



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería Agronómica

**Diversidad fúngica en ecosistemas
mediterráneos de Castilla y León**

Alumna: Laura Morejón Escudero

Tutora: María Elena Hidalgo Rodríguez

Cotutor: Sergio Díez Hermano

Director: Julio Díez Casero

Febrero de 2022

Copia para el tutor/a

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Cambio climático y biodiversidad.....	3
1.2. Biodiversidad microbiana en ecosistemas mediterráneos.....	4
1.3. Medición de la biodiversidad basada en secuenciación.....	11
2. Objetivos.....	17
3. Materiales y métodos.....	17
3.1. Materiales.....	17
3.2. Métodos.....	23
4. Resultados y discusión.....	31
4.1. Comparativa entre métodos de extracción de ADN.....	32
4.2. Análisis descriptivo de la biodiversidad.....	33
4.3. Análisis de nichos funcionales.....	39
5. Conclusiones.....	43
Agradecimientos.....	45
Bibliografía.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Impacto de biodiversidad sobre los ecosistemas y el papel transformador de los seres humanos en ellos	4
Figura 2. Región de ADN ribosómico (ADNr) de hongos y de espaciadores transcritos internos (ITS)	16
Figura 3. Localización geográfica de las muestras	19
Figura 4. Diseño del muestreo de campo	20
Figura 5. Inspección visual de síntomas en especies arbóreas	23
Figura 6. Protocolos de extracción de ADN de material vegetal	26
Figura 7. Proceso de identificación fúngica realizado en las muestras de madera.....	28
Figura 8. Comparativa entre el método de extracción de ADN de material vegetal Doyle & Doyle (1990) modificado y el kit E.Z.N.A. [®] de Omega Bio-tek.....	32
Figura 9. Número de lecturas obtenidas por secuenciación en cada muestra de ADN extraída con el kit comercial.....	33
Figura 10. Abundancia relativa a nivel de filo taxonómico	34
Figura 11. Abundancia a nivel taxonómico de clase	35
Figura 12. Análisis de diversidad alfa.....	36
Figura 13. Análisis de diversidad beta.....	38
Figura 14. Análisis de rasgos funcionales de hongos	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos de secuenciadores masivos y sus características	14
Tabla 2. Resumen de especies y enfermedades forestales muestreadas	19
Tabla 3. Extracto de la tabla de abundancias	29
Tabla 4. Riqueza de especies.....	36

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosómico nuclear

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

BAM: *Block Alignment Map*

CMNUCC: Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

D: *diseased* (enfermo/a)

E.T.S.I.I.A.A.: Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias

H: *healthy* (sano/a)

ha: hectárea

HTS: *High-Throughput Sequencing* o secuenciación masiva

IPCC: *Intergovernmental Panel on Climate Change* (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático)

ITS: Región del espaciador transcrito interno

ITS1: *Internal Transcribed Spacer 1*

Krpm: kilo revoluciones por minuto

LTI: Laboratorio de Técnicas Instrumentales

NGS: *Next Generation Sequencing* o secuenciación de nueva generación

NMDS: escalado multidimensional no métrico

OTU: *Operational Taxonomic Unit* o Unidad Taxonómica Operativa

PCR: *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa

SAM: *Sequence Alignment Map*

SEVAG: cloroformo-alcohol isoamílico 24:1

Sp: especie

Spp: especies

TE: Tris-EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

TFM: Trabajo de Fin de Máster

UE: Unión Europea

UV: Ultravioleta

VCF: *Variant Call Format*

Nomenclatura propia del estudio

AD: La Alamedilla *Diseased* (muestras enfermas de La Alamedilla)

AH: La Alamedilla *Healthy* (muestras sanas de La Alamedilla)

CD: El Cubo de Don Sancho *Diseased* (muestras enfermas de El Cubo de Don Sancho)

CH: El Cubo de Don Sancho *Healthy* (muestras sanas de El Cubo de Don Sancho)

LD: Linares de Riofrío *Diseased* (muestras enfermas de Linares de Riofrío)

LH: Linares de Riofrío *Healthy* (muestras sanas de Linares de Riofrío)

VD: Valdelosa *Diseased* (muestras enfermas de Valdelosa)

VH: Valdelosa *Healthy* (muestras sanas de Valdelosa)

RESUMEN

El cambio climático y la acción humana afectan negativamente a la biodiversidad de los ecosistemas mediterráneos, dando lugar a su deterioro y desintegración, debido al cambio del clima y a las modificaciones del uso de la tierra. Estudios recientes se centran en evaluar la actividad de la biodiversidad fúngica de los ecosistemas mediante el empleo de técnicas moleculares de secuenciación de nueva generación (NGS) como el *metabarcoding*. En el presente trabajo se pretendió caracterizar la biodiversidad fúngica y contrastar si había diferencias en la diversidad fúngica detectada entre árboles sanos y enfermos de cuatro ecosistemas mediterráneos distintos de Castilla y León (España). Para ello se seleccionaron cuatro zonas de árboles de distintas especies ubicadas en la provincia de Salamanca. Cada una de las zonas estaba dividida en 3 parcelas de árboles sanos y 3 parcelas de árboles enfermos. De cada parcela se tomó una muestra de madera de 5 árboles para realizar la extracción de ADN con dos métodos diferentes, la secuenciación mediante *metabarcoding* y el análisis bioinformático de los resultados. Se ha observado que no hay diferencias significativas entre parcelas sanas y enfermas de una misma zona. A nivel de filo, se ha observado una predominancia del filo Ascomycota en los hongos patógenos de planta y del filo Basidiomycota en los hongos saprótrofos, tanto en muestras sanas como en enfermas. Este estudio contribuye al desarrollo de la caracterización de la diversidad fúngica mediante técnicas moleculares como una interesante alternativa complementaria al resto de técnicas tradicionales de identificación para conocer posibles enfermedades en plantas.

Palabras clave: diversidad, ecosistemas mediterráneos, hongos, *metabarcoding*.

ABSTRACT

Climate change and human action negatively affect the biodiversity of Mediterranean ecosystems, leading to their deterioration and disintegration, due to climate change and land use modifications. Recent studies are focused on assessing the activity of fungal biodiversity in ecosystems using next-generation sequencing (NGS) molecular techniques such as metabarcoding. In the present work we aimed to characterize fungal biodiversity and to contrast if there were differences in fungal diversity detected between healthy and diseased trees in four different Mediterranean ecosystems of Castilla y León (Spain). For this purpose, four zones of trees of different species located in the province of Salamanca were selected. Each of the zones was divided into 3 plots of healthy trees and 3 plots of diseased trees. From each plot a wood sample of 5 trees was taken for DNA extraction using two different methods, sequencing by metabarcoding and bioinformatic analysis of the results. It has been observed that there are no significant differences between healthy and diseased plots in the same area. At the phylum level, a predominance of the phylum Ascomycota in plant pathogenic fungi and of the phylum Basidiomycota in saprotrophic fungi was observed in both healthy and diseased samples. This study contributes to the development of the characterization of fungal diversity by molecular techniques as an interesting complementary alternative to other traditional identification techniques to identify possible plant diseases.

Key words: diversity, fungi, Mediterranean ecosystems, metabarcoding.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cambio climático y biodiversidad

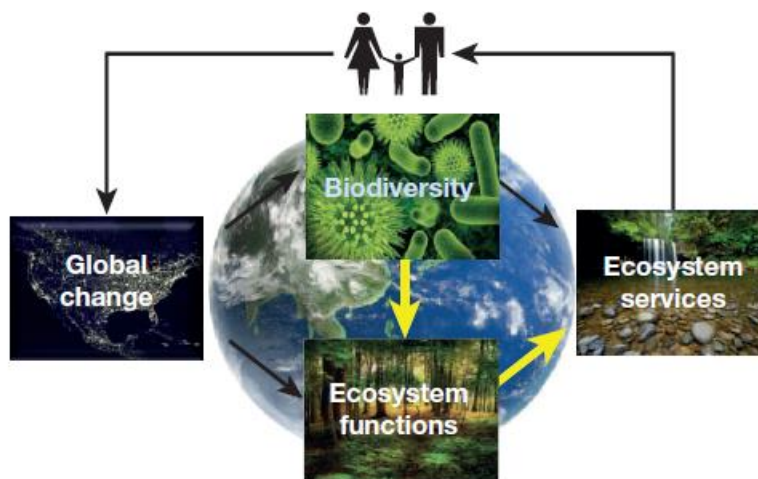
Según la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) el cambio climático se define como “cambio del clima asociado directa o indirectamente a la acción antropogénica que afecta a la composición atmosférica y comprende la variación natural del clima registrada durante períodos de tiempo semejantes”. Asimismo, considera importante diferenciar el cambio climático debido a la acción humana, que afecta principalmente a la composición de la atmósfera, frente al cambio climático a causa de fenómenos naturales (IPCC, 2013). En la actualidad, existe la necesidad de hacer frente a diversos retos basados en la conservación de la naturaleza, ya que cada vez se tiene más conocimiento de que están implicados en la protección de los ecosistemas de los impactos del cambio climático. Entre estos retos se encuentran la mitigación del cambio climático y su adaptación, la protección de la biodiversidad y la garantía del bienestar humano (Seddon *et al.*, 2020).

Si nos centramos en la biodiversidad, ésta se define como todo tipo de vida en la que se incluyen las variabilidades entre genes, especies y rasgos funcionales. Suele medirse como la riqueza (número de especies observadas en un lugar) y la uniformidad (medida de la homogeneidad en la distribución entre las especies de un lugar) (Cardinale *et al.*, 2012). Cada vez son más los estudios que documentan los efectos del cambio climático sobre la pérdida de biodiversidad, tanto a nivel de ecosistemas como de especies, pero sin llegar a nivel de diversidad genética intraespecífica. Esto es posible gracias al empleo de técnicas moleculares, como por ejemplo, el *metabarcoding* (Bálint *et al.*, 2011) que permite identificar niveles de biodiversidad por debajo de morfoespecie.

