas sugiere que estas poseen una estructura más o menos irregular, estas parcelas son: Pan do Zarco, Moreira, Cabana Vella, Braña Vieya y Río del Alba (Figura 3.5, b, c). En estas parcelas, en principio, no se detectan problemas de regeneración. De hecho, en las parcelas de Pan do Zarco, Cabana Vella y Braña Vieya, se observa una cierta tendencia hacia la irregularidad en equilibrio (Figura 3.5a, c). Por otro lado, las parcelas de Tarna, Monasterio de Hermo, Cerredo y Sanguñales, de acuerdo con la distribución de sus pies en clases diamétricas, presentarían una estructura de masa compatible con la que exhiben las masas regulares, es decir, una curva de distribución tipo Weibull (Figura 3.5b, c).



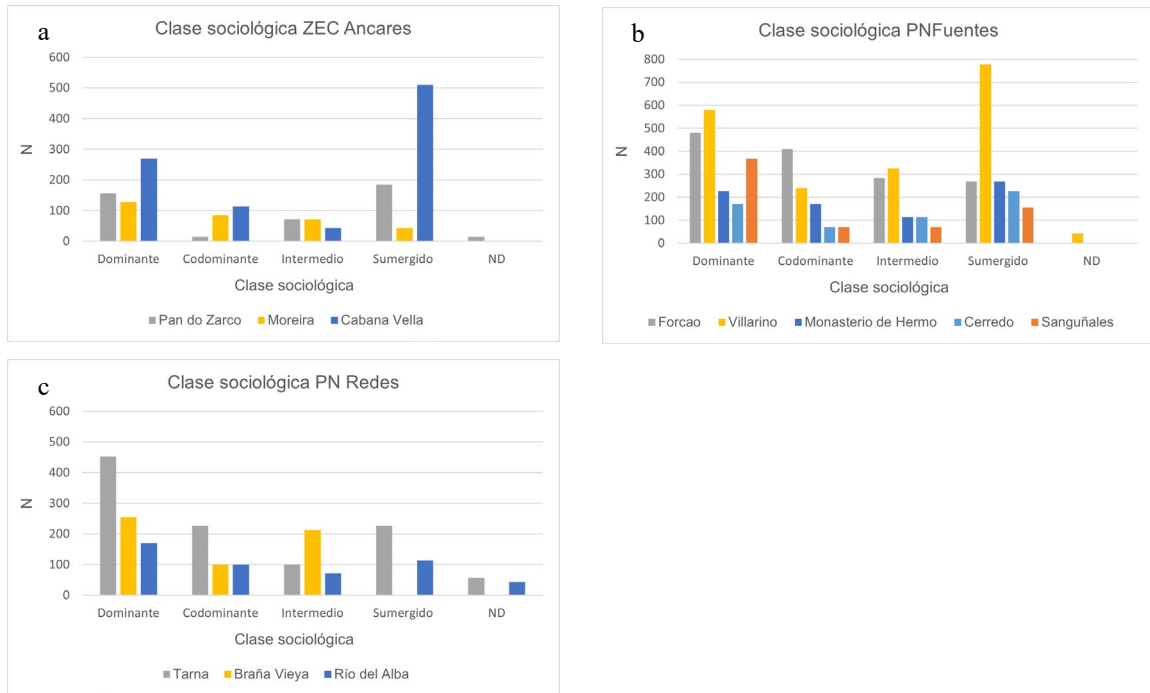


Figura 3.4: Distribución de los pies de las parcelas de trabajo en función a su clase sociológica. a) ZEC Ancares; b) PN Fuentes; c) PN Redes “N”: nº de árboles por hectárea.

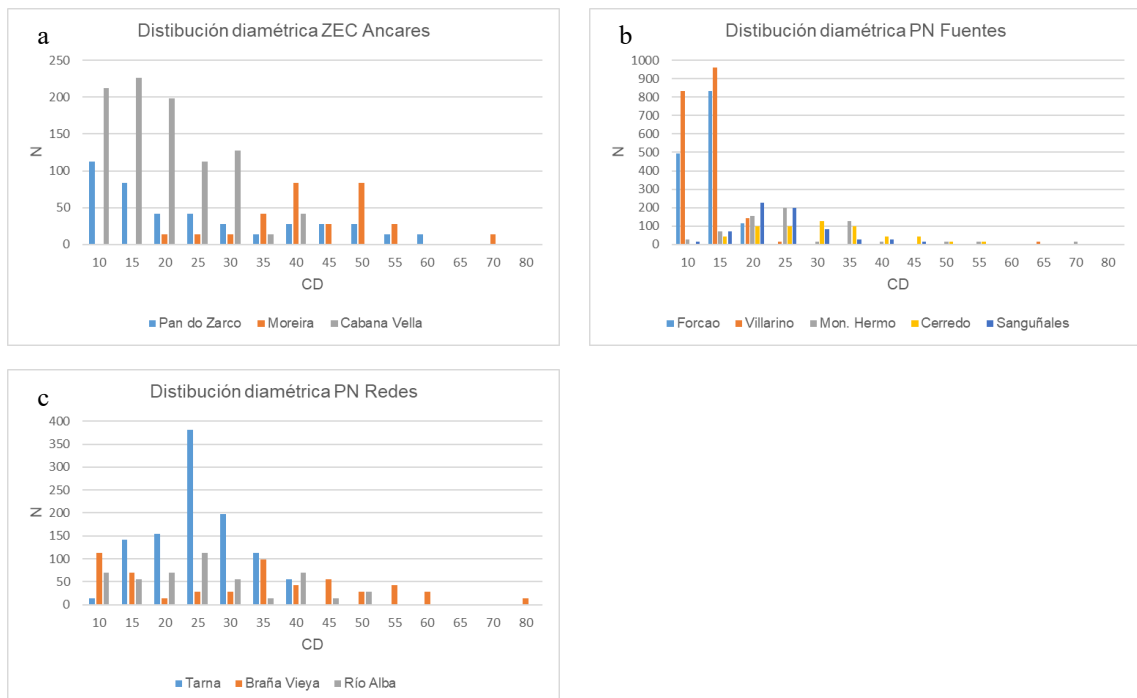


Figura 3.5: Distribución diamétrica de los pies de las parcelas de trabajo. a) ZEC Ancares; b) PN Fuentes; c) PN Redes “N”: nº de árboles por hectárea; “CD”: clase diamétrica a la que pertenecen en cm.

### 3.3.2. LiDAR.

Se realizó una adquisición de datos por parte de sensores remotos en 9 de las 11 parcelas de inventario propuestas. El vuelo LiDAR se realizó con un dron multirrotor equipado con un sensor LiDAR, asegurando una densidad media de 100 puntos /m<sup>2</sup>. Las imágenes de los vuelos se pueden observar en la Figura 3.6a, b, c, d, e, f, g, h e i, mientras que, sus características se recogen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Características de los vuelos LiDAR.

Zona	Fecha vuelo	Superficie(m <sup>2</sup> )	Nº Puntos (mill.)	Densidad (puntos/m <sup>2</sup> )
Pan do Zarco	29/09/2021	54644	8,9	162,3
Moreira	27/08/2021	67216	25,1	373,4
Cabana Vella	27/08/2021	48480	19,9	411,4
Mon. Hermo	07/07/2021	64136	25,7	401,5
Cerredo	24/06/2021	52180	17,4	333,5
Sanguñales	07/09/2022	81272	40,7	501,3
Tarna	23/06/2022	63300	32,6	515,2
Braña Vieya	01/06/2022	63092	23,6	374,8
Río del Alba	06/07/2021	55272	23,3	422,5

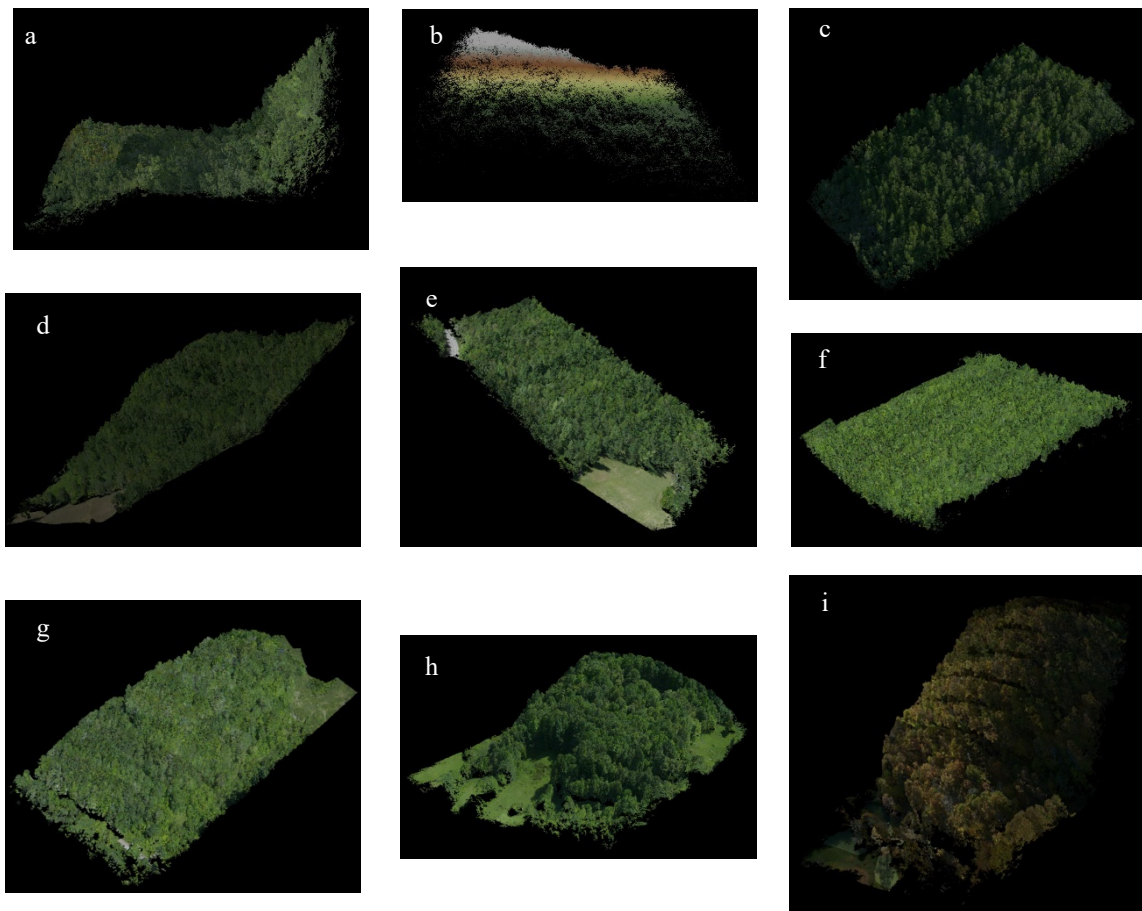


Figura 3.6: Imágenes de la nube de puntos LiDar. a) Ladera de Pan de Zarco; b) Ladera de Moreira; c) Ladera de Cabana Vella; d) Ladera de Monasterio de Hermo; e) Ladera de Cerredo; f) Ladera de Sanguñales;g) Ladera de Tarna; h) Ladera de Braña Vieya y i) Ladera de Río del Alba.

A partir de los datos del modelo digital el terreno (DTM) reflejados en la Tabla 3.6 se puede observar como el rango de altitudes medias de las laderas varía entre los 674,3 m de Río del Alba y los 1208,4 m de Cabana Vella, mientras que, la parcela que se localiza a una menor altitud es Río del Alba, a 677,5 m, y la de mayor Monasterio de Hermo, a 1194,5 m.

Los valores del modelo de la cubierta vegetal (CHM) presentan unos valores máximos ligeramente superiores, salvo en el caso de Pan do Zarco, en el conjunto de la ladera que en la parcela (Tabla 3.6), oscilando entre los 25,2 m de Monasterio de Hermo y los 38,2 m de Braña Vieya (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Valores del modelo digital del terreno (DTM) en m y del modelo de la cubierta vegetal (CHM) en m. Indicando los valores máximos (Max.), medios (Medio) y mínimos (Mín.).

Localización	Valor	Ladera		Parcela	
		DTM	CHM	DTM	CHM
Pan do Zarco	Máx.	1213,1	28,4	1112,4	24,8
	Medio	1132,4	7,2	1102,8	12,3
	Mín.	1062,7	0,04	1093,8	0,9
Moreira	Máx.	1017,04	32,8	934,4	29,7
	Medio	933,4	9,9	923,8	21,4
	Mín.	853,9	0,001	912,3	5,02
Cabana Vella	Máx.	1288,3	27,05	1200,5	23,7
	Medio	1208,4	12,3	1190,9	14,5
	Mín.	1135,9	0,05	1181,6	2,7
Mon. Hermo	Máx.	1287,1	25,5	1200,4	21,2
	Medio	1190,3	10,3	1194,5	14
	Mín.	1121,6	0,001	1189,4	0,03
Cerrodo	Máx.	1150,8	28,4	1088,5	26,8
	Medio	1091,5	10,4	1082,5	19,7
	Mín.	1030,7	0,01	1076,8	0,3
Sanguñales	Máx.	1091,6	28,1	1004,8	22,8
	Medio	1010,1	15,2	1000,3	15,8
	Mín.	962,8	0,01	995,7	0,32
Tarna	Máx..	1152,4	28,9	1049,1	26,8
	Medio	1052,04	10,4	1037,5	22,1
	Mín.	953,3	0,001	1026,4	9,8
Braña Vieya	Máx.	919,8	38,2	844,03	33,1
	Medio	840,4	12,3	835,8	27,9
	Mín.	786,2	0,001	827,8	10,2
Río del Alba	Máx.	758,7	34,2	686,2	27,9
	Medio	674,3	15,8	677,5	21,4
	Mín.	620,7	0,001	668,1	3,6

A partir de los datos del CHM se realizó una división por zonas tanto de la parcela como de la ladera, dividiéndose éstas en 3 zonas de vegetación: *i*) herbácea (0,01- 0,5 m);

ii) arbustiva (0,501 – 2,0 m) y iii) arbórea (> 2,0 m). Para cada una de las zonas se calculó la altura media y el porcentaje de cobertura.

Como paso previo a la elaboración de la zonificación de las masas se consideró conveniente comprobar si los datos obtenidos a través del sensor se corresponden con los reales. Esta verificación se realizó comparando los datos de altura máxima y media de la vegetación obtenidos del inventario dasométrico frente a los obtenidos a partir del CHM, así como la relación entre la altura (Coordenada Z) de la parcela determinada a través del DTM y el correspondiente dato obtenido mediante GPS de precisión (Tabla 3.7); obteniéndose unos coeficientes de correlación de Pearson de 0,9 para la altura media y máxima de la vegetación y 1 para la Coordenada Z. Por lo tanto, los valores extraídos a partir de las nubes de puntos LiDAR se consideran adecuados y precisos para realizar la estratificación vertical en las zonas de trabajo.

Tabla 3.7: Valores de altura máxima (Hmax) y media (Hmean) de la vegetación y Coordenada Z (CZ) de las parcelas de estudio

Parcela	Hmax <sup>1</sup> (m)	Hmax <sup>2</sup> (m)	CZ <sup>1</sup> (m)	CZ <sup>2</sup> (m)	Hmean <sup>1</sup> (m)	Hmean <sup>2</sup> (m)
Pan do zarco	23,6	24,8	1106	1103,0	12,2	12,5
Moreira	24,8	26,9	926	923,0	19,2	21,4
Cabana Vella	19	23,8	1191	1190,9	10,2	14,5
Mon. Hermo	19	21,2	1200	1194,5	12,8	14,0
Cerredo	26,2	26,8	1085	1082,5	16,7	19,7
Canguñales	24,5	22,9	1002	1003,0	17,3	15,7
Tarna	22,8	26,9	1047	1037,5	16,7	22,2
Braña Vieya	30,8	33,1	843	835,8	21,2	27,9
Río del Alba	28,6	28,0	676	677,5	17,8	21,4

<sup>1</sup> Datos obtenidos del inventario dasométrico; <sup>2</sup> Datos obtenidos del vuelo LiDAR.

Como se puede observar en la Tabla 3.8 al realizar la zonificación solo se detecta vegetación por debajo de 0,5 m en las parcelas de Monasterio de Hermo y Sanguñales y por debajo de 2 m en Monasterio de Hermo, Cerredo y Sanguñales y Pan do Zarco. Estando las 3 zonas presentes en el conjunto de las laderas (Tabla 3.8).

En las parcelas, la cobertura del estrato arbóreo, según los datos analizados, es del 97% en Monasterio de Hermo, 98% en Cerredo, Sanguñales y Pan do Zarco y del 100% en el resto (Tabla 3.9). Estos valores son sensiblemente inferiores al analizar la ladera en su conjunto (Tabla 3.9).

Tabla 3.8: Zonificación de la vegetación a partir del CHM.

Localización	Zona	Ladera		Parcela	
		Cobertura (%)	Altura media (m)	Cobertura (%)	Altura media (m)
Pan do Zarco	Herbácea	3,7	0,3	--	--
	Arbustiva	11,5	1,2	1,2	1,4
	Arbórea	84,8	8,2	98,8	12,5
Moreira	Herbácea	3,6	0,2	--	--
	Arbustiva	11,9	1,2	--	--
	Arbórea	84,4	11,6	100	21,2
Cabana Vella	Herbácea	0,4	0,3	--	--
	Arbustiva	3,5	1,3	--	--
	Arbórea	96	12,7	100	14,3
Mon. Hermo	Herbácea	11,8	0,1	0,9	0,2
	Arbustiva	6,4	1,2	1,9	1,04
	Arbórea	81,7	12,5	97,2	14,4
Cerrodo	Herbácea	12,9	0,2	--	--
	Arbustiva	7,8	1,1	1,6	1,02
	Arbórea	79,3	13,04	98,4	20,07
Sanguñales	Herbácea	1	0,2	0,004	0,3
	Arbustiva	2,4	1,2	1,4	1,6
	Arbórea	96,6	15,7	98,1	16,3
Tarna	Herbácea	10,7	0,3	--	--
	Arbustiva	13,1	0,9	--	--
	Arbórea	76,2	13,5	100	22,2
Braña Vieya	Herbácea	13,7	0,2	--	--
	Arbustiva	11,3	1,1	--	--
	Arbórea	75	16,2	100	28,1
Río del Alba	Herbácea	9,4	0,2	--	--
	Arbustiva	5,6	1,1	--	--
	Arbórea	85	18,5	100	22,1

### 3.3.3. Multiespectral.

La captura de La obtención de las imágenes multiespectrales se realizó con llevó a cabo a través de un dron de ala fija eBeeX® en el cual se incorporó una cámara *Sequoia* de la marca Parrot®, cuyas características se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9: Características de la cámara multiespectral.

Sensor	Longitud de onda (nm)	Ancho de banda	Longitud mínima (nm)	Longitud máxima (nm)	Definición (mpx)
Verde	550	40	510	590	1,2
Rojo	660	40	620	700	1,2
Borde rojo	735	10	725	745	1,2
Infrarrojo cercano	790	40	750	830	1,2

Las zonas de las cuales se obtuvieron estas imágenes y las fechas del vuelo son las mismas que en caso de los datos LiDAR. En la Tabla 3.10 se muestran los resultados obtenidos tras el cálculo del NDVI de las laderas y parcelas de estudio.

En las laderas, los valores (medios) de este índice están comprendidos entre 0,2 de Pan do Zarco y 1 de Cerredo, mientras que, en las parcelas, dichos valores oscilan entre 0,1, de Sanguñales, a 1, de Cerredo (Tabla 3.10), Sanguñales y Pan de Zarco son las zonas que presentan el NDVI más próximo a 0 esto podría ser debido a estado fenológico de la vegetación en el momento en el cual se realizaron los vuelos (Tabla 3.10).

Tabla 3.10: Valores del NDVI para las laderas y parcelas de estudio. Máx.: valor máximo; Mín.: valor mínimo; D.S.: desviación estándar.

Parcela	Fecha vuelo	Ladera				Parcela			
		Máx.	Medio	Mín	D. S.	Máx.	Medio	Mín	D. S.
Pan do Zarco	29/09/2021	0,5	0,2	-0,2	0,04	0,2	0,2	0,1	0,02
Moreira	27/08/2021	0,9	0,8	-0,2	0,1	0,9	0,8	0,7	0,02
Cabana Vella	27/08/2021	0,9	0,9	0,5	0,03	0,9	0,9	0,8	0,01
Mon. Hermo	07/07/2021	0,9	0,8	0,002	0,05	0,9	0,9	0,8	0,01
Cerredo	24/06/2021	1	1	0,7	0,02	1	1	0,9	0,002
Sanguñales	07/09/2022	0,9	0,4	-0,7	0,06	0,2	0,1	0,02	0,03
Tarna	23/06/2022	1	0,9	0,1	0,07	0,9	0,9	0,8	0,01
Braña Vieya	01/06/2022	1	0,9	0,1	0,05	0,9	0,9	0,9	0,008
Río del Alba	06/07/2021	1	0,6	-0,6	0,09	0,9	0,6	0,4	0,08

### 3.3.4. Inventario de flora.

En los inventarios realizados, se han identificado un total de 72 especies, pertenecientes a 35 familias botánicas (Tabla 3.11, Tabla 3.12, Tabla 3.13). El 96% de estas familias se integra en la clase Magnolipsida, mientras que solo se han inventariado ejemplares de 3 familias de la división Polypodipsida. Las familias con más ejemplares representados son la Compositae Giseke, Fabaceae Lindl., Fagaceae Dumort., Poaceae Barnhart y Rosaceae Juss., agrupando al 37,5 % de las especies.

El espacio protegido que mayor diversidad florística presenta es el ZEC Ancares, donde se han inventariado 43 taxones diferentes (Tabla 3.11). Le sigue el PN de Redes con 39 especies (Tabla 3.12). Por otro lado, el PN de Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias es el que presenta una menor diversidad con 34 taxones (Tabla 3.13).

Tabla 3.11: Resumen de los datos de inventario localizado en el ZEC Ancares. "C" indica el grado de cobertura; "ISD" hace referencia al índice de sociabilidad y dispersión.

Altitud (m)	1106	926	1191
Coordenada X (m)	676794	673457	672082
Coordenada Y (m)	4751439	4778262	4741679
Orientación	NW	NW	W
Pendiente (°)	20	35	30

Capítulo 3: Caracterización de las masas de roble atlántico

Nº Especies	32		12		22	
Parcela	Pan do Zarzo		Moreira		Cabana Vella	
Especie	C	ISD	C	ISD	C	ISD
<i>Acer pseudoplatanus</i>	1	1	--	--	--	--
<i>Anemone nemorosa</i> L.	2	2	--	--	3	3
<i>Anthoxanthum odoratum</i> L.	2	2	--	--	3	4
<i>Arrhenatherum elatius</i> L.	--	--	--	--	2	3
<i>Asphodelus albus</i> Mill	--	--	--	--	1	2
<i>Betula celtiberica</i>	1	1	--	--	--	--
<i>Castanea sativa</i>	--	--	+	1	--	--
<i>Ceratocarpus claviculata</i> (L.) Lidén	r	1	--	--	--	--
<i>Conopodium pyrenaicum</i> (Loisel.) Miégev.	r	1	--	--	--	--
<i>Corylus avellana</i> L.	3	2	--	--	--	--
<i>Crepis lamsanoides</i> (Gouan) Tausch	--	--	--	--	1	2
<i>Cruciata glabra</i> (L.) Ehrend.	--	--	--	--	2	3
<i>Dactylis glomerata</i> L.	--	--	--	--	2	3
<i>Dryopteris filix-mas</i> L.	4	3	--	--	--	--
<i>Erica arborea</i> L.	+	1	4	4	--	--
<i>Euphorbia dulcis</i> L.	1	1	--	--	--	--
<i>Frangula alnus</i> Mill.	--	--	1	1	--	--
<i>Genista florida</i> subsp. <i>polygaliphylla</i> (Brot.) Cout.	+	1	r	1	1	1
<i>Geranium robertianum</i> L.	+	1	--	--	--	--
<i>Hedera hibernica</i> (G. Kirchn.) Carrière	--	--	1	1	--	--
<i>Hyacinthoides non-scripta</i> L.	+	1	--	--	r	1
<i>Ilex aquifolium</i> L.	1	2	+	1	+	1
<i>Lamium maculatum</i> L.	+	1	--	--	--	--
<i>Lonicera periclymenum</i> L.	1	2	--	--	--	--
<i>Luzula sylvatica</i> (Huds.) Gaudin	1	1	--	--	--	--
<i>Melampyrum pratense</i> L.	+	1	1	3	2	3
<i>Mellitys melisophyllum</i> L.	1	1	--	--	1	2
<i>Omphalodes verna</i> Moench.	2	2	--	--	--	--
<i>Oxalis acetosella</i> L.	1	2	--	--	--	--
<i>Polygonatum odoratum</i> (Mill.) Druce	--	--	--	--	1	1
<i>Pteridium aquilinum</i> L.	1	2	3	3	4	5
<i>Quercus petraea</i>	4	5	5	5	5	5
<i>Quercus pyrenaica</i>	--	--	+	1	--	--
<i>Ranunculus aconitifolius</i> L.	1	2	--	--	--	--
<i>Ranunculus platanifolius</i> L.	1	2	--	--	--	--
<i>Rubus</i> sp L.	3	4	--	--	2	2
<i>Rumex acetosa</i> L.	--	--	--	--	2	3
<i>Saxifraga spathularis</i> Brot.	2	3	--	--	--	--
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	3	1	1	1	--	--
<i>Stellaria holostea</i> L.	3	1	--	--	1	2
<i>Teucrium scorodonia</i> L.	3	1	1	2	1	2
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	2	2	4	3	--	--

<i>Vicia orobus</i> DC.	--	--	--	--	1	2
<i>Viola riviniana</i> Rchb.	+	1	--	--	1	2

Tabla 3.12: Resumen de los datos de inventario localizado en el PN de Redes. "C" indica el grado de cobertura; "ISD" hace referencia al índice de sociabilidad y dispersión.

Altitud (m)	1047		842		675	
Coordenada X (m)	317979		304419		298685	
Coordenada Y (m)	4776001		4778649		4782038	
Orientación	SW		W		NE	
Pendiente (°)	35		25		25	
Nº Especies	21		13		20	
Parcela	Tarna		Braña Vieya		Río del Alba	
Especie	C	ISD	C	ISD	C	ISD
<i>Anemone nemorosa</i>	2	2	1	2	3	1
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	3	3	--	--	--	--
<i>Arenaria montana</i> L.	1	2	1	2	1	3
<i>Avenella flexuosa</i> (L.) Drejer	--	--	---	--	3	2
<i>Blechnum spicant</i> (L.) Roth	--	--	--	--	3	3
<i>Castanea sativa</i>	--	--	+	1	--	--
<i>Corylus avellana</i> L.	+	1	--	--	--	--
<i>Cytisus dieckii</i> (Lange) Fern.Prieto, Nava, Fern.Casado, M.Herrera, Bueno Sánchez & Sa	1	1	--	--	--	--
<i>Daboecia cantabrica</i> (Huds.) K. Koch	--	--	1	2	1	1
<i>Doronicum carpetanum</i> Willk.	--	--	--	--	r	1
<i>Erica arborea</i>	--	--	--	--	1	2
<i>Euphorbia amygdaloides</i> L.	+	1	--	--	--	--
<i>Fagus sylvatica</i>	+	1	--	--	--	--
<i>Frangula alnus</i>	--	--	--	--	+	1
<i>Fragaria vesca</i> L.	1	1	--	--	--	--
<i>Genista florida</i> subsp. <i>polygaliphylla</i>	--	--	1	1	--	--
<i>Glandora diffusa</i> (Lag.) D. C. Thomas	R	1	--	--	1	1
<i>Hedera hibernica</i>	--	--	--	--	1	1
<i>Holcus mollis</i> L.	--	--	--	--	3	1
<i>Hypericum perforatum</i> L.	+	1	--	--	--	--
<i>Ilex aquifolium</i>	+	1	+	1	2	1
<i>Laserpitium latifolium</i> L.	+	1	--	--	--	--
<i>Lathyrus linifolius</i> (Reichard) Bässler	R	1	--	--	--	--
<i>Lonicera periclymenum</i>	+	1	--	--	--	--
<i>Luzula sylvatica</i>	--	--	--	--	1	1
<i>Melampyrum pratense</i>	3	2	1	2	1	1
<i>Melittis melissophyllum</i>	R	1	--	--	--	--
<i>Physospermum cornubiense</i> (L.) DC.	--	--	1	1	--	--
<i>Polygala vulgaris</i> L.	R	1	--	--	--	--
<i>Prunella vulgaris</i> L.	+	1	--	--	--	--



<i>Prunus spinosa</i> L.	--	--	--	--	+	1
<i>Pteridium aquilinum</i>	+	3	1	5	4	3
<i>Quercus petraea</i>	5	5	5	5	5	5
<i>Serratula tinctoria</i> L.	+	1	+	1	--	--
<i>Sorbus aria</i> (L.) Crantz	--	--	--	--	1	2
<i>Teucrium scorodonia</i>	--	--	+	2	--	--
<i>Ulex gallii</i> Planch.	--	--	--	--	1	1
<i>Vaccinium myrtillus</i>	--	--	4	3	4	4
<i>Viola riviniana</i>	1	3	--	--	--	--

Tabla 3.13: Resumen de los datos de inventario localizado en el PN de Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias. "C" indica el grado de cobertura; "ISD" hace referencia al índice de sociabilidad y dispersión.

Altitud (m)	917		821		1199		1084		1002	
Coordenada X (m)	707529		708103		699867		704822		701221	
Coordenada Y (m)	4772504		4771318		4761827		4757571		4756568	
Orientación	SW		NW		E		NW		NE	
Pendiente (°)	20		35		20		25		16	
Nº Especies	7		7		20		16		14	
Parcela	Forcao		Villarino		Mon Hermo		Cerredo		Sanguñales	
Especie	C	ISD	C	ISD	C	ISD	C	ISD	C	ISD
<i>Anemone nemorosa</i>	--	--	--	--	1	1	3	2	1	1
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	--	--	--	--	3	3	--	--	2	3
<i>Arenaria montana</i>	--	--	--	--	1	2	--	--	--	--
<i>Asphodelus albus</i> Mill	--	--	--	--	2	2	--	--	--	--
<i>Avenella flexuosa</i>	3	4	1	3	--	--	--	--	--	--
<i>Betula celtiberica</i>	--	--	r	1	--	--	--	--	--	--
<i>Castanea sativa</i>	--	--	+	1	--	--	--	--	--	--
<i>Conopodium pyrenaicum</i> (Loisel.) Miégev.	--	--	--	--	+	1	--	--	--	--
<i>Cytisus scoparius</i> L.	--	--	--	--	1	1	--	--	--	--
<i>Dryopteris affinis</i> (Lowe) Fraser-Jenk.	--	--	--	--	--	--	+	1	--	--
<i>Erica arborea</i>	2	3	3	3	--	--	r	1	1	2
<i>Euphorbia dulcis</i>	--	--	--	--	+	1	--	--	--	--
<i>Fagus sylvatica</i>	--	--	--	--	1	1	--	--	--	--
<i>Frangula alnus</i>	1	1	--	--	--	--	--	--	2	1
<i>Genista florida</i> subsp. <i>polygaliphylla</i>	1	1	--	--	--	--	+	1	+	1
<i>Hedera hibernica</i>	--	--	--	--	--	--	+	1	--	--
<i>Hieracium murorum</i> L.	--	--	--	--	r	1	--	--	--	--
<i>Hyacinthoides non-scripta</i>	--	--	--	--	+	1	1	2	--	--
<i>Ilex aquifolium</i>	--	--	--	--	+	1	--	--	2	1
<i>Lonicera periclymenum</i>	--	--	--	--	--	--	3	2	2	2
<i>Melampyrum pratense</i>	3	4	--	--	4	3	--	--	5	5
<i>Physospermum cornubiense</i> (L.) DC.	--	--	--	--	--	--	1	2	2	1
<i>Polygonatum verticillatum</i> L.	--	--	--	--	--	--	2	2	--	--

<i>Pteridium aquilinum</i>	--	--	--	--	3	3	3	3	4	2
<i>Quercus petraea</i>	5	5	4	5	5	5	4	5	4	5
<i>Quercus pyrenaica</i>	--	--	--	--	1	5	--	--	--	--
<i>Quercus robur</i>	--	--	3	5	--	--	--	--	--	--
<i>Rubus spp</i>	--	--	--	--	--	--	3	3	1	1
<i>Rumex pulcher</i> L.	--	--	--	--	r	5	--	--	--	--
<i>Solidago virgaurea</i>	--	--	--	--	r	1	--	--	--	--
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	--	--	--	--	+	1	+	1	1	1
<i>Stellaria holostea</i> L.	--	--	--	--	--	--	1	2	--	--
<i>Teucrium scorodonia</i>	--	--	--	--	1	2	+	1	--	--
<i>Vaccinium myrtillus</i>	2	3	2	3	--	--	4	4	2	2

*Ilex aquifolium* es la única especie presente los inventarios (Tabla 3.11, Tabla 3.12, Tabla 3.13) sobre la cual existe algún tipo de regulación ya que se encuentra incluida dentro del Catálogo Regional de Especies Amenazadas de la Flora del Principado de Asturias (Decreto 65/95) con la figura de *especie de interés especial*, contando con un Plan de Manejo (Decreto 147/2001). Tres de las especies presentes en las parcelas *Fragaria vesca*, *Prunus spinosa* y *Teucrium scorodonia* (Tabla 3.11, Tabla 3.12, Tabla 3.13), se encuentran incluidas dentro de la Lista Roja Europea (EEA, 2024c) en la categoría “LC” o preocupación menor, sin medidas de protección adicionales.