La continua pérdida de biodiversidad supone un reto a nivel internacional en el siglo XXI (Thomsen & Willerslev, 2015), ya que en los últimos años se ha demostrado que afecta negativamente al funcionamiento de los ecosistemas y disminuye la eficiencia con la que se obtienen recursos (alimentos o biomasa), se descompone la materia orgánica y se reciclan algunos nutrientes esenciales (Cardinale *et al.*, 2012; García-Vega & Newbold, 2020). Asimismo, provoca el deterioro de los ecosistemas originales por su pérdida y desintegración, lo que favorece el aislamiento de hábitats y la desaparición de especies y podrá afectar en un futuro a la viabilidad de sus poblaciones (Fernández *et al.*, 2020). Por todo ello, resulta necesario conocer la forma en la que se distribuyen las especies y los cambios en la dimensión de las poblaciones a lo largo del tiempo para

conservar la biodiversidad de los ecosistemas y realizar un seguimiento biológico de esta (García-Vega & Newbold, 2020; Thomsen & Willerslev, 2015).

Como se ilustra en la Figura 1 la biodiversidad está en el origen de las funciones que pueden desarrollar los ecosistemas. Estas funciones son aprovechadas como servicios por las poblaciones humanas que, a su vez, contribuyen a un cambio climático global que acaba modificando esas funciones de los ecosistemas.



Images from NASA and Shutterstock.com; used with permission.

Figura 1. **Impacto de biodiversidad sobre los ecosistemas y el papel transformador de los seres humanos en ellos** (Cardinale *et al.*, 2012).

1.2. Biodiversidad microbiana en ecosistemas mediterráneos

De los ecosistemas terrestres, los ecosistemas mediterráneos son los más amenazados por la pérdida de biodiversidad debido a los cambios del uso de la tierra (Sala *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2017) y las modificaciones del clima, como el aumento de la temperatura, la extensión de los períodos de sequías, los incendios más frecuentes y las situaciones extremas impredecibles (Aguilera *et al.*, 2020; Castro & Castro, 2019; Henne *et al.*, 2015; Kavadia *et al.*, 2020; Newbold *et al.*, 2020; Raftoyannis *et al.*, 2014).

Para facilitar la adaptación de los microorganismos y para mitigar los graves efectos del cambio climático y de la acción humana en los ecosistemas mediterráneos, se considera necesaria la creación de resiliencia mediante la gestión de la biodiversidad fúngica a través de sistemas agroforestales, que permiten un mejor control de plagas y

enfermedades (Aguilera *et al.*, 2020; Lasco *et al.*, 2014) provocadas en general por insectos y hongos (Maghnia *et al.*, 2019).

La biodiversidad fúngica de los ecosistemas se traduce en la existencia de una multitud de estrategias de supervivencia, que incluyen la nutrición y la interacción con otros microorganismos. Esto supone un reto de gran envergadura para los investigadores que pretenden descifrar las relaciones entre ellos y las principales funciones que desempeñan (Bajpai & Johri, 2017; Nilsson *et al.*, 2019a). Las características de los hongos se ven modificadas en función de los factores abióticos, la localización geográfica, los efectos del cambio climático y los factores ambientales de los ecosistemas, e influyen sobre la aptitud de los ecosistemas. Por ejemplo, la composición y la abundancia de los hongos patógenos, endófitos, saprótrofos y micorrícicos se ven afectadas por las variaciones en la composición y diversidad de especies vegetales en los diferentes hábitats (Saitta *et al.*, 2018). Por ello, resulta conveniente estudiar la contribución de los diferentes hongos en los ecosistemas (Bajpai & Johri, 2017; Nilsson *et al.*, 2019a; Scoma & Vorholt, 2018).

Para evaluar la actividad de la biodiversidad fúngica en los ecosistemas, una tendencia actual en los estudios de investigación es comparar diferentes ecosistemas mediterráneos y analizar cuáles de los parámetros relacionados con la biodiversidad fúngica afecta a la fertilidad del suelo y a la frecuencia de aparición e intensidad de las enfermedades provocadas por hongos. Uno de estos estudios es el de Francaviglia *et al.*, (2017), en el cual se comparó el efecto de intensificación del uso de la tierra en cinco ecosistemas diferentes (viñedo con laboreo, viñedo con cubierta vegetal, viñedos antiguos, cultivo de heno y pastos, y alcornocal) en el noreste de Cerdeña. Se observó que tanto el pasto como el alcornocal presentaron mayor contenido de carbono orgánico en el suelo que el resto de los ecosistemas estudiados y un mayor índice de fertilidad biológica en el último, lo que supone un incremento en el mantenimiento del ecosistema en cuanto a fertilidad biológica del suelo y diversidad microbiana. En el caso de los estudios de Costa *et al.*, (2021) y Gomes *et al.*, (2018) se compararon la biodiversidad fúngica presente en las hojas y las ramitas de olivos de diferentes plantaciones, en los que observaron diferencias de composición fúngica en función del órgano vegetal estudiado. En el estudio de Costa *et al.*, (2021), obtuvieron una mayor abundancia fúngica endófito en las ramitas que en las hojas, lo que indica la influencia del tipo de órgano sobre la biodiversidad fúngica. En cambio, en el estudio de Angelini *et al.*, (2016) se comparó la biodiversidad fúngica en cuanto a su composición y distribución en

diferentes bosques autóctonos y de plantación de distintas regiones de Italia, y pudieron observar la influencia de las características específicas de cada zona de estudio y de la especie del árbol sobre la biodiversidad fúngica encontrada.

1.2.1. Ecosistemas mediterráneos en Castilla y León

Los ecosistemas mediterráneos se caracterizan por presentar un clima con veranos calurosos y secos con riesgo de incendios, y otoños e inviernos frescos con precipitaciones (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 2000) y surgen de la interacción del clima con alteraciones antropogénicas, especialmente ligadas a actividades como el cultivo, el pastoreo y la explotación de madera y leña (Castro & Castro, 2019). Dicho clima se prevé que se vea modificado como consecuencia del efecto de la acción antropogénica, por lo que se esperan un descenso de la frecuencia de precipitaciones, un incremento de los períodos de sequía y el aumento de la frecuencia de situaciones extremas, todo lo cual incrementa el riesgo de pérdida de biodiversidad (Castro & Castro, 2019).

Tomando como ejemplo los incendios, está muy bien documentado que muchos de los ecosistemas mediterráneos se caracterizan por ser resistentes a los incendios y depender de ellos para mantenerse, para renovar bosques y controlar daños de plagas y enfermedades, ya que han sufrido incendios reiteradamente a lo largo de su evolución histórica (Ojeda, 2020). Sin embargo, los incendios de forma frecuente y a gran escala, derivados del cambio climático, conllevan graves consecuencias sobre la biodiversidad, el suelo, la calidad del aire y el agua y el paisaje (EEA, 2021).

Dentro de los ecosistemas mediterráneos, resulta muy interesante el estudio de los entornos agroforestales, ya que son considerados como sistemas socio-ecológicos de gran importancia para conservar la biodiversidad del medio, que como ya se ha indicado previamente, es la responsable de mantener la estabilidad de los ecosistemas y de que estos aporten servicios (Balzan *et al.*, 2020; Castro & Castro, 2019).

En los ecosistemas mediterráneos se considera a los árboles como los principales productores de materia orgánica y suponen la principal fuente de alimentación de una gran cantidad de organismos. Entre ellos se cuentan insectos, hongos, bacterias, virus y nemátodos, algunos de estos últimos, causantes de plagas y enfermedades en la vegetación forestal (Gil Sánchez *et al.*, 2007). Estos microorganismos son fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas (Martin *et al.*, 2011; Pérez-

Magariño *et al.*, 2015), aunque todavía son poco conocidos en los ecosistemas mediterráneos (Saitta *et al.*, 2018). Entre las diferentes comunidades de plantas, animales y hongos de los ecosistemas se establecen relaciones parasitarias y mutualistas entre los microorganismos, que ponen de manifiesto el estado de salud y las condiciones medioambientales en las que se encuentran los organismos huéspedes (Bahram *et al.*, 2011; Nilsson *et al.*, 2019a). Especialmente, cabe destacar la función que desempeñan los hongos y su conservación en los ecosistemas, ya que intervienen en numerosos procesos esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas y para su adaptación al cambio climático (Venice *et al.*, 2021).

Los ecosistemas mediterráneos se pueden encontrar en 31 países, incluida España (Venice *et al.*, 2021) que abarca una de las regiones de ecosistemas mediterráneos más extensas de España y de la Unión Europea: Castilla y León (Gil Sánchez *et al.*, 2007). Presenta una superficie de 9.422.309 ha destinada al aprovechamiento, de las que el 37% son tierras de cultivo (cultivos herbáceos, barbechos y cultivos leñosos), el 24% los prados y los pastizales (prados naturales, pastizales y erial a pastos), el 32% el terreno forestal (monte maderable, monte abierto y monte leñoso) y el 7% otras superficies (terreno improductivo, superficie no agrícola y ríos y lagos) (Junta de Castilla y León, 2021). Del total de la superficie de Castilla y León, 5,0 millones de ha son de suelo forestal (52%), y 3.038.645 ha corresponden a superficie forestal arbolada (32%), lo que representa la mayor ratio de España (Consejo Económico y Social de Castilla y León, 2020).

La mayor parte del territorio castellanoleonés se incluye en la región mediterránea que se caracteriza por presentar veranos cálidos y secos, y altitudes elevadas (entre los 600 y 1000 m sobre el nivel del mar), lo que ofrece cierta continentalidad que repercute en la vegetación forestal. Igualmente, presenta una gran variedad de medios naturales distribuidos por las muchas comarcas que abarca, ya que comprende una gran diversidad de climas, suelos y actividades humanas que permiten que existan ecosistemas mediterráneos como bosques termófilos y xerófilos, bosques de coníferas de alta montaña, montes mediterráneos, extensos bosques caducifolios de especies eurosiberianas y sotos y bosques de ribera. Entre estos ecosistemas, predominan los bosques de especies de hoja perenne y resistentes de géneros como *Quercus*, *Pinus* y *Juniperus* (Gil Sánchez *et al.*, 2007). Estos ecosistemas presentan una elevada biodiversidad endémica modelada por la acción antropogénica. En este caso, los ecosistemas mediterráneos de Castilla y León no se encuentran amenazados por un

incremento de la población o la sobreexplotación, sino por el abandono rural y la desertización (San Miguel Ayanz *et al.*, 2011).

Respecto a los servicios que aportan los ecosistemas mediterráneos de Castilla y León a la sociedad gracias al funcionamiento de estos, se pueden clasificar en cuatro tipos (Consejo Económico y Social de Castilla y León, 2020):

- Servicios de aprovisionamiento: engloba los bienes y las materias primas que aporta cada uno de los ecosistemas como, por ejemplo, madera, alimentos, etc.
- Servicios de soporte: comprenden la biodiversidad y los procesos biológicos naturales de los ecosistemas para que exista el resto de los servicios ecosistémicos.
- Servicios de regulación: incluye aquellos servicios que se obtienen de la regulación de los procesos que tienen lugar en los ecosistemas, como la fijación de carbono, la protección de los suelos contra la degradación y erosión, el ciclo del agua, etc.
- Servicios culturales: hace referencia a aquellos servicios asociados con el ocio y tiempo libre.

1.2.2. *El reino de los hongos*

El reino de los hongos es muy amplio, abarca una gran diversidad genética (Peay *et al.*, 2016) y está en continua revisión en cuanto a la adscripción taxonómica y la nomenclatura de las especies (Richards *et al.*, 2017). Engloba más de 3,8 millones de especies distribuidas por todo el planeta en diferentes ecosistemas, sobre todo en ecosistemas terrestres (Nilsson *et al.*, 2019a). A pesar de su importancia económica (Lücking *et al.*, 2021), ya que presentan una gran influencia sobre las actividades del hombre, se caracterizan por ser microorganismos omnipresentes difíciles de identificar, al ser el resultado de una evolución convergente, (Mueller & Schmit, 2007) cuyo conocimiento es menor que para otros grupos de organismos, por lo que se considera insuficiente (Nilsson *et al.*, 2019a; Peay *et al.*, 2016). Participan en procesos fundamentales de los ecosistemas como en la propagación o biocontrol de enfermedades y plagas, en la obtención de biocombustibles, aditivos de alimentos,

enzimas y productos de la industria farmacéutica (Lücking *et al.*, 2021), en el ciclo de carbono (Martin *et al.*, 2011), en la descomposición de la materia orgánica y en las diferentes asociaciones tanto beneficiosas como antagónicas con plantas y animales (Spatafora *et al.*, 2017).

A partir de la aparición de tecnologías moleculares que permiten analizar la compleja diversidad de microorganismos existentes en la naturaleza y dar solución a problemas medioambientales, se ha incrementado el interés por el conocimiento del microbioma (Bajpai & Johri, 2017; Scoma & Vorholt, 2018), definido como el conjunto de genomas de comunidades microbianas que habitan en un medio definido (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Junto al estudio del microbioma, surge la necesidad de revisar la clasificación y la nomenclatura de los hongos (Lücking *et al.*, 2021) y mejorar la comprensión de la estructura poblacional y las funciones de cada uno de ellos (McCarthy & Fitzpatrick, 2017). Este conocimiento tanto ecológico como taxonómico de especies incluso aun no descubiertas, resulta importante para la conservación y la utilización de la biodiversidad (Saitta *et al.*, 2018). Sin embargo, antes del empleo de técnicas moleculares, se analizaban los hongos comparando las características morfológicas o bioquímicas de cada uno de ellos para su identificación, lo cual limitaba el conocimiento de algunas especies fúngicas de este amplio reino (McCarthy & Fitzpatrick, 2017).

La mayor parte de los hongos se ocultan en los sustratos donde viven (Heilmann-Clausen *et al.*, 2015). Entre los sustratos se encuentran los diferentes órganos de las plantas, los cuales interactúan con los microorganismos presentes en el medio, como los hongos. De estos se tiene conocimiento su diversidad y contribución al estado sanitario de las plantas, la caída de las hojas y la descomposición de estas.

La mayor parte de las especies de hongos son saprótrofas, organismos descomponedores de materia orgánica, biopolímeros como la celulosa y polisacáridos como la quitina (Peay *et al.*, 2016). Recientemente se ha descubierto el amplio grupo de los hongos endófitos en el interior de las plantas sin causar síntomas de daño (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Se conocen como hongos endófitos a aquellos que viven en el interior de los tejidos vegetales de las plantas (Peay *et al.*, 2016). Suelen ser inapreciables a simple vista, pudiendo ser mutualistas, comensales, parasitarios o patógenos en estado latente (Schlegel *et al.*, 2018), que pasan la mayor parte de su ciclo vital en las plantas sin causar daños (Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Según Schlegel *et al.*, (2018) no se conocen lo suficiente las interacciones de dichos hongos con las plantas huésped, pero se sabe que las protegen del estrés abiótico, pueden variar su

resistencia frente a los patógenos y favorecer el intercambio de nutrientes. Sin embargo, existen algunos endófitos que pueden presentar efectos adversos sobre las plantas huésped en el caso de cambiar las condiciones del medio, de forma que pasan a actuar como parásitos (Nilsson *et al.*, 2019a). Por ello, es importante comprender la forma de vida de los hongos para conocer sus funciones ecológicas y su impacto sobre las diversas comunidades vegetales de cada ecosistema (Martin *et al.*, 2011), pero aún se desconocen los diferentes agentes y acciones responsables de la actividad de las comunidades de los hongos endófitos (Faticov *et al.*, 2021)

Dentro de los endófitos, los ascomicetos son los más abundantes en las hojas, seguidos de los basidiomicetos (Nilsson *et al.*, 2019a). Los ascomicetos son hongos pertenecientes al filo Ascomycota, y comprenden los hongos formadores de líquenes y los principales hongos patógenos de cultivos agrícolas responsables de causar enfermedades en las plantas que, junto con los oomicetos y las bacterias patógenas, dan lugar a graves pérdidas agrícolas (Hua *et al.*, 2018; Peay *et al.*, 2016).

Dentro de los hongos basidiomicetos se encuentran los hongos ectomicorrícicos y los descomponedores de la madera, (Peay *et al.*, 2016), destacando el grupo Agaricomycotina. Este engloba a los hongos de la podredumbre blanca responsables de la despolimerización y mineralización de la lignina que utilizan para obtener energía y carbono a partir de los carbohidratos de la pared celular (Martin *et al.*, 2011).

A continuación, se recogen las temáticas y las principales conclusiones las que han llegado los pocos estudios de metagenómica en los que se describen las comunidades fúngicas presentes en ecosistemas mediterráneos.

Entre los primeros estudios de descripción e identificación de hongos en ecosistemas mediterráneos, se cuentan el de Saitta *et al.*, (2018) y el de Ruiz Gómez *et al.*, (2019) realizados mediante *metabarcoding*. En ellos compararon la diversidad fúngica de suelos de ecosistemas mediterráneos con especies forestales del género *Quercus* donde observaron un notable predominio de basidiomicetos, seguido de ascomicetos y zigomicetos. En el caso del estudio de Saitta *et al.*, (2018) se concluyó que la riqueza de especies de árboles presentes en el medio influyen sobre la riqueza y diversidad de hongos endófitos, mientras que los factores abióticos (la altitud, el clima y la edafología) apenas influyen. En cambio, en el estudio de Ruiz Gómez *et al.*, (2019) observaron que el estado sanitario de las encinas afectadas por la seca y la abundancia de patógenos oomicetos, vegetales y saprótrofos, tenían cierta influencia sobre los basidiomicetos.

También hay unos pocos estudios de descripción e identificación de diversidad fúngica en suelos forestales. En ellos trabajan con muestras de suelos de castaños de más de 100 años de ecosistemas mediterráneos de Portugal, y en ambos (Baptista *et al.*, (2015) y Reis *et al.*, (2017)), observaron una elevada diversidad fúngica en la cual predominaban los ascomicetos seguidos de basidiomicetos y, en menor proporción, los zigomicetos.

Otros estudios se centran en la identificación de hongos a partir de hojas mediante *metabarcoding*. En uno de ellos, Fernandez-Conradi *et al.*, (2019), identificaron hongos endófitos de las hojas de castaños y de las agallas producidas por la avispa invasora, *Dryocosmus kuriphilus*, en el sur de la Toscana (Italia) y observaron diferencias en la riqueza y la diversidad de hongos endófitos entre las hojas y las agallas analizadas, siendo mayor en los tejidos de las hojas con predominio de los ascomicetos. Del mismo modo, Taudière *et al.*, (2018) identificaron una comunidad de hongos endófitos de ascomicetos en hojas de pino negro corso en el estudio realizado en la isla de Córcega.

1.3. Medición de la biodiversidad basada en secuenciación

1.3.1. La secuenciación nucleotídica

Las técnicas tradicionales de medida de biodiversidad, como las técnicas de cultivo puro o estudios genéticos basados en la secuenciación enzimática de Sanger, desarrollada en los años 70 (Sanger & Coulson, 1975), tienen grandes limitaciones a la hora de estudiar la complejidad de las comunidades microbianas de los diferentes ecosistemas (Deiner *et al.*, 2017; Fuhrman, 2009; Ruppert *et al.*, 2019), ya que muchos microorganismos no son cultivables y la secuenciación de Sanger sólo permite estudiarlos de uno en uno. Debido a esto, cada vez más se emplean las técnicas meta-ómicas para el estudio de la biodiversidad microbiana (Abdelfattah *et al.*, 2018).

A principios del siglo XXI, aparecieron los métodos de pirosecuenciación y *Next Generation Sequencing* (NGS) o secuenciación de nueva generación. Estas últimas son actualmente denominadas *High-Throughput Sequencing* (HTS) o secuenciación masiva, surgidas de nuevas generaciones de secuenciadores con la aplicación de técnicas de secuenciación en paralelo, lo que permite analizar las secuencias nucleotídicas de numerosos organismos (del orden de miles) a la vez (Hernández *et al.*, 2019). La aparición de las técnicas de secuenciación de nueva generación y

secuenciación masiva han supuesto un cambio radical a la hora de estudiar la biodiversidad (Deiner *et al.*, 2017; Peay *et al.*, 2016) y el control biológico de los ecosistemas (Deiner *et al.*, 2017; Estensmo *et al.*, 2021), ya que permiten secuenciar de forma rápida el ADN contenido en muestras ambientales y asociar cada una de las secuencias de ADN resultantes con una categoría taxonómica. Estas técnicas permiten el análisis de millares de secuencias. Además, son metodologías capaces de dar lugar una gran cantidad de fragmentos de ADN mediante una única secuenciación, lo que se traduce en un mayor rendimiento del proceso y un menor coste en comparación con otras técnicas convencionales como la secuenciación de Sanger (Illumina, 2021a; Peay *et al.*, 2016; Taş *et al.*, 2021).