El estrato arbóreo está conformado por especies planocaducifolias, dominado por los robles, siendo el *Q. petraea* el más ampliamente distribuido, dominante en las zonas inventariadas (presente en el 100% de las parcelas de estudio) (Tabla 3.11, Tabla 3.12, Tabla 3.13). *Vaccinium myrtillus* e *Ilex aquifolium* son las especies arbustivas más frecuentes en las parcelas de inventario, presentes en 8 de las 11 zonas (72%), seguida por *Erica arborea* L. localizada en 7 de los 11 puntos (64%) (Tabla 3.11, Tabla 3.12, Tabla 3.13). Sólo 3 de las especies inventariadas pertenecen al grupo de las lianas o plantas trepadoras, éstas son *Lonicera periclymenum*, *Hedera hibernica* y *Rubus spp.* (Tabla 3.11, Tabla 3.12, Tabla 3.13). El estrato herbáceo es el que presenta una mayor diversidad, a él pertenecen el 65% de los ejemplares inventariados siendo las especies más representativas *Melampyrum pratense* y *Anemone nemorosa*, presentes en 9 y 8, respectivamente, de las parcelas de inventario (Tabla 3.11, Tabla 3.12, Tabla 3.13).

### 3.3.5. Producción de bellota.

Se realizó el estudio de la producción de bellota en 8 de las 11 parcelas de inventario (Tabla 3.13). En cada una de las parcelas se llevaron a cabo 2 muestreos: el primero se realizó a finales de octubre del año 2021, concretamente en la semana 42 y, el segundo se realizó 3 semanas más tarde, a mediados de noviembre del año 2021, en la semana 45.

Los resultados de los muestreos llevados a cabo se pueden observar en la Tabla 3.14, donde cabe señalar la nula producción de la parcela Rio del Alba, no localizándose bellotas en las trampas ni tampoco se observaron en el suelo o en los árboles. Obviando este dato, la producción de bellota oscila entre los 92,6 kg/ha de Villarino y los 9092,6 kg/ha de Moreira, siendo la media de  $2493,1 \pm 1027$  kg/ha (Tabla 3.14). Se puede apreciar

(Tabla 3.14, Figura 3.7) como la producción de bellota no es constante a lo largo de los dos periodos muestreados siendo la producción, salvo en el caso de Moreira que es muy acusado, ligeramente inferior en el segundo muestreo.

Comparando los datos de producción de bellota con los obtenidos tras el análisis dasométrico de las masas, se observa (Tabla 3.14) como Moreira presenta la producción más elevada y es aquella a la que presenta mayor edad, a falta de una estimación propia de la misma, pero analizando los datos de densidad (menor de la serie) y diámetro (medio y medio cuadrático más elevados de la serie), se podría llegar a esta conclusión. El caso contrario sucede en la parcela de Villarino (Tabla 3.14).

Se realizó un análisis de correlaciones entre los datos de producción de bellota y las variables dasométricas de las parcelas de estudio en el cual, las variables que presentan una mejor correlación positiva con la producción de bellota son el diámetro normal y el diámetro medio cuadrático (Figura 3.8). Por otro lado, la densidad y el coeficiente de esbeltez son aquellos que presentan los valores negativos más altos (Figura 3.8).

Tabla 3.14: Datos de la producción de bellota en las parcelas seleccionadas. Muestreo 1: semana 42 del año 2021, Muestreo 2: semana 45 del año 2021.

Parcela	Muestreo 1			Muestreo 2			Total	
	Peso (gr)	Exi. Parcela (kg)	Exi. Hectárea (kg)	Peso (gr)	Exi. Parcela (kg)	Exi. Hectárea (kg)	Parcela (kg)	Hectárea (kg)
Braña Viella	65	85,1	1203,7	15	19,6	277,8	104,7	1481,5
Moreira	434	568,1	8037,0	57	74,6	1055,6	642,7	9092,6
Cabana Vella	61	79,8	1129,6	8	10,5	148,1	90,3	1277,8
Villarino	5	6,5	92,6	0	0,0	0,0	6,5	92,6
Mon. Hermo	85	111,3	1574,1	28	36,7	518,5	147,9	2092,6
Cerredo	90	117,8	1666,7	44	57,6	814,8	175,4	2481,5
Sanguñales	110	144,0	2037,0	75	98,2	1388,9	242,2	3425,9
Río Alba	0	0	0	0	0,0	0,0	0	0
Producción Media	106,3	139,1	1967,6	28,4	37,1	525,5	176,2	2493,1
Des. estándar	138,1	180,7	2556,8	27,9	36,5	516,3	205,3	2904,7
Error	48,8	63,9	904,0	9,9	12,9	182,6	72,6	1027,0

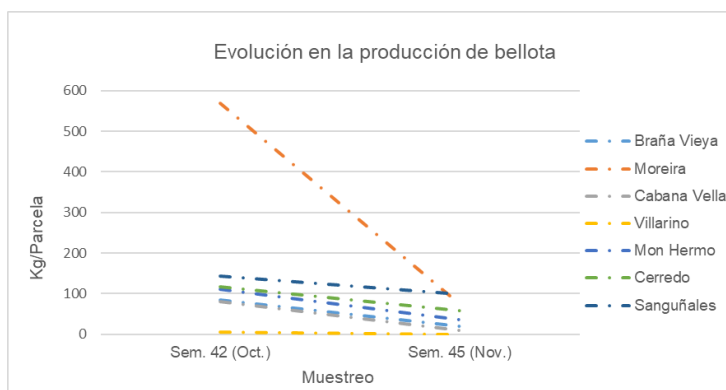


Figura 3.7: Evolución de la producción de bellota en kg/parcela.

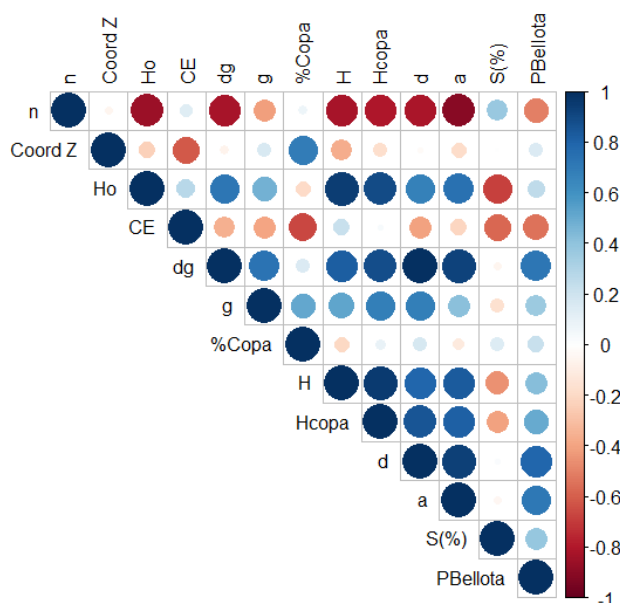


Figura 3.8: Diagrama de correlaciones de Pearson. n: pies/parcela; CoordZ: altitud de la parcela (m); Ho: altura dominante (m), CE: Coeficiente de esbeltez; dg: diámetro medio cuadrático (cm); g: área basimétrica (m<sup>2</sup>/parcela); %Copa: porcentaje de copa; H: altura media (m); Hcopa: altura de copa (m); d: diámetro medio (cm); a: coeficiente de espaciamiento; S(%): Índice de Hart-Becking; Pbellota: Producción de bellota en kg/parcela.

### 3.3.6. Análisis de suelos.

Según valores de pH los suelos sobre los que se sustentan las masas analizadas son ácidos, con valores comprendidos entre los 3,8 de Monasterio de Hermo y los 5,5 de Cabana Vella (Tabla 3.15). Podrían calificarse como “fuertemente ácidos” (Anexo 2: Tabla 1), lo que podría inducir una posible toxicidad por Al<sup>3+</sup> y exceso de Co, Cu, Fe, Mn, Zn; deficiencia en Ca, K, N, Mg, Mo, P, S. y una escasa actividad bacteriana.

Los valores de P, Na, Ca y Mn son bajos, mientras que los del K son correctos (Tabla 3.16, Anexo 2: Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9). Se considera que el Al provocaría daños cuando su contenido en el suelo sea superior a 2 cmol (+)/kg, cuando el

porcentaje de saturación de Al en relación al resto de cationes intercambiables sea superior al 25 o, cuando la relación  $(Ca+Mg+K)/Al \leq 1$  (Casierra-Posada & Aguilar-Avenida, 2007; Rivera et al., 2016). Se puede observar cómo los valores de Al (Tabla 3.16) se encuentran por debajo del umbral que indica toxicidad, así como, la relación  $(Ca+Mg+K)/Al$  es superior a la unidad en todos los casos, por lo que se considera que no existe un problema de toxicidad provocado por el contenido en aluminio del suelo (Tabla 3.16).

Estos son suelos no salinos, con valores de CE inferiores a 0,35 dS/m (Tabla 3.15, Anexo 2: Tabla 2). El contenido en materia orgánica (MO) es muy alto, que va desde 9,1% de Cabana Vella al 33,9% de Braña Vieya (Tabla 3.15, Anexo 2: Tabla 3). El contenido en carbono orgánico y nitrógeno están directamente relacionados con el contenido en por ello, aquellas parcelas que presentan unos valores más altos en MO también los tienen en estos parámetros siendo, los valores de N altos en Cabana Vella, Forcao y Sanguñales y, muy altos en el resto de las parcelas (Tabla 3.15, Anexo 2: Tabla 3).

La relación C/N indica el grado de mineralización de la MO y el tipo de humus que se encuentra presente. Excepto en Braña Vieya, los valores de esta relación son altos (Tabla 3.15, Anexo 2: Tabla 5) por lo que, teniendo en cuenta que cuanto más bajos son los valores de esta relación mejor es la calidad del suelo, Braña Vieya sería la parcela que tiene un suelo de mayor calidad y humus de tipo mull cálcico, siendo moder en el resto.

Excepto Forcao y Sanguñales, que presentan suelos con textura franca o arenosa franca, en el resto de las parcelas la textura es franco arenoso (Tabla 3.16). En general, los suelos presentan una baja capacidad de intercambio catiónico (Tabla 3.16, Anexo 2: Tabla 10).

Tabla 3.15: Resultados globales del análisis de suelos. CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; C. orgánico: Contenido en Carbono orgánico; N: contenido en Nitrógeno; C/N: Relación Carbono/Nitrógeno; PM3: Fósforo disponible por el método de Mehlich 3.

Parcela	pH	CE (dS/m)	MO (%)	C orgánico (%)	N (%)	C/N Ratio	PM3 (mg/kg)
Braña Vieya	4,9	0,2	33,9	19,7	2,3	9,1	27,4
Cabana Vella	5,5	0,0	9,1	5,3	0,3	15,6	3,4
Cerredo	3,9	0,2	23,9	13,9	0,7	17,6	17,4
Forcao	4,8	0,0	9,2	5,3	0,4	15,2	5,0
Mon. Hermo	3,8	0,2	25,6	14,9	0,9	15,6	18,0
Moreira	5,0	0,2	20,3	11,8	0,6	16,5	21,2
Pan do Zarco	4,7	0,4	18,9	10,0	0,5	19,7	9,3
Río del Alba	4,6	0,2	27,8	16,1	1,2	15,6	19,1
Sanguñales	4,5	0,1	13,0	7,6	0,4	18,9	11,9
Tarna	5,1	0,1	25,5	14,8	0,8	17,7	8,4
Villarino	4,4	0,1	34,7	20,2	1,3	18,4	13,2

Tabla 3.16: Resultados globales del análisis de suelos. Ca: Calcio; Mg: Magnesio; K: Potasio; Na: Sodio. Al: Aluminio; CICE: Capacidad de intercambio catiónico.

Parcela	Ca (cmol+/ kg)	Mg (cmol+/ kg)	K (cmol+/ kg)	Na (cmol+/ kg)	Al (cmol+/ kg)	(Ca+Mg +K)/Al	CICE (cmol+/ kg)	Textura
Braña Vieya	2,0	1,3	0,6	0,9	1,4	2,9	6,3	Franco arenoso
Cabana Vella	0,9	0,3	0,2	0,8	1,0	1,3	3,2	Franco arenoso
Cerredo	1,7	1,1	0,6	0,8	1,1	3,0	5,3	Franco arenoso
Forcao	1,1	0,3	0,2	0,4	1,0	1,5	3,1	Franco
Mon. Hermo	1,5	0,9	0,5	1,4	1,4	2,1	5,7	Franco arenoso
Moreira	1,6	0,9	0,5	0,8	1,2	2,5	5,0	Franco arenoso
Pan do Zarco	1,7	1,2	0,7	0,8	1,0	3,5	5,5	Franco arenoso
Río del Alba	2,0	1,3	0,6	0,9	1,2	3,4	6,1	Franco arenoso
Sanguñales	1,4	0,8	0,3	0,6	1,0	2,4	4,1	Arenoso franco
Tarna	3,4	2,3	0,9	1,0	1,3	5,0	8,9	Franco arenoso
Villarino	1,5	0,9	0,6	0,9	1,3	2,4	5,3	Franco arenoso

### 3.4. DISCUSIÓN.

Se ha realizado un estudio de las poblaciones de roble atlántico localizadas en varios espacios naturales protegidos a lo largo de la Cordillera Cantábrica a través del análisis detallado de la composición de la vegetación en 11 parcelas de muestreo, 5 situadas en el PN de Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias, 3 en el PN de Redes y 3 en la ZEC Ancares.

Los resultados obtenidos a partir del inventario dasométrico indican que el 72,7% de las masas podrían considerarse como monoespecíficas de *Quercus petraea* o roble albar (*carbayu montés* o *carballo albar*) ya que, ésta es la única especie presente o más del 90% de los individuos que la conforman lo son (Madrigal, 1994). Los robledales son las formaciones arboladas más características de los pisos colino y montano inferior de la zona húmeda de la Península Ibérica (Blanco Castro, 1997) por lo que no es inusual que este tipo de formaciones sean las predominantes en la zona de estudio.

La descripción del establecimiento y el desarrollo de la regeneración es esencial para conocer los patrones de establecimiento, crecimiento y supervivencia de estos robledales. En este sentido, el análisis de las clases diamétricas y su distribución en el rodal pueden expresar su potencial de regeneración (Johnson et al, 2002). Las parcelas de Moreira, Monasterio de Hermo, Cerredo, Sanguñales y Tarna son las que presentan unos

valores menores en las clases diamétrica más baja (CD 10), pudiendo ser este un síntoma de problemas regenerativos.

La distribución de frecuencias de las edades de los árboles se utiliza para diferenciar la tipología de las masas, masas o rodales con una distribución regular o bien rodales irregulares. En este sentido y como una aproximación a las clases de edad de un rodal se puede utilizar las distribuciones de frecuencias de las clases de diámetro o la distribución diamétrica, ya que en unas condiciones de desarrollo más o menos normal estas cambian conforme la masa crece y se desarrolla. Atendiendo a estos valores se puede indicar como la parcela de Moreira sería la de mayor edad frente a Villarino y Forcao, que son las parcelas más jóvenes y aglutinan mayor cantidad de pies en las clases diamétricas inferiores.

También de la clasificación sociológica de los pies de las diferentes parcelas de estudio se puede obtener información relevante sobre la estructura de la masa, la competencia que se establece entre los pies y el estado de desarrollo. Aquellas parcelas que presentan un alto grado de pies catalogados como sumergidos indican que el grado de competencia sería elevado, como es el caso de Cabana Vella y Cerredo.

La tecnología LiDAR se ha convertido en una de las herramientas más útiles en el medio forestal debido a lo precisos que pueden llegar a ser sus datos. En este aspecto, se debe de tener en cuenta que la precisión de los datos obtenidos dependerá de la densidad de los puntos de la nube y de la cobertura (Coops et al., 2021). Mediante el uso de esta tecnología se ha realizado una zonificación de 9 de las 11 laderas donde se encuentran localizadas las parcelas de estudio a través de la altura de la vegetación, así como, el porcentaje que ocuparía cada una de las zonas (herbáceo, arbustivo y arbóreo) a través del CHM. Este mapeo es un factor crucial especialmente relevante en los procesos ecológicos y los servicios que ofrecerían los bosques (Zhou & Li, 2023), siendo esencial para comprender las funciones de los ecosistemas terrestres (Lang et al., 2023). Los modelos de cobertura de la vegetación de alta resolución son una herramienta útil en la determinación de la heterogeneidad de un hábitat (Tuanmu & Jets, 2015; Lang et al., 2023) estando, este hecho, relacionado con la biodiversidad ya que, hábitats diversos proporcionarían distintos recursos para que un mayor número de individuos hagan uso de ellos (Benton et al., 2003).

Uno de los índices más empleados para determinar el estado de la vegetación es el NDVI (Rouse et al., 1973), empleando para su estimación los valores de reflectancia del rojo y del infrarrojo cercano (NIR). A pesar de que cada tipo de vegetación responde de forma distinta, se cumplen unos parámetros generales que, observando la firma espectral de la vegetación sana se aprecia un contraste muy evidente entre la zona del infrarrojo cercano y el visible (Chuvienco, 2008). El NDVI es un índice normalizado cuyos valores van de +1 a -1; valores por debajo de 0,1 corresponderían a zonas sin vegetación; entre 0,2 y 0,5 serían para zonas de pastizal y matorral y, por encima de 0,5 a zonas de vegetación densa (Sobrino et al., 2000; Weier & Herring, 2000). En el caso de las masas de roble estudiadas poseen valores por encima de 0,5, salvo en Pan do Zarco y Sanguñales, que son inferiores. Este hecho podría deberse al estado fenológico de la vegetación cuando se realizó el vuelo o quizá a algún tipo de patología aún sin determinar

ya que la vegetación que sufre algún tipo de daño refleja más el visible que el NIR, por lo tanto, los valores del NDVI serán más próximos a 0 (Weier & Herring, 2000).

El cortejo florístico inventariado es el típico que acompaña a los robledales atlánticos, donde *T. scorodinia*, *M. pratense*, *A. odoratum* y *A. nemorosa* son utilizadas como bioindicadoras de una fuerte acidez del suelo sobre el que se sustentan (Díaz González & Fernández Prieto, 1994; Blanco Castro, 1997; Díaz-Maroto & Vila-Lameiro, 2007). En general, salvo el *D. filix-mas* que es una especie esciófila (crece en condiciones de sombra), el resto son plantas presentan ciertas adaptaciones a vivir en condiciones nemorales como, por ejemplo, *A. nemorosa*, *T. scorodonia* *H. non-scripta* o *M. melissophyllum* que poseen rizomas donde acumulan sustancias de reserva gracias a las cuales son capaces de desarrollar la parte aérea antes de la foliación del estrato arbóreo (Díaz González & Fernández Prieto, 1994). Este cortejo arbustivo se caracteriza por la tolerancia que presentan las especies a desarrollarse en condiciones nemorales (umbrófilas) como las que se desarrollan en el interior de los robledales atlánticos. Especies como *F. alnus*, *S. aucuparia*, *E. arborea* o *V. myrtillus* indican la presencia de suelos ácidos, utilizándose como bioindicadoras de este parámetro.

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, la especie dominante en las parcelas de estudio es el *Q. petraea*, acompañado en algunas de las zonas de otros robles atlánticos como el *Q. robur* y/o el *Q. pyrenaica*. En la zona del PN de Redes los caracteres botánicos de las muestras tomadas para su identificación indican, a falta de análisis más concretos, que esos ejemplares serían puros mientras que, en el resto de las zonas se encuentran características que indican una posible hibridación entre las distintas especies de roble. Esta presunta hibridación se observa en las zonas que presentan un clima más mediterráneo, es decir, aun perteneciendo a la Región Eurosiberiana la influencia Mediterránea es cada vez mayor debido a las condiciones climáticas actuales. Kremel (2010) realizó un análisis de cómo responderían los robles europeos frente al cambio climático siendo la hibridación entre *Q. robur* y *Q. petraea* uno de los mecanismos que facilitarían la supervivencia de las especies en las nuevas áreas de distribución donde se abocarían a desarrollarse y, quizá sea este el fenómeno que está desarrollándose en algunas de las zonas de estudio.

Las especies del género *Quercus* tienen un rango edáfico amplio (Rodríguez-Campos et al. 2010) cuya característica común es que son suelos de carácter ácido al igual que lo que indica el análisis de los suelos.

En Gea-Izquierdo et al. (2006) indican que, aunque la producción de bellota es variable, ésta está influenciada de forma negativa con la densidad de la masa. Los resultados obtenidos en el presente estudio están de acuerdo con esta afirmación puesto que las parcelas con mayor producción son las que menores densidades presentan. Así mismo, los datos obtenidos están en consonancia con los de Martíník et al. (2013) en donde indican que la producción de bellota está relacionada con el espaciamiento entre los pies, siendo mayor cuanto mayor es este valor.

Entre los resultados más significativos de la producción de bellota es la nula recolección de bellotas en la parcela de Río del Alba, parcela que visualmente no presenta



ningún problema fitosanitario. Hay diversos condicionantes de los cuales depende la producción de bellota, por un lado, están los condicionantes ecológicos y por otro los propios del individuo, ambos influyen en la floración y posterior fructificación. Los factores ambientales influyen directamente en el proceso de floración de robles y en el posterior desarrollo de la bellota (Gea-Izquierdo et al., 2006, Jonson et al., 2009). El estrés hídrico durante el periodo de floración, la incidencia de patógenos o predadores influye negativamente en la producción de bellota (Koenig et al., 2013). Otro aspecto del cual depende la producción de bellota es de la vecería que consiste en que la producción de semillas no se produce todos los años, si no de una forma intermitente y periódica, con ciclos que en la mayor parte de las especies son de 2, 3 ó 4 años (Serrada Hierro, 2011).

La vecería ha sido fenómeno ampliamente estudiada y aún no están claros los condicionantes que la desencadenan. Recientemente, Fleurot et al. (2023) realizaron un estudio de este fenómeno en masas de *Q. petraea* en Francia durante 8 años y de él se extrae que dependiendo de la localización de las masas la producción de semilla se ve afectada por unos condicionantes u otros. En lugares con un clima más favorables la fructificación aumenta al hacerlo el esfuerzo de floración (número de flores producidas) mientras que, en climas más desfavorables ésta depende principalmente del tiempo primaveral, lo que sugiere que esta especie podría poseer distintas estrategias dependiendo de las condiciones ambientales (Fleurot et al., 2023). McClory et al (2024) hacen un estudio de la producción de bellota en *Q. robur* en Reino Unido y durante uno de los años de muestreo obtienen una producción baja de forma generalizada, lo que coincide con el hecho de que este es un fenómeno geográficamente sincronizado en las especies de roble. Esta afirmación no concordaría con lo que ocurrió en la parcela de Río del Alba ya que, la parcela de Braña Vieya (ambas en el PN Redes) se encuentra en una localización próxima y donde si se constató la producción de bellota.

### 3.5. CONCLUSIONES.

En este capítulo se hace un detallado análisis y caracterización de las masas de robles atlánticos inventariadas, desprendiéndose las siguientes conclusiones:

- **Importancia para la conservación:** Los robledales atlánticos, catalogados como hábitats vulnerables en la Lista Roja de Hábitats de la Unión Europea, desempeñan un papel fundamental en la biodiversidad. Por ejemplo, para especies consideradas como paraguas, como el oso pardo cantábrico, cuya protección implica la protección indirecta de otras especies con las que comparten su hábitat. Por ello, la implementación de medidas de gestión forestal sostenible y la promoción de la restauración de hábitats degradados son acciones clave para preservar la integridad de estos ecosistemas.

- **Diversidad y singularidad:** La singularidad de los robledales atlánticos en la Península Ibérica se manifiesta en su riqueza biológica y en su papel como refugio para especies endémicas. Por ejemplo, la competencia natural que ejerce el haya (*Fagus sylvatica*) sobre los robledales destaca la importancia de comprender las dinámicas de sucesión ecológica en estos bosques. La conservación de estos ecosistemas no solo garantiza la supervivencia de especies emblemáticas, sino que también contribuye a mantener la diversidad genética y la resiliencia frente al proceso de cambio climático.

- **Regeneración y desarrollo:** El análisis dasométrico revela la presencia de problemas regenerativos en ciertas parcelas de robledales atlánticos, como la escasez de individuos jóvenes y la falta de diversidad estructural. Por ejemplo, la identificación de áreas con una baja densidad de árboles jóvenes en parcelas como Moreira y Tarna sugiere la necesidad de implementar estrategias de regeneración activa, como la promoción de la dispersión de semillas y la restauración de áreas degradadas. El fomento de la regeneración natural y el manejo adaptativo son clave para garantizar la viabilidad a largo plazo de estos bosques.

- **Relación suelo-vegetación:** El estudio detallado de las características edáficas en las parcelas de estudio resalta la importancia de la interacción entre el suelo y la vegetación en los robledales atlánticos. Por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes en el suelo y su influencia en la producción de bellotas son aspectos significativos para la regeneración y el crecimiento de los robles. El mantenimiento de la calidad del suelo a través de prácticas de manejo sostenible, como la incorporación de materia orgánica, es importante para asegurar la salud y la productividad ecológica de estos ecosistemas forestales.

- **Conservación y gestión sostenible:** La conservación efectiva de los robledales atlánticos requiere la implementación de estrategias de gestión sostenible que aborden tanto las amenazas antrópicas como las naturales. Por ejemplo, la promoción de la diversidad estructural en los bosques, mediante la creación de claros y la promoción de la regeneración natural, puede aumentar la resiliencia de estos ecosistemas frente a eventos extremos como incendios forestales. Asimismo, la monitorización continua de la salud de los robledales y la evaluación de su respuesta a los cambios ambientales son aspectos muy importantes para adaptar las estrategias de conservación a largo plazo.

### 3.6. BIBLIOGRAFÍA.

- Alcaráz Ariza, F. (2008). Geobotánica. Universidad de Murcia. [www.um.es/docencia/geobotanica/teoria.html](http://www.um.es/docencia/geobotanica/teoria.html).
- Benito Garzón, M., Sánchez de Dios, R., & Sainz Ollero, H. (2008). Effects of climate change on the distribution of Iberian tree species. *Appl. Veg. Sci.* 11 (2), 169–178. <https://doi.org/10.3170/2008-7-18348>
- Benton, T. G., Vickery, J. A., & Wilson, J. D. (2003). Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key?. *Trends in ecology & evolution*, 18(4), 182-188.
- Blanco Castro, E. (1997). Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica. Ed. Planeta
- Braun-Blanquet, J. (1979) Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales. Blume Ediciones, MADRID.
- Casierra-Posada, F. & Aguilar-Avenidaño, O. E. (2007). Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, Vol 1, nº2, pag: 246-257
- Castedo Dorado, F., Álvarez Álvarez, P., Crecente Campo, F., & Barrio Anta, M. (2007). Consideración de la estabilidad de la masa en diagramas de manejo de densidad. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 63-74.
- Chuvieco, E. (2008). Teledetección ambiental: La observación de la Tierra desde el Espacio. *Ariel Ciencia* (Vol. 3).
- Coops, N. C., Tompalski, P., Goodbody, T. R., Queinnec, M., Luther, J. E., Bolton, D. K., ... & Hermosilla, T. (2021). Modelling lidar-derived estimates of forest attributes over space and time: A review of approaches and future trends. *Remote Sensing of Environment*, 260, 112477.
- Davies, C. E., Moss, D., & Hill, M. O. (2004). EUNIS habitat classification revised 2004. Report to: European environment agency-European topic centre on nature protection and biodiversity, 127-143.
- De Zulueta, J., & Cañellas, I. (1989). Método para estimar la producción real de bellota en un alcornocal. *Scientia Gerundensis* 15, 115-119
- Díaz Gonzalez, T. E., & Fernández Prieto, J.A. (1994). La vegetación de Asturias. *Itinera Geobotanica*. 8: 243-528.
- Díaz-Maroto, I., & Vila-Lameiro, P. (2007). Natural forests of *Quercus robur* L. in Northwest Spain. main properties of soils. *Polish Journal of Ecology*, 55(2), 401-404.

- Decreto 147/2001, de 13 de diciembre, por el que se aprueba el Plan de Manejo del Acebo (*Ilex aquifolium*) en el Principado de Asturias. BOPA nº 14, de 18 de enero de 2002.
- Decreto 65/95, de 27 de abril, por el que se crea el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de la Flora del Principado de Asturias y se dictan normas para su protección. BOPA 5-VI-95.
- Díaz-Maroto, I. J., & Vila-Lameiro, P. (2007). Deciduous and semi-deciduous oak forests (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pyrenaica*) floristic composition in the Northwest Iberian Peninsula. *Biologia*, 62, 163-172.
- do Amaral Franco, J. (1990). *Quercus*. En Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. (eds.). *Flora iberica 2*: 15-36. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Dyderski, M. K., Paź, S., Frelich, L. E., & Jagodziński, A. M. (2018). How much does climate change threaten European forest tree species distributions? *Glob Chang Biol*. 2018 Mar;24(3):1150-1163. <https://doi.org/10.1111/gcb.13925>
- European Environment Information and Observation Network (EIONET) (2021). G1.8 Acidophilus *Quercus* woodland. Recuperada en abril de 2024, de <https://forum.eionet.europa.eu/european-red-list-habitats/library/terrestrial-habitats/g.-forests/g1.8-acidophilous-quercus-woodland/download/en/1/G1.8%20Acidophilous%20Quercus%20woodland.pdf>
- European Environment Agency (EEA) (2024a). EUNIS habitat type hierarchical view (version 2012). Recuperada en abril de 2024, de <https://eunis.eea.europa.eu/habitats-code-browser-revised.jsp>
- European Environment Agency (EEA) (2024b). EUNIS habitat type hierarchical view (marine version 2022 & terrestrial version 2021). Recuperada en abril de 2024, de [https://eunis.eea.europa.eu/habitats-code-browser-revised.jsp?expand=20955,20956#level\\_20956](https://eunis.eea.europa.eu/habitats-code-browser-revised.jsp?expand=20955,20956#level_20956)
- European Environment Agency (EEA) (2024c). European Red List of Species. Recuperado en abril de 2024 de <https://www.eea.europa.eu/en/datahub/datahubitem-view/202f3c2e-54a9-4ff4-a1da-ed7ca524f634>
- Fernández López, M. J., Barrio Anta, M., Álvarez, P., López Varela Álvarez, B., & Gómez Fernández, J. A. (2012). *Quercus petraea* (Matt.) Liebl *Quercus robur* L. En J. Pemán, R. M. Navarro Cerrillo, J. L. Nicolás Peragón, M. A. Prada Sáez, & R. Serrada Hierro (Eds.), *Producción y manejo de semillas y plantas forestales (Tomo 2, Capítulo: Quercus petraea (Matt.) Liebl Quercus robur L.)*. Madrid: Organismo Autónomo Parques Naturales - Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
- Ferreras Chasco, C., & Fidalgo, C. (1999). *Biogeografía y Edafogeografía*. Síntesis, Madrid.

- Fleurot, E., Lobry, J. R., Boulanger, V., Debias, F., Mermet-Bouvier, C., Caignard, T., ... & Venner, S. (2023). Oak masting drivers vary between populations depending on their climatic environments. *Current Biology*, 33(6), 1117-1124.
- Gea-Izquierdo, G., Cañellas, I., & Montero, G. (2006). Acorn production in Spanish holm oak woodlands. *Forest Systems*, 15(3), 339-354.
- González, M., Schwendtner, O., & Val, Y. (2008). Desplazamiento del roble (*Quercus robur* L. y *Quercus petraea* (Matt) Liebl.) por el haya (*Fagus sylvatica* L.) en el Parque Natural Señorío de Bértiz (Navarra). En *Actas de la I reunión sobre botánica forestal*, Villablino (León). SECF.
- Gysel, L.W. (1956). Measurement of acorn crops. *For Sci* 2, 305-313
- Janssen, J. A., Rodwell, J. S., García Criado, M., Gubbay, S., Haynes, T., Nieto, A., ... & Rašomavičius, V. (2016). European red list of habitats part 2. Terrestrial and freshwater habitats (pp. 1-44). European Union.
- Johnson, P. A., Shifley, S.R., & Rogers, R. (2002). *The Ecology and Silviculture of Oaks*. CABI Publishing.
- Koenig, W. D., Díaz, M., Pulido, F., Alejano, R., Beamonte, E., & Knops, J. M. (2013). Acorn production patterns. Mediterranean oak woodland working landscapes: dehesas of Spain and ranchlands of California, 181-209.
- Koenig, W. D., Kelly, D., Sork, V. L., Duncan, R. P., Elkinton, J. S., Peltonen, M. S., & Westfall, R. D. (2003). Dissecting components of population-level variation in seed production and the evolution of masting behavior. - *Oikos* 102: 581-59
- Kremer, A. (2010) "Evolutionary responses of European oaks to climate change.", *Irish Forestry*. Available at: <https://journal.societyofirishforesters.ie/index.php/forestry/article/view/10039>
- Lacoste, A. & Salanon, R. (1973). *Biogeografía*. Oikos TAU, Barcelona.
- Lang, N., Jetz, W., Schindler, K., & Wegner, J. D. (2023). A high-resolution canopy height model of the Earth. *Nature Ecology & Evolution*, 7(11), 1778-1789.
- Lucas-Villar, F. J., Oliet-Palá, J., González-Goicoetxea, P., & Serrada-Hierro, R. (2013). *Quercus pyrenaica* Wild. En: *Producción y Manejo de Semillas y Plantas Forestales*. Tomo II. Pemán J, Navarro-Cerrillo RM, Nicolás JL, Prada MA, Serrada R. (Coords.) Organismo Autónomo Parques Nacionales. Serie Forestal pp: 278-291; ISBN: 978-84-8014-846-7.
- Madrigal, A. (1994). *Ordenación de montes arbolados*. Colección Técnica. ICONA. Madrid.
- Martiník, A., Dobrovolný, L., & Palátová, E. (2014). Tree growing space and acorn production of *Quercus robur*. *Dendrobiology*, (71).