De esta manera, resulta abordable el estudio de la biodiversidad, empezar a analizar la función de los distintos microorganismos en los ecosistemas (Taş *et al.*, 2021) y analizar sus relaciones evolutivas (Dupré & O'Malley, 2007) mediante la identificación de un elevado número de taxones distintos de forma rápida a partir de una única muestra. Entre estos métodos se encuentran las técnicas de segunda generación como el *metabarcoding* utilizando Illumina® (Ruiz Gómez *et al.*, 2019): una plataforma de secuenciación por pares, que lleva a cabo la lectura del fragmento de ADN por los dos extremos y permite realizar una estimación del tamaño del fragmento de ADN inicial y ubicarlo en el genoma (Santamaría González & Lezana Rosales, 2018). Esta tecnología se ha utilizado con diferentes objetivos, como la secuenciación completa y profunda de regiones específicas del genoma, la secuenciación del ARN para analizar el transcriptoma (variantes del ARN mensajero) y para analizar lugares de unión, o análisis de expresión génica y factores epigenéticos, así como para el estudio del microbioma en distintas situaciones, o la identificación de patógenos, entre otras aplicaciones (Illumina, 2021b).

En especial, las técnicas de secuenciación masiva son herramientas muy empleadas actualmente para la identificación de la diversidad alfa y beta de comunidades fúngicas, ya que son capaces de secuenciar millones de veces e identificar miles de taxones de hongos a nivel de especie de una muestra (Anslan *et al.*, 2018; Baldrian *et al.*, 2021).

Por lo general, las técnicas de secuenciación incluyen las siguientes etapas:

- Fragmentación del ADN y unión de adaptadores en los extremos de los fragmentos. La totalidad de fragmentos de ADN asociados a los adaptadores se denomina librería.

- Selección de zonas de ADN de interés antes de secuenciar mediante hibridación en fase sólida y amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las plataformas de segunda generación requieren amplificación de los fragmentos de ADN, mientras que las plataformas de tercera generación esto ya no es necesario.
- Unión de los fragmentos de ADN amplificados a una superficie sólida para realizar el proceso de secuenciación.
- Secuenciación de los fragmentos de ADN.
- Obtención de archivos de la secuenciación, alineamiento de lecturas con genomas de referencia mediante plataformas informáticas y creación de base de datos con los resultados obtenidos. Las técnicas de secuenciación nueva generación crean tres tipos de archivos: uno en formato FASTQ para el almacenamiento de lecturas, SAM (*Sequence Alignment Map*) / BAM (*Block Alignment Map*) para el alineamiento y VCF (*Variant Call Format*) para la anotación (Santamaría González & Lezana Rosales, 2018).

Hoy en día se encuentran disponibles una gran variedad de plataformas para la secuenciación masiva. Como se refleja en la Tabla 1, según Hernández *et al.*, (2019) a lo largo de los años distintas empresas han desarrollado metodologías con diferentes bases técnicas y han generado plataformas cuyo rendimiento, tamaño medio y máximo de las lecturas y tipo y frecuencia de los errores es muy variable. Así, para cada aplicación de la secuenciación, se puede elegir la mejor plataforma.

Tabla 1. Principales tipos de secuenciadores masivos y sus características (Hernández *et al.*, 2019).

Secuenciador	Compañía	Año ^a	Química	Máxima longitud de lectura	Máx. rendimiento/carrera	Ratio de error (%)	Máx. n.º de secuencias/carrera
454 GS FLX	Roche	2004	Pirosecuenciación-emulsión	700-800 pb	0,7 Gb	1	5 × 10 ⁵
Genome Analyzer GA	Solexa	2006	Síntesis-terminadores-clusters	2 × 100 pb	1 Gb	~0,1	1 × 10 ⁸
SOLID [®]	Life Technologies	2007	Ligación-emulsión	75 + 35 pb	150 Gb	~5	1.400 × 10 ⁶
Ion Torrent PGM [™]	Life Technologies	2010	Síntesis-emulsión-detección protones	200-400 pb	2 Gb	~1	0,4-5,5 × 10 ⁶
Proton [™]	Life Technologies	2012	Síntesis-emulsión-detección protones	200 pb	10 Gb (actualmente ~100 Gb)	~1	60-80 × 10 ⁶
PacBio [®]	Pacific Biosciences	2010	SMRT	6-8 kb (máx. 15 kb)	3 Gb/día	~13	370.000 × 10 ⁶
HiSeq	Illumina	2010	Síntesis-terminadores-clusters	2 × 150 pb (250 pb en modo <i>rapid run</i>)	1.500 Gb	~0,1	5.000 × 10 ⁶
MiSeq	Illumina	2011	Síntesis-terminadores-clusters	2 × 300 pb	15 Gb	~0,1	25 × 10 ⁶
Nextseq	Illumina	2014	Síntesis-terminadores-clusters	2 × 150 pb	120 Gb	~0,1	260 × 10 ⁶
Novaseq	Illumina	2017	Síntesis-terminadores-clusters	2 × 250 pb	4.800-6.000 Gb	~0,1	20.000 × 10 ⁶
MinION [™]	Oxford Nanopore	2014	SMRT	300 kb	42 Gb	≥ 4	4,4 × 10 ⁶

SMRT: single molecule real-time.
^a Año de introducción en el mercado.

1.3.2. Secuenciación de muestras ambientales: metagenómica y metabarcoding

Las tecnologías de secuenciación que se explican a continuación emplean material genético aislado directamente a partir de muestras ambientales (agua, suelo, hojas, madera, etc.) denominado ADN ambiental, sin previo aislamiento individual del organismo objeto de estudio (Creer *et al.*, 2016; Deiner *et al.*, 2017; Thomsen & Willerslev, 2015). A partir de la información recogida en las muestras ambientales de ADN ambiental, cuyas características dependen de la biomasa, edad, nutrición del organismo, fisiología, historia vital y manejo del espacio, se pueden detectar y clasificar especies sin tener previo conocimiento de estas y sin alterar los ecosistemas (Ruppert *et al.*, 2019).

La metagenómica es una ciencia dedicada al análisis molecular del genoma de las comunidades microbianas a través de la extracción y secuenciación del ADN de muestras ambientales (Dupré & O'Malley, 2007; Singh *et al.*, 2009; Xu, 2006), para caracterizarlas e identificar su diversidad y distribución sin el empleo de técnicas de aislamiento ni cultivo de microorganismos (Creer *et al.*, 2016; Doolittle & Zhaxybayeva, 2010). A partir de una abundante mezcla de ADN, gracias a la metagenómica se pueden comprender mejor cada uno de los procesos biológicos que tienen lugar en las comunidades microbianas de los ecosistemas (Taş *et al.*, 2021), sus interacciones y la

complejidad de sus relaciones evolutivas (Dupré & O'Malley, 2007). Asimismo, permite dar solución a problemas a los que tiene que hacer frente la humanidad en diferentes ámbitos como en biomedicina y en la gestión agrícola y medioambiental (National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications, 2007).

Entre las herramientas más habituales de la metagenómica, destaca el *metabarcoing*, una herramienta molecular clave para realizar el seguimiento de la composición de la biodiversidad de los ecosistemas (Guerrieri *et al.*, 2021; Makiola *et al.*, 2019). Consiste en identificar taxonómicamente las diferentes categorías microbianas presentes en una muestra de ADN de entornos naturales o artificiales, amplificada por cebadores de PCR y secuenciada en un sistema de alto rendimiento como puede ser Illumina® o Ion Torrent® (Adamo *et al.*, 2020; Creer *et al.*, 2016; Deiner *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2013; Ruppert *et al.*, 2019). Esto genera una colección de variantes genéticas (similares a los “códigos de barras”) de material genético, cada una de las cuales corresponde con una categoría taxonómica (típicamente, una especie). Así, la población microbiana presente en la muestra ambiental (suelo, plantas, madera, sedimentos o agua), se caracteriza a partir del ADN de la sus componentes (Ruppert *et al.*, 2019).

Gracias al *metabarcoing* se pueden estudiar las diferentes comunidades microbianas desconocidas presentes en los ecosistemas a partir de muestras ambientales, comprender su estructura, su función en el medio (Estensmo *et al.*, 2021; Lücking *et al.*, 2021; Ruppert *et al.*, 2019), su relación con diversos síntomas de enfermedades de plantas (Ruiz Gómez *et al.*, 2019) y su efecto con las alteraciones antropogénicas y medioambientales (Adamo *et al.*, 2020). De esta forma, se pueden identificar los modelos de diversidad patógena que afectan a las plantas en función del tipo del uso del suelo (Makiola *et al.*, 2019) y estudiar la manera en la que las plantas y los microorganismos se adaptan a las diversas condiciones ambientales (Abdelfattah *et al.*, 2018).

Otra de las aplicaciones del *metabarcoing* es la caracterización de comunidades microbianas a disposición de la comunidad científica (Baldrian *et al.*, 2021). Para ello, se analiza la región de ADN ribosómico nuclear (ADNr), correspondiente en los hongos con la región genética 18S, común en los organismos eucariotas, como se muestra en la Figura 2. La región del espaciador transcrito interno (ITS) es la mejor región del ADN ribosómico para diferenciar taxonómicamente los hongos de una población fúngica a nivel de especie (Schoch *et al.*, 2012), por su altísima variabilidad. Puede dar lugar a

una variación intraespecífica y a su vez estar ligada a una mayor división de especies durante el análisis (Estensmo *et al.*, 2021; Molik *et al.*, 2021).