- McClory, R., Ellis, R. H., Lukac, M., Clark, J., Mayoral, C., Hart, K. M., ... & MacKenzie, A. R. (2024). Carbon dioxide enrichment affected flower numbers transiently and increased successful post-pollination development stably but without altering final acorn production in mature pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Journal of Forestry Research*, 35(1), 73.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico [MITECO] (2024). Inventario Forestal Nacional, recuperado en abril de 2024 de <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-forestal-nacional.html>
- Moss, D. (2008). EUNIS habitat classification—a guide for users. European Topic Centre on Biological Diversity.
- Perry, R.W., & Thill, R.E. (1999). Estimating mast production: an evaluation of visual surveys and comparison with seed traps using white oaks. *South J Appl For* 23, 164-169
- Reque Kilchenmann, J. (2004). Modelo estático de producción para masas naturales de *Quercus petraea* en la Cordillera Cantábrica. Aplicación de la base de datos del segundo inventario forestal nacional. *Cuad. Soc. Esp. Cien. For.* 18: 185-192
- Rivas-Martínez, S. (1987). Memoria del Mapa de Series de Vegetación de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Rivas-Martínez, S., Penas, Á., Díaz González, T. E., Cantó, P., del Río, S., Costa, J. C., ... & Molero, J. (2017). Biogeographic units of the Iberian Peninsula and Balearic Islands to district level. A concise synopsis. *The Vegetation of the Iberian Peninsula: Volume 1*, 131-188.
- Rivera, Y., Moreno, L., Herrera, M., & Romero, H. M. (2016). La toxicidad por aluminio (Al<sup>3+</sup>) como limitante del crecimiento y la productividad agrícola: el caso de la palma de aceite. *Palmas*, 37(1), 11-23.
- Rodríguez-Campos, A., Díaz-Maroto, I.J., Barcala-Pérez, E., & Vila-Lameiro, P. (2010). Comparison of the autoecology of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Mattuschka) Liebl. stands in the Northwest of the Iberian Peninsula. *Annals of Forest Research*, 53, 7-25.
- Rouse, J. W., Jr., Haas, R. H., Deering, D. W., & Schell, J. A. (1973). Monitoring the vernal advancement and retro gradation (green wave effect) of natural vegetation: Progress Report RSC 1978-2
- Roussel, J. R., & Auty, D. (2023). Airborne LiDAR Data Manipulation and Visualization for Forestry Applications. R package version 3.1.0. <https://cran.r-project.org/package=lidR>
- Roussel, J.R., Auty, D., Coops, N. C., Tompalski, P., Goodbody, T. R. H., Sánchez Meador, A., Bourdon, J.F., De Boissieu, F., & Achim, A. (2021). lidR : An R package for analysis of Airborne Laser Scanning (ALS) data. *Remote Sensing of Environment*, 251 (August), 112061. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2020.112061>

- Serrada Hierro, R. (2011). Apuntes de Selvicultura. Universidad Politécnica de Madrid, 490.
- Sobrino, J. A., Raissoouni, N., Kerr, Y., Oliosio, A., López-García, M. J., Belaid, A., El Kharraz, M. H., Cuenca, J. & Dempere, L. (2000). Teledetección. Sobino, J.A. (Ed). Servicio de Publicaciones, Universitat de Valencia.
- Tuanmu, M. N., & Jetz, W. (2015). A global, remote sensing-based characterization of terrestrial habitat heterogeneity for biodiversity and ecosystem modelling. *Global Ecology and Biogeography*, 24(11), 1329-1339.
- Villar-Salvador, P., Nicolás-Peragón, J.L., Heredia Guerrero, N., & Uscola Fernández, M. (2013). *Quercus ilex L.* En: Producción y Manejo de Semillas y Plantas Forestales. Tomo II. Pemán J, Navarro-Cerrillo RM, Nicolás JL, Prada MA, Serrada R. (Coords.) Organismo Autónomo Parques Nacionales. Serie Forestal pp: 226-250; ISBN: 978-84-8014-846-7.
- Weiwew, J. & Herring, D. (2000). Measuring Vegetation (NDVI & EVI). [https://earthobservatory.nasa.gov/features/MeasuringVegetation/measuring\\_vegetation\\_1.php](https://earthobservatory.nasa.gov/features/MeasuringVegetation/measuring_vegetation_1.php)
- Zhou, X., & Li, C. (2023). Mapping the vertical forest structure in a large subtropical region using airborne LiDAR data. *Ecological Indicators*, 154, 110731.





## CAPÍTULO 4

### DIVERSIDAD FÚNGICA DE RAÍCES Y RIZOSFERAS DE ESPECIES DE ROBLLEDAL ATLÁNTICO



## 4.1. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior, se realizaron estudios para analizar detalladamente las comunidades vegetales que conforman los ecosistemas. La especie principal en estos ecosistemas es el roble atlántico, que se desarrolla en la zona occidental de la Cordillera Cantábrica, específicamente en Asturias y Lugo. Una vez que se ha comprendido lo que crece sobre el suelo, es esencial, para obtener una visión holística del ecosistema, discernir qué se desarrolla por debajo de este horizonte.

Las plantas que conforman los ecosistemas interactúan de forma natural con los organismos que habitan en el suelo que rodea sus sistemas radiculares, una región conocida como rizosfera. Según Ingiehon & Babalao (2018), la rizosfera es la región del suelo cercana a las raíces de las plantas y alberga una gran diversidad de organismos. Entre los organismos que se pueden encontrar en la rizosfera, destacan los hongos micorrícicos arbusculares y las rizobacterias. Estos organismos se nutren de las secreciones de las raíces de las plantas, como los mucílagos y los flavonoides, que pueden influir en su diversidad y función. Además, estas secreciones pueden aumentar el potencial de estos organismos para colonizar las raíces de las plantas.

Los hongos son uno de los elementos más importantes dentro de la rizosfera de las plantas. Se estima que 1 g de suelo puede contener unos 100 metros de micelio (Whitfield, 2017), lo que da una idea de la importancia que estos organismos tienen en los ecosistemas. La existencia de una gran red miceliar que se desarrolla en el suelo y de la cual las plantas se benefician ha sido teorizada durante la última década. Esta red se conoce como *Wood-wide web* o *common mycorrhizal network* (CMN) (Simard & Drurall, 2004, Simard et al., 2012, Horton, 2015) y generalmente se asocia a hongos micorrícicos (Merkx et al., 2024). En la actualidad hay una gran controversia sobre el grado de implicación que tiene esta red en el desarrollo de las comunidades vegetales. Por un lado, están las investigaciones basadas en las teorías en las cuales se hace hincapié en la existencia de dicha red y cómo esta jugaría un papel importante en desarrollo de los ecosistemas, como por ejemplo Merkx et al. (2024), Rillig et al. (2024) o Ullah et al. (2024). Por otro, hay una serie de investigadores que ponen en entredicho el grado importancia que se le otorga a esta red como Robinson et al. (2023) o Karst et al. (2023). Karst et al. (2023), aunque reconocen su existencia, indican que una serie de afirmaciones sobre la CMN tales como, a) es una red extendida por los bosques, b) los recursos se transfieren a través de la red para favorecer el desarrollo y c) los árboles maduros favorecen a sus descendientes a través de dicha red, carecen de suficientes argumentos científicos sólidos que las apoyen o tendrían una explicación alternativa.

En el presente capítulo se realizará un estudio de las comunidades fúngicas que se encuentran presentes en la rizosfera de robledales atlánticos, tratando de discernir las especies o grupos de especies que tienen su hábitat en estas localizaciones.

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 4.2.1. Localización de las zonas de estudio.

Se han seleccionado 3 zonas de estudio localizadas en una serie de masas de roble atlántico emplazadas en espacios naturales protegidos situados a lo largo de la Cordillera Cantábrica tal y como se muestra en la Figura 4.1.

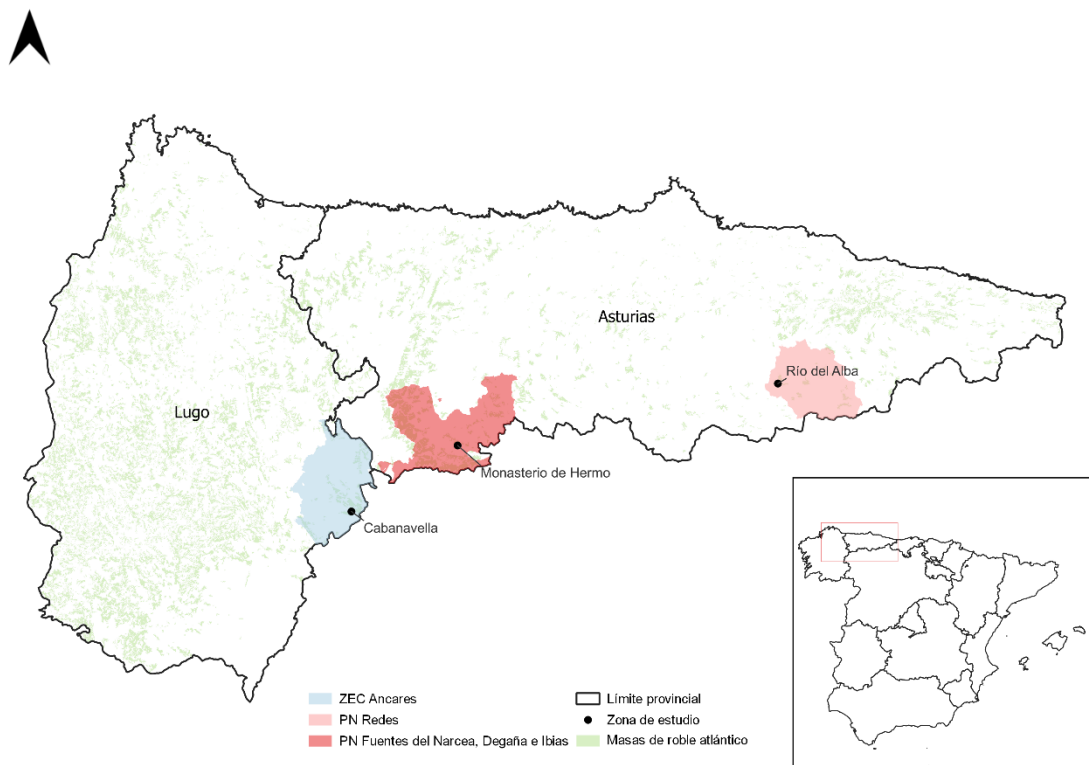


Figura 4.1: Localización de las parcelas de estudio en masas de roble atlántico.

Las parcelas de estudio se seleccionaron ya que las comunidades vegetales observadas poseen una diversidad alta y reflejan cómo es el espectro vegetal por encima del suelo en este tipo de ecosistemas. La parcela de Río del Alba se seleccionó, además de por lo indicado anteriormente, debido a la nula producción de bellota que se observó durante el inventario de producción llevado a cabo. La descripción pormenorizada de las zonas seleccionadas se encuentra descrita en el Capítulo 3 de la presente memoria.

### 4.2.2. Muestreo de los sistemas radicales.

Para estudiar la diversidad fúngica de las poblaciones de roble, se realizó un muestreo de los sistemas radicales. Se seleccionaron varios árboles dentro de cada parcela, basándose esta selección en los parámetros sociológicos del arbolado. Se eligió un ejemplar aleatoriamente de cada clase sociológica, resultando en un total de 12 ejemplares analizados (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Ejemplares arbóreos seleccionados para el estudio de sus sistemas radicales. Cód. Árbol: código identificativo del árbol para los análisis; Diámetro (cm): diámetro normal medido a 1,30 m; Altura (m): altura total en m; Clase sociológica: clase sociológica del arbolado según Serrada Hierro (2011).

Parcela	Especie	Cód. Árbol	Diámetro (cm)	Altura (m)	Clase sociológica
Cabana Vella	<i>Q. petraeae</i> (Matt.) Liebl	A1	42,3	18,4	Dominante
		A2	33,8	16,8	Codominante
		A3	18,8	13,5	Intermedio
		A4	11,5	6,3	Sumergido
Monasterio de Hermo	<i>Q. petraeae</i> (Matt.) Liebl	F1	26,1	17,5	Dominante
		F2	26,5	14,6	Codominante
		F3	32,5	12,9	Intermedio
		F4	17,8	12	Sumergido
Río del Alba	<i>Q. petraeae</i> (Matt.) Liebl	R1	41,4	24,9	Dominante
		R2	26,7	16,7	Codominante
		R3	23,9	16,6	Intermedio
		R4	11,9	11,2	Sumergido

Una vez seleccionado el ejemplar, se procedió a la toma de la muestra de la raíz. Para ello se escogió una raíz principal del árbol, comprobando 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 su localización (Figura 4.2). Con la ayuda de una tijera de podar se corta una sección de la raíz variable.



Figura 4.2: Localización de muestras en un ejemplar arbóreo.

La muestra es introducida en una bolsa Zip de plástico a la cual se le añade un poco de agua para mantener la humedad. Las muestras tomadas en campo se almacenan en la cámara fría, a una temperatura de 4°C hasta su posterior análisis.

### 4.2.3. Descripción macroscópica y microscópica.

Una vez recolectadas, las muestras se acondicionan para su posterior análisis macro y microscópico. Este proceso comienza con el lavado de las muestras con agua corriente para eliminar la tierra adherida. Una vez limpias, las muestras se dividen en sub-muestras de aproximadamente 10 cm. Cada sub-muestra se coloca en una placa Petri, a la que se añade un poco de agua para mantener la humedad. Tras el procesamiento, todo el material se almacena a 4 °C hasta su análisis.

### 4.2.4. Ectomicorrizas (EcM).

Tras la recolección de las sub-muestras, se llevó a cabo la caracterización macroscópica de la diversidad micorrícica presente con la ayuda de una lupa Leica EZ 410. Las distintas EcM encontradas se agruparon por morfotipos, utilizando como referencia las fichas identificativas de Fernández-Miranda (2014), basadas en la sistemática empleada por Agerer (1990) y Goodman et al. (1996) (Anexo 3). Para cada morfotipo, se realizaron mediciones de las distintas partes que conforman una micorriza, analizando un total de 20 micorrizas por morfotipo (ver Tabla 4.2). Posteriormente, se recolectó una parte de estas micorrizas en un tubo eppendorf de 1,5 ml con el fijador FAA (90% etanol, 5% formol y 5% de ácido acético) para su posterior análisis microscópico. Además, se recolectó otra serie de puntas (ver Tabla 4.2) en otro tubo eppendorf de 1,5 ml, las cuales fueron congeladas a -80 °C para su uso en los futuros análisis moleculares.

Tabla 4.2: Número de sistemas utilizados para la descripción EcM.

Morfotipo	Nº sistemas		
	Medición	Histología	Molecular
1	20	10	20
2	20	10	14
3	20	10	20
4	20	10	20
5	20	10	20
6	20	10	18
7	20	10	10
8	20	10	10
9	20	10	20
10	6	2	4
11	20	10	20

Para la descripción microscópica de cada morfotipo, se realizaron cortes de entre 10-30 µm de espesor con un criostato Leica modelo CM1510-1. Su caracterización histológica se realizó con la ayuda de fichas descriptivas (Fernández-Miranda, 2014) elaboradas basadas en lo indicado por Goodman et al. (1996) e Ingleby et al. (1990) (Anexo 4).

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 diez medidas del manto para cuantificar el grosor de este. Los cortes de las raíces se estudiaron con microscopio Leica DM 2000 y cámara fotográfica Leica DFC295.

#### 4.2.5. Micorrizas vesículo arbusculares y otros endófitos.

Para cuantificar la presencia o ausencia de endomicorrizas u otros endófitos se procedió a la recolección de una serie de pequeñas raíces que se almacenaron en tubos eppendorf a los que se les añadió previamente fijador FAA (90% etanol, 5% formol y 5% de ácido acético). Para su análisis se siguió el protocolo de clarificación y tinción establecido por Phillips y Hayman (1970), ligeramente modificado, que consiste en los siguientes pasos:

- Lavado inicial, consistente en lavar las raíces en abundante agua corriente para eliminar impurezas.
- Tratamiento con KOH (hidróxido de potasio): colocar las raíces en una solución de KOH al 10% dentro de una estufa a 100 °C durante 10-15 minutos, para suavizar los tejidos.
- Lavar nuevamente con agua corriente para eliminar restos de KOH.
- Blanqueo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno), en el cual se colocan las raíces en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% durante 10-15 minutos, con el objetivo de aclarar los tejidos.
- Tratamiento con HCL (Ácido clorhídrico) mediante el cual se colocan las raíces en una solución HCL 1N durante 10 minutos dentro de una estufa a 100°C para detener la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Decantación del HCL, sin lavar las raíces para no diluir el ácido.
- Tinción con azul de tripán al 0,05% y colocarlas a 100 °C durante 10 minutos para teñir las células.
- Eliminación del exceso de colorante.
- Lavado final con lactoglicerol para prepararlas para la observación microscópica.
- Montaje de la muestra colocando 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 su observación mediante un microscopio Leica DM 2000.

#### 4.2.6. Extracción de DNA genómico.

Para el estudio de los organismos responsables de las asociaciones endofíticas se llevó a cabo seleccionado varios trozos de raíz, con una longitud comprendida entre 2 y 4 cm, localizados a lo largo de la muestra del sistema radical del ejemplar a analizar. Estos fragmentos de raíz, junto con los morfotipos identificados macroscópicamente como EcM seleccionadas para el estudio genómico (Tabla 4.2), se almacenaron, etiquetados de forma individual, en tubos eppendorf de 1,5 ml congeladas a -80 °C hasta su posterior análisis. La homogeneización de las muestras se realizó con la ayuda del homogeneizador Silamat® S6, extrayéndose el ADN mediante el GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURX) siguiendo los protocolos del fabricante.

#### 4.2.7. DNA Metabarcoding.

Una vez obtenidas las muestras de ADN, éstas fueron analizadas siguiendo las técnicas de DNA Metabarcoding que se describen a continuación.

Al igual que en el capítulo 2, para la preparación de la librería se amplificó un segmento de la región ITS1 (Espaciador Transcrito Interno 1), de aproximadamente 280 bp, utilizando las parejas de cebadores ITS1f e ITS2 (Espaciador Transcrito Interno 2), como se detalla en la Tabla 4.3. Estos cebadores también se incluyeron en la plataforma de secuenciación Illumina añadidos a sus extremos 5'.

Tabla 4.3: Cebadores y cebador de bloqueo utilizados en la amplificación de la región ITS. F indica el cebador forward y R el reverse.

Región	Cebador	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS	ITS1f	F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993
	ITS2	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990
	Quercus ITS2BP	--	ATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCC	--

Para evitar la amplificación del ADN *Quercus* L. spp., se diseñó un cebador de bloqueo (Quercus ITS2BP) siguiendo la metodología de Vestheim y Jarman (2008), que fue incluido en el protocolo de preparación de la biblioteca (Tabla 4.3). Para diseñar de este cebador, se utilizó Geneious 11.1.5 (<https://www.geneious.com>) (BiomattersLtd), y se basó en la complementariedad de secuencias de *Quercus petraea* y *Quercus robur* L. (GenBank: FM244132 y FM244246, respectivamente), intentando, al mismo tiempo, minimizar su complementariedad con las secuencias de hongos endofíticos disponibles públicamente. Se añadió un espaciador C3 CPG al extremo 3' del cebador de bloqueo para evitar el alargamiento.

En el primer paso de amplificación, las PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 µL, que contenía 1,25 µL de ADN molde, 0,5 µM de los cebadores, 10 µM de los cebadores de bloqueo y 3,13 µL de Supreme NZYTaq 2x Green Master Mix. (NZYTech) y agua ultrapura hasta 12,5 µL. La mezcla de reacción se incubó de la siguiente manera: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 65 °C durante 45 s, 52,9 °C durante 45 s, 72 °C durante 45 s y un paso final paso de extensión a 72 °C durante 7 min.

Salvo en el primer paso de la amplificación, los siguientes pasos llevados a cabo en el proceso del *DNA Metabarcoding* son los descritos en el Capítulo 2. Finalmente, la asignación taxonómica se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo 2.

#### 4.2.8. Análisis de diversidad.

Los análisis de diversidad llevados a cabo fueron los descritos en el Capítulo 2 de la presente memoria. En el caso de las EcM también se realizó la cuantificación de la colonización del sistema radical analizado siendo ésta el número de puntas observadas por cm de raíz estudiadas, basándose en Brundrett et al. (1996), así como la localización de los sistemas EcM observados.



### 4.3. RESULTADOS.

Cabe destacar en este punto una peculiaridad extra de la parcela del PN de Redes (Río del Alba) con respecto al resto de parcelas analizadas, que no se tuvo en cuenta a la hora de realizar la selección previa de las zonas de muestreo, pero, junto con la nula producción de bellota es una característica diferencial con el resto de las parcelas. Cuando se fue a campo a recoger las muestras de raíz (Marzo de 2022) se observó que desde la última visita (Noviembre de 2021) la parcela había sufrido un incendio, poco severo, en el cual la masa no se vio comprometida.

#### 4.3.1. Ectomicorrizas (EcM).

##### 4.3.1.1. Descripción morfológica, histológica y asignación taxonómica.

Tras realizar el análisis, tanto macroscópico como microscópico, de los sistemas radicales de los doce árboles seleccionados, se diferenciaron un total de 11 morfotipos. En el conjunto de las extracciones de ADN de los morfotipos se obtuvieron 332 ASVs (Amplicon Sequence Variant) de los cuales, 163 se asignaron al filo Ascomycota Caval.-Sm., 143 a Basidiomycota R.T. Moore, 11 a Mucoromycota Doweld, 11 se quedaron asignados a nivel de reino y 4 a Cryptomycota M.D.M. Jones & T.A. Richards.

A continuación, se reflejan las características de cada uno de los morfotipos localizados, así como, su caracterización taxonómica.

**Morfotipo 1:** EcM no ramificadas, puntas derechas o ligeramente dobladas de textura lisa y color negro mate. La longitud del sistema y de la punta es de  $0,7 \pm 0,1$  mm, el ancho de la punta y el de su base es de  $0,2 \pm 0,01$  mm y el ancho del eje mayor es de  $0,3 \pm 0,01$  mm. Además, presenta hifas emergentes de color negro (Figura 4.3a). El manto (red densa alrededor de las raíces de las plantas sin penetrar en las células de la planta) posee un espesor de  $26,7 \pm 2,4$   $\mu\text{m}$ , con una primera capa de pseudoparénquima en estructura de red seguido de uno irregular. La red de Hartig se extiende hasta la primera capa de células corticales (Figura 4.3b).

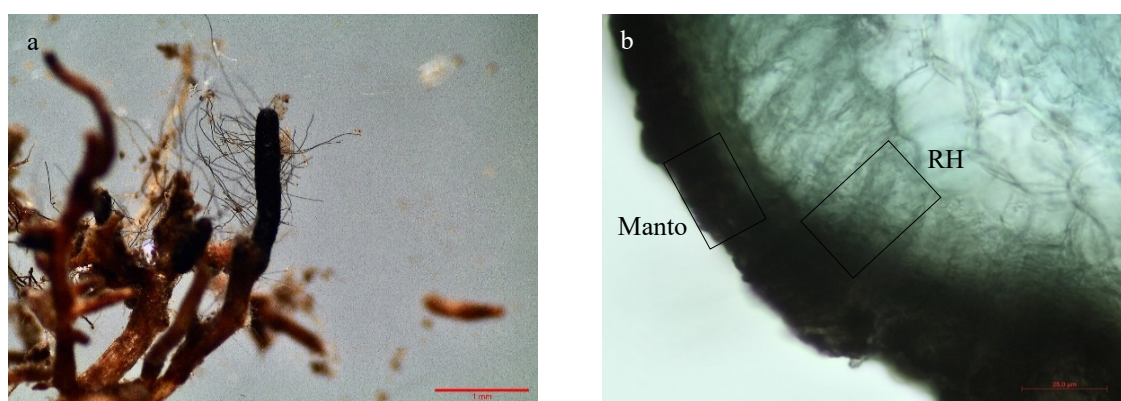


Figura 4.3: Morfotipo 1. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón. RH: Red de Hartig.

En la muestra de ADN perteneciente a este morfotipo se obtuvieron un total de 71 ASV. 43 pertenecientes al filo Ascomycota, 22 al Basidiomycota, 2 al Cryptomycota, 1 al Mucoromycota y 3 se quedaron asignados a nivel reino. Tras la realización de la asignación taxonómica el 96,9% de las lecturas se asignaron al filo Ascomycota, correspondiendo el 87,5% de ellas con *Cenococcum geophilum* Fr. El restante 2,9% de las lecturas corresponden a diversos organismos encuadrados dentro del filo Basidiomycota siendo el orden más común, Trechisporales K.H. Larss. (Figura 4.5).

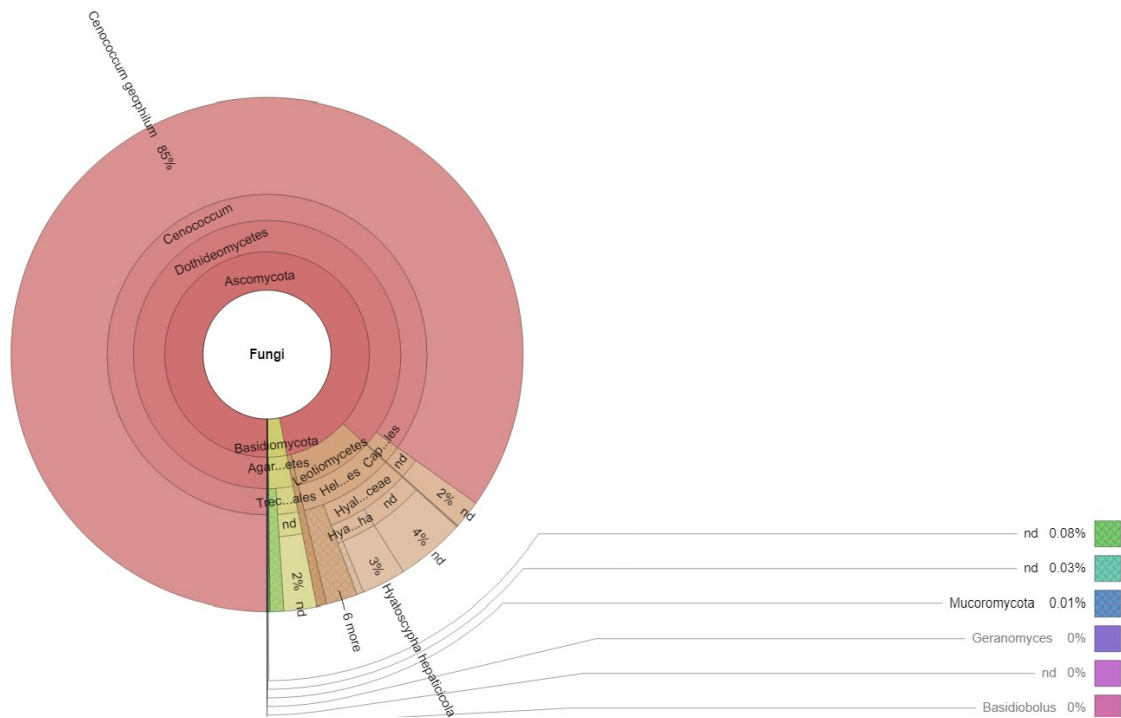


Figura 4.5: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 1.

**Morfotipo 2:** EcM no ramificada o monopodial pinnanda. Su forma doblada o inclinada de color beige, textura aterciopelada y lustre brillante, posee hifas emergentes (Figura 4.6a). La longitud del sistema y de la punta es de  $0,7 \pm 0,1$  mm, el ancho de la punta y el de su base es de  $0,2 \pm 0,01$  mm y el ancho del eje mayor es de  $0,3 \pm 0,01$  mm. El manto presenta un espesor de  $13,8 \pm 0,4$   $\mu$ m, con una primera capa de pseudoparénquima en estructura de red seguido de uno irregular. La red de Hartig se extiende hasta la primera capa de células corticales (Figura 4.6b).



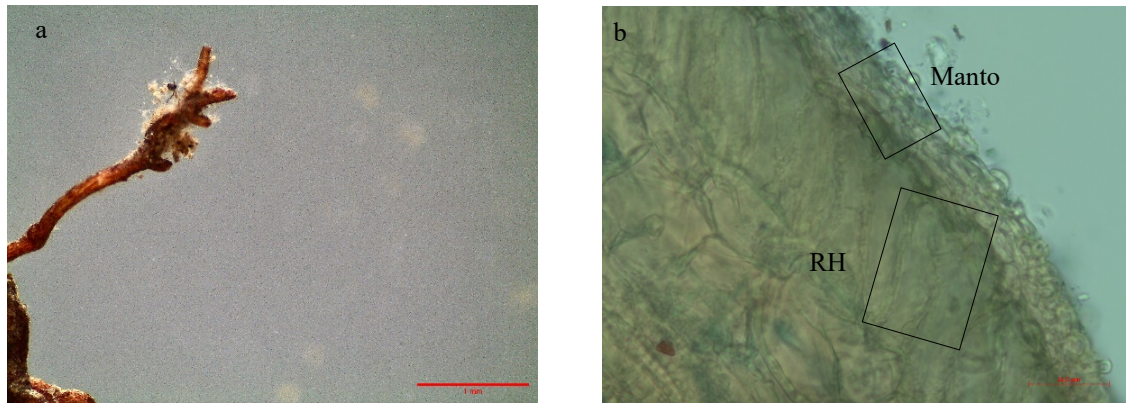


Figura 4.6: Morfotipo 2. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón. RH: Red de Hartig.

Tras la secuenciación de la muestra de ADN perteneciente a este morfotipo se obtuvieron un total de 72 ASV: 24 pertenecientes al filo Ascomycota, 47 al Basidiomycota mientras que, 1 se quedó asignados a nivel reino. Después de la asignación taxonómica aproximadamente el 70,7% de las lecturas corresponden a especies del filo Basidiomycota, siendo el 69,1% pertenecientes a la familia Russulaceae Lotsy, concretamente a los géneros *Lactarius* Pers. y *Russula* Pers. Al filo Ascomycota le pertenecen el 29,3% de las lecturas totales, donde el 18,5% de las mismas serían de *Genea hispidula* Berk. ex Tul. & C. Tul. y, aproximadamente, el 9,3% a especies pertenecientes al orden Helotiales Nannf. (Figura 4.7).

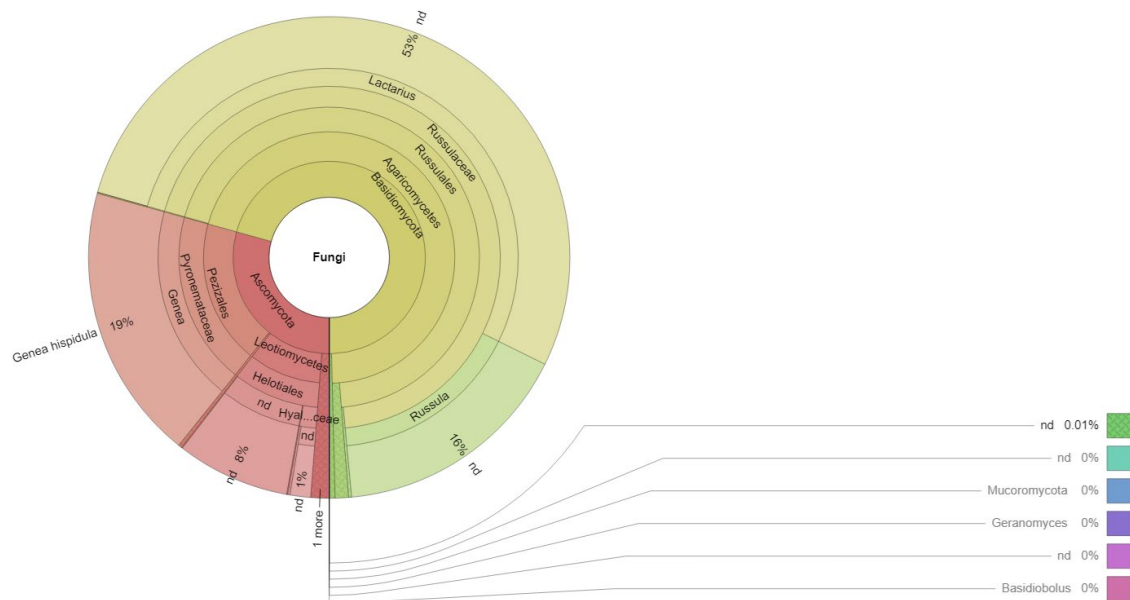


Figura 4.7: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 2.

**Morfotipo 3:** EcM no ramificada o monopodial pinnada, punta derecha o ligeramente doblada. Presenta una coloración grisácea sobre un fondo beige, lustre mate y textura aterciopelada (Figura 4.8a y b). La longitud del sistema es de  $0,9 \pm 0,1$  mm, la

longitud de la punta es de  $0,7\pm 0,1$  mm, ancho de la punta, el ancho del eje mayor y el de su base es de  $0,2\pm 0,01$  mm y el ancho del eje mayor es de  $0,3\pm 0,01$  mm. El manto presenta un grosor de  $27,5\pm 3,7$   $\mu\text{m}$ , siendo éste bicapa donde la primera de ellas posee una estructura de prosénquima en red seguida de una capa de pseudoparénquima irregular (Figura 4.8c). La red de Hartig se extiende hasta la segunda capa de células corticales (Figura 4.8d).

En la muestra de ADN procesada se obtuvieron un total de 56 ASV: 26 pertenecientes al filo Ascomycota, 26 al Basidiomycota y 4 al Mucoromycota. Taxonómicamente el 96,2% de las lecturas totales se asignan al filo Basidiomycota, siendo el 87,02% de las mismas de *Tomentella lilacinogrisea* Wakef., el 8% del género *Lactarius* (Figura 4.9). Un 3,7 % de las lecturas totales pertenecen al filo Ascomycota, siendo un 2,7% especies del orden Helotiales (Figura 4.9). El filo Mucoromycota representa el 0,07% de las lecturas (Figura 4.9).