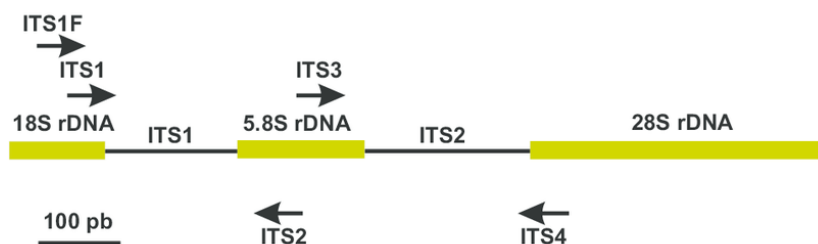


Figura 2. **Región de ADN ribosómico (ADNr) de hongos y de espaciadores transcritos internos (ITS)** (Fontecha *et al.*, 2012)

1.3.3. Herramientas de análisis de secuencias: la bioinformática

La acumulación de datos derivados de la secuenciación masiva de nueva generación, (NGS), requiere sofisticadas herramientas para comprender la importancia de las diferencias observadas entre organismos y ayudar tanto a nivel interespecífico (como la identificación de especies y OTUs), como a nivel intraespecífico (identificación de genes y variantes alélicas). En respuesta a la necesidad de comparar y analizar genomas completos o múltiples variantes biológicas de secuencias nucleotídicas, junto con su análisis estadístico, apareció la novedosa disciplina de la bioinformática, cuyo auge se puede vincular a la secuenciación completa del genoma humano en el año 2001. La bioinformática consiste en aplicar una serie de herramientas de cálculo y análisis (BLAST y Ensembl) para interpretar datos biológicos (Bayat, 2002). En plena expansión de las técnicas de secuenciación, se hizo necesario analizar un enorme volumen de secuencias de ADN obtenidas, ya sea mediante secuenciación de nueva generación o por secuenciación masiva en análisis metagenómicos como de *metabarcoding*. Para ello, la metagenómica emplea sistemas informáticos de programación como R, entre otros, y de sistemas operativos como Linux con el fin de buscar patrones en la información biológica observada y comprender procesos complejos mediante modelos biológicos (Xu, 2006).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio es caracterizar la biodiversidad fúngica presente en distintos ecosistemas de Castilla y León en relación con su estado sanitario, mediante la aplicación de *metabarcoding* sobre muestras de madera.

Dicho objetivo corresponde a una parte del proyecto *LIFE MycoRestore* titulado “*Innovative use of mycological resources for resilient & productive Mediterranean forests threatened by climate change*”, en el cual se muestrean y estudian diferentes regiones mediterráneas de España, Italia y Portugal.

El estudio de la biodiversidad en madera, a partir de *barcoding* de hongos es un objetivo complejo que se ha abordado recientemente, para el que se dispone de poca información bibliográfica con la que contrastar los resultados. Por consiguiente, hemos dividido este objetivo principal en una serie de objetivos específicos:

- Obtener ADN a partir de muestras de madera de diferentes especies de árboles sanas y enfermas y de distintos ecosistemas mediterráneos de Castilla y León (España) de suficiente calidad y en suficiente cantidad como para realizar secuenciación de nueva generación (NGS) con ellas.
- Describir y cuantificar la biodiversidad de comunidades fúngicas presentes en los ecosistemas de bosque mediterráneo seleccionados.
- Analizar posibles diferencias entre las distintas funciones que desempeñan las comunidades fúngicas de las muestras de árboles sanos y enfermos de cada lugar de muestreo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para la realización de este estudio de investigación, se han empleado muestras de madera de cuatro especies de árboles (*Quercus ilex*, *Quercus pyrenaica*, *Quercus suber* y *Castanea sativa*), con distintos estados sanitarios, procedentes de cuatro localidades diferentes de la provincia de Salamanca (La Alamedilla, El Cubo de Don Sancho, Linares

de Riofrío y Valdelosa). Dichas muestras fueron facilitadas por el Departamento de Patología Forestal de la E.T.S.I.I.A.A. de la Universidad de Valladolid, y fueron recogidas en el marco de la primera anualidad del proyecto *LIFE MycoRestore*. Este proyecto *LIFE* corresponde al Programa *LIFE* de la Unión Europea para el Medio Ambiente y la Acción Climática para el periodo 2021-2027. Los objetivos generales del Programa *LIFE* son muy ambiciosos y entre ellos se encuentran conseguir una sociedad justa y próspera en la UE, con una economía moderna, eficiente en recursos y competitiva, sin emisiones netas de gases de efecto invernadero en 2050 y con crecimiento económico desvinculado del uso de recursos. Además, persigue proteger, conservar y mejorar los espacios naturales de la UE, y proteger la salud y el bienestar de los ciudadanos de los riesgos e impactos asociados con el medio ambiente y el clima (Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico).

3.1.1. Descripción de las localidades, selección de parcelas y toma de muestras

El presente estudio se centra en cuatro zonas diferentes de la provincia de Salamanca (La Alamedilla, El Cubo de Don Sancho, Linares de Riofrío y Valdelosa), de 60 hectáreas cada una, aproximadamente. La localización de dichas zonas se recoge en los mapas de la Figura 3.

En cada una de dichas localidades se han definido subparcelas de árboles sanos y enfermos de cuatro especies forestales mediterráneas predominantes (*Quercus ilex*, *Quercus pyrenaica*, *Quercus suber* y *Castanea sativa*). La enfermedad característica de cada zona, así como la especie forestal predominante y las características de la zona se recogen en la Tabla 2.

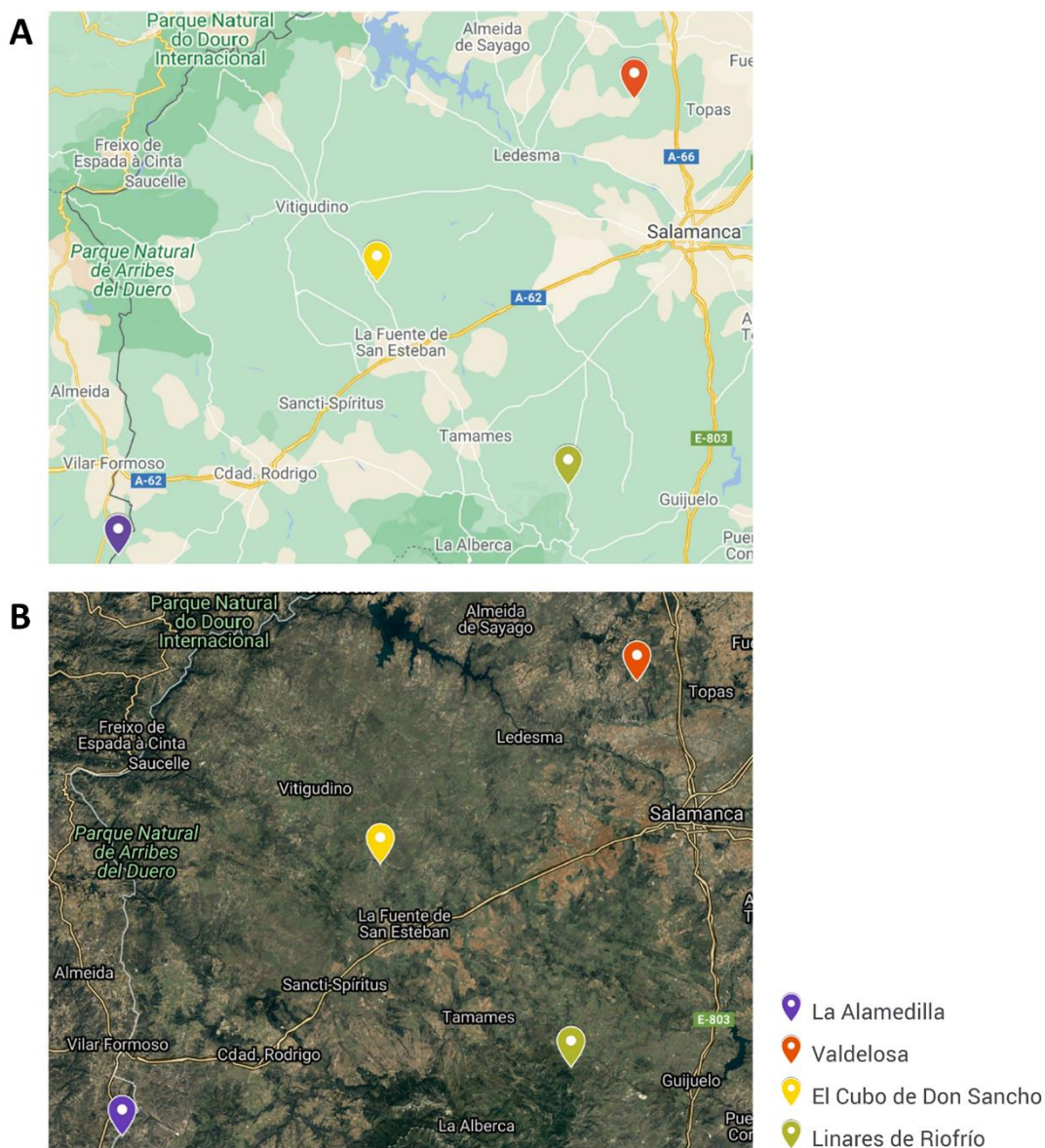


Figura 3. **Localización geográfica de las muestras.** Mapa (A) y mapa relieve (B) con localización de las zonas de muestreo (La Alamedilla, Valdelosa, El Cubo de Don Sancho y Linares de Riofrío) en la provincia de Salamanca. Imágenes reproducidas de Google Maps.

Tabla 2. **Resumen de especies y enfermedades forestales muestreadas.**

Localidad	Especie forestal	Enfermedad
La Alamedilla	<i>Quercus ilex</i>	La seca
El Cubo Don Sancho	<i>Quercus pyrenaica</i>	La seca
Linares de Riofrío	<i>Castanea sativa</i>	Tinta del castaño y chancro del castaño
Valdelosa	<i>Quercus suber</i>	La seca

Para cada una de las zonas estudiadas, entre noviembre de 2019 y enero de 2020 se seleccionaron visualmente 3 parcelas de árboles aparentemente sanos y 3 de árboles enfermos, que presentaran síntomas. De cada parcela se recogieron muestras de madera de 5 árboles que formasen una circunferencia y se mezclaron, siguiendo el esquema de la Figura 4. Para ello se empleó una técnica no destructiva de recolección del material vegetal basada en la percusión mediante cincel y martillo. Las muestras se tomaron a una altura de 1.5 m desde el suelo y a una profundidad aproximada de 1 cm desde la superficie cortical. De esta manera, hemos manejado un total de 12 muestrās de árboles aparentemente sanos (3 repeticiones x 4 localizaciones) y 12 muestrās enfermas entre todas las zonas.

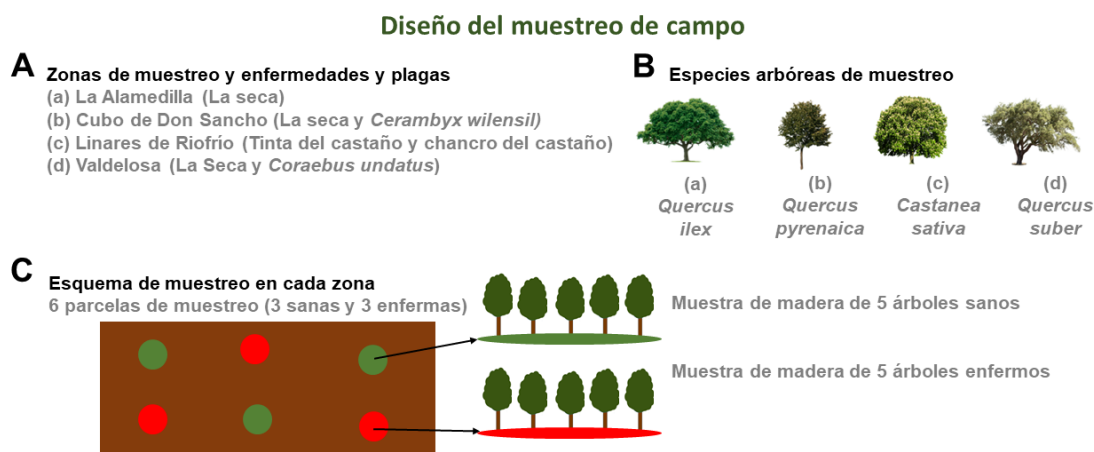


Figura 4. **Diseño del muestreo de campo.** **A.** Zonas de muestreo y composición de especies arbóreas. **B.** Imágenes representativas de las especies de árboles seleccionadas. **C.** Esquema de la selección de parcelas muestreadas (3 de árboles sanos y 3 de árboles enfermos), con 5 árboles por parcela. Este esquema se repite en cada zona de muestreo.

3.1.2. Descripción de enfermedades emblemáticas

Las parcelas se han seleccionado, en cada caso, por presentar enfermedades producidas por hongos, como la seca de los *Quercus* y la enfermedad de la tinta del castaño, ambas causadas por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, junto con *Phytophthora cambivora*, en algunas ocasiones en la enfermedad de la tinta del castaño, y la enfermedad del chancro del castaño, cuyo responsable es el ascomiceto *Cryphonectria parasítica* (Sánchez *et al.*, 2010) (Figura 5).

La seca de las especies del género *Quercus* consiste en la podredumbre de la raíz que puede afectar a un gran número de especies leñosas debido al oomiceto patógeno destructivo originario de Asia *Phytophthora cinnamomi* (Sena *et al.*, 2018; Valverde *et*

al., 2017). Causa una reducción del vigor, clorosis o marchitez de las hojas, defoliación y en ocasiones la muerte de los árboles (Caetano *et al.*, 2010; Hernández-Lambrano *et al.*, 2019). La aparición e incidencia de este oomiceto puede verse favorecida por los efectos del cambio climático que tienden a incrementar la temperatura y los periodos de sequía de los ecosistemas (Fernández-Habas *et al.*, 2019).

La enfermedad de la **tinta del castaño** consiste en la obstrucción de los vasos xilemáticos y en la secreción de una especie de líquido de color negro como consecuencia de la oxidación de los taninos en contacto con el aire, dando lugar un decaimiento progresivo de los brotes hasta la totalidad de la copa (Valverde *et al.*, 2017). En este caso, el agente causante de la enfermedad de la tinta del castaño también es el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* y en algunas ocasiones *Phytophthora cambivora* de forma individual o junto *P. cinnamomi* (Sánchez *et al.*, 2010).

La enfermedad del **chancro del castaño** es una de las amenazas fitosanitarias más graves de esta especie, causada por el hongo ascomiceto *Cryphonectria parasítica*, originario del este asiático. Este hongo causa la muerte de ramas y troncos (Valverde *et al.*, 2017; Junta de Andalucía) como consecuencia de la aparición de lesiones necróticas en la corteza de los árboles denominados chancros que provocan su marchitez (Rigling & Prospero, 2018).

3.1.3. Descripción de las localidades de estudio

La Alamedilla: la dehesa de encinas (*Quercus ilex*), tanto sanas como enfermas afectadas por especies del oomiceto *Phytophthora spp*, se encuentra a una altitud de 756 m a nivel del mar y se caracteriza por presentar una precipitación media anual entre 600-854 mm. Engloba 60 ha de superficie de dehesa de *Quercus ilex* con una densidad de 49 árboles/ha, con algunos cultivos de cereales y con aprovechamiento para pastoreo de vacas, ovejas y cerdos ibéricos. En este caso, las encinas se encuentran mezcladas con otros árboles como alcornoques y robles. Asimismo, algunos de los árboles de esta zona están afectados principalmente por la enfermedad de la seca causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*.

El Cubo de Don Sancho: dehesa dedicada al pastoreo de vacas con una superficie de 6000 ha y una densidad de 24 árboles/ha. Se encuentra a 736 m de altitud sobre el nivel del mar y presenta una precipitación media anual entre 500-700 mm. En ella predomina

el roble marojo (*Quercus pyrenaica*), algunos de ellos afectados por el insecto *Cerambyx wilensil* y por especies del oomiceto *Phytophthora spp*, siendo este último el principal causante de la seca de las quercíneas.

Valdelosa: la dehesa presenta 6000 ha de superficie con la mayor densidad de masa forestal de *Quercus suber* dedicada principalmente al aprovechamiento del corcho y al pastoreo de vacas y ovejas. Se encuentra a 842 m de altitud sobre el nivel del mar y presenta una precipitación media anual de 500-700 mm. En esta zona predominan los árboles de la especie *Quercus suber*, tanto sanos como enfermos, como consecuencia de la seca de las quercíneas y del insecto *Coraebus undatus*, seguida de las especies *Quercus ilex* y *Quercus pyrenaica*.

Linares de Riofrío: a 956 m de altitud sobre el nivel del mar y con una precipitación media anual entre 700-900 mm. Engloba 10 ha de bosque antiguo de castaños centenarios anteriormente abandonado y sin pastoreo, con mezcla de especies caducifolias y con una densidad de 1250 árboles/ha. En este caso, algunos de los árboles se encuentran afectados por la enfermedad de la tinta del castaño causada por los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora cambivora*, y por la enfermedad del chancro del castaño, causada por *Cryphonectria parasítica*. Debido a estas enfermedades, el castaño se considera una especie amenazada por las enfermedades fúngicas estudiadas como la tinta y el chancro del castaño, que han reducido notablemente la densidad de esta especie (Gil Sánchez *et al.*, 2007; Conedera *et al.*, 2016).

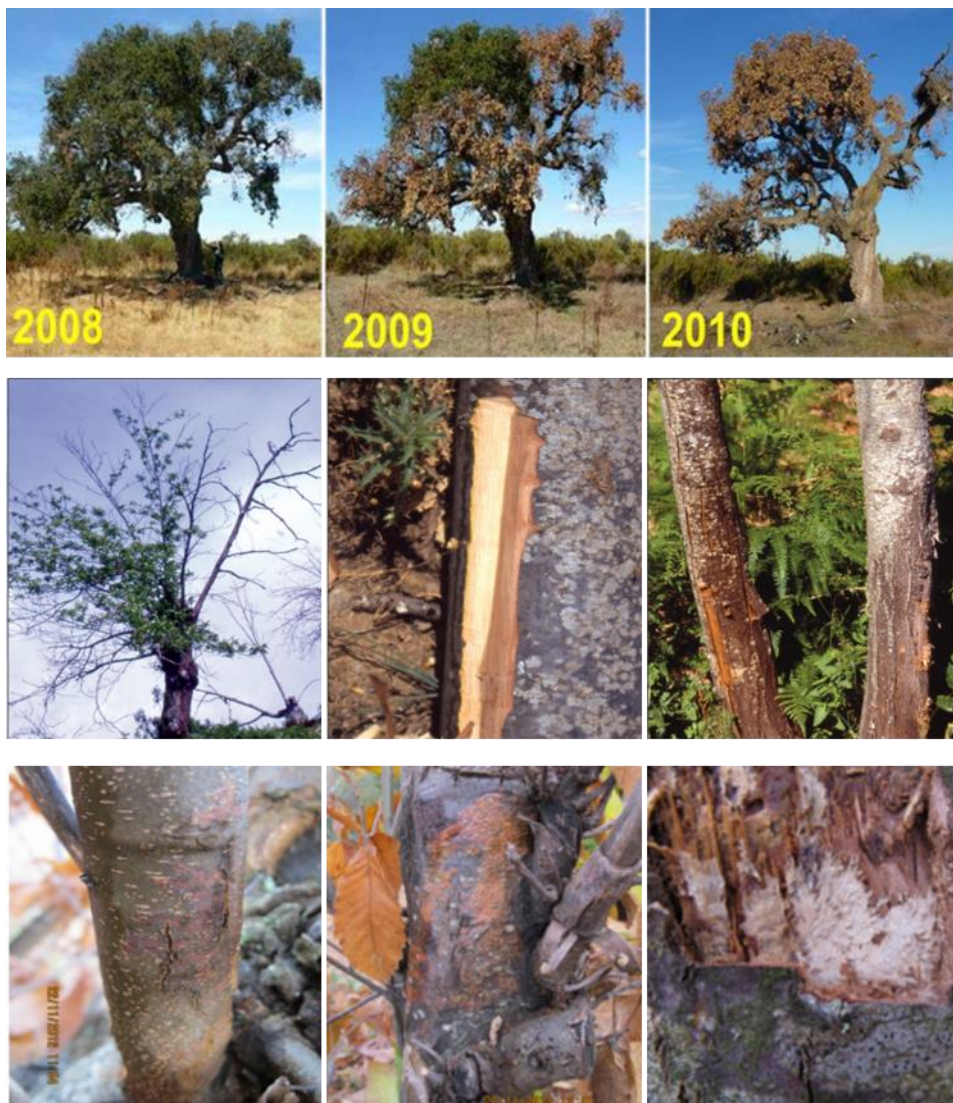


Figura 5. **Inspección visual de síntomas en especies arbóreas. Fila superior.** La seca de las especies del género *Quercus*. Imágenes reproducidas de <https://bit.ly/2Z5QJPj>. **Fila intermedia.** La enfermedad de la tinta del castaño. Imágenes reproducidas de <https://bit.ly/3DUB3NN>. **Fila inferior.** La enfermedad del chancro del castaño. Imágenes reproducidas de <https://bit.ly/3aQiyh9>.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparación de las muestras

Las muestras de madera utilizadas en este estudio habían sido congeladas con nitrógeno líquido y mantenidas en un congelador a -18°C en tubos Eppendorf.