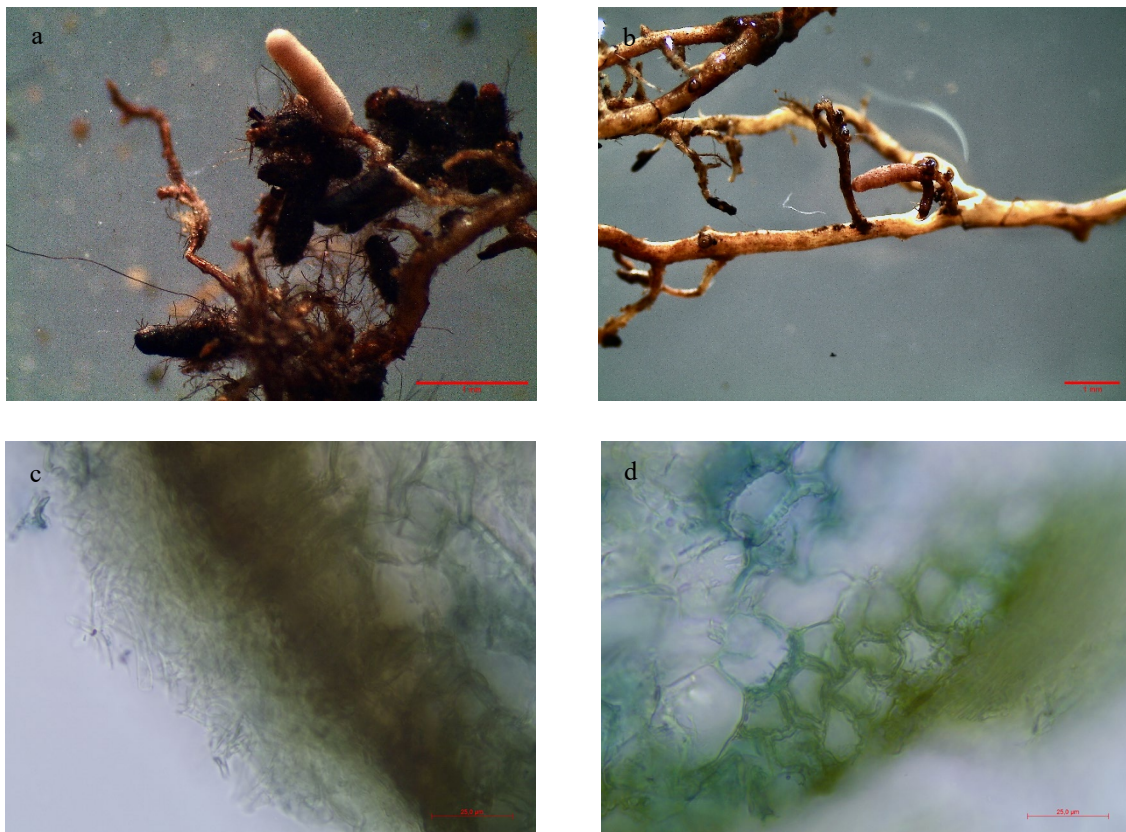


Figura 4.8 Morfotipo 3. a) y b) Aspecto macroscópico; c) Corte histológico teñido con azul de algodón: manto; d). Corte histológico teñido con azul de algodón: Red de Hartig.

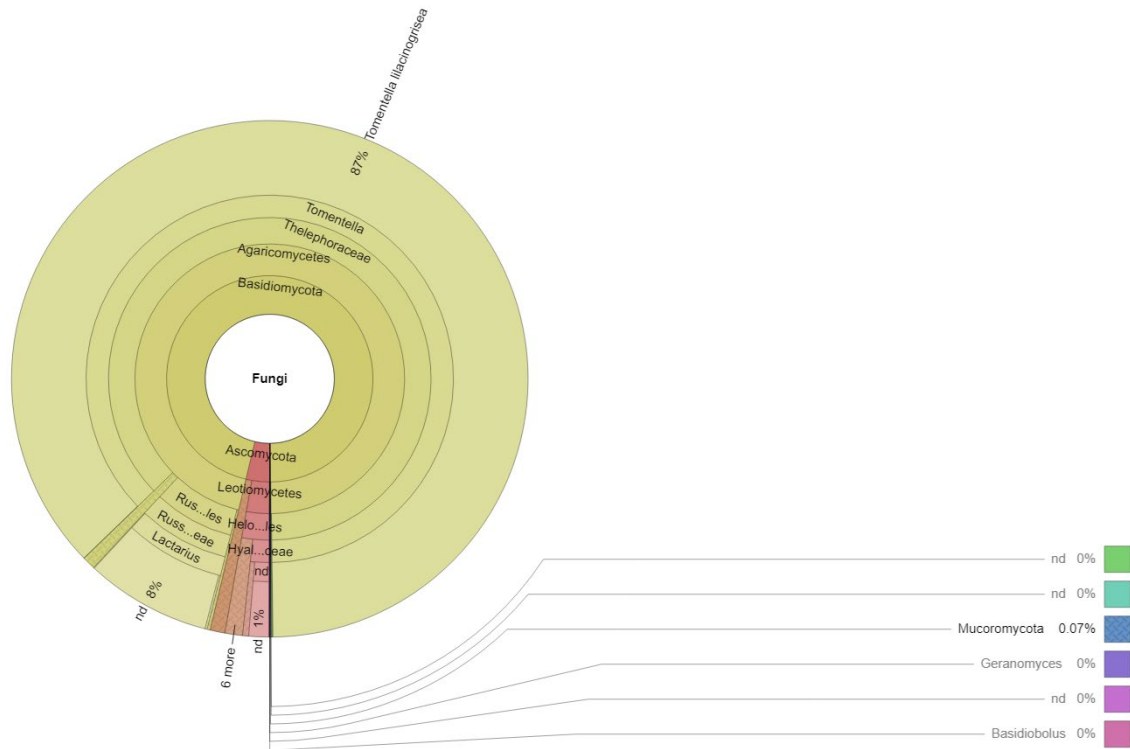


Figura 4.9: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 3.

**Morfotipo 4:** EcM no ramificada, de puntas derechas o dobladas y textura lisa; color, blanco roto y lustre brillante. La longitud de la punta es de  $0,7 \pm 0,1$  mm y el ancho  $0,2 \pm 0,01$  mm (Figura 4.10a). Se caracteriza por presentar un manto de  $15,8 \pm 1,3$   $\mu\text{m}$  constituido por una sola capa que presenta una estructura de pseudoparénquima en red y una red de Hartig que se extiende hasta la segunda capa de células corticales (Figura 4.10b).

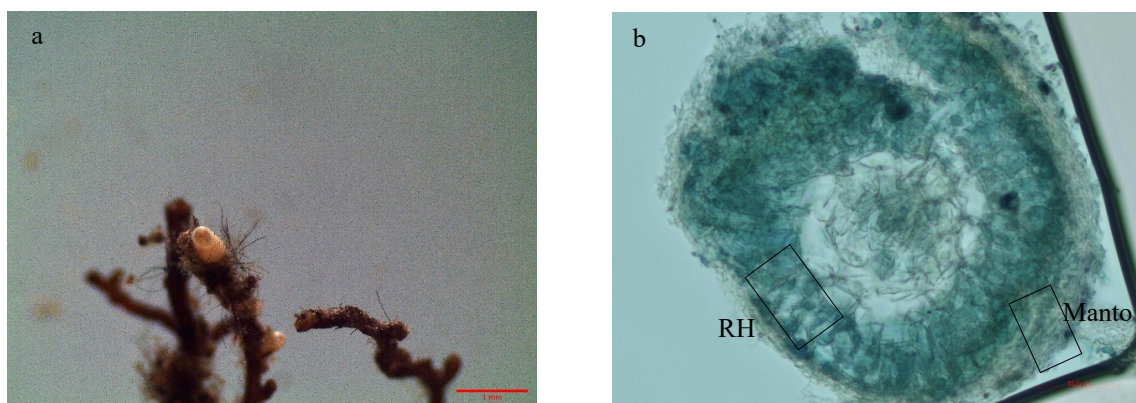


Figura 4.10: Morfotipo 4. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón. RH: Red de Hartig.

En el análisis de la muestra de ADN de los ejemplares recolectados que presentaban este morfotipo se obtuvieron 74 ASV, siendo 49 del filo Ascomycota, 22 del Basidiomycota y 3 del Mucoromycota. En este caso, el 99% de las lecturas corresponden



al filo Basidiomycota, donde el 98% de las mismas pertenecería a la clase Agaricomycetes siendo 59,2% asignables al orden Agaricales y el 38,7% al Russulales (Figura 4.11). El 0,8 % de las lecturas totales se asignan al filo Ascomycota y, en este caso, el filo Mucoromycota está representado con el 0,2% de las lecturas totales (Figura 4.11).

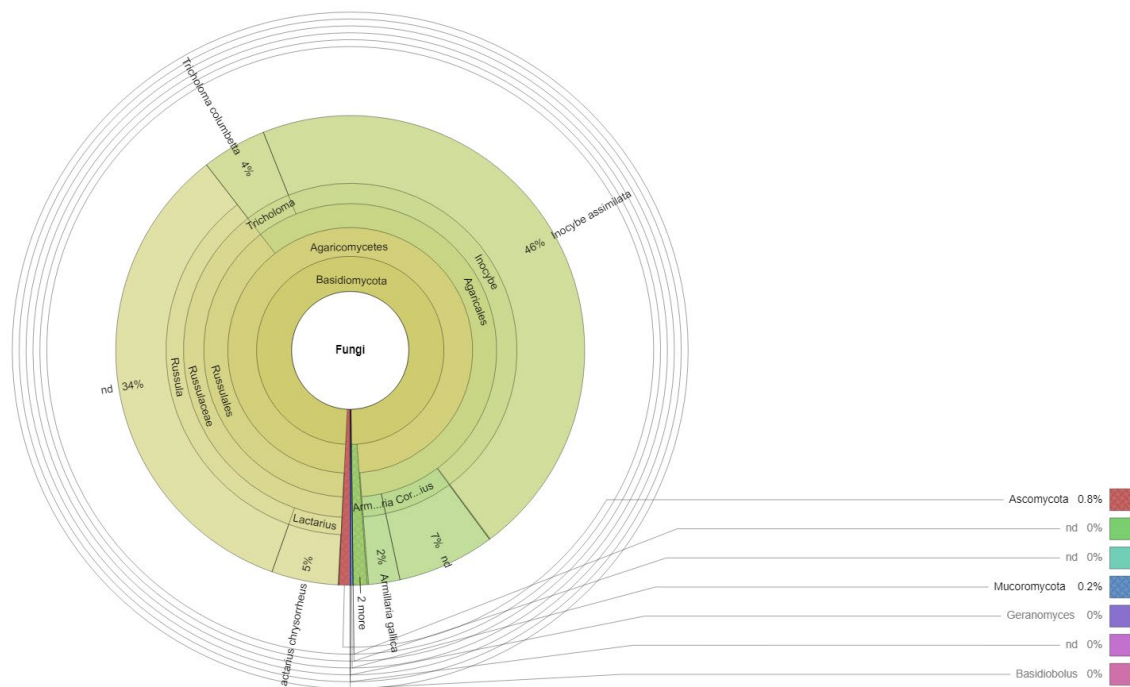


Figura 4.11: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del Morfotipo 4.

**Morfotipo 5:** EcM monopodial pinnada no ramificada. De color negro mate y textura reticulada (Figura 4.12a y b), se caracteriza por poseer hifas emergentes de color negro. Las puntas dobladas, inclinadas o tortuosas. La longitud del sistema es de  $0,8 \pm 0,1$  mm, longitud de la punta  $0,5 \pm 0,1$  mm, ancho de la punta  $0,1 \pm 0,01$  mm, ancho del eje mayor y de la base de la punta de  $0,2 \pm 0,01$  mm. Presenta un manto con una estructura de pseudoparénquima en red con un espesor medio de  $40,3 \pm 1,9$   $\mu\text{m}$  (Figura 4.12c), extendiéndose la Red de Hartig hasta la primera capa de células corticales (Figura 4.12d).

La secuenciación de la muestra de ADN indicó la presencia de 57 ASV, de los cuales, 28 pertenecían al filo Ascomycota, 22 al Basidiomycota, 6 al Mucoromycota y 1 se quedó asignado a nivel reino. Una vez efectuada la asignación taxonómica se observó cómo los 3 filios están representados, al igual que en el caso anterior, siendo el más abundante el Basidiomycota al cual le corresponden el 88% de las lecturas totales, cuya especie principal sería *Russula lepida* Fr. Las especies del orden Helotiales serían las dominantes dentro del filo Ascomycota, con el 11,3% de las lecturas totales; por último, filo Mucoromycota representa el 0,6% de las lecturas (Figura 4.13).

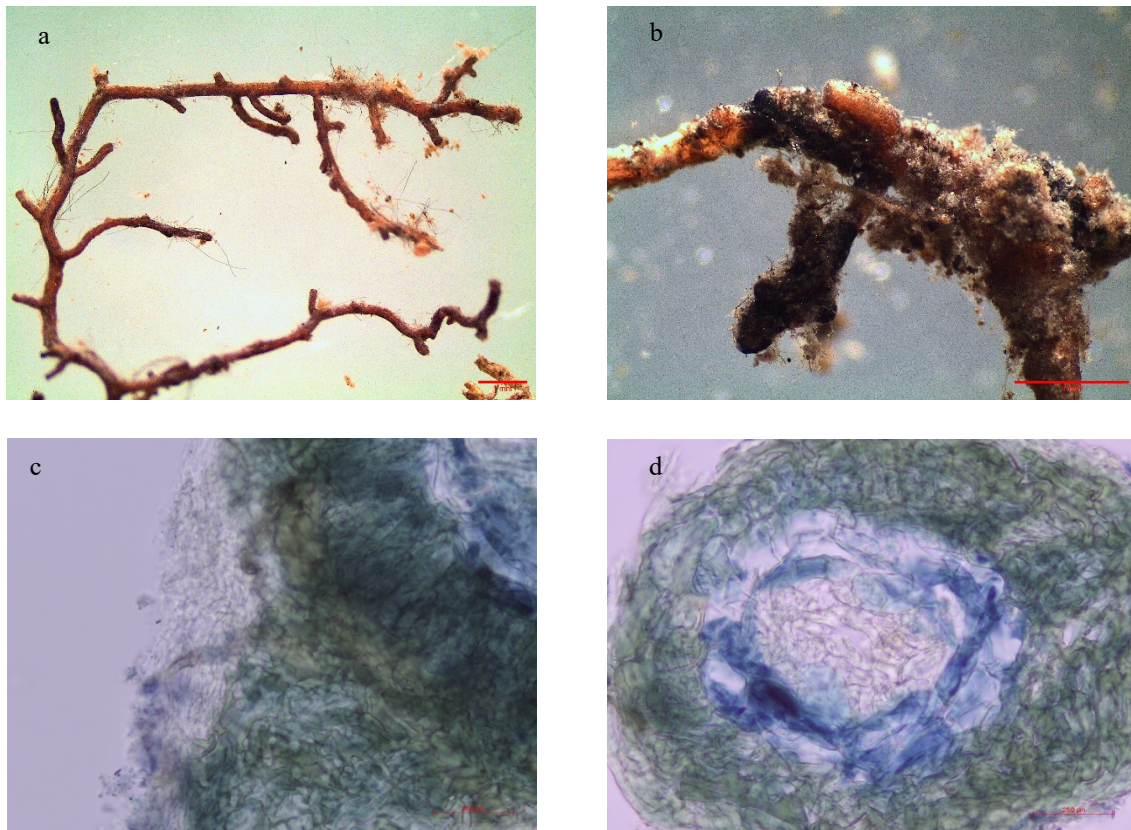


Figura 4.12: Morfotipo 5. a) y b) Aspecto macroscópico; c) Corte histológico teñido con azul de algodón: manto; d). Corte histológico teñido con azul de algodón.

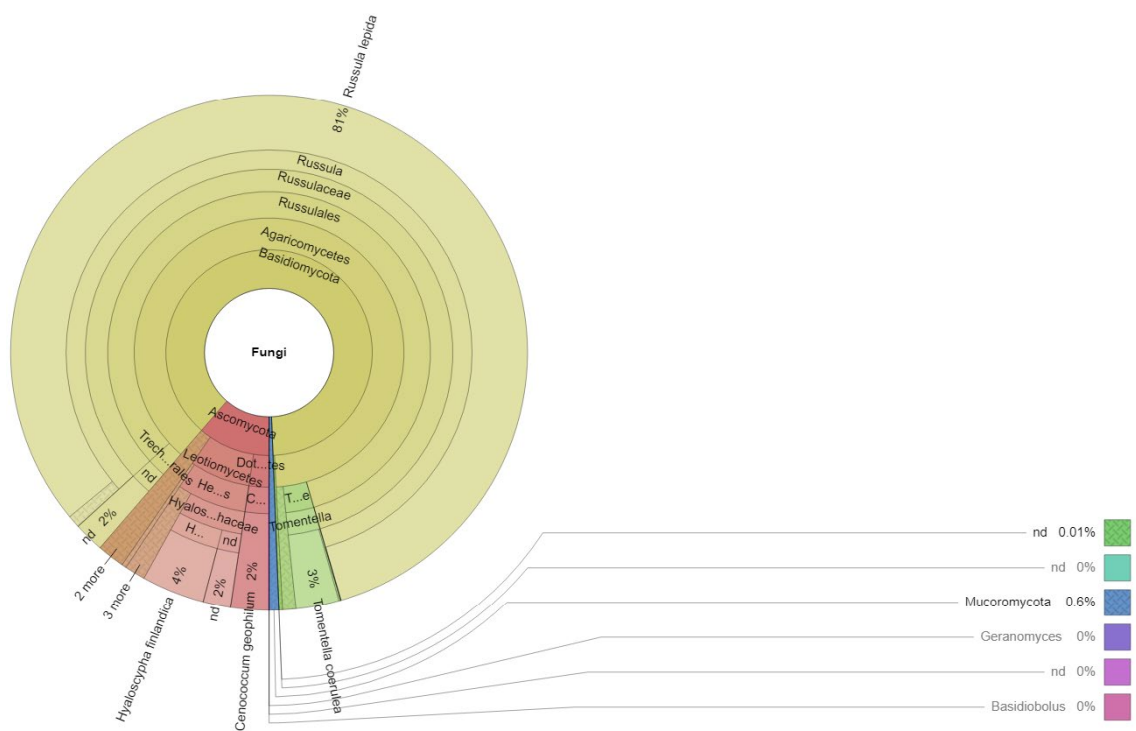


Figura 4.13: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del Morfotipo 5.

**Morfotipo 6:** EcM monopodial pinnada o no ramificada. Puntas doblada o tortuosa, de textura aterciopelada y color que varía entre el gris oscuro al negro, con lustre mate (Figura 4.14a). La longitud del sistema es de  $1,8 \pm 0,2$  mm, longitud de la punta  $1,1 \pm 0,1$  mm, ancho de la punta  $0,3 \pm 0,01$  mm, ancho del eje mayor  $0,3 \pm 0,02$  mm y de la base de la punta de  $0,2 \pm 0,01$  mm. Presenta un manto con una estructura de prosénquima deshilachado con un espesor medio de  $20,2 \pm 2$   $\mu\text{m}$ , extendiéndose la Red de Hartig hasta la primera capa de células corticales (Figura 4.14b).

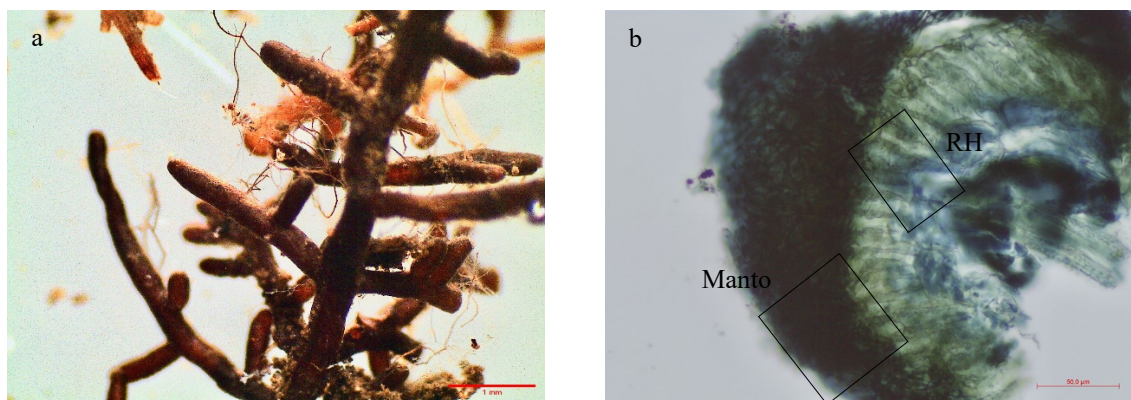


Figura 4.14: Morfotipo 6. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón. RH: Red de Harting.

En la muestra de ADN perteneciente a este morfotipo se obtuvieron un total de 20 ASV. 13 pertenecientes al filo Ascomycota, 6 al Basidiomycota y 1 al Mucoromycota. Tras la realización de la asignación taxonómica, el 98,8% de las lecturas corresponden al filo Basidiomycota, donde solo está presente *Tomentella coerulea* Höhn. & Litsch., mientras que, 1,1% pertenecen a diversas especies del filo Ascomycota y el 0,2% al Mucoromycota (Figura 4.15).

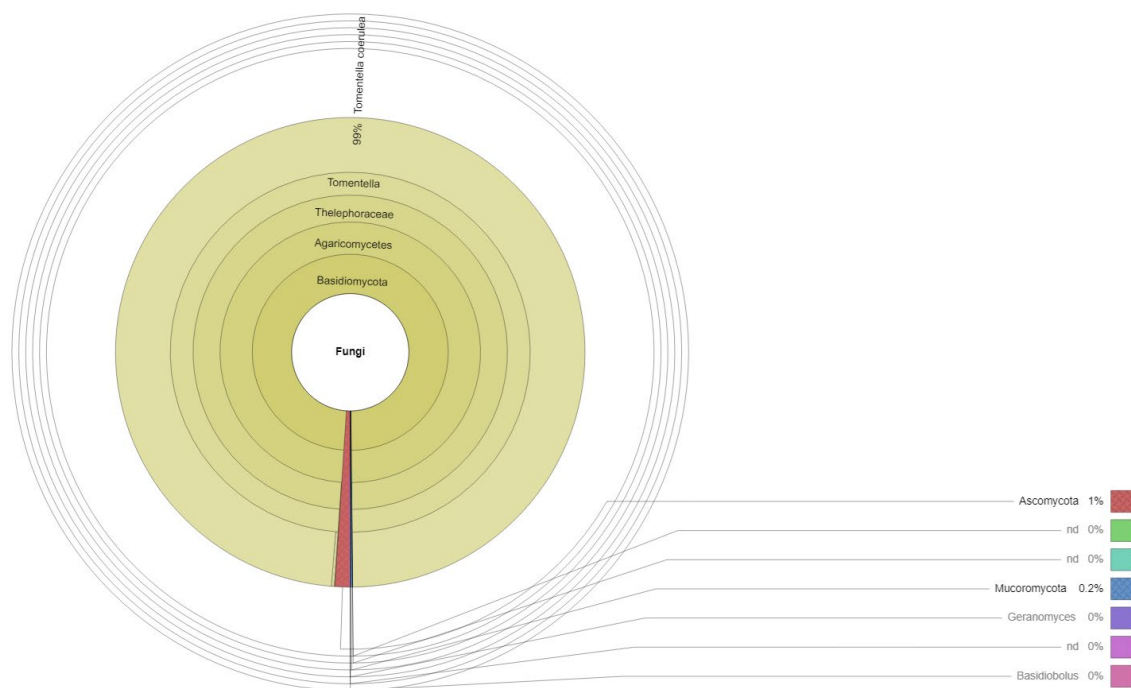


Figura 4.15: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 6.



**Morfotipo 7:** EcM monopodial pinnada o no ramificada. De puntas dobladas o inclinadas. Suelen presentar una textura reticulada-algodonosa de color crudo sobre fondo negro; en ocasiones, presentan una parte de la punta de color negro y textura reticulada. El lustre tiende a ser mate (Figura 4.16a). La longitud del sistema es de  $0,9\pm 0,2$  mm, longitud de la punta  $0,7\pm 0,1$  mm, el ancho de la punta, ancho del eje mayor y de la base de la punta de  $0,2\pm 0,01$  mm. Presenta un manto con una estructura de pseudoparénquima en red con un espesor medio de  $40,3\pm 1,9$   $\mu\text{m}$ . En los cortes histológicos realizados a este morfotipo no se ha apreciado Red de Hartig (Figura 4.16).

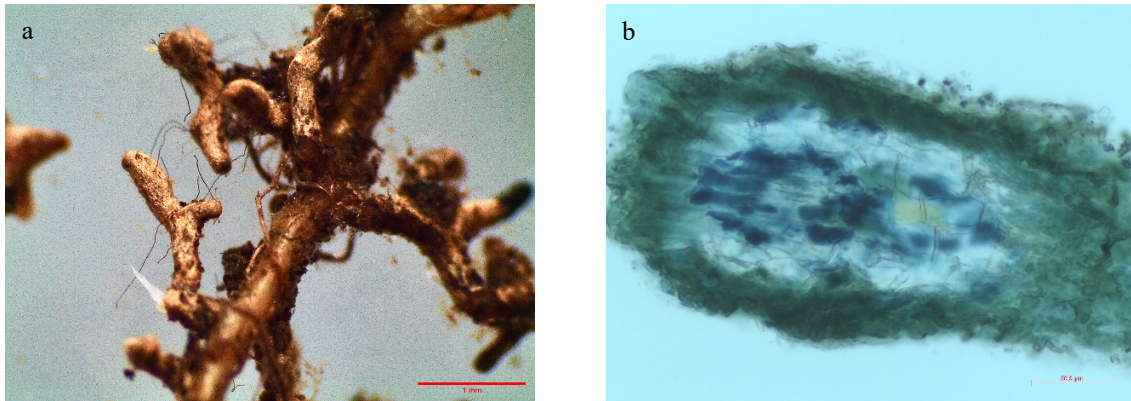


Figura 4.16: Morfotipo 7. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón.

Se han obtenido un total de 60 ASV tras la secuenciación de la muestra de ADN, perteneciendo 23 pertenecientes al filo Ascomycota, 31 al Basidiomycota, 2 al Cryptomycota, 3 al Mucoromycota y 1 se quedó asignado a nivel reino. Taxonómicamente, el 88,2% de las lecturas totales se encuadran dentro del filo Basidiomycota, representando, casi en su totalidad por *Melanogaster ambiguus* (Vittad.) Tul. & C. Tul. (Figura 4.17); el filo Ascomycota, está representado en el 11,4% de las lecturas, siendo el orden Helotiales el que posee un mayor peso (Figura 4.17). El filo Mucoromycota aglutina al 0,3% de las lecturas (Figura 4.17).

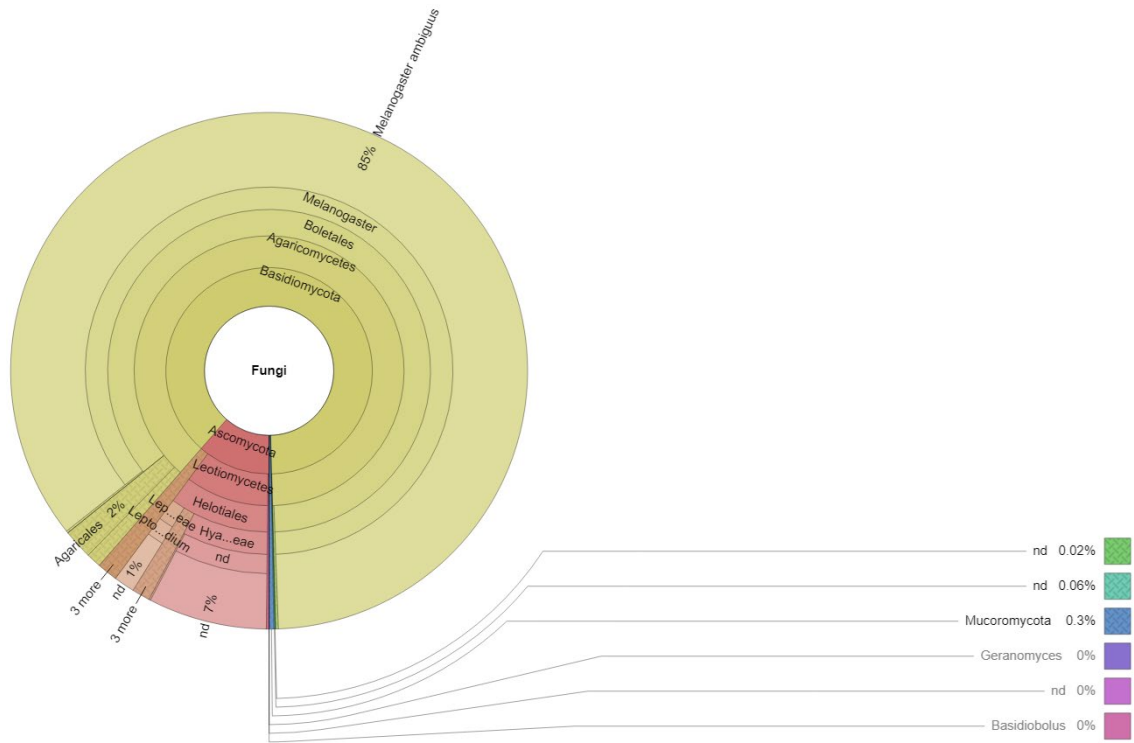


Figura 4.17: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 7.

**Morfotipo 8:** EcM no ramificada, de puntas tortuosas y textura reticulada. Posee un color marrón claro, con la punta negruzca y lustre brillante (Figura 4.18a). La longitud de la punta y del sistema es de  $0,9 \pm 0,1$  mm, y el ancho de la punta, ancho del eje mayor y de la base de la punta es de  $0,2 \pm 0,01$  mm. Presenta un manto de pseudoparénquima en estructura de red con un espesor medio de  $9,6 \pm 0,8$   $\mu\text{m}$ , extendiéndose la Red de Hartig hasta la primera capa de células corticales (Figura 4.18b).

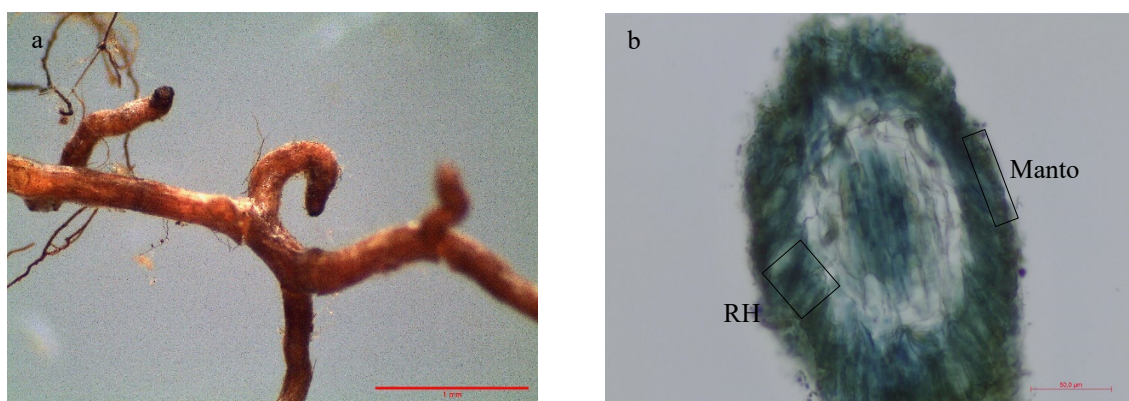


Figura 4.18: Morfotipo 8. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón. RH: Red de Hartig,

En la muestra de ADN procesada se obtuvieron un total de 67 ASV: 36 pertenecientes al filo Ascomycota, 29 al Basidiomycota y 2 se quedaron asignados a nivel



de reino. Taxonómicamente el 65,4% de las lecturas corresponden a miembros del filo Basidiomycota, siendo el orden Trechisporales el más representativo (Figura 4.19). El restante 35,6% se atribuyen Ascomycota, donde domina el orden Helotiales; por último, Mucoromycota el 0,01% de las lecturas (Figura 4.19).

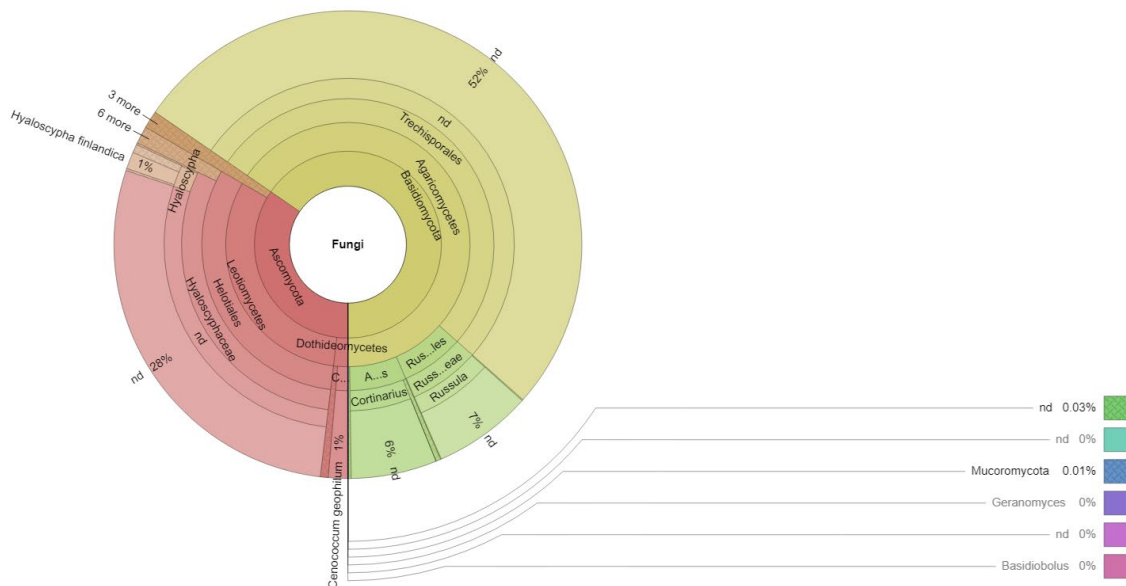


Figura 4.19: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 8.

**Morfotipo 9:** EcM irregulares o no ramificadas, de puntas tortuosas y textura algodonosa. Presentan un color blanco mate (Figura 4.20a). La longitud del sistema y de la punta de  $1,4 \pm 0,2$  mm, y el ancho de la punta, ancho del eje mayor y de la base de la punta es de  $0,2 \pm 0,01$  mm. Presenta un manto bi-estratificado con una primera capa de prosénquima en estructura de red y otra de pseudoparénquima en estructura de red, con un espesor medio de  $8,6 \pm 0,4$   $\mu\text{m}$ , pudiendo llegar la Red de Hartig hasta la segunda capa de células corticales (Figura 4.20b).

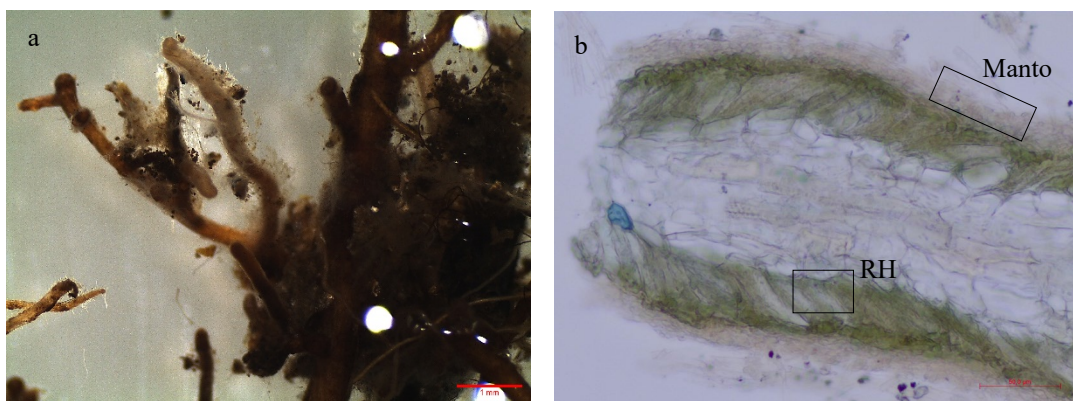


Figura 4.20: Morfotipo 9. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón. RH: Red de Hartig.

Tras la secuenciación del ADN de este morfotipo se obtuvieron 28 ASV: 12 pertenecientes al filo Ascomycota, 15 al Basidiomycota y 1 al Mucoromycota. Una vez

realizada la asignación taxonómica, el 99,1 % de las lecturas pertenecen al filo Basidiomycota, siendo el género *Cortinarius* (Pers.) Gray, el dominante (Figura 4.21). El filo *Ascomycota* estaría representado por un 0,9% de las lecturas totales y el *Mucormycota* por el 0,01% (Figura 4.21).

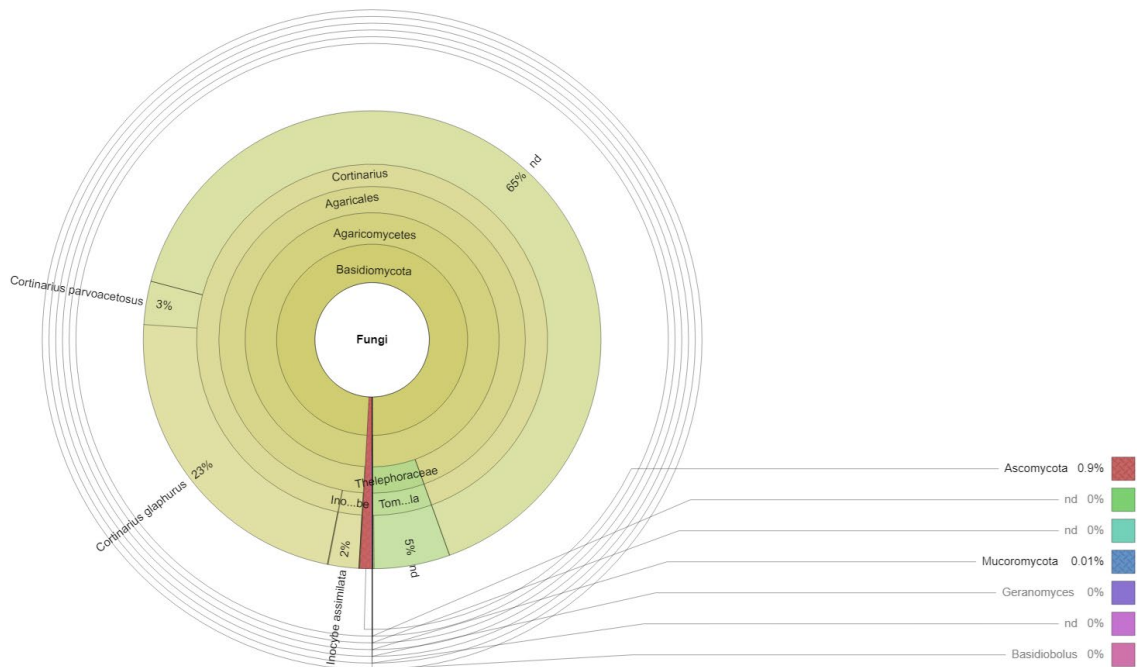


Figura 4.21: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 9.

**Morfotipo 10:** EcM monopodial piramidal o no ramificadas. Puntas dobladas o inclinadas, de color gris, ligeramente brillante, y textura aterciopelada (Figura 4.22a). La longitud del sistema es de  $1,8 \pm 0,2$  mm, longitud de la punta  $1,4 \pm 0,2$  mm, ancho de la punta, del eje mayor y de la base de la punta de  $0,4 \pm 0,03$  mm. Presenta un manto de pseudoparénquima en estructura de red con un espesor medio de  $24,5 \pm 1,2$   $\mu\text{m}$ , extendiéndose la Red de Hartig hasta la segunda capa de células corticales (Figura 4.22b).

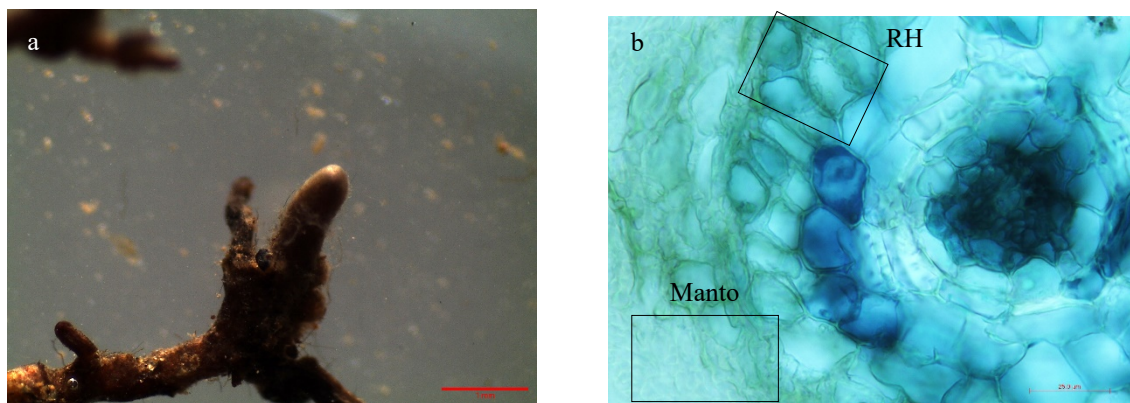


Figura 4.22: Morfotipo 10. a) Aspecto macroscópico; b) Corte histológico teñido con azul de algodón. RH: Red de Hartig.

Una vez analizada la muestra de ADN se obtuvieron 46 ASV de los cuales, 31 pertenecen al filo Ascomycota, 13 al Basidiomycota, 1 al Mucoromycota y 1 se quedó nivel de reino. Taxonómicamente, el 75,2% de las lecturas totales se asignaron al filo Ascomycota, siendo orden Helotiales es el más común (Figura 4.23). El filo Basidiomycota acogería el restante 24,8% de las lecturas, donde el orden Russulales Kreisel ex P.M. Kirk, P.F. Cannon & J.C. David, sería el dominante (Figura 4.23). El 0,02% de las lecturas corresponden con el filo Mucoromycota (Figura 4.23).

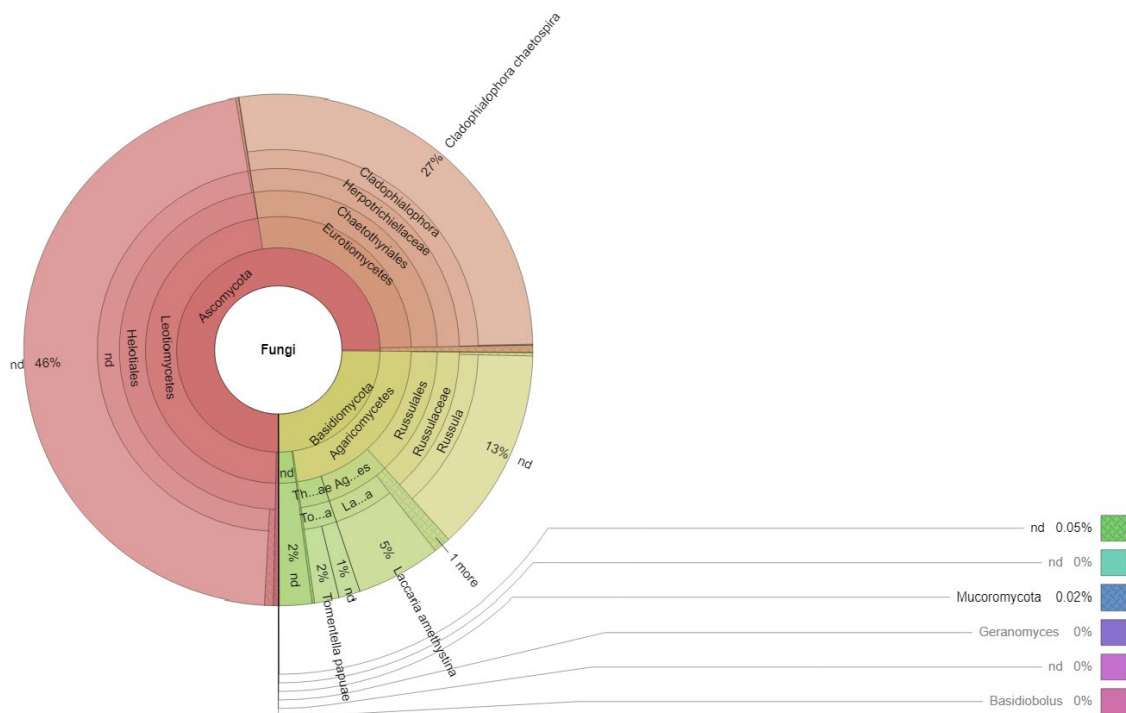


Figura 4.23: Distribución de lecturas tras la asignación taxonómica del morfotipo 10.

**Morfotipo 11:** EcM monopodial pinnada o no ramificada. Puntas tortuosas con estructura reticulada, color marrón oscuro y lustre mate (Figura 4.24a). La longitud del sistema es de  $0,9 \pm 0,1$  mm, longitud de la punta  $0,9 \pm 0,1$  mm, el ancho de la punta, ancho del eje mayor y de la base de la punta de  $0,1 \pm 0,04$  mm. Presenta un manto con una estructura de pseudoparénquima en red con un espesor medio de  $26,7 \pm 2,4 \mu\text{m}$ , no observándose Red de Hartig en los cortes histológicos (Figura 4.24b).





Tabla 4.4: Colonización y variabilidad EcM en los sistemas radicales de estudio. Cód. Árbol: código identificativo del árbol para los análisis; Clase: clase sociológica del arbolado según Serrada Hierro (2011); Colonización: Número de puntas/centímetro de raíz muestreada; Variabilidad: Expresa los distintos morfotipos identificados en el conjunto de las muestras en la parcela.

Parcela	Cód. Árbol	Clase	Colonización	Variabilidad
Cabana Vella	A1	Dominante	3,6	6
	A2	Codominante	2,4	5
	A3	Intermedio	5,8	8
	A4	Sumegido	1,4	4
Mon. Hermo	F1	Dominante	5,4	9
	F2	Codominante	3,2	3
	F3	Intermedio	4,5	7
	F4	Sumegido	4,3	7
Río del Alba	R1	Dominante	0,4	4
	R2	Codominante	0,6	3
	R3	Intermedio	0,3	3
	R4	Sumegido	2,6	5

La distribución de los morfotipos encontrados se describe en la tabla 4.5. Los morfotipos 1, 2 y 3 se observaron en todos los sistemas radicales estudiados. El morfotipo 4 no se observó en los pies codominantes y en la parcela de Río del Alba tampoco en el dominante. El morfotipo 5 se localizó en el conjunto de ejemplares de Río del Alba y Monasterio de Hermo pero solo en el intermedio de Cabana Vella. El morfotipo 6 estaba presente en Cabana Vella y en Monasterio de Hermo salvo en el codominante. El morfotipo 7 solo se vio en el ejemplar intermedio de la parcela de Cabana Vella. Los morfotipos 8 y 9 se localizaron en las mismas parcelas, Monasterio de Hermo y Cabana Vella. Los morfotipos 10 y 11 se observaron solo en Monasterio de Hermo.

Tabla 4.5: Localización de los morfotipos observados. Cód. Árbol: código identificativo del árbol para los análisis EcM: morfotipo.

Parcela	Cód. Árbol	EcM										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Cabana Vella	A1	si	si	si	si	si	no	no	no	no	no	no
	A2	si	si	si	no	si	no	no	no	no	no	no
	A3	si	si	si	si	si	no	no	no	no	no	no
	A4	si	si	si	no	si	no	no	no	no	no	no
Mon. Hermo	F1	si	si	si	si	si	si	no	no	si	si	no
	F2	si	si	si	no	si	no	no	no	no	no	no
	F3	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si
	F4	si	si	si	si	si	si	no	no	si	no	si
Río del Alba	R1	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no
	R2	si	si	si	si	no	si	no	no	no	no	no
	R3	si	si	si	no	no	si	no	si	si	no	no
	R4	si	si	si	si	no	si	no	si	si	no	no

### 4.3.2. Histología.

En las clarificaciones y tinciones de los segmentos de raíz analizados se observaron varias estructuras compatibles con infecciones fúngicas en el conjunto de las parcelas analizadas. En todas ellas se observaron hifas septadas (Figura 4.26a), endófitos septados oscuros (Figura 4.26b y c), vesículas de almacenamiento (Figura 4.26d) y un tipo de infección sin determinar, pero perteneciente a un hongo ya que, el tinte utilizado es específico para este tipo de organismos (Figura 4.26c).

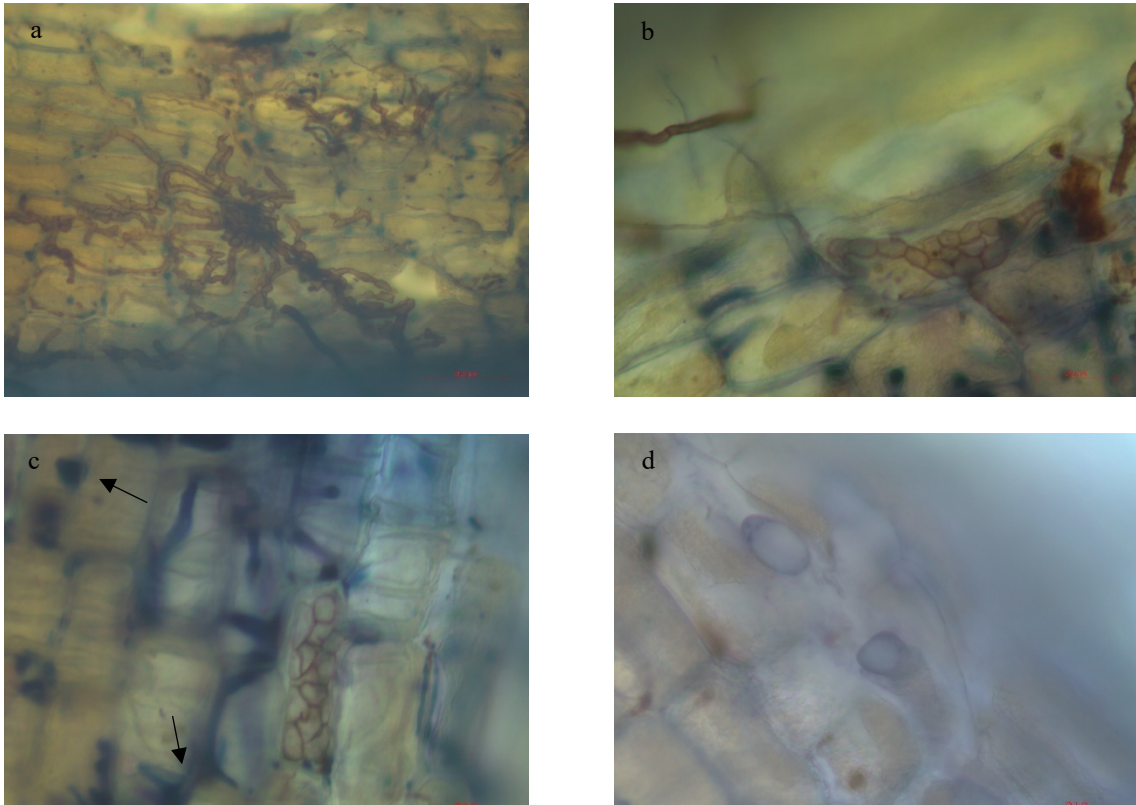


Figura 4.26: a) Hifas septadas; b) Endófitos septados oscuros (DSE); c) DSE, la flecha indica la infección desconocida y d) Vesículas.

### 4.3.3. Diversidad fúngica obtenida a través de los análisis de ADN.

#### 4.3.3.1. Caracterización taxonómica.

##### Población global.

En el conjunto de las extracciones de ADN, de los segmentos de raíz, se han obtenido un total de 1.043 ASVs de los cuales, 659 se asignaron al filo Ascomycota, 280 a Basidiomycota, 46 a Mucoromycota, 42 se quedaron asignados a nivel de reino, 12 a Cryptomycota M.D.M. Jones & T.A. Richards, 2 a Zygomycota Moreau, 1 a Chytridiomycota Dowel y 1 a Glomeromycota C. Walker & A. Schüßler, obteniéndose un total de 4.401.585 lecturas. La distribución de los ASVs se encuentra reflejada en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Distribución de los ASV en el conjunto de las masas y en cada una de las poblaciones.

Filo	PN Fuentes <sup>1</sup>	PN Redes	ZEC Ancares	Total
Ascomycota	289	249	338	659
Basidiomycota	118	74	149	280
Chytridiomycota	--	--	1	1
Cryptomycota	12	3	1	12
Glomeromycota	1	--	--	1
Mucoromycota	23	27	15	46
Zygomycota	--	--	2	1
Sin Asignar (Reino)	22	13	17	42
Total ASVs	465	366	523	1043

<sup>1</sup>PN Fuentes: PN Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias.

Como resultado de esta asignación se ha constatado la presencia, de un total de 298 especies, 249 géneros, 141 familias, 69 órdenes, 20 clases pertenecientes a los filos mencionados anteriormente. Estos resultados indican una rica composición de hongos en las raíces y rizosfera de los robles analizados, lo que sugiere una interacción muy diversa y compleja entre los hongos y las plantas hospedantes en el ecosistema estudiado.

En la Figura 4.27 se muestra la distribución del número de lecturas del conjunto de las parcelas analizadas, observándola se puede indicar que el filo Ascomycota es el dominante, seguido por Basidiomycota y Mucoromycota, suponiendo los 3 el 99,6% de las lecturas. Las especies con mayor representación son *Rhizoderma veluwensis* Verkley & J.D. Zijlstra (14,7%), seguida de *Lachnum pygmaeum* (Fr.) Bres. (5,1%) y de *Rhizoscyphus monotropae* (Kernan & Finocchio) W.Y. Zhuang (4,3%); siendo, a su vez, los géneros de estas especies, los principales. En cuanto a las familias, las tres más comunes son Nectriaceae Tul. & C. Tul. (15,8%), Dermateaceae Fr. (14,9%) e Hyaloscyphaceae Nannf. (12,2%). En el caso de los órdenes, aquellos en los cuales se encuentran presentes las familias más representativas son a la vez los más comunes, éstos son Helotiales (49,8%) e Hypocreales Lindau. (16,1%), completando el grupo, Russulales (7,3%). Como cabría esperar, las clases donde se engloban estos órdenes son, a su vez, las más representativas siendo éstas Leotiomycetes O.E. Erikss. & Winka (51%), Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka (19,6%) y Agaricomycetes Doweld (12,7%).

En el Anexo 5 se indica el número de lecturas en cada una de las parcelas de estudio y los gráficos de distribución de las lecturas de los principales filos.

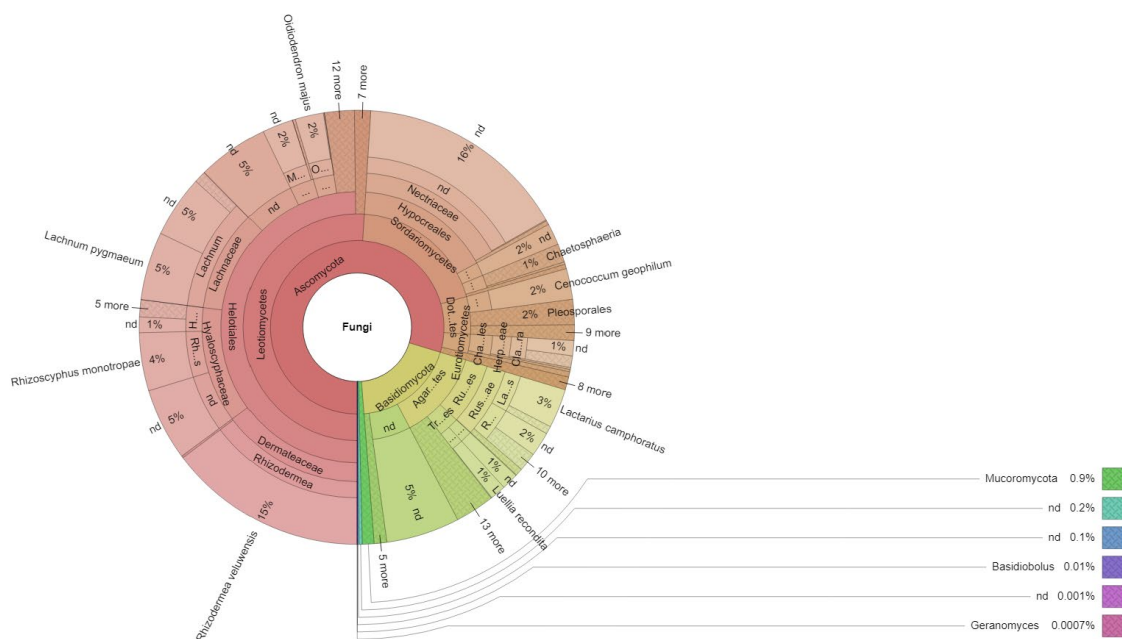


Figura 4.27: Distribución de las lecturas efectuadas durante la asignación taxonómica en el conjunto de las parcelas analizadas.

PN Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias (PN Fuentes): Monasterio de Hermo.

En los análisis de DNA pertenecientes a los ejemplares seleccionados en la parcela se han obtenido un total de 465 ASV diferentes de los cuales, 289 pertenecen al filo Ascomycota, 118 a Basidiomycota, 23 a Mucoromycota, 12 a Cryptomycota, 1 a Glomeromycota y 22 se quedaron asignados a nivel de reino. La distribución de éstos ASV se encuentra reflejada en Tabla 4.7

Tabla 4.7: Distribución de los ASVs en los árboles analizados en el PN Fuentes y en la parcela.

	Dominante	Codominante	Intermedio	Sumergido	Parcela
Ascomycota	113	121	145	103	289
Basidiomycota	18	38	54	41	118
Cryptomycota	-	2	11	1	12
Glomeromycota	-	-	1	-	1
Mucoromycota	8	9	11	11	23
Sin Asignar (Reino)	5	6	11	6	22
Total	144	176	233	162	465

Se han identificado un total de total de 137 especies, 129 géneros, 85 familias, 49 órdenes, 15 clases y 5 filios en la población del PN de Fuentes, donde, como se puede apreciar en la Figura 4.28, los filios Ascomycota (89,3%), Basidiomycota (9,8%) y Mucoromycota (0,3%), por este orden, son los más representativos aglutinando el 99,5% de las lecturas. Globalmente, las especies dominantes son las mismas que las indicadas en el apartado anterior, pero en distinto orden, siendo la primera *L. pygmeum* (12,3%), seguida de *R. monotropae* (10,3%) y *R. veluwensis* (10%). *Lachnum* Retz.(23,1%), *Rhizoscyphus* W.Y. Zhuang & Korf (10,3%) y *Rhizodermea* Verkley & J.D. Zijlstra (10%) son los principales géneros. Lachnaceae Raitv. (23,2%), Hyaloscyphaceae (20%)



y Nectriaceae (15,6%) serían las familias con mayor representación. Claramente, el orden Helotiales (64,7%) es el dominante, seguido de Hypocreales (15,8%) y Chaetothyriales M.E. Barr (2,8%). Las clases donde se ubican estos órdenes, Leotiomycetes (64,7%), Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka (17,1%) y Agaricomycetes (7,5%) son a su vez las más comunes.

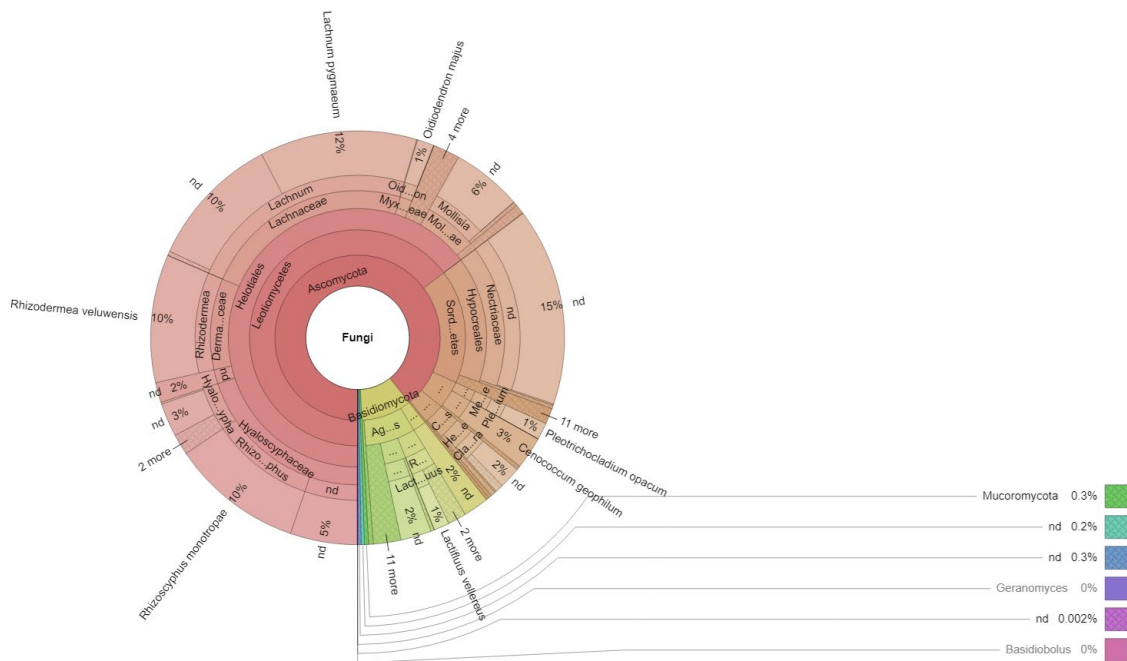


Figura 4.28: Distribución de las lecturas efectuadas durante la asignación taxonómica en la parcela del PN Fuentes.

En la Tabla 4.8 se indican los niveles taxonómicos principales de cada uno de los árboles que se analizaron en la parcela y, como se puede observar, existen algunas diferencias entre estos. Por ejemplo, a nivel de filo en el árbol intermedio aparece el Cryptomycota como componente terciario en lugar de Mucormycota, o en la clase, donde Sordariomycetes es la principal del árbol codominante en lugar de Leotiomycetes, que lo es en el resto. Ocurre lo mismo a nivel de orden, siendo Helotiales el principal salvo en el árbol codominante que es Hypocreales. En cuanto a las familias, aparece Nectriaceae en el árbol codominante y Gloniaceae E. Boehm, C.L. Schoch & Spatafora en el intermedio. *Oidiodendron* Robak. sp. e *Hyaloscypha* Boud. sp., solo están presentes (entre los componentes principales) en el codominante e intermedio respectivamente. En cuanto a las especies, en el árbol dominante aparecen *Lactifluus vellereus* (Fr.) Kuntze e *Hyaloscypha hepaticicola* (Grelet & Croz.) Baral, Huhtinen & J.R. De Sloover, *Oidiodendron majus* G.L. Barron en el codominante y *C. geophilum* en el intermedio.

Tabla 4.8. Componentes principales de cada uno de los niveles taxonómicos en los ejemplares analizados en el PN Fuentes (parcela de Monasterio de Hermo). Los valores entre paréntesis indican el porcentaje con respecto al total de las lecturas del árbol. Comp.: Componente; Prin.: principal; Sec.: Secundario; Terc.: terciario.

Nivel	Comp.	Clase sociológica			
		Dominante	Codominante	Intermedio	Sumergido
Filo	Prin.	Ascomycota (89,9)	Ascomycota (96,7)	Ascomycota (81,6)	Ascomycota (89,3)
	Sec.	Basidiomycota (9,5)	Basidiomycota (3)	Basidiomycota (16,9)	Basidiomycota (10,1)
	Terc.	Mucoromycota (0,5)	Mucoromycota (0,2)	Cryptomycota (0,9)	Mucoromycota (0,3)
Clase	Prin.	Leotiomycetes (83)	Sordariomycetes (53)	Leotiomycetes (62,6)	Leotiomycetes (83,1)
	Sec.	Agaricomycetes (7)	Leotiomycetes (40,8)	Agaricomycetes (11,2)	Agaricomycetes (9,9)
	Terc.	Dothideomycetes (2,3)	Agaricomycetes (2,6)	Dothideomycetes (10,2)	Eurotiomycetes (3,4)
Orden	Prin.	Helotiales (83)	Hypocreales (52,5)	Helotiales (62,4)	Helotiales (83,1)
	Sec.	Russulales (4,7)	Helotiales (40,8)	Mytilinidiales (7,5)	Trechisporales (5,2)
	Terc.	Chaetothyriales (1,7)	Russulales (1,9)	Chaetothyriales (5)	Chaetothyriales (3,2)
Familia	Prin.	Lachnaceae (42,3)	Nectriaceae (52,3)	Hyaloscyphaceae (42,2)	Lachnaceae (36,9)
	Sec.	Dermateaceae (19,6)	Lachnaceae (21,8)	Dermateaceae (11,5)	Hyaloscyphaceae (19,2)
	Terc.	Mollisaceae (13,5)	Hyaloscyphaceae (10,2)	Gloniaceae (7,5)	Mollisaceae (14,4)
Género	Prin.	<i>Lachnum</i> (42,3)	<i>Lachnum</i> (21,7)	<i>Rhizoscyphus</i> (26,6)	<i>Lachnum</i> (36,9)
	Sec.	<i>Rhioodermea</i> (19,6)	<i>Rhioodermea</i> (4,6)	<i>Rhioodermea</i> (11,5)	<i>Mollisia</i> (12,7)
	Terc.	<i>Mollisia</i> (13,5)	<i>Oidiodendron</i> (2,8)	<i>Hyaloscypha</i> (7,8)	<i>Rhizoscyphus</i> (11,2)
Especie	Prin.	<i>R. veluwensis</i> (19,6)	<i>L. pygmaeum</i> (21,4)	<i>R. monotropae</i> (26,6)	<i>L. pygmaeum</i> (31,5)
	Sec.	<i>L. vellereus</i> (4,7)	<i>R. veluwensis</i> (4,6)	<i>R. veluwensis</i> (11,7)	<i>R. monotropae</i> (11,2)
	Terc.	<i>H. hepaticicola</i> (1,8)	<i>O. majus</i> (2,7)	<i>C. geophilum</i> (7,5)	<i>R. veluwensis</i> (4,3)

#### PN de Redes: Río del Alba

En los análisis de DNA pertenecientes a los ejemplares seleccionados en la parcela del PN de Redes se han obtenido un total de 366 ASV diferentes de los cuales, 249 pertenecen al filo Ascomycota, 74 a Basidiomycota, 2 a Mucoromycota, 3 a Cryptomycota, y 13 se quedaron asignados a nivel de reino, cuya distribución se indica en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Distribución de los ASVs en los árboles analizados en el PN de Redes y en la población.