Las muestras de madera fueron sometidas a una serie de tres lavados con el fin de eliminar la mayor cantidad de impurezas y polifenoles presentes en la madera y favorecer la ruptura de células para facilitar la extracción de ADN (Rachmayanti *et al.*,

2006). En primer lugar, se realizó un lavado con 1 mL de NaCl al 0,9%, seguido de un lavado con 1 mL de PVP al 7% y otro lavado con 1 mL de NaCl al 0,9%. Los lavados consistieron en una incubación en un baño seco a 65°C durante 10', con doble agitación en vórtex. Posteriormente, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5' para eliminar el sobrenadante.

Tras realizar los lavados correspondientes en las muestras de madera, se molieron en un molino (RETSCHMM 400) a 30 Hz durante 40' con cuatro bolas de wolframio o acero de 2 mm de diámetro y con el tampón correspondiente según el protocolo de extracción de ADN aplicado.

3.2.2. *Genética molecular*

3.2.2.1. Extracción y purificación de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron en los laboratorios del departamento de Producción Vegetal de la E.T.S.I.I.A.A. de la Universidad de Valladolid. Se utilizaron dos protocolos de extracción de ADN de material vegetal para comparar su efectividad, Doyle & Doyle (1990) adaptado a pequeños volúmenes y kit comercial de extracción de ADN de plantas E.Z.N.A.[®] de Omega Bio-tek (Figura 6).

Doyle & Doyle (1990) modificado

Se basa en la extracción de ADN con CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), adaptado a pequeños volúmenes y utilizando molinillo a partir de 200 mg de material vegetal congelado a -20°C.

Cada muestra de madera, después de los lavados indicados en el apartado 3.2.1., se molieron siguiendo el método indicado en el mismo apartado. El tampón de extracción utilizado en este caso tenía la siguiente composición: 100 mM Tris.HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl, 1% PVP, 2% CTAB y 0.4% beta-mercaptoetanol. Tras la molienda, se recuperó el sobrenadante de cada una y se pasó a un tubo Eppendorf limpio, se añadieron 100 µL de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico) y se incubaron los tubos en un baño de agua a 65°C durante 30' con agitación periódica mediante vórtex. A continuación, se centrifugaron los tubos a 13 krpm durante 5'; se eliminó el precipitado; se traspasó el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio y se añadieron 600

μL de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) frío. Se agitó la mezcla utilizando un vórtex y se volvió a centrifugar del mismo modo. Tras la centrifugación, se recuperaron 400 μL del sobrenadante, se traspasó a un tubo Eppendorf limpio y se añadió 1 mL de etanol 95° a 4°C de temperatura para su incubación en frío durante un mínimo de 12h. A continuación, se centrifugaron los tubos durante 10' a 13 krpm para eliminar el sobrenadante y se procedió a realizar los lavados con las soluciones de lavado 1 (0.2 M acetato sódico y 76% etanol) y 2 (10 mM acetato amónico y 76% etanol) previamente preparadas, con centrifugación y eliminación de sobrenadante entre lavados sin retirar el pellet. Por último, se dejaron secar los pellets en un concentrador SpeedVac ThermoFisher Scientific durante 10' y, una vez comprobado que estaban secos, se añadieron 100 μL de TE 10:1 (Tris-EDTA, 10 mM Tris.HCl a pH 7.4 y 1 mM EDTA). Los ADNs extraídos se conservaron a -20°C.

Kit comercial de extracción de ADN de plantas E.Z.N.A.® de Omega Bio-tek

Se trata de un método de extracción de ADN de tejidos vegetales capaz de eliminar polisacáridos, compuestos fenólicos e inhibidores enzimáticos de las muestras vegetales. Emplea ARNasa para purificar el ADN extraído de forma que se elimine el ARN presente. La extracción se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Después de la fase de molienda de las muestras, se añadieron 800 μL del buffer P1 y se incubaron a 65°C en un baño de agua durante 10' con agitación periódica con vórtex. A continuación, se añadieron 140 μL del buffer P2 en cada tubo, se mezclaron con vórtex y se centrifugaron durante 10' a 10 krpm. Tras la centrifugación, se recuperaron en torno a 700 μL del sobrenadante en cada tubo, se añadieron 490 μL de isopropanol y se mezclaron con vórtex antes de ser centrifugados a 14 krpm durante 2'. Una vez centrifugados los tubos, se elimina el sobrenadante sin retirar el pellet resultante y se ponen los tubos bocabajo sobre papel absorbente para eliminar el isopropanol restante. A continuación, se añadieron en cada tubo 300 μL de agua destilada a 65°C, se mezclaron con vórtex y se incubaron en el baño de agua a 65°C durante 3'. Acto seguido, se añadieron 4 μL de ARNasa, 150 μL del buffer P3 y 300 μL de etanol. Después, se pasó todo el líquido del tubo a una columna que incluye el kit de extracción y se centrifugó a 10 krpm durante 1'. Tras la centrifugación, se realizaron dos lavados de 650 μL cada uno con la solución de lavado a la que se le añadió 100 μL de etanol 100%. Después, se centrifugaron las columnas vacías a 10 krpm dos veces durante 2' para eliminar el etanol restante, para decantar el sobrenadante y eliminar las trazas de

etanol, respectivamente. A continuación, se transfirió la columna a un tubo Eppendorf limpio, se añadieron 50 μ L de buffer de elución a 65°C de temperatura, se dejaron durante 3-5' a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10 krpm durante 1'. Por último, el paso anterior se repitió y se almacenó el ADN extraído en el congelador a -20°C.

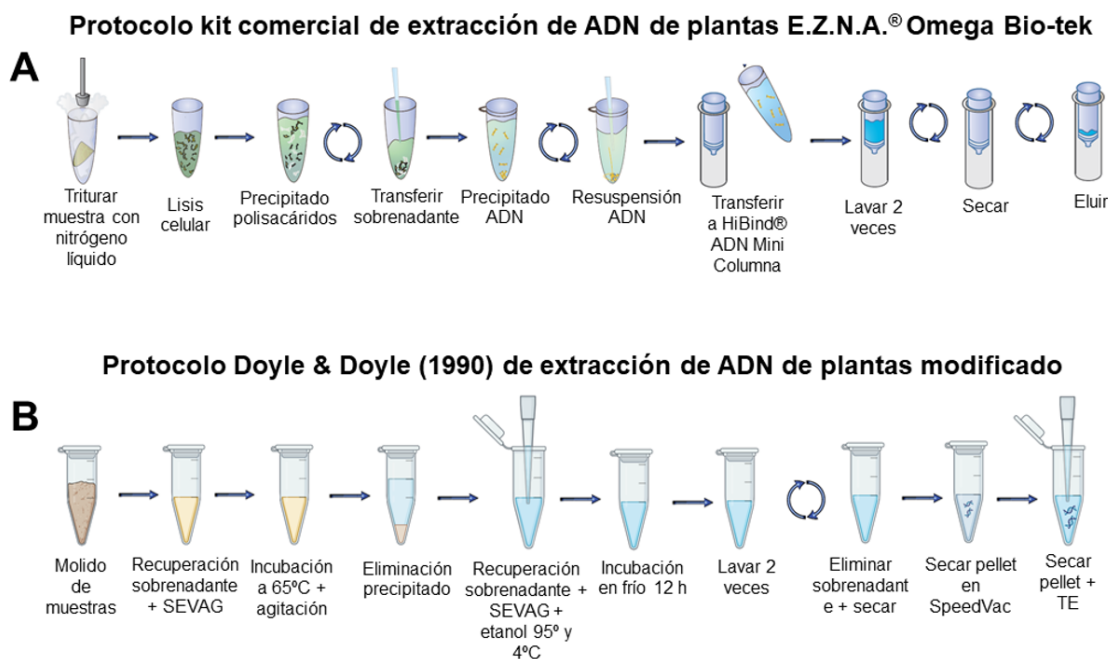


Figura 6. **Protocolos de extracción de ADN de material vegetal.** **A.** Protocolo kit comercial de extracción de ADN de plantas E.Z.N.A.® Omega Bio-tek. **B.** Protocolo Doyle & Doyle (1990) de extracción de ADN de planta modificado.

3.2.2.2. Medidas de calidad de la extracción de ADN

La calidad y cantidad de ADN recuperado en cada caso se midió de dos maneras: i) con equipo Qubit (ThermoFisher Scientific) de fluorimetría del Departamento de Patología Forestal y ii) con el espectrofotómetro disponible en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) del Campus de Palencia de la Universidad de Valladolid.

El fluorómetro, además de cuantificar el ADN, permite medir de forma rápida y precisa la cantidad de contaminantes (ARN y proteínas) presentes en las muestras. Para ello, se utilizan fluorómetros Qubit específicos a las moléculas de análisis que sólo emiten fluorescencia cuando se unen a las moléculas de estudio, en este caso, a moléculas de ADN. El fluorómetro que se emplea es más sensible que la absorbancia a UV (ultravioleta).

El espectrofotómetro permite determinar la cantidad y la pureza del ADN extraído presente en las muestras, gracias a la capacidad de absorción de los diferentes compuestos contenidos en las muestras a diferentes longitudes de onda (280, 260 y 230 nm). En nuestro caso, las cantidades de ADN recuperadas estaban por debajo del límite de detección del aparato empleado, por lo que los valores obtenidos no resultaron fiables.

3.2.3. Secuenciación masiva y análisis bioinformático

Una vez cuantificadas, las muestras de ADN fueron enviadas para su secuenciación a la empresa Biome Makers S.L. (España), que analiza la biología del suelo mediante la secuenciación del ADN extraído con el empleo de técnicas moleculares. Para ello se combinaron las muestras de los 5 árboles seleccionados en cada parcela, de forma que se secuenciaron 3 muestras compuestas por madera de 5 árboles sanos y 3 muestras compuestas por madera de 5 árboles enfermos, por cada zona de muestreo.

Para caracterizar la diversidad de comunidades microbianas fúngicas se amplificó la región ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) del gen ITS, mediante el empleo de cebadores específicos (Patente WO2017096385A1). La secuenciación se realizó en un equipo Illumina® MiSeq® (San Diego, CA, USA) aplicando la estrategia de secuenciación por pares o *paired-end* (2 x 300 bp).

En la Figura 7 se reflejan los pasos del proceso seguido para la identificación de la diversidad fúngica de las muestras de madera desde la toma de muestras hasta los análisis bioinformáticos realizados. La etapa 1 de Muestreo, fue íntegramente desarrollada en el Laboratorio de Patología Forestal de la UVa, así como la etapa 2.1, de extracción del ADN de cada muestra. El resto de las etapas de la Fase 2 (amplificación y secuenciación), así como la Fase 3-I (análisis bioinformático y adjudicación de OTUs), fue llevada a cabo por la empresa Biome Makers. La fase 3-II (análisis estadístico) es el cuerpo del presente estudio.

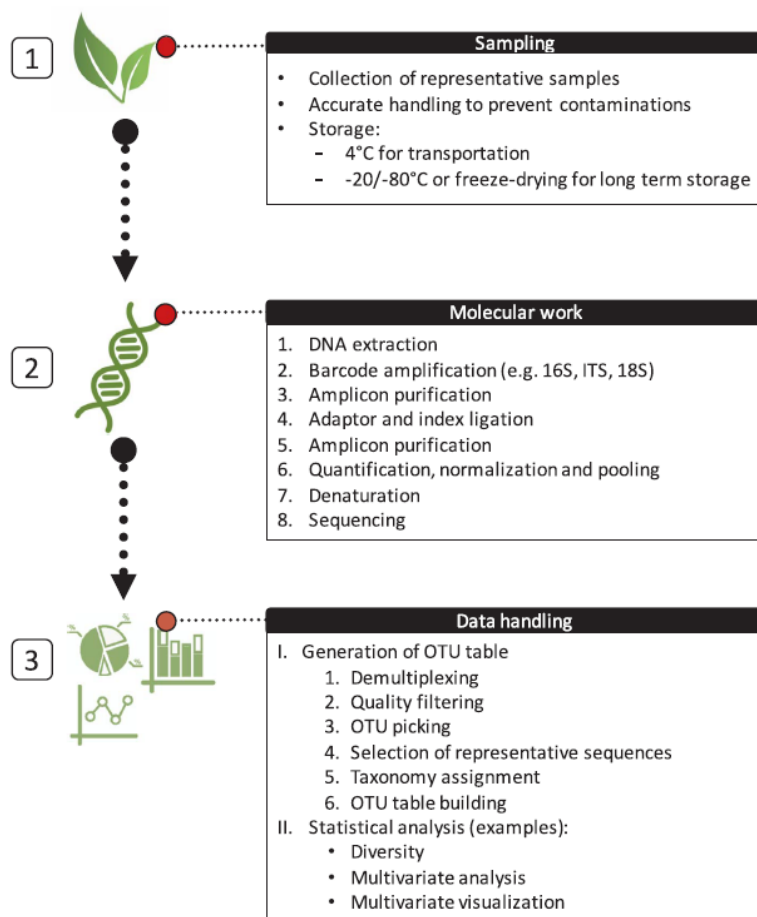


Figura 7. **Proceso de identificación fúngica realizado en las muestras de madera** (Abdelfattah *et al.*, 2018).

El análisis bioinformático se realizó siguiendo los protocolos propiedad de Biome Makers y protegidos por la patente WO2017096385A1, basados en la plataforma QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019). Se llevó a cabo un control de calidad de las secuencias para eliminar quimeras y adaptadores en los extremos (Edgar *et al.*, 2011). La asignación *de novo* a grupos de unidades taxonómicas (*operational taxonomic units*, OTU) se realizó mediante alineamiento y ensamblaje de las secuencias. Como criterio de identidad se determinó un 97% de similitud en el alineamiento. La clasificación de las OTUs en grupos taxonómicos conocidos se realizó enfrentando las secuencias más representativas con la base de datos UNITE (Nilsson *et al.*, 2019b).

Se realizó un análisis de rarefacción para controlar las diferencias en la profundidad de secuenciación entre muestras. Finalmente, se obtuvo una tabla de abundancias absolutas de especies de hongos y se estimaron las frecuencias relativas dentro de cada muestra (abundancias porcentuales). En la Tabla 3 se refleja un ejemplo representativo del formato de los datos.

Tabla 3. **Extracto de la tabla de abundancias.** La columna “Código” contiene los identificadores del servicio de secuenciación. La columna “Etiqueta” contiene los identificadores internos usados para almacenar las muestras. Las columnas “Parcela” y “Etiqueta” contienen la localización y el estado sanitario de las muestras. Las columnas con nombres de especies contienen la abundancia relativa detectada en cada muestra, de forma que el sumatorio de cada fila sea igual al 100%.

Código	Etiqueta	Parcela	Condición	<i>Absidia repens</i>	<i>Absidia spinosa</i>	<i>Zopfiella marina</i>
A3805Y	AD1	Alamedilla	<i>Diseased</i>	0.007	0	0
A3805L	AD2	Alamedilla	<i>Diseased</i>	0	0	0
A3805K	AD3	Alamedilla	<i>Diseased</i>	0	0	0
A3805J	AH1	Alamedilla	<i>Healthy</i>	0	0	0
A3805I	AH2	Alamedilla	<i>Healthy</i>	0	0	0
A3805H	AH3	Alamedilla	<i>Healthy</i>	0	0	0
A3805W	CD1	Cubo	<i>Diseased</i>	0	0	0.004
A3805V	CD2	Cubo	<i>Diseased</i>	0	0.05	0
A3805U	CD3	Cubo	<i>Diseased</i>	0	0	0
A3805T	CH1	Cubo	<i>Healthy</i>	0	0.03	0
A3805S	CH2	Cubo	<i>Healthy</i>	0	0	0
A3805R	CH3	Cubo	<i>Healthy</i>	0	0	0
A3805Q	LD1	Linares	<i>Diseased</i>	0	0	0
A3805P	LD2	Linares	<i>Diseased</i>	0	0	0.001
A3805O	LD3	Linares	<i>Diseased</i>	0	0	0
A3805Z	LH1	Linares	<i>Healthy</i>	0	0.009	0
A3805N	LH2	Linares	<i>Healthy</i>	0	0	0
A3805M	LH3	Linares	<i>Healthy</i>	0	0	0.003
A3805G	VD1	Valdelosa	<i>Diseased</i>	0	0.02	0.008
A3805E	VD2	Valdelosa	<i>Diseased</i>	0	0	0
A3805F	VD3	Valdelosa	<i>Diseased</i>	0	0	0
A3805D	VH1	Valdelosa	<i>Healthy</i>	0	0	0
A3805X	VH2	Valdelosa	<i>Healthy</i>	0.005	0.008	0.003
A3805C	VH3	Valdelosa	<i>Healthy</i>	0	0	0

3.2.4. Análisis de biodiversidad

3.2.4.1. Medida de diversidad alfa

La **diversidad alfa** es la diversidad interna de un lugar o una muestra específicos. En este caso se estimó mediante tres indicadores: la riqueza, el índice de Shannon y el índice de Simpson (Shannon, 1948; Simpson, 1949). Si se considera c_i el número de especies observadas i veces ($i = 1, 2, \dots$) y p_s la abundancia proporcional de la especie s ($s = 1, \dots, S$), entonces los indicadores de diversidad alfa pueden estimarse mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Riqueza} = \sum_s 1_{\{p_s > 0\}} = \sum_i c_i$$

$$\text{Índice de Shannon} = - \sum_s p_s \log(p_s) \leq \log(S)$$

$$\text{Índice de Simpson} = \frac{1}{\sum_s p_s^2} \leq S$$

Donde la riqueza representa el número total de especies observadas, el índice de Shannon representa la uniformidad en la distribución de abundancias de las especies y el índice de Simpson representa el inverso de la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar pertenezcan a la misma especie.

3.2.4.2. Medida de diversidad beta

La **diversidad beta** es la diversidad entre muestras. Se estimó de forma cuantitativa mediante el índice de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Se puede calcular mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Bray - Curtis} = \frac{\sum |x_{ij} - x_{ik}|}{\sum (x_{ij} + x_{ik})}$$

Donde j y k hacen referencia a las dos muestras a comparar, x_{ij} se corresponde con la abundancia de la especie i en el sitio j y x_{ik} es la abundancia de la especie i en el sitio k . Por tanto, el índice de Bray-Curtis representa la fracción de la comunidad fúngica que

se comparte entre dos muestras. Las muestras se ordenaron en función de este índice mediante un método de escalado multidimensional no métrico (NMDS).

El análisis de diversidad de nichos funcionales se llevó a cabo mediante la base de datos FungalTraits v1.2 (Pöhlme *et al.*, 2020). A cada especie de hongo se le asignaron las características funcionales descritas como “primarias” o, en su defecto, “secundarias”. La prevalencia de cada nicho funcional se estimó sumando las abundancias de las especies que lo presentaban.

Los índices de diversidad alfa se estimaron a partir de la tabla de abundancias absolutas. Los índices de diversidad beta y de diversidad funcional se estimaron a partir de la tabla de abundancias relativas y tras una preselección de aquellas comunidades fúngicas con una presencia del 0.001% en al menos el 50% de las muestras, al nivel taxonómico de familia (Venice *et al.*, 2021).

La estimación de los indicadores de biodiversidad se llevó a cabo en R v3.6.2 (R Core Team, 2019), mediante los paquetes *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013), *microbiome* (Lahti, 2019) y *vegan* (Oksanen *et al.*, 