	Dominante	Codominante	Intermedio	Sumergido	Parcela
Ascomycota	111	128	194	25	249
Basidiomycota	29	36	29	8	74
Cryptomycota	2	3	1	--	3
Mucoromycota	18	10	8	12	27
Sin Asignar (Reino)	5	5	7	--	13
Total	165	182	149	45	366

En la población del PN de Redes se ha determinado la presencia, de un total de 122 especies, 119 géneros, 75 familias, 45 órdenes, 15 clases y 4 filos. En la Figura 4.29, donde se visualiza la asignación taxonómica de las lecturas correspondientes a la parcela, se observa como las especies con mayor representación son *R. veluwensis* (7,2%), seguida de *Phacidium mollerianum* (Thüm.) Crous (3,6%) y de *Chaetosphaeria vermicularioides* (Sacc. & Roum.) W. Gams & Hol.-Jech. (3,4%). Cabría esperar que los géneros de estas especies fuesen los tres principales, sin embargo, éstos son *Rhizoderma* (7,2%), *Lachnum* (4,4%) y *Chaetosphaeria* Tul. & C. Tul. (4,02%). En cuanto a las familias, las tres más comunes son Nectriaceae (17,3%), Hyaloscyphaceae (10,5%) y Dermateaceae Fr. (7,5%). En el caso de los órdenes, aquellos en los cuales se encuentran presentes las familias más representativas son a la vez los más comunes, éstos son Helotiales (33,1%) e Hypocreales (17,8%), completando el grupo, Russulales (4,5%). Las clases donde se engloban estos órdenes son, a su vez, las más representativas siendo éstas Leotiomycetes (37%), Sordariomycetes (29,1%) y Agaricomycetes (5,1%). El filo Ascomycota, con 73,2% de las lecturas es el principal, seguido de Basidiomycota, con el 24,4% y Mucoromycota, con el 2,3%.

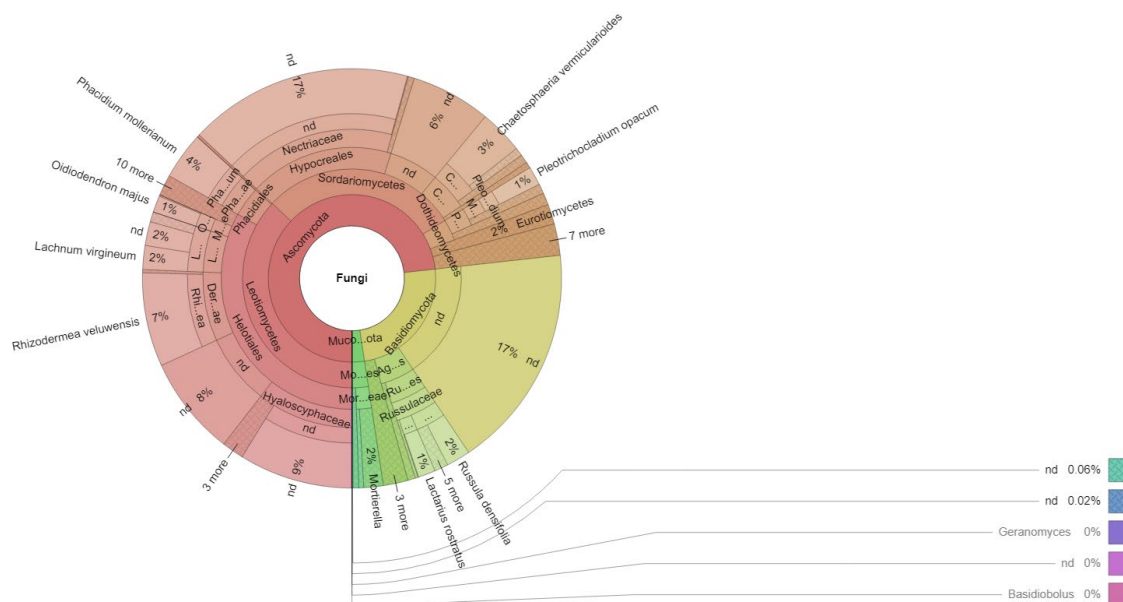


Figura 4.29: Distribución de las lecturas efectuadas durante la asignación taxonómica en la parcela del PN Redes.

Al igual que en el caso anterior, se ha realizado un resumen de los componentes principales de cada uno de los niveles taxonómicos en los árboles analizados, recogido

en la Tabla 4.10. En cuanto a nivel de filo y clase, los componentes son similares variando su posición, es decir, su porcentaje. Cabe mencionar la aparición de la clase Dothideomycetes O.E. Erikss. & Winka solo (entre los componentes principales) del árbol dominante. A nivel de orden, solo Helotiales está presente en los 4 árboles analizados siendo el resto de los componentes diverso similar a lo que ocurre en el resto de los niveles donde existe bastante diversidad entre los distintos árboles. Cabe mencionar que, a nivel de especie, solo *R. veluwensis* está entre los componentes principales de los pies seleccionados.

Tabla 4.10: Componentes principales de cada uno de los niveles taxonómicos en los ejemplares analizados en el PN Redes (parcela de Río del Alba). Los valores entre paréntesis indican el porcentaje con respecto al total de las lecturas del árbol. Comp.: Componente; Prin.: principal; Sec.: Secundario; Terc.: terciario.

Nivel	Comp.	Clase sociológica			
		Dominante	Codominante	Intermedio	Sumergido
Filo	Prin.	Ascomycota (72,4)	Ascomycota (57,8)	Ascomycota (59,4)	Ascomycota (94)
	Sec.	Basidiomycota (20,3)	Basidiomycota (40,7)	Basidiomycota (38)	Basidiomycota (5,5)
	Terc.	Mucoromycota (7,1)	Mucoromycota (1,5)	Mucoromycota (2,6)	Mucoromycota (0,4)
Clase	Prin.	Leotiomycetes (29,3)	Leotiomycetes (39,4)	Leotiomycetes (54,9)	Sordariomycetes (56,9)
	Sec.	Sordariomycetes (23,7)	Sordariomycetes (12,1)	Agaricomycetes (17,5)	Leotiomycetes (35,1)
	Terc.	Dothideomycetes (10,1)	Agaricomycetes (5,6)	Sordariomycetes (4,3)	Agaricomycetes (4,3)
Orden	Prin.	Helotiales (29,1)	Helotiales (39,1)	Helotiales (53)	Hypocreales (51)
	Sec.	Plesosporales (9,7)	Chaetosphaeriales (11,2)	Russulales (17,4)	Helotiales (24,4)
	Terc.	Mortierellales (7,1)	Russulales (5,3)	Mortierellales (2,6)	Phacidiales (10,7)
Familia	Prin.	Lachnaceae (12,3)	Hyaloscyphaceae (21,2)	Dermateaceae (20,9)	Nectriaceae (50,6)
	Sec.	Dermateaceae (8,5)	Chaetosphaeriaceae (9,5)	Russulaceae (17,4)	Phacidaceae (10,7)
	Terc.	Melanommataceae (6,4)	Russulaceae (5,3)	Mortierellaceae (2,6)	Dermateaceae (9,2)
Género	Prin.	<i>Lachnum</i> (42,8)	<i>Chaetosphaeria</i> (9,5)	<i>Rhizoderma</i> (20,9)	<i>Phacidium</i> (10,6)
	Sec.	<i>Rhizoderma</i> (7,2)	<i>Russula</i> (5,2)	<i>Lactarius</i> (17,4)	<i>Rhizoderma</i> (9,2)
	Terc.	<i>Pleotrichocladium</i> (6,3)	<i>Rhizoderma</i> (2,8)	<i>Mortierella</i> (2,6)	<i>Lachnum</i> (5,7)
Especie	Prin.	<i>R. veluwensis</i> (7,2)	<i>Chaetosphaeria vermicularioides</i> (8,2)	<i>R. veluwensis</i> (20,9)	<i>Phacidium mollierianum</i> (10,7)
	Sec.	<i>Pleotrichocladium opacum</i> (6,4)	<i>R. densifolia</i> (4,9)	<i>Lactarius rostratus</i> (17,4)	<i>R. veluwensis</i> (9,2)
	Terc.	<i>L. virgineum</i> (4,1)	<i>R. veluwensis</i> (2,8)	<i>Leotia atrovirens</i> (1,8)	<i>L. virgineum</i> (3)

ZEC Ancares: Cabana Vella

En los análisis de DNA pertenecientes a los ejemplares seleccionados en la parcela de la ZEC Ancares se han obtenido un total de 523 ASV diferentes de los cuales, 338 pertenecen al filo Ascomycota, 149 a Basidiomycota, 15 a Mucoromycota, 2 a Zygomycota 1 a Chytridiomycota, 1 a Cryptomycota, y 17 se quedaron asignados a nivel de reino. La distribución de éstos se indica en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11: Distribución de los ASVs en los árboles analizados en la ZEC Ancares y en la población

	<b>Dominante</b>	<b>Codominante</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sumergido</b>	<b>Población</b>
Ascomycota	124	125	158	111	338
Basidiomycota	50	46	75	32	149
Chytridiomycota	-	-	1	-	1
Cryptomycota	-	-	1	-	1
Mucoromycota	4	2	11	6	15
Zygomycota	-	2	11	-	2
Sin Asignar (Reino)	5	8	0	3	17
Total	183	183	257	152	523

En el conjunto de los sistemas radicales analizados se identificaron 165 especies, 152 géneros, 103 familias, 52 órdenes, 16 clases y 6 filos, siendo el 99,5% de las lecturas correspondientes a los filos Ascomycota (73,3%), Basidiomycota (25,8%) y Mucoromycota (0,4%). Globalmente, tal y como refleja la Figura 4.30, las especies principales son *R. veluwensis* (25,6%), *Lactarius camphoratus* (Bull.) Fr. (8,3%) y *O. majus* (3,5%); siendo, los principales, géneros *Rhizodermea* (25,6%), *Lactarius* (8,5%) y *Russula* (6%). Dermateaceae (25,8%), Nectriaceae (15%) y Russulaceae (14,5%) serían las familias con mayor representación. Claramente, el orden Helotiales (44,9%) es el dominante, seguido de Hypocreales (15,3%) y Russulales (14,6%). Las clases donde se ubican estos órdenes, Leotiomycetes (45,6%), Agaricomycetes (24,1%) y Sordariomycetes (15,6%), son a su vez las más comunes

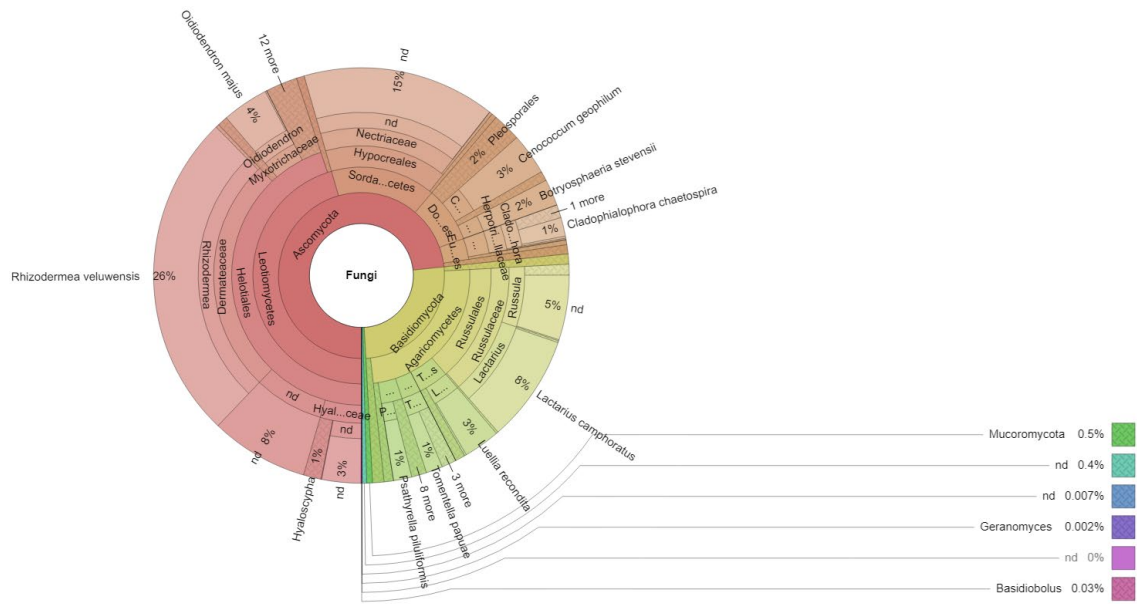


Figura 4.30: Distribución de las lecturas efectuadas durante la asignación taxonómica en la parcela de la ZEC Ancares.

Según lo indicado en la Tabla 4.12 existe una cierta homogeneidad, en cuanto a los componentes principales, a nivel de filo y clase en los pies seleccionados de Cabana Vella, destacando la presencia de Zygomycota en árbol codominante. Helotiales y Russulales son los principales órdenes del conjunto siendo, Russulaceae la única familia que se encuentra presente, entre las principales, en todos los sistemas radicales analizados. Se podría indicar que, salvo en el sumergido que es *L. camphoratus*, *R. veluwensis* es la especie principal en todos los árboles analizados siendo sus acompañantes variados.

Tabla 4.12: Componentes principales de cada uno de los niveles taxonómicos en los ejemplares analizados en el PN Redes (parcela de Río del Alba). Los valores entre paréntesis indican el porcentaje con respecto al total de las lecturas del árbol. Comp.: Componente; Prin.: principal; Sec.: Secundario; Terc.: terciario.

Nivel	Comp.	Clase sociológica			
		Dominante	Codominante	Intermedio	Sumergido
Filo	Prin.	Ascomycota (67,5)	Ascomycota (81)	Ascomycota (77,3)	Ascomycota (67,7)
	Sec.	Basidiomycota (33,6)	Basidiomycota (18,2)	Basidiomycota (21,2)	Basidiomycota (37,7)
	Terc.	Mucoromycota (0,4)	Zygomycota (0,6)	Mucoromycota (1)	Mucoromycota (0,5)
Clase	Prin.	Leotiomycetes (48,4)	Leotiomycetes (37,3)	Leotiomycetes (59,9)	Leotiomycetes (36,2)
	Sec.	Agaricomycetes (31,5)	Sordariomycetes (33,3)	Agaricomycetes (20,2)	Agaricomycetes (31,5)
	Terc.	Dothideomycetes (13,3)	Agaricomycetes (15,5)	Dothideomycetes (6,8)	Sordariomycetes (25)
Orden	Prin.	Helotiales (48,3)	Helotiales (35,8)	Helotiales (59,7)	Helotiales (35,8)
	Sec.	Russulales (13,5)	Hypocreales (33,1)	Russulales (15,2)	Russulales (27,6)
	Terc.	Botryosphaeriales (7,2)	Trechisporales (7,2)	Chaetothyriales (6,3)	Hypocreales (24,6)
Familia	Prin.	Russulaceae (13,5)	Nectriaceae (33)	Dermateaceae (39,8)	Russulaceae (27,6)
	Sec.	Dermateaceae (8,5)	Russulaceae (7)	Russulaceae (14,7)	Nectriaceae (25,4)
	Terc.	Botryosphaeriaceae (7,2)	Hydnodontaceae (6,9)	Myxotrichaceae (2,6)	Hyaloscyphaceae (13,4)
Género	Prin.	<i>Rhizodermea</i> (30)	<i>Rhizodermea</i> (22,7)	<i>Rhizodermea</i> (8,6)	<i>Lactarius</i> (26,4)
	Sec.	<i>Botryosphaeria</i> (7,2)	<i>Luellia</i> (6,9)	<i>Russula</i> (10,7)	<i>Rhizodermea</i> (5)
	Terc.	<i>Lactarius</i> (7)	<i>Russula</i> (5,2)	<i>Oidiodendron</i> (8,6)	<i>Hyaloscypha</i> (3,9)
Especie	Prin.	<i>R. veluwensis</i> (30,1)	<i>R. veluwensis</i> (22,7)	<i>R. veluwensis</i> (39,8)	<i>L. camphoratus</i> (26,4)
	Sec.	<i>Botryosphaeria stevensii</i> (7,2)	<i>Luellia recondita</i> (6,9)	<i>O. majus</i> (8,5)	<i>R. veluwensis</i> (5)
	Terc.	<i>L. camphoratus</i> (7)	<i>Phoma herbarum</i> (2,5)	<i>C. geophilum</i> (4,8)	<i>O. majus</i> (3,6)



Resumen de la asignación taxonómica.

En el conjunto de las parcelas analizadas se identificó la presencia, en menor o mayor grado, de un total de 298 especies, 249 géneros, 141 familias, 69 órdenes, 20 clases pertenecientes a 7 filos siendo, la parcela que presenta unos mayores valores en cada uno de los niveles taxonómicos, Cabana Vella (ZEC Ancares) y, la menor, Río del Alba (PN Redes) (Figura 4.31).

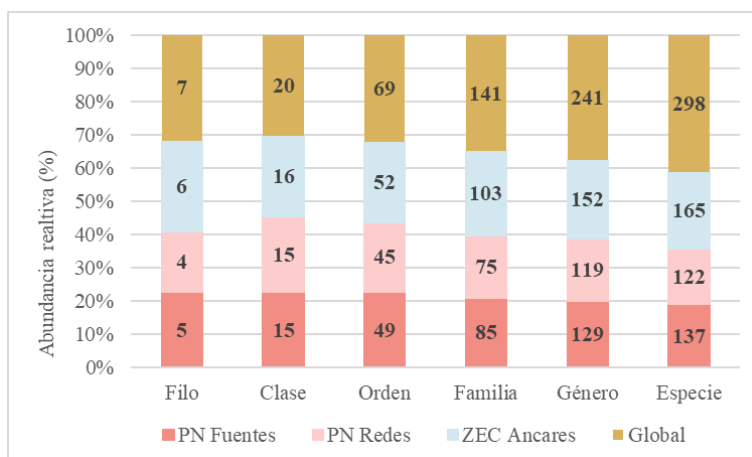


Figura 4.31: Resumen de la asignación taxonómica.

En la Tabla 13 se muestra un resumen de la asignación taxonómica en función a los ejemplares analizados, indicándose entre paréntesis los valores únicos para ese taxon que solo aparecen en el pie estudiado siendo, en el caso de Cabana Vella y Monasterio de Hermo, los árboles sociológicamente clasificados como intermedios los que poseen un mayor número de taxones propios y, en Río del Alba, el codominante.

Tabla 13: Resumen de la asignación taxonómica de los ejemplares analizados en las parcelas seleccionadas (el valor entre paréntesis indica los valores únicos de esa categoría para esa especie en esa localización). Cód. Árbol: código identificativo del árbol para los análisis.

Localización	Cód. Árbol	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Cabana Vella (ZEC Ancares)	A1	3 (0)	11 (0)	28 (5)	50 (9)	54 (14)	56 (19)
	A2	4 (1)	12 (1)	30 (3)	54 (12)	73 (25)	64 (25)
	A3	5 (2)	12 (2)	40 (12)	66 (19)	84 (32)	92 (43)
	A4	3 (0)	11 (2)	28 (3)	50 (10)	63 (18)	56 (21)
Mon. Hermo (PN Fuentes)	F1	3 (0)	9 (0)	28 (3)	38 (5)	51 (7)	46 (12)
	F2	4 (0)	10 (0)	27 (2)	40 (7)	55 (14)	55 (18)
	F3	5 (1)	13 (1)	36 (7)	59 (19)	76 (24)	78 (33)
	F4	4 (0)	13 (1)	33 (2)	44 (7)	68 (21)	61 (20)
Río del Alba (PN Redes)	R1	4 (0)	12 (0)	32 (3)	46 (7)	64 (19)	63 (26)
	R2	3 (0)	14 (2)	34 (6)	49 (11)	63 (24)	64 (31)
	R3	3 (0)	9 (0)	16 (0)	20 (2)	22 (3)	20 (5)
	R4	4 (0)	11 (0)	31 (3)	49 (11)	64 (21)	48 (16)

### 4.3.3.2. Análisis de diversidad.

A nivel poblacional, se puede observar como el Índice de Shannon alcanza su punto máximo a nivel de familia en las 3 zonas analizadas, disminuyendo para género y especie (Figura 4.32a). Salvo a nivel de filo, en las poblaciones los valores son normales, encontrándose entre 1,5 y 3,5, excepto en clase y orden en ZEC Ancares donde se encuentran por debajo de este rango (Figura 4.32a).

En términos generales, el Índice de Pielou, con la excepción del nivel de filo, fluctúa entre 0,4 y 0,6. Esta oscilación sugiere una dominancia relativa de ciertas especies o grupos de especies sobre otros. Es más, existe una probabilidad considerable de que algunas especies o grupos sean más abundantes que otros. Esta probabilidad se incrementa a medida que el valor del índice disminuye (Figura 4.32b).

Según los datos del Índice de Simpson, se observa que las poblaciones del Parque Natural de Fuentes y Redes exhiben una alta diversidad, con valores superiores a 0,7. Sin embargo, a nivel de filo, la diversidad es sólo moderada. En la Zona Especial de Conservación (ZEC) Ancares, la diversidad también es alta en general, pero se vuelve moderada para los niveles de filo y clase (Figura 4.32c). Esto sugiere una variedad significativa de especies en estas áreas, aunque con algunas limitaciones a nivel de filo y clase

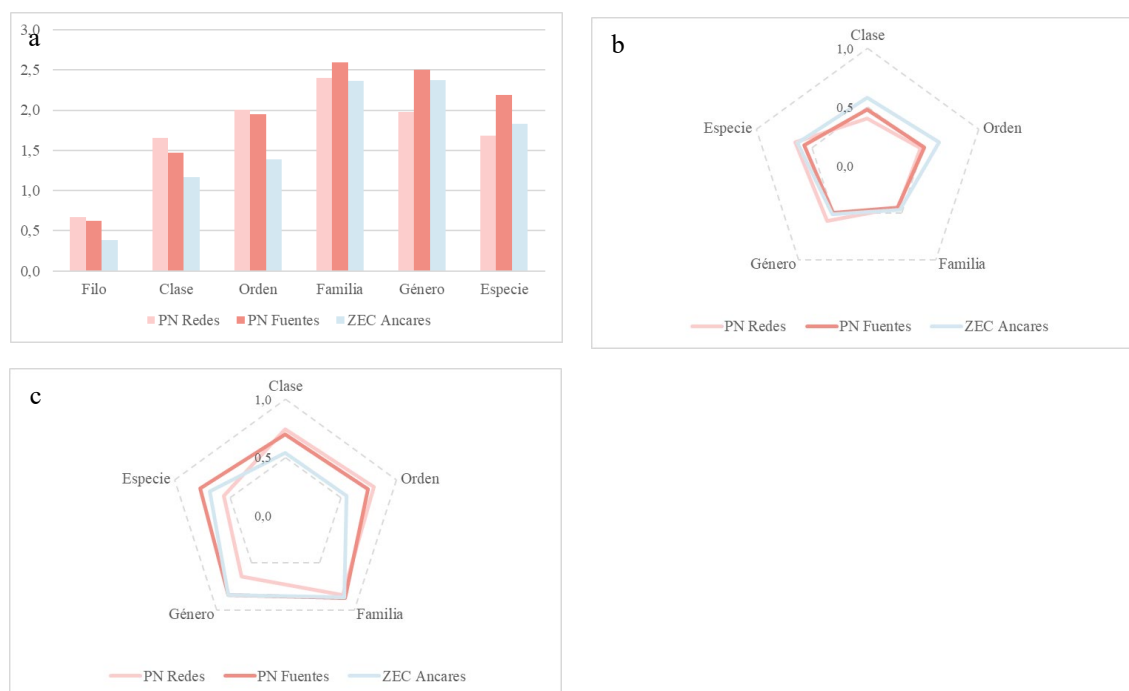


Figura 4.32: Diversidad alfa en la población. a) Índice de Shannon; b) Índice de Pielou; c) Índice de Simpson

Teniendo en cuenta los valores de los 3 índices, en términos generales, se podría indicar que la población del PN de Fuentes presenta unos valores de diversidad moderada-alta, donde no existe dominancia de unas pocas especies o grupos existiendo una cierta equitatividad en la distribución de sus miembros. El PN Redes presenta unos valores de

diversidad similares al caso anterior y, donde sus miembros se encuentran bien distribuidos, aunque puede existir un cierto de dominancia. La ZEC Ancares, aunque presenta unos valores de diversidad ligeramente inferiores a nivel de clase y orden, sigue el patón establecido en el resto de las poblaciones analizadas.

A continuación, se realizará un breve análisis de cómo es esta diversidad teniendo en cuenta los árboles seleccionados para hacer el estudio de la diversidad fúngica.

PN Fuentes del Narcea, Degaña e Ibias: Monasterio de Hermo.

Teniendo en cuenta los valores de los 3 índices se podría indicar que, en el conjunto de los árboles analizados, a nivel de familia, género y especie, los valores de diversidad son normales (Figura 4.33a) donde las especies o grupos de especies se encuentran distribuidos de forma, más o menos, equitativa (Figura 4.33b) y la probabilidad de seleccionar de forma consecutiva, al azar, dos veces el mismo ejemplar es baja (Figura 4.33c). En el resto de los niveles la diversidad disminuye ligeramente manteniéndose similar la equitatividad y distribución. En cuanto a los ejemplares, dependiendo del nivel taxonómico y del índice de estudio los valores varían de unos ejemplares a otros, siendo, el árbol intermedio, el que tiene una mayor diversidad en todos los niveles analizados (Figura 4.33a), presentando una población (fúngica) bien distribuida (Figura 4.33c) donde no existe dominancia (Figura 4.33b).

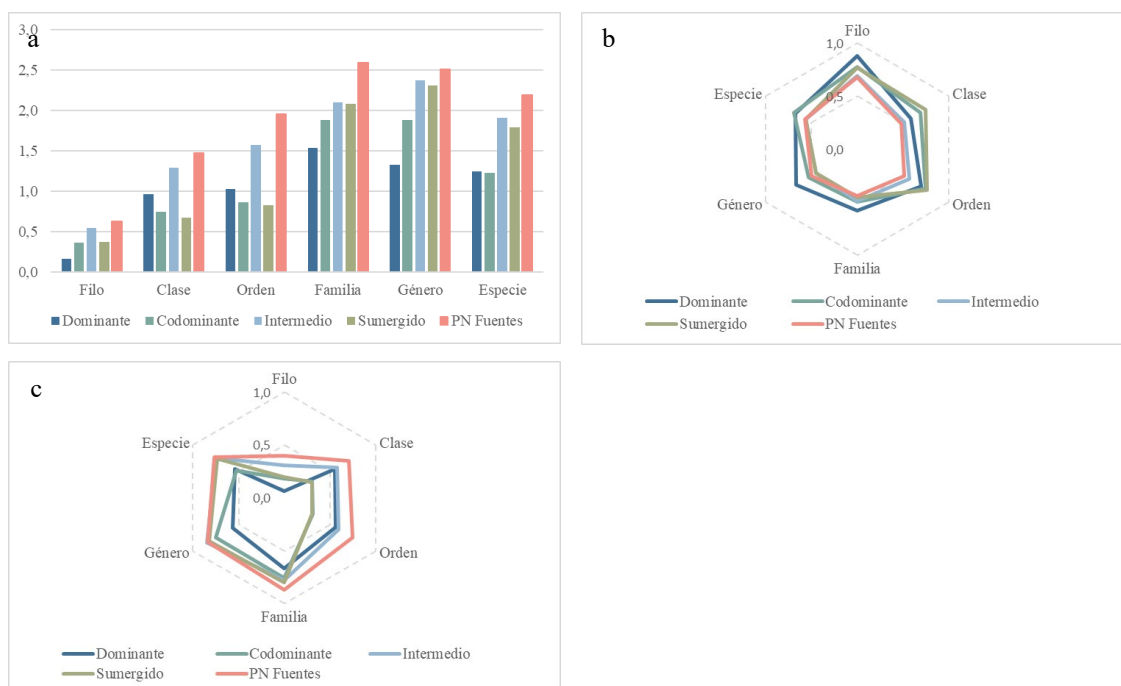


Figura 4.33. Diversidad alfa en Monasterio de Hermo: a) Índice de Shannon; b) Índice de Pielou; c) Índice de Simpson

PN Redes: Río del Alba.

En la parcela de Río del Alba en el conjunto de los pies, salvo a nivel de filo, que es menor de 1, en el resto de los niveles taxonómicos la diversidad oscila entre 1,1 y 2,2 siendo esta moderada-baja (Figura 4.34a), donde las especies o grupos de especies se encuentran bien distribuidos (Figura 4.34c) pero existiendo un cierto grado de dominancia (Figura 4.34b). El árbol dominante es el que presenta una mayor diversidad en su comunidad fúngica en todos los niveles taxonómicos, estando ésta bien distribuida, con una cierta prevalencia de unas especies o grupos frente a otros (Figura 4.34). Al contrario que en el caso anterior, en la parcela de Río del Alba es el árbol intermedio el que presenta unos valores de diversidad menores (Figura 4.34).

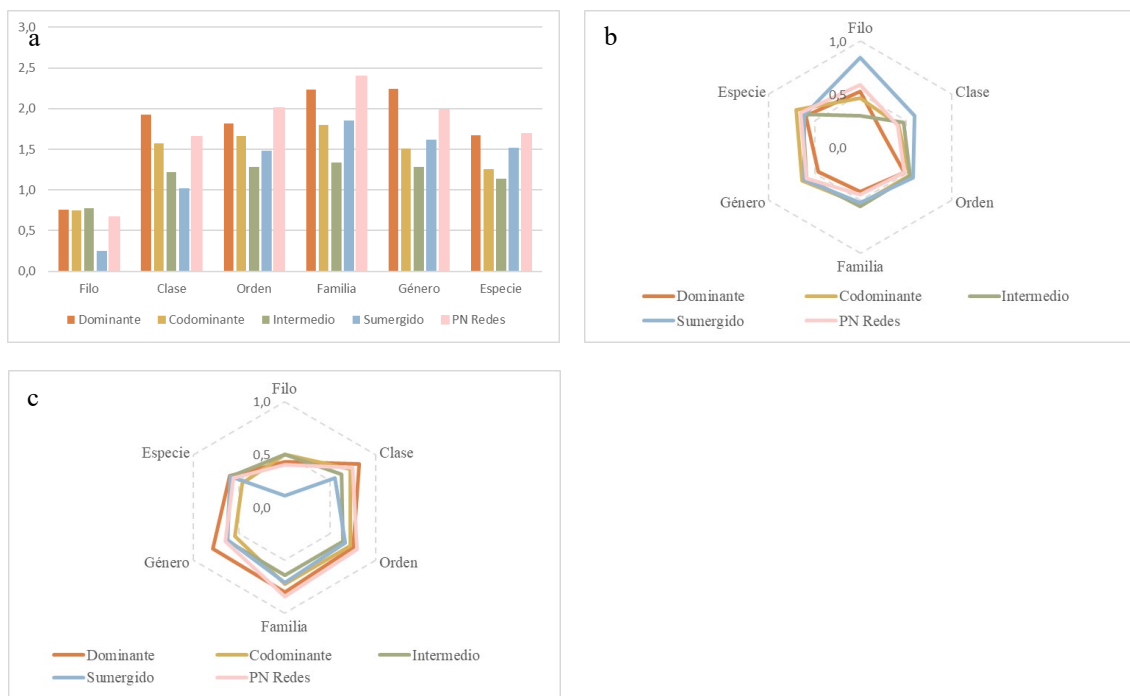


Figura 4.34: Diversidad alfa en Río del Alba: a) Índice de Shannon; b) Índice de Pielou; c) Índice de Simpson.

ZEC Ancares: Cabana Vella.

Según los resultados mostrados en la Figura 4.35 se podría indicar que, en el conjunto de los árboles analizados, a nivel de familia, género y especie, los valores de diversidad son normales (Figura 4.35a) donde las especies o grupos de especies se encuentran bien distribuidos (Figura 4.35c), pero con una cierta dominancia de unas especies o grupos de especies frente a otros (Figura 4.35b). En el resto de los niveles, la diversidad disminuye ligeramente manteniéndose similar la equitatividad y distribución, salvo para filo donde la distribución y equitatividad se comportan de forma inversa. En cuanto a los ejemplares no existen diferencias significativas entre ellos, siendo, el árbol dominante, el que tiene una mayor diversidad en todos los niveles analizados (Figura

4.35a), presentando una población bien distribuida (Figura 4.35c) donde existiría dominancia de unas especies o grupos frente a otros (Figura 4.35b).

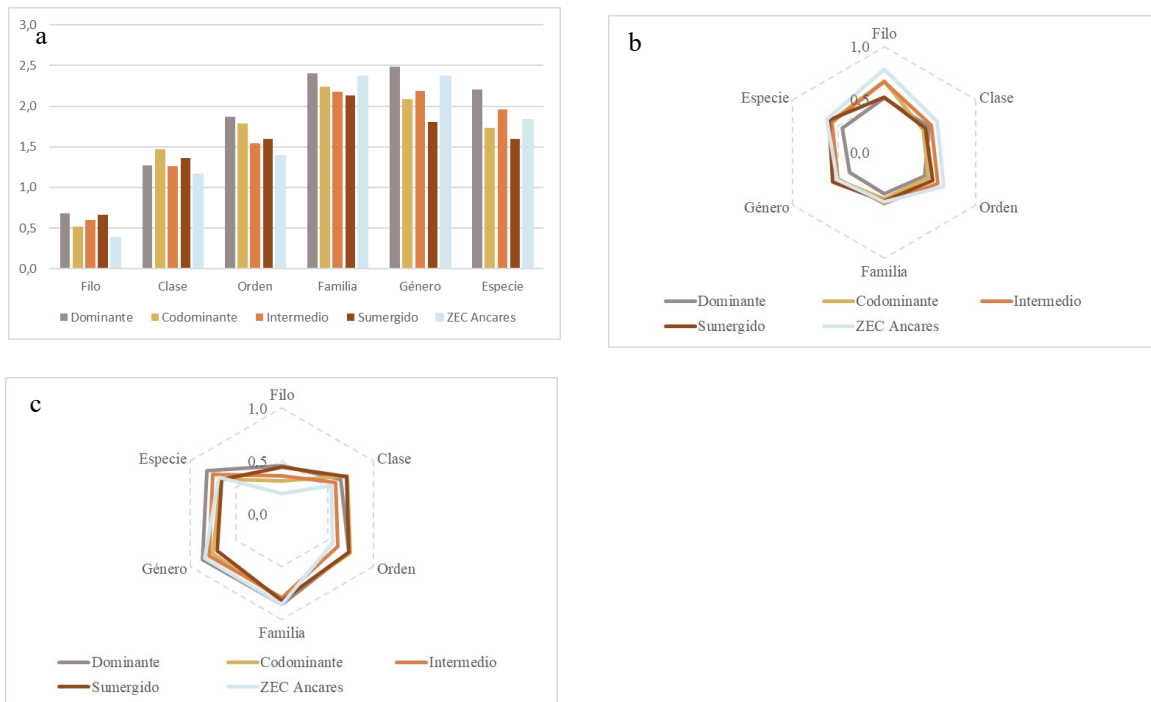


Figura 4.35. Diversidad alfa en Cabana Vella. a) Índice de Shannon; b) Índice de Pielou; c) Índice de Simpson.

#### 4.4. DISCUSIÓN.

El análisis de los sistemas radicales de las poblaciones de roble Atlántico seleccionadas han permitido conocer la diversidad del ecosistema fúngico asociado a los mismos, mostrando un complejo sistema de organismos que tienen como hábitat común la rizosfera de los ejemplares estudiados.

Se han muestreado aproximadamente 28,4 m de raíz, observándose 8076 EcM, entre las cuales se diferenciaron 11 morfotipos atendiendo a sus caracteres macroscópicos. Estos resultados en número de morfotipos son inferiores a los obtenidos por Milović et al. (2023) que identificaron 26 morfotipos en masas de *Q. petraea* en Serbia, sin embargo, se debe tener en cuenta que la diversidad de EcM depende tanto de factores bióticos como de abióticos (Rinaldi et al., 2008), estando las comunidades fúngicas del suelo intensamente influenciadas por diversos factores entre ellos, clima, parámetros edáficos, vegetación o biogeografía, entre otros (Wang et al., 2023).

Los estudios llevados a cabo en la determinación de los organismos responsables de las asociaciones EcM reflejan una coexistencia, en la misma punta, de diversas especies de hongos. Generalmente, el hongo EcM principal, aquel responsable de la formación del manto y la Red de Hartig, pertenece al filo Basidiomycota salvo, en el caso del morfotipo 1 cuyo responsable es *C. geophilum*, y está acompañado de un grupo, más

o menos numeroso, de hongos pertenecientes, principalmente, al filo Ascomycota. En algunas ocasiones también del Cryptomycota y Mucoromycota.

*Cenococcum* Moug. & Fr., *Cortinarius* (Pers.) Gray, *Inocybe* (Fr.) Fr., *Lactarius*, *Melanogaster* Corda., *Russula* y *Tomentella* Pers. ex Pat. son los principales géneros de hongos formadores de EcM en los morfotipos analizados. Como acompañantes se suelen encontrar otros hongos EcM en menor proporción como, por ejemplo, *Amanita* Pers. sp., *Elaphomyces* T. Ness. sp., *Genea* Vittad. sp. o *Pachyphlodes* Zobel sp. Junto con estos géneros, en una misma punta, se encuentran organismos pertenecientes al orden Helotiales, tales como *O. majus* o *R. veluwensis*, o al *Chaetothyriales*, como *Cladophialophora chaetospira* (Grove) Crous & Arzanlou. Los resultados obtenidos son coincidentes con los reflejados en Tedersoo et al. (2009) o Pellitier & Zak (2021), que reflejan dicha coexistencia, donde en un mismo sistema micorrícico se encuentra el hongo EcM junto con un cortejo de otros organismos fúngicos entre los que se encuentran otros hongos EcM, endófitos, saprófitos o patógenos. En Pellitier & Zak (2021) se indica que “la coexistencia de múltiples especies fúngicas dentro de una misma punta de raíz pone de manifiesto la complejidad de las interacciones subterráneas en los ecosistemas y la importancia de comprender la dinámica de estas comunidades fúngicas para la salud de las plantas y el funcionamiento de los ecosistemas”.

Los resultados del estudio de la diversidad fúngica de los sistemas radicales efectuados a través del análisis del material genético obtenido de segmentos de raíz muestran una amplia diversidad de organismos que habitan dentro o sobre la superficie de raíz, entre los que se encuentran hongos EcM, endófitos, parásitos, saprófitos o levaduras. Identificándose un total de 298 especies, valor superior al de Halmschlagler & Kowalski (2004) en masas de *Q. robur* y *Q. petraea* (126 especies), Kwaśna & Szewczyk (2016) en *Q. robur* (41 especies) o Jankowiak et al. (2022) también en *Q. robur* (111 especies).

En cuanto a las parcelas analizadas, la localizada en el PN de Redes es la que presenta unos menores valores en cada nivel taxonómico (Figura 4.30) y también se detectó una menor variabilidad de morfotipos (Tabla 4.4). Esta parcela presenta dos signos diferenciales: la ausencia de producción de fruto en el periodo otoñal previo a la recolección de las muestras (Marzo) y el haber sufrido un incendio. Corcobado et al. (2014) es su estudio sobre *Q. ilex* L. encontraron que una mayor abundancia de EcM en árboles sanos que en afectados por un patógeno, de la misma manera Bzdyk et al. (2019) observaron un bajo grado de colonización de EcM en masas *Q. robur* con patologías, mostrando, estos dos estudios, que existiría una relación entre el estado sanitario de la masa y el grado de colonización. Dove & Hart (2017) en su metaanálisis del efecto del fuego en los hongos (comunidades fúngicas saprofíticas y micorrícicas) concluyen que el fuego reduce la riqueza de especies y la colonización micorrícica *in situ*. Estos resultados coinciden con los de Pérez-Izquierdo et al. (2020) donde, los autores observaron una menor abundancia de especies fúngicas en zonas quemadas. En ambas circunstancias, la existencia de alguna patología en la masa aún sin detectar y los efectos adversos del fuego pueden ser los motivos por los cuales esta parcela presenta una menor presencia de especies fúngicas.

El orden Helotiales (Ascomycota, Leotiomycetes) es, sin lugar a duda, el más representativo, siendo el dominante en el conjunto de las poblaciones estudiadas. Este orden es uno de los principales ordenes dentro del filo Ascomycota, en la actualidad cuenta con más de 8.400 especies reconocidas (Catalogue of life, 2024), entre ellas patógenos, saprófitos, endófitos, micorrícicos ericoides (ErM) y EcM (Vrålstad et al., 2002). Estos resultados son coincidentes con los de Halmschlager & Kowalski (2004), en masas de *Q. robur* y *Q. petraea*, y Toju et al. (2013), en ecosistemas dominados por *Quercus* spp., mientras que, Voříšková et al. (2014), en su estudio en suelos de masas de *Q. petraea*, encontraron a este orden el segundo en importancia tras Agaricales Underw. (Basidiomycota). Bruyant et al. (2024) indican que en este orden jugaría un papel fundamental en la nutrición de las plantas en ausencia de simbiosis vesículo arbuscular, lo que podría ocurrir en caso de los robles que no presenten asociaciones con hongos Glomeromycota.

*Rhizodermea veluwensis*, *Lachnum pygmaeum* y *Rhizoscyphus monotropae* son las especies más comunes, todos pertenecientes al orden Helotiales. En el conjunto de las poblaciones estudiadas, la especie principal es *R. veluwensis* comúnmente asociado a miembros de la familia Ericaceae (hongos ErM) (Verkley et al., 2010) sin embargo, se encuentra presente formando asociaciones otros grupos, entre ellos, las fagáceas (Nakamura et al., 2018). *L. pygmaeum* y *R. monotropae*, al igual que *R. veluwensis* se asocian a ericáceas (Fehrer et al., 2019, Lou et al., 2022) sin embargo, cada vez es más común encontrar hongos ErM en asociaciones con diversas especies que no pertenecen a la familia Ericaceae, entre ellas *Q. ilex* (Bernego et al., 2000).

*Lactarius*, *Russula* (ambos del filo Basidiomycota) y *Cenococcum* (Ascomycota) son los principales géneros EcM, es decir, aquellos que acumulan un mayor número de lecturas en el conjunto de las 3 poblaciones seleccionadas. Como se menciona en un párrafo superior, estos géneros son los hongos formadores principales de alguno de los morfotipos analizados. Estudios llevados a cabo en poblaciones de *Q. robur* y/o *petraea*, como Courty et al. (2008), Suz et al. (2014), Barsoum et al. (2021) o Milović et al. (2023), revelan un cortejo de hongos EcM similar al identificado en las parcelas de los espacios naturales de estudio.

Como no se han esterilizado las muestras antes de proceder a su análisis molecular no podemos discernir si la presencia de hongos saprófitos, como por ejemplo *Luellia recondita* (Basidiomycota), se encuentran en la parte exterior o bien en la interna de la raíz. Si bien hay algunos saprófitos que pueden asociarse simbióticamente con orquídeas (Martos et al., 2009), raramente ocurre con especies arbóreas (Smith et al., 2017). En este caso, no se podría establecer la función que desempeñan estos organismos en los sistemas analizados. Hibbet et al. (2000) indican que “*la evolución de los hongos EcM implica complejas interacciones entre hongos y plantas, con transiciones entre estilos de vida simbióticos y saprotróficos que dan forma a la diversidad y dinámica de estas asociaciones mutualistas en ecosistemas terrestres*”.

Mucoromycota es el tercer filo en importancia en el conjunto de las extracciones realizadas, siendo los géneros más representativos *Mortierella* Coem. y *Linnemannia* Vandepol & Bonito. Ambos géneros fueron identificados por Diez-Hermano et al. (2024) en su estudio en sistemas radicales de varias especies de *Quercus* sp. sanas y con alguna



patología, sin embargo, *Linnemannia* solo fue aislada en *Q. suber* con patologías. En nuestro estudio este género está representado en todas las localizaciones analizadas, sin embargo, es en la parcela del PN de Redes donde tiene un mayor peso (aproximadamente el 0,3% de las lecturas totales), parcela que, como se mencionó previamente, podría tener algún tipo de patología aún sin detectar y sufrió un incendio. Generalmente, los Mortierellales Caval.-Sm., donde pertenecen *Mortierella* y *Linnemannia*, son considerados saprófitos (Bonfante & Venice, 2020), sin embargo, hay varios estudios que demuestran como especies del género *Mortierella* aisladas como endófitos de diversas especies donde favorecen su crecimiento (Liao et al., 2019, Ozimek & Hanaka, 2020).

El resto de los filos, Cryptomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota y Zygomycota, también aparecen en nuestro estudio, aunque con menor peso que los descritos anteriormente. Los miembros del filo Cryptomycota habitualmente se aíslan en suelos (Tedersoo et al., 2017). Tanto Chytridiomycota como Glomeromycota y Zygomycota se aislaron formando parte de la rizosfera de especies de roble (He et al., 2016) por lo tanto, no sería inusual la presencia de estos filos en las zonas de estudio.

Algunos de los hongos EcM identificados, a efectos de este estudio, podríamos considerar que son generalistas ya que se identificaron en todos los ejemplares analizados, como es el caso de *C. geophilum* o *T. lilacinogrisea*, pudiendo, estos hongos, formar parte de una red micorrícica propia entre los distintos individuos de roble. Como se indicó en párrafos superiores, las principales especies de hongos identificadas se consideran ErM aislándose, cada vez más comúnmente, en otras especies que no forman parte de las ericáceas. En el caso de la parcela de Río del Alba, en el inventario florístico se detectaron ericáceas en la parcela de estudio (*Daboecia cantabrica* (Huds.) K. Koch y *Vaccinium myrtillus* L.) lo que podría ser un indicativo de la existencia de una CMN, entre estas especies y el roble, que interconectaría ambos grupos de especies mediante la cual se realizaría una transferencia azúcares y otros nutrientes. Serían necesarios más estudios para confirmar estos hechos.

#### 4.5. CONCLUSIONES.

Se ha realizado el análisis de la comunidad fúngica asociada a los sistemas radicales de *Q. petraea* pertenecientes a masas naturales que se localizan en varios espacios naturales protegidos a lo largo de la Cordillera Cantábrica. Dicho análisis consistió en determinar, por un lado, los organismos fúngicos de responsables de las EcM observadas y por otro, la diversidad global a partir de extracciones de ADN de varios segmentos de raíz. Este análisis es un elemento indispensable para conocer las complejas interacciones entre los distintos elementos que conforman el ecosistema del roble atlántico.

A continuación, se detallan las principales conclusiones obtenidas de este estudio:

- **Morfotipos:** Se han identificado 11 morfotipos diferentes, presentando, todos, un manto bien desarrollado, no observándose Red de Hartig en los cortes histológicos realizados en 2. En los análisis moleculares realizados con las muestras de estos 11 morfotipos se han obtenido 332 ASVs, de los cuales, 163 se asignaron al filo Ascomycota,

143 a Basidiomycota, 11 a Mucoromycota, 11 se quedaron asignados a nivel de reino y 4 a Cryptomycota. *Cenocccum*, *Cortinarius*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Melanogaster*, *Russula* y *Tomentella* son los principales géneros de hongos formadores de EcM en los morfotipos analizados y junto con el un diverso de hongos que reflejan coexistencia, donde en un mismo sistema micorrícico se encuentra el hongo EcM junto con un cortejo de otros organismos fúngicos entre los que se encuentran otros hongos EcM, endófitos, saprófitos o patógenos.

- **Diversidad taxonómica:** A través de las extracciones de ADN de los segmentos de raíz se obtuvieron 1.043 ASVs, de los cuales, 659 se asignaron al filo Ascomycota, 280 a Basidiomycota, 46 a Mucoromycota, 42 se quedaron asignados a nivel de reino, 12 a Cryptomycota, 2 a Zygomycota, 1 a Chytridiomycota y 1 a Glomeromycota. Como resultado de la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas se identificaron 298 especies, 249 géneros, 141 familias, 69 órdenes, 20 clases y 7 filos donde, los elementos con mayor número de lecturas es cada uno de los niveles son *R. veluwensis* (especie), *Rhizodermea* sp. (género), Nectriaceae (familia), Helotiales (orden), Leotiomycetes (clase), Ascomycota (filo).

- **Identificación de hongos ectomicorrícicos generalistas:** como *Cenocccum geophilum* y *Tomentella lilacinogrisea*, que se encontraron en todos los ejemplares analizados, sugiere la existencia de una red micorrícica interconectada entre los individuos de roble. Estos hongos generalistas podrían desempeñar un papel relevante en la transferencia de nutrientes y la comunicación subterránea entre los distintos árboles de robledal atlántico. Además, la presencia de especies de hongos ErM que se asocian cada vez más comúnmente con especies no pertenecientes a las ericáceas plantea interrogantes sobre la posible existencia de una red micorrícica común que conecta diferentes grupos de especies vegetales en estos ecosistemas.

- **Riqueza taxonómica:** Los valores de diversidad taxonómica indicaron unos valores similares en las parcelas de Cabana Vella y Monasterio de Hermo mientras que, en la parcela de Río de Alba fueron sensiblemente inferiores, debido, este hecho, probablemente a la existencia de unos condicionantes diferenciales de esta parcela frente a las otras.

- **Índices de Diversidad:** Los índices de diversidad alfa ( $\alpha$ ) proporcionaron valores detallados sobre la diversidad fúngica en las parcelas estudiadas, mostrando una comunidad que posee una diversidad moderada con una distribución de las especies que no es completamente equitativa, pero tampoco está dominada por unas pocas especies o grupos de especies.

El estudio detallado de la diversidad fúngica de raíces y rizosfera de especies de robledal atlántico presentado en este trabajo sienta una base sólida y necesaria para futuros trabajos de investigación en este campo. La amplia variedad de organismos fúngicos identificados, incluyendo hongos EcM generalistas y especialistas, endófitos, saprófitos y patógenos, proporciona una visión integral de las interacciones subterráneas en estos ecosistemas. Esta información detallada no solo enriquece nuestra comprensión

de la ecología micorrícica en los robledales atlánticos, sino que también abre nuevas puertas para investigaciones adicionales sobre la conectividad entre especies vegetales, la transferencia de nutrientes y la salud de los bosques. Por lo tanto, este estudio se posiciona como una referencia imprescindible y un punto de partida fundamental para futuros estudios que profundicen en la complejidad de las relaciones fúngicas en los ecosistemas de roble atlántico, contribuyendo al avance del conocimiento científico y a la conservación de estos valiosos ecosistemas forestales.

#### 4.6. BIBLIOGRAFÍA.

- Agerer, R. (1987-1995). *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn, Schwäbisch Gmünd. Munich.
- Barsoum, N., A'Hara, S. W., Cottrell, J. E., Forster, J., Garcia, M. S. J., Schonrogge, K., & Shaw, L. (2021). Root ectomycorrhizal status of oak trees symptomatic and asymptomatic for Acute Oak Decline in southern Britain. *Forest Ecology and Management*, 482, 118800.
- Bartram, J., Mountjoy, E., Brooks, T., Hancock, J., Williamson, H., Wright, G., Moppett, J., Goulden, N., & Hubank, M. (2016). Accurate sample assignment in a multiplexed, ultrasensitive, high-throughput sequencing assay for minimal residual disease. *The Journal of Molecular Diagnostics* 18, 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.02.008>
- Bergero, R., Perotto, S., Girlanda, M., Vidano, G., & Luppi, A. M. (2000). Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology*, 9(10), 1639-1649.
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., & others (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bonfante, P., & Venice, F. (2020). Mucoromycota: going to the roots of plant-interacting fungi. *Fungal Biology Reviews*, 34(2), 100-113.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Disclaimer, N. M., Neale, M. B., Grove, B. T., Malajczuk, N., & Csiro, F. (1996). *Working With Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Bruyant, P., Moënné-Loccoz, Y., & Almario, J. (2024). Root-associated helotiales fungi: Overlooked players in plant nutrition. *Soil Biology and Biochemistry*, 109363.
- Bzdyk, R. M., Olchowik, J., Studnicki, M., Nowakowska, J. A., Oszako, T., Urban, A., & Hilszczańska, D. (2019). Ectomycorrhizal colonisation in declining oak stands on the Krotoszyn Plateau, Poland. *Forests*, 10(1), 30.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., & Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cañete-Gibas, C. F. & Wiederhold, N. P. (2018). The Black Yeasts: an Update on Species Identification and Diagnosis. *Current Fungal Infection Reports* 12:59-65. <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0314-0>
- Catalogue of life. (2024). Helotiales, Recuperada en mayo de 2024 de <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/3BV>

- Corcobado, T., Vivas, M., Moreno, G., & Solla, A. (2014). Ectomycorrhizal symbiosis in declining and non-declining *Quercus ilex* trees infected with or free of *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Ecology and Management*, 324, 72-80.
- Courty, P. E., Franc, A., Pierrat, J. C., & Garbaye, J. (2008). Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5792-5801.
- Diez-Hernando, S., Poveda, J., Benito, Á., Peix, Á., Martín-Pinto, P., & Diez, J. J. (2024). Soil mycobiome and forest endophytic fungi: Is there a relationship between them?. *Forest Ecology and Management*, 562, 121924.
- Dove, N. C., & Hart, S. C. (2017). Fire reduces fungal species richness and in situ mycorrhizal colonization: a meta-analysis. *Fire Ecology*, 13, 37-65.
- Esling, P., Lejzerowicz, F., & Pawlowski, J. (2015). Accurate multiplexing and filtering for high-throughput amplicon-sequencing. *Nucleic Acids Research* 43, 2513–2524. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv107>
- Fehrer, J., Réblová, M., Bambasová, V., & Vohník, M. (2019). The root-symbiotic *Rhizoscypha ericae* aggregate and *Hyaloscypha* (Leotiomycetes) are congeneric: Phylogenetic and experimental evidence. *Studies in Mycology*, 92(1), 195-225.
- 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.
- Frank, B. (2005). On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). In *Mycorrhiza* (Vol. 15, Issue 4, pp. 267–275). <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0329-y>
- Gardes, M., & Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- 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.
- Grünig, C. R., Queloz, V., & Sieber, T. N. (2011). Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. *Endophytes of forest trees: biology and applications*, 3-30.
- Guardiola, M., Wangenstein, O.S., Taberlet, P., Coissac, E., Uriz, M.J., & Turon, X. (2016). Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ* 4, e2807. <https://doi.org/10.7717/peerj.2807>
- Halmshlager, E., & Kowalski, T. (2004). The mycobiota in nonmycorrhizal roots of healthy and declining oaks. *Canadian Journal of Botany*, 82(10), 1446-1458.

- He, F., Yang, B., Wang, H., Yan, Q., Cao, Y., & He, X. (2016). Changes in composition and diversity of fungal communities along *Quercus mongolica* forests developments in Northeast China. *Applied Soil Ecology*, 100, 162-171.
- Hibbett, D. S., Gilbert, L. B., & Donoghue, M. J. (2000). Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature*, 407(6803), 506-508.
- Horton, T. R. (Ed.). (2015). *Mycorrhizal networks* (Vol. 224). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2018). Below-ground-above-ground plant-microbial interactions: focusing on soybean, rhizobacteria and mycorrhizal fungi. *The open microbiology journal*, 12, 261.
- Illumina, I. (2017). Effects of index misassignment on multiplexing and downstream analysis.
- Ingleby, K., Manson, P.A., Last, F.T. & Fleming, L. V. (1990). Identification of ectomycorrhizas. Institute of terrestrial Ecology Res.
- Isaeva, O. V., Glushakova, A. M., Garbuz, S. A., Kachalkin, A. V., & Chernov, I. Y. (2010). Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biology bulletin*, 37, 26-34.
- Jankowiak, R., Stępniewska, H., Bilański, P., & Taerum, S. J. (2022). Fungi as potential factors limiting natural regeneration of pedunculate oak (*Quercus robur*) in mixed-species forest stands in Poland. *Plant pathology*, 71(4), 805-817.
- Karst, J., Jones, M. D., & Hoeksema, J. D. (2023). Positive citation bias and overinterpreted results lead to misinformation on common mycorrhizal networks in forests. *Nature Ecology & Evolution*, 7(4), 501-511.
- Kwaśna, H., & Szewczyk, W. (2016). Effects of fungi isolated from *Quercus robur* roots on growth of oak seedlings.
- Liao, H. L., Bonito, G., Rojas, J. A., Hameed, K., Wu, S., Schadt, C. W., ... & Vilgalys, R. (2019). Fungal endophytes of *Populus trichocarpa* alter host phenotype, gene expression, and rhizobiome composition. *Molecular plant-microbe interactions*, 32(7), 853-864.
- Lou, H., Guo, C., Fan, B., Fu, R., Su, H., Zhang, J., & Sun, L. (2022). Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) interact with *Lachnum pygmaeum* to mitigate drought and promote growth. *Frontiers in Plant Science*, 13, 920338.
- Magurran, A. E (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp
- Malicka, M., Magurno, F., & Piotrowska-Seget, Z. (2022). Plant association with dark septate endophytes: When the going gets tough (and stressful), the tough fungi get going. *Chemosphere*, 302, 134830.

- Margalef, R. (1972). Homage to E. Hutchison, or why is there an upper limit to diversity. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences* 44: 21-235
- Martos, F., Dulormne, M., Pailler, T., Bonfante, P., Faccio, A., Fournel, J., ... & Selosse, M. A. (2009). Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist*, 184(3), 668-681.
- Merckx, V. S., Gomes, S. I., Wang, D., Verbeek, C., Jacquemyn, H., Zahn, F. E., ... & Bidartondo, M. I. (2024). Mycoheterotrophy in the wood-wide web. *Nature Plants*, 1-9.
- Milović, M., Kovačević, B., Drekić, M., Pilipović, A., Pekeč, S., Kesić, L., ... & Galić, Z. (2023). Ectomycorrhizal diversity in a mature pedunculate oak stand near Morović, Serbia. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 16(6), 345.
- Moreno, C. E (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *M&T-Manuales y Tesis SEA*, vol. 1. Zaragoza, 84 pp.
- Nakamura, N., Hosoya, T., Tanaka, C., & Takeuchi-Kaneko, Y. (2018). Detection of a root-associated group of Hyaloscyphaceae (Helotiales) species that commonly colonizes Fagaceae roots and description of three new species in genus *Glutinomyces*. *Mycoscience*, 59(5), 397-408.
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., ... & Weedon, J. (2022). *\_vegan: Community Ecology Package\_*. R package version 2.6-4, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Ozimek, E., & Hanaka, A. (2020). *Mortierella* species as the plant growth-promoting fungi present in the agricultural soils. *Agriculture*, 11(1), 7. Pellitier, P. T., & Zak, D. R. (2021). Ectomycorrhizal root tips harbor distinctive fungal associates along a soil nitrogen gradient. *Fungal Ecology*, 54, 101111.
- Pérez-Izquierdo, L., Clemmensen, K. E., Strengbom, J., Granath, G., Wardle, D. A., Nilsson, M. C., & Lindahl, B. D. (2021). Crown-fire severity is more important than ground-fire severity in determining soil fungal community development in the boreal forest. *Journal of Ecology*, 109(1), 504-518.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing root and stainin parasitic and vesicular-arbucular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*: 55(1), 158-IN18.
- R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rillig, M. C., Lehmann, A., Lanfranco, L., Caruso, T., & Johnson, D. (2024). Clarifying the definition of common mycorrhizal networks. *Functional Ecology*.
- Rinaldi, A. C., Comandini, O., & Kuyper, T. W. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal diversity*, 33, 1-45.



- Robinson, D. G., Ammer, C., Polle, A., Bauhus, J., Aloni, R., Annighöfer, P., ... & Näsholm, T. (2023). Mother trees, altruistic fungi, and the perils of plant personification. *Trends in Plant Science*.
- Serrada Hierro, R. (2011). Apuntes de Selvicultura. *Universidad Politécnica de Madrid*, 490.
- Simard, S. W., & Durall, D. M. (2004). Mycorrhizal networks: A review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1140–1165. <https://doi.org/10.1139/B04-116>
- Simard, S. W., Beiler, K. J., Bingham, M. A., Deslippe, J. R., Philip, L. J., & Teste, F. P. (2012). Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews*, 26(1), 39-60.
- Simpson, E (1949). Measurement of Diversity. *Nature* 163, 688 <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Smith, G.R., Finlay, R.D., Stenlid, J., Vasaitis, R. & Menkis, A. (2017), Growing evidence for facultative biotrophy in saprotrophic fungi: data from microcosm tests with 201 species of wood-decay basidiomycetes. *New Phytol*, 215: 747-755. <https://doi.org/10.1111/nph.14551>
- Suz, L. M., Barsoum, N., Benham, S., Dietrich, H. P., Fetzer, K. D., Fischer, R., ... & Bidartondo, M. I. (2014). Environmental drivers of ectomycorrhizal communities in Europe's temperate oak forests. *Molecular Ecology*, 23(22), 5628-5644.
- Tedersoo, L., Pärtel, K., Jairus, T., Gates, G., Põldmaa, K., & Tamm, H. (2009), Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environmental Microbiology*, 11: 3166-3178. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02020.x>
- Tedersoo, L., May, T.W. & Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20, 217–263
- Tedersoo, L., Bahram, M., Puusepp, R., Nilsson, R. H., & James, T. Y. (2017). Novel soil-inhabiting clades fill gaps in the fungal tree of life. *Microbiome*, 5, 1-10.
- Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., Tanabe, A. S., Gilbert, G. S., & Kadowaki, K. (2013). Community composition of root-associated fungi in a Quercus-dominated temperate forest: “codominance” of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution*, 3(5), 1281-1293.
- Ullah, A., Gao, D., & Wu, F. (2024). Common mycorrhizal network: the predominant socialist and capitalist responses of possible plant–plant and plant–microbe interactions for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1183024.
- Urban, A., Puschenreiter, M., Strauss, J., & Gorfer, M. (2008). Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil. *Mycorrhiza*, 18, 339-354.

- Verkley G.J.M, Hofland-Zijlstra J.D., & Berendse F. (2010). *Rhizoderma veluwensis*. Fungal Planet 46, Persoonia 24: 130–131
- Vrålstad, T., Myhre, E., & Schumacher, T. (2002). Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytologist*, 155(1), 131–148. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00444.x>
- Voříšková, J., Brabcová, V., Cajthaml, T., & Baldrian, P. (2014). Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist*, 201(1), 269–278.
- Wang, M., Wang, C., Yu, Z., Wang, H., Wu, C., Masoudi, A., & Liu, J. (2023). Fungal diversities and community assembly processes show different biogeographical patterns in forest and grassland soil ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1036905.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., others (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications* 18, 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Whitfield, J. (2017) Underground networking. *Nature* 449, 136–138. <https://doi.org/10.1038/449136a>
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs*, 30(3), 279–338.
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2-3), 213–251.



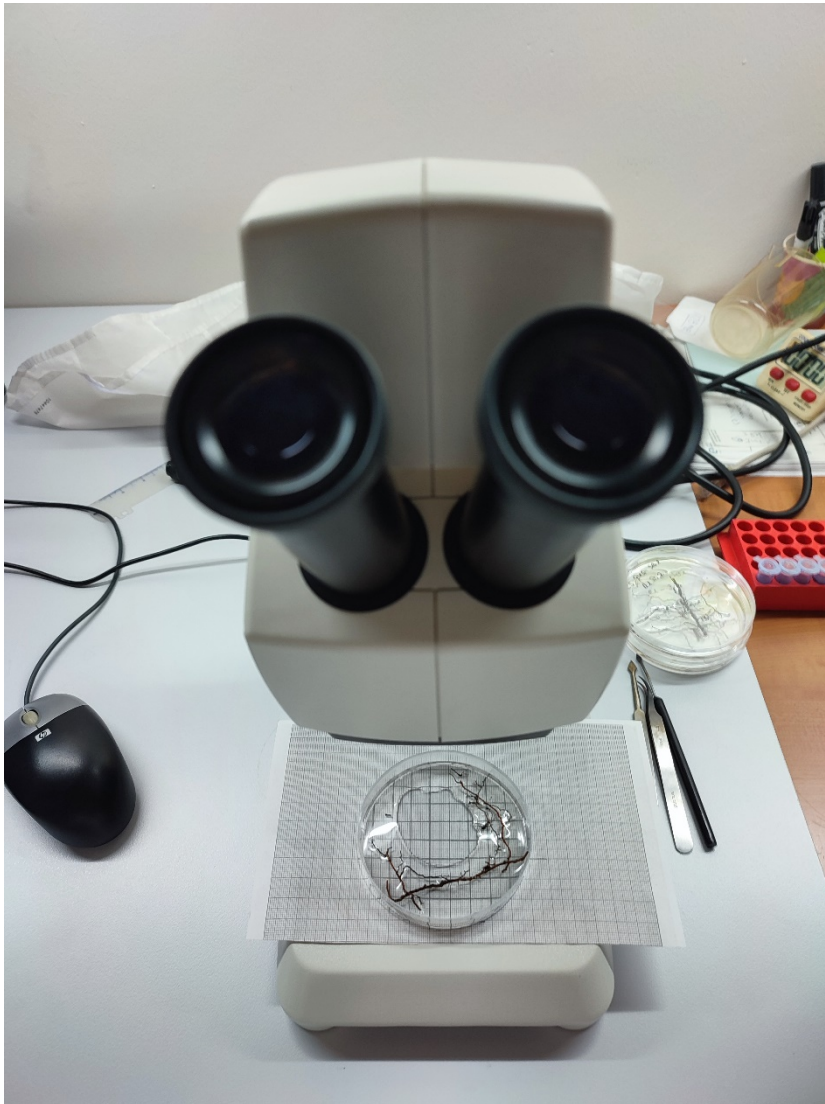
## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES.

En la presente tesis doctoral se ha realizado un minucioso estudio de la comunidad fúngica que habita en raíces y rizosferas de diversas especies de ecosistemas Cantábricos. Utilizando técnicas moleculares se han realizado análisis taxonómicos precisos, revelándose una gran diversidad de la comunidad fúngica, la estructura de las comunidades y las diferencias taxonómicas, indicando variaciones específicas en la composición de especies fúngicas entre los distintos hospedantes. A continuación, se detallan las principales conclusiones obtenidas de este estudio:

- La diversidad taxonómica en las comunidades fúngicas de las especies estudiadas reveló la presencia de diversos filos, clases, ordenes, familias, géneros y especies. En ambas comunidades dominan los miembros del filo Ascomycota, seguidos de Basidiomycota y, en el caso de las poblaciones de pastizal alpino, los Glomeromycota, mientras que en los robledales serían los Mucoromycota.
- En el conjunto de las poblaciones se ha observado cómo en las zonas de muestreo que se sustentan sobre suelos ácidos, las comunidades fúngicas dominantes pertenecen al orden Helotiales (Leotiomycetes, Ascomycota) mientras que, en las zonas básicas domina el orden Pleosporales (Dothideomycetes, Ascomycota).
- Se ha constatado la presencia en las raíces y rizosfera de las especies analizadas de miembros de los mismos géneros, tales como *Lachnum* spp. o *Entoloma* spp., lo que indica la capacidad que tienen estos organismos de desarrollarse en diversos hábitats, proporcionándoles una ventaja evolutiva significativa, ya que les permite colonizar diversos territorios y sobrevivir en condiciones cambiantes.
- En los pastizales alpinos, se ha observado que los factores ambientales influyen en la composición de la comunidad fúngica asociada a especies específicas, tomando como ejemplo a *Thymus praecox*. Los especímenes recolectados en la localización de los Picos de Europa muestran una mayor diversidad fúngica en comparación con los de San Emiliano, presentando además comunidades fúngicas asociadas significativamente diferentes entre ambas localidades.
- Se ha llevado a cabo un análisis de la comunidad fúngica asociada a los sistemas radicales de *Quercus petraea* pertenecientes a masas naturales, constándose que, en un mismo sistema micorrícico, se encuentra el hongo ectomicorrícico (EcM) principal junto con un conjunto de otros organismos fúngicos, entre los que se incluyen otros hongos EcM, endófitos, saprófitos y patógenos.
- Se ha observado cómo los factores ambientales e intrínsecos de las masas forestales influyen en la composición de la comunidad fúngica asociada a las raíces y la rizosfera de los robledales. En la parcela localizada en el Parque Natural de Redes, se presenta una riqueza y diversidad fúngica inferior en comparación con el resto de las parcelas analizadas. Esta menor diversidad puede atribuirse a las características diferenciales de dicha parcela, como la posible existencia de una patología aún no identificada y el haber sufrido un incendio de baja intensidad.





ANEXOS

Tabla 1: Distribución de las lecturas según filo en la localización de Picos de Europa.

	<i>A.cantabrica</i>	<i>A. vulneraria</i>	<i>C. sempervirens</i>	<i>T. praecox</i>	Global
Ascomycota	526168	280921	284607	518483	1610179
Basidiomycota	176122	49225	306086	174495	705928
Chytridiomycota	130	0	0	51	181
Cryptomycota	1397	33	1252	412	3094
Fungi (Reino)	1389	267	3632	3260	8548
Glomeromycota	13106	8570	1090	30055	52821
Mucoromycota	9448	1087	5099	1129	16763
Zoopagomycota	13	0	13	0	26
Total	727773	340103	601779	727885	2397540

Tabla 2: Distribución de las lecturas según filo en la localización de San Emiliano.

	<i>A.duriaei</i>	<i>T. praecox</i>	<i>L. caespitosa</i>	Global
Ascomycota	550791	416692	522077	1489560
Basidiomycota	44756	124820	42289	211865
Chytridiomycota	2480	0	2750	5230
Cryptomycota	729	55	21	805
Entorrhizomycota	0	11	0	11
Fungi (Reino)	18495	80455	4676	103626
Glomeromycota	264	0	49284	49548
Mucoromycota	24433	6248	7114	37795
Total	641948	628281	628211	1898440

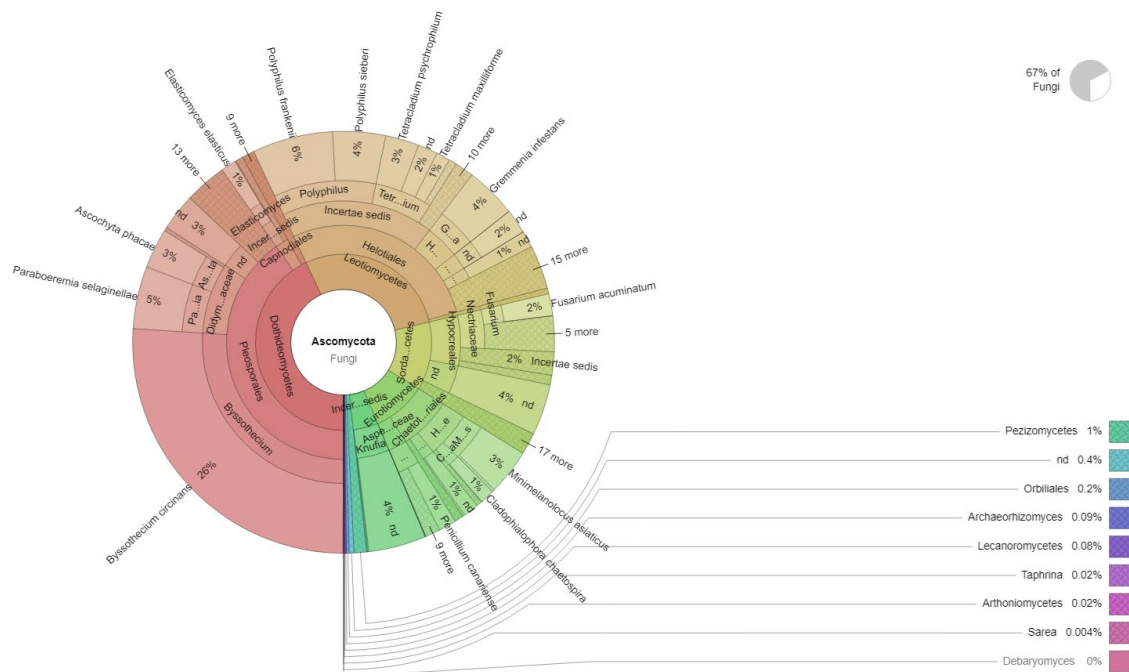


Figura 1: Distribución de lecturas del filo Ascomycota en la población de Picos de Europa.

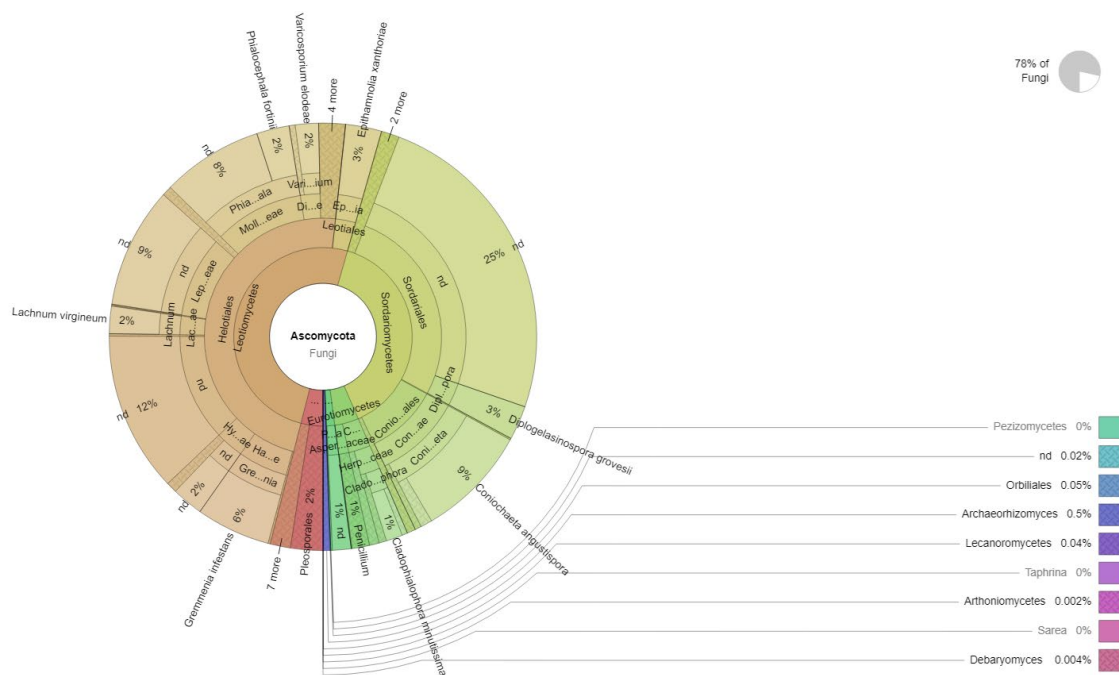


Figura 3: Distribución de lecturas del filo Ascomycota en la población de San Emiliano.

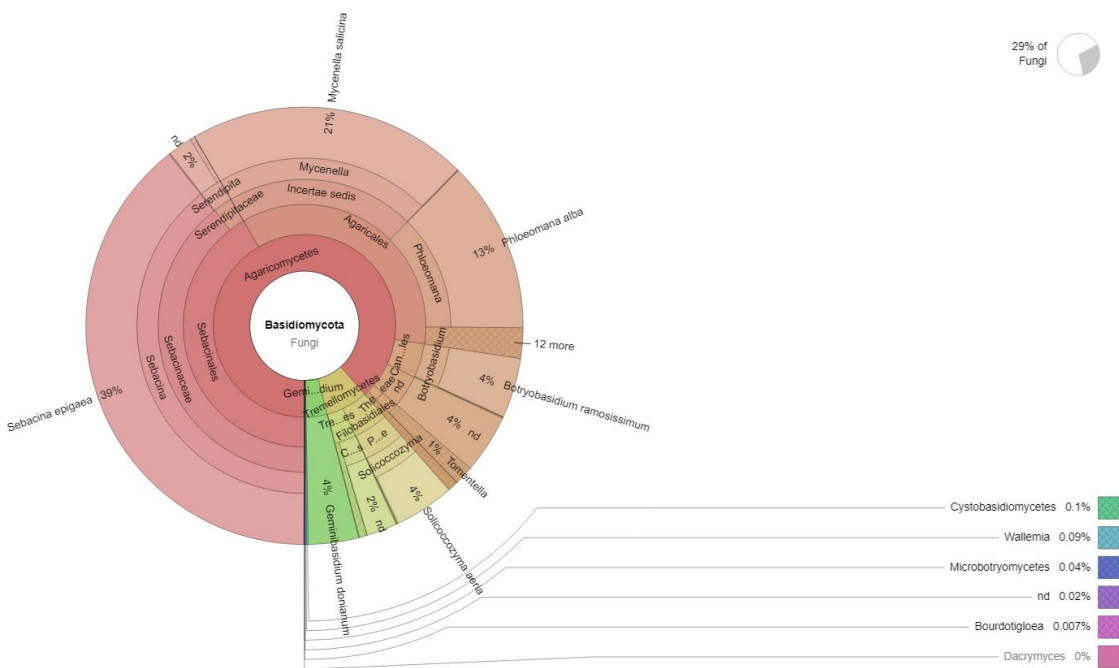


Figura 2: Distribución de lecturas del filo Basidiomycota en la población de Picos de Europa.



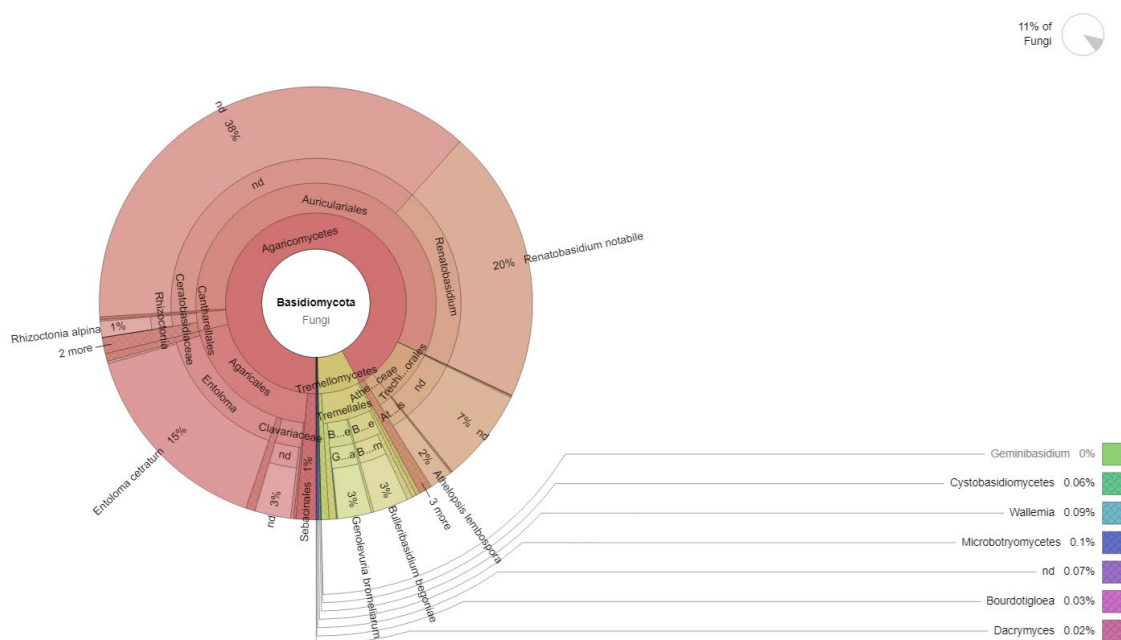


Figura 4: Distribución de lecturas del filo Basidiomycota en la población de San Emiliano.

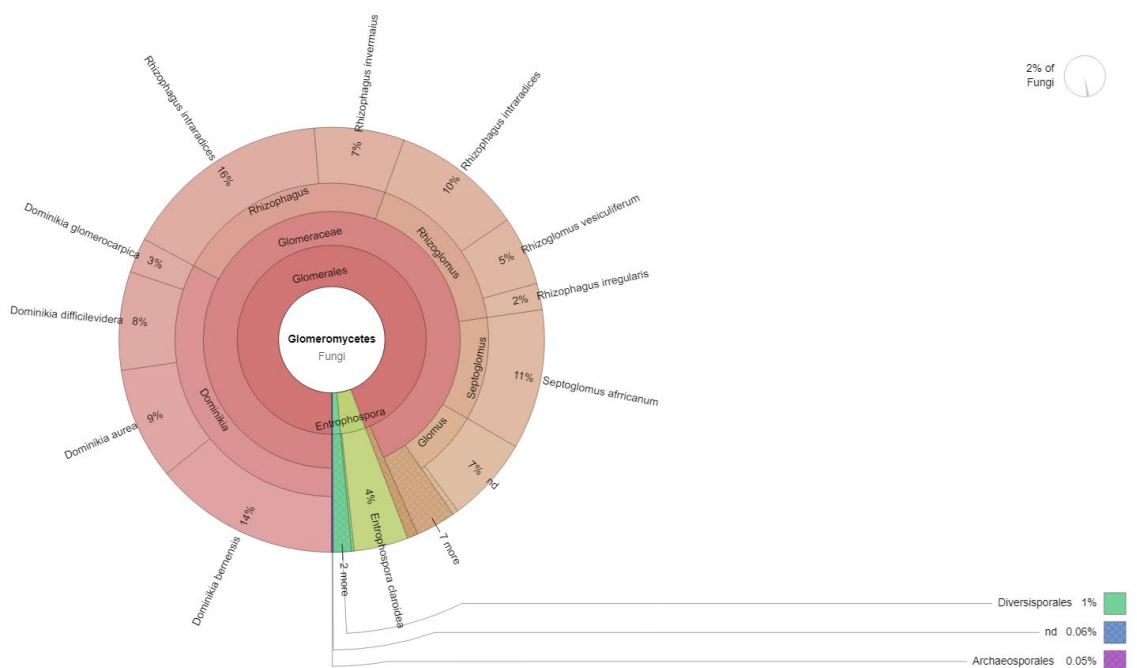


Figura 5: Distribución de lecturas del filo Glomeromycota en la población de Picos de Europa.

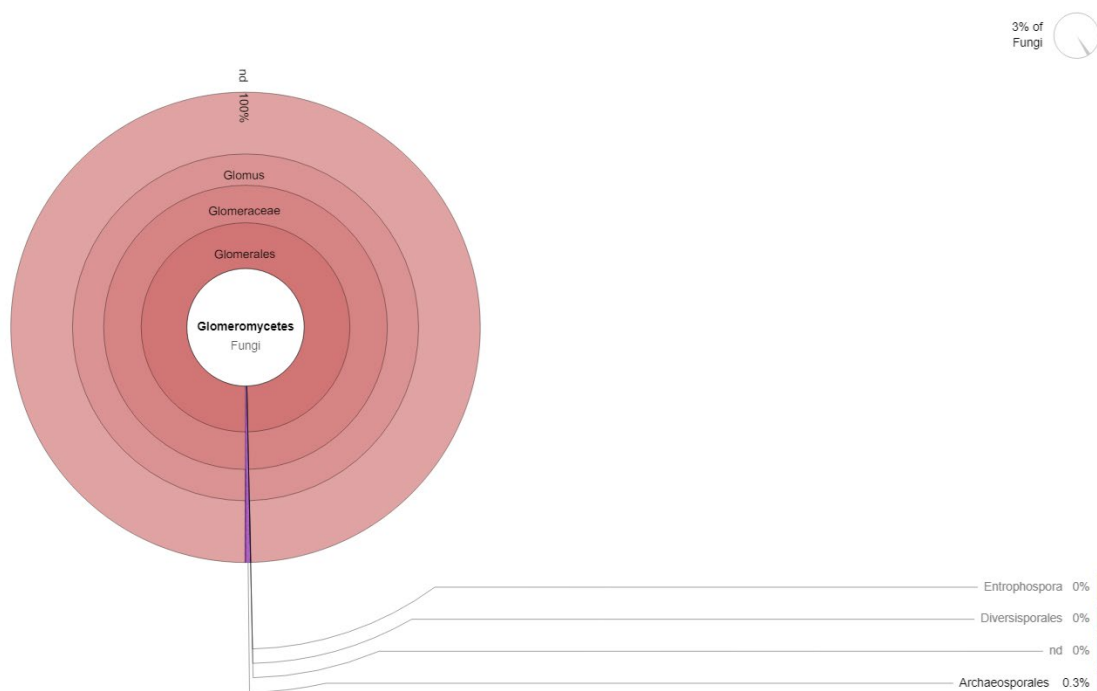


Figura 6: Distribución de lecturas del filo Glomeromycota en la población de San Emiliano.

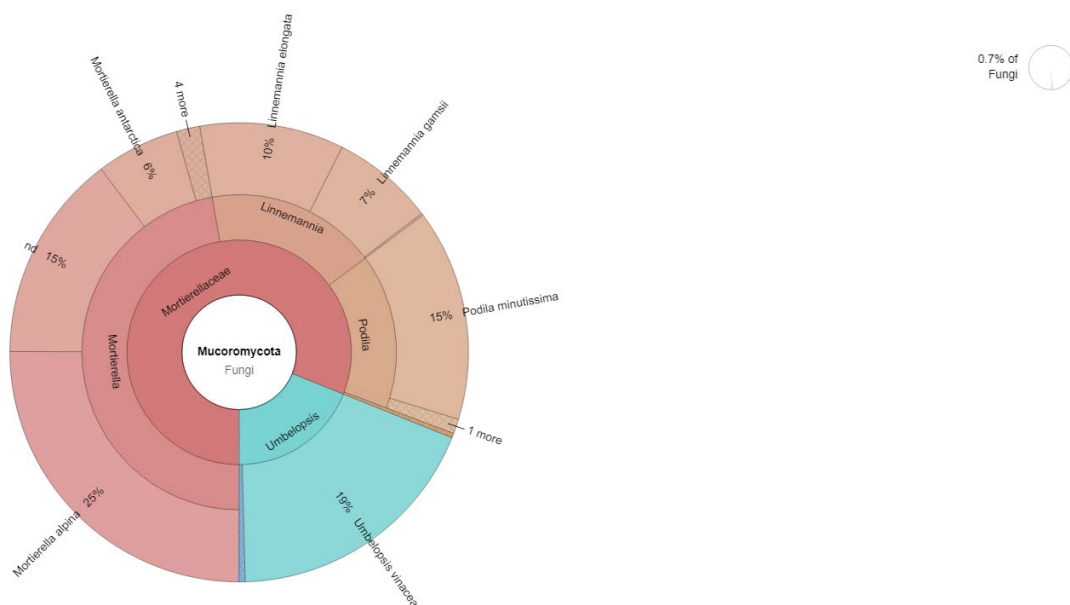


Figura 7: Distribución de lecturas del filo Mucoromycota en la población de Picos de Europa.

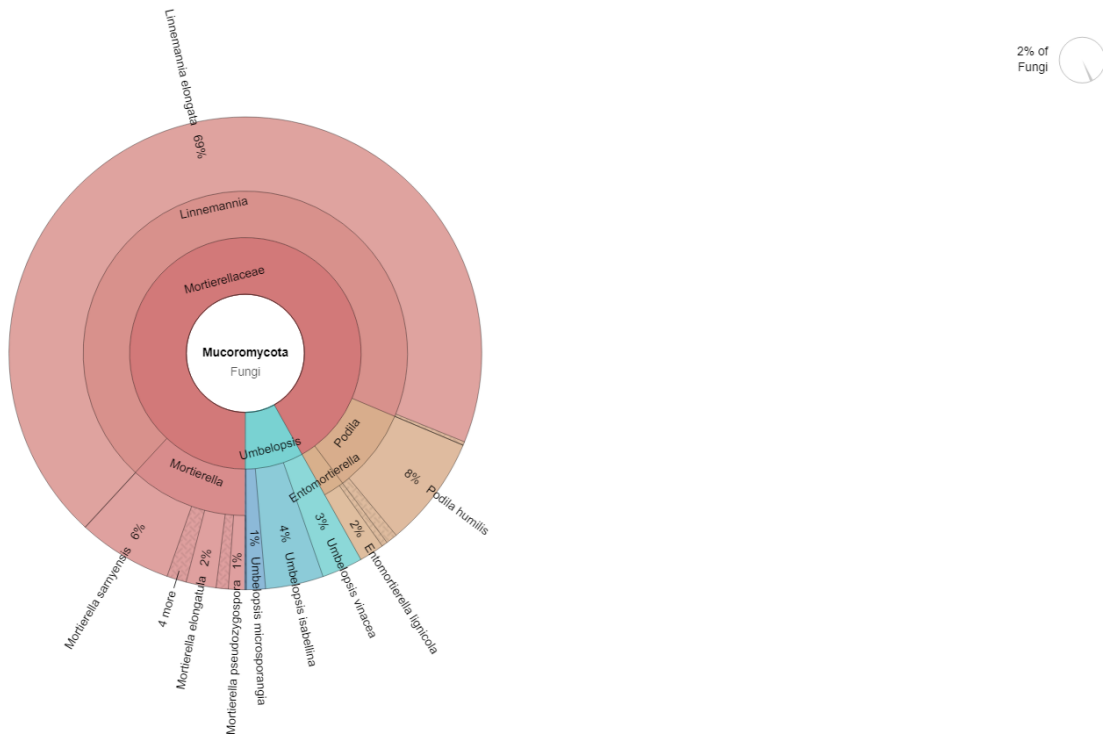


Figura 8: Distribución de lecturas del filo Mucoromycota en la población de San Emiliano.

Tabla 1: Valores del pH y sus efectos.

pH	Evaluación	Efectos en el intervalo
<4,5	Extremadamente ácido	Condiciones muy desfavorables
4,5-5	Muy fuertemente ácido	Posible toxicidad por Al <sup>3+</sup> y exceso de Co, Cu, Fe, Mn, Zn; deficiencia en Ca, K, N, Mg, Mo, P, S. Escasa actividad bacteriana.
5,1-5,5	Fuertemente ácido	
5,6-6	Medianamente ácido	Intervalo adecuado para la mayoría de los cultivos; máxima disponibilidad de nutrientes (por debajo de pH 7 el CaCO <sub>3</sub> no es estable)
6,1-6,5	Ligeramente ácido	
6,6-7,3	Neutro	
7,4-7,8	Medianamente básico	Suelos generalmente con CaCO <sub>3</sub> ; disminuye la disponibilidad de P y B; deficiencia creciente de Co, Cu, Fe, Mn, Zn
7,9-8,4	Básico	
8,5-9,0	Ligeramente alcalino	En suelos con carbonatos, el pH alto puede deberse al MgCO <sub>3</sub> , si no hay Na intercambiable
9,1-10	Alcalino	Presencia de carbonato sódico; elevado porcentaje de Na intercambiable (ESP>15%); toxicidad Na, B; escasa actividad microbiana; micronutrientes poco disponibles excepto Mo
>10	Fuertemente alcalino	

Tabla 2: Valores de referencia de conductividad eléctrica (CE).

CE (dS/m)	Evaluación
<0,35	No salino
0,36-0,65	Ligeramente salino
0,66-1,15	Salino
>1,16	Muy salino

Tabla 3: Porcentaje de M.O. en suelos.

MO (%)	Evaluación
0-1,0	Muy bajo
1,0-2,0	Bajo
2,0-2,5	Normal
2,5-3,5	Alto
>3,5	Muy Alto

Tabla 4: Valores de referencia de nitrógeno Kjeldahl.

N (%)	Evaluación
<0,05	Muy Bajo
0,06-0,10	Bajo

0,11-0,20	Norma
0,21-0,40	Alto
>0,41	Muy Alto

Tabla 5: Relación C/N y tipo de humus asociado

C/N	Evaluación	Tipo de humus
<8	Muy baja	Mull cálcico
8-12	Baja	Mull cálcico
12-15	Adecuada	Mull forestal
15-25	Elevada	Moder
>25	Muy elevada	Mor

Tabla 6: Interpretación del contenido en sodio.

Na (cmol <sup>(+)</sup> /kg)	Valoración
<2	Bajo
2	Norma
2-4,5	Alto
>4,5	Muy alto

Tabla 7: Interpretación del contenido en calcio (cmol<sup>(+)</sup>/kg).

Calcio asimilable	Interpretación
< 4,5	Muy bajo
4,5-9	Bajo
9-10,5	Correcto
10,5-12	Alto
> 12	Excesivo

Tabla 8: Interpretación del contenido en magnesio (cmol<sup>(+)</sup>/kg).

Magnesio (cmol <sup>(+)</sup> /kg)	Interpretación
< 0,75	Muy bajo
0,75-1,5	Bajo
1,5-2,25	Correcto
2,25-3	Alto
> 3	Excesivo


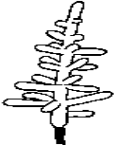





Tabla 9: Interpretación del contenido potasio asimilable (cmol(+)/kg).

<b>Potasio asimilable (cmol<sub>(+)</sub> /kg)</b>	<b>Interpretación</b>
< 0,13	Muy bajo
0,13 – 0,30	Bajo
0,30 – 0,60	Correcto
0,20 – 1,20	Alto
>1,20	Excesivo





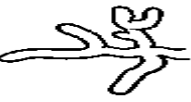
Tabla 10: Valoración de la CICE (cmol(+)/kg).

<b>CICE (cmol<sub>(+)</sub> /kg)</b>	<b>Interpretación</b>
<6	Muy bajo
6 – 12	Bajo
12 – 25	Medio
25– 40	Alto
>40	Muy alto

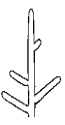
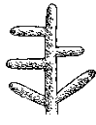

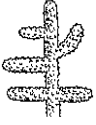





Tipo de ramificación:

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

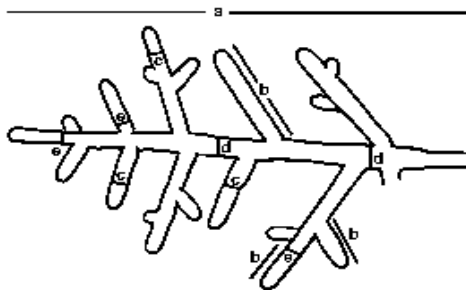
Forma:

				
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:


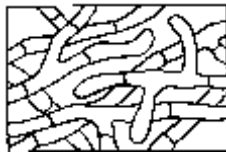
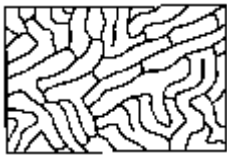
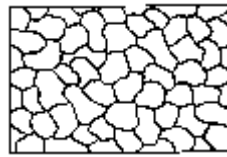
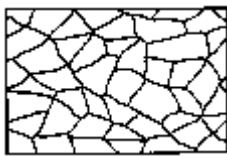
Reflectante:

Observaciones:

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



**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))

Tabla 1: Distribución de las lecturas según filo en los robledales atlánticos.

	<b>PN Fuentes</b>	<b>PN Redes</b>	<b>ZEC Ancares</b>	<b>Global</b>
Ascomycota	1561279	819058	1125716	3506053
Basidiomycota	172079	272424	396198	840701
Chytridiomycota	0	0	31	31
Cryptomycota	4902	202	113	5217
Fungi (Reino)	4306	709	5560	10575
Glomeromycota	43	0	0	43
Mucoromycota	5616	25932	6951	38499
Zygomycota	0	0	466	466
Total	1748225	1118325	1535035	4401585

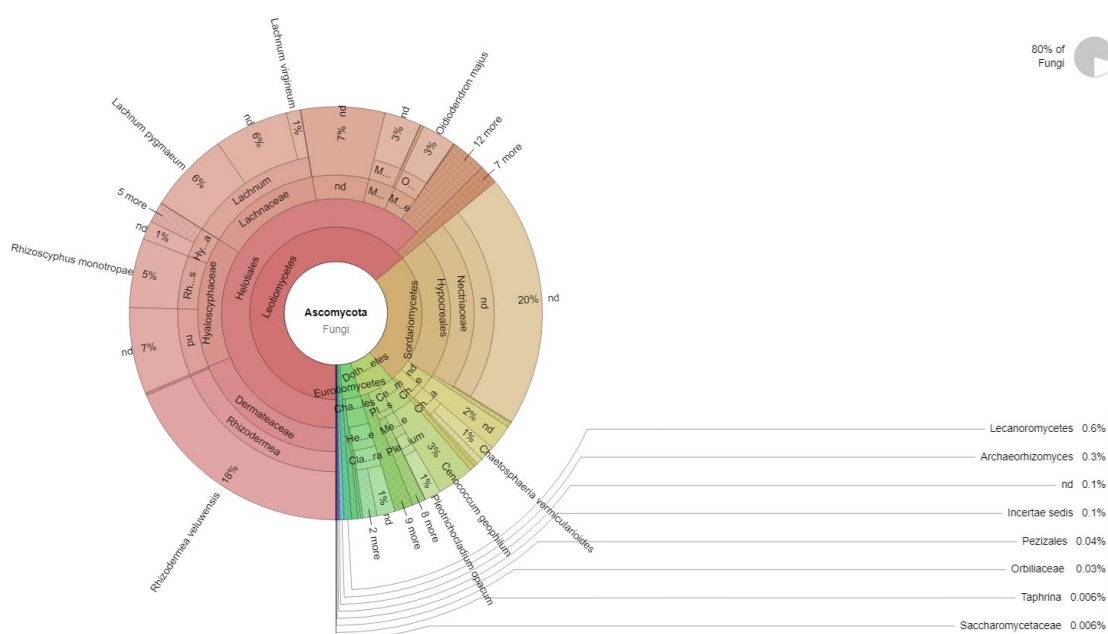


Figura 1: Distribución de lecturas del filo Ascomycota en el conjunto de las parcelas de roble atlántico.

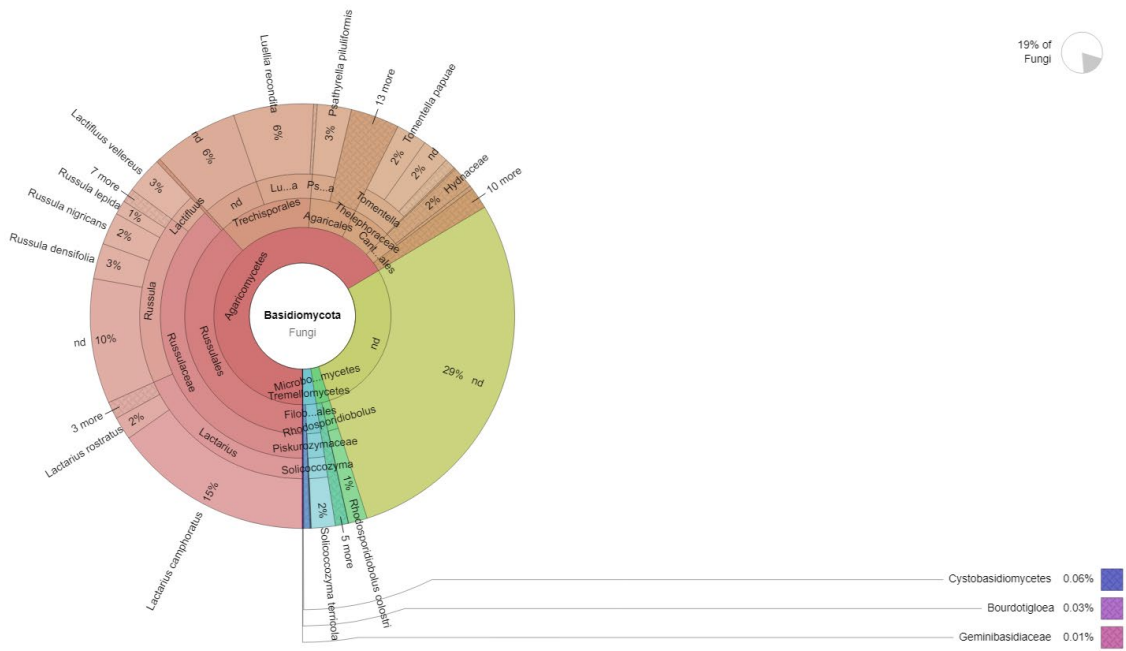


Figura 2: Distribución de lecturas del filo Basidiomycota en el conjunto de las parcelas de roble atlántico.

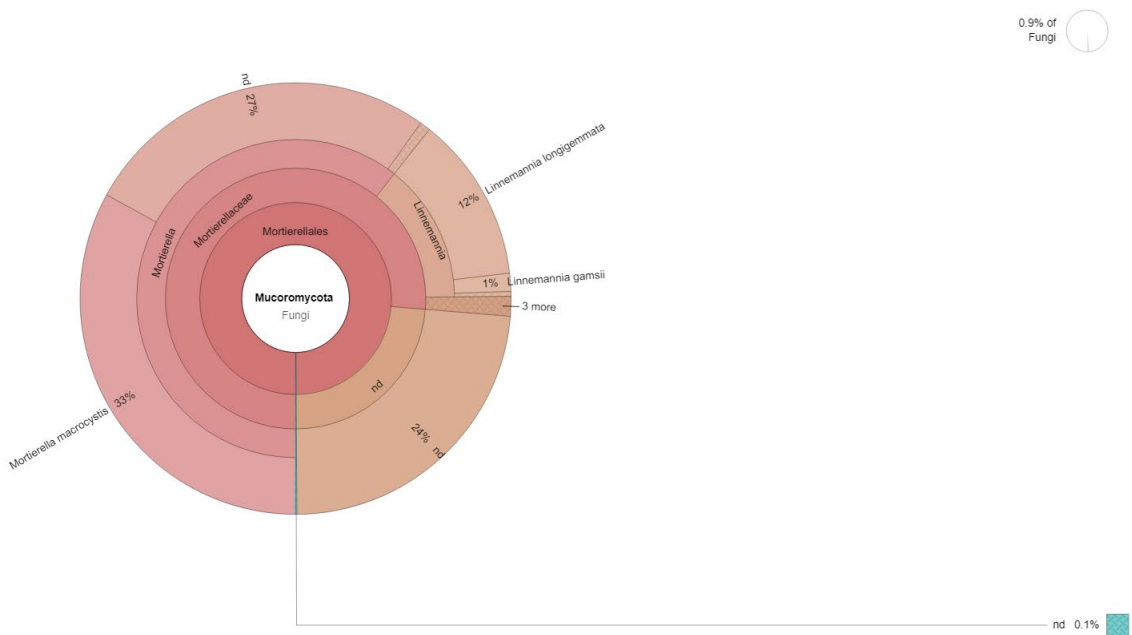


Figura 3: Distribución de lecturas del filo Mucoromycota en el conjunto de las parcelas de roble atlántico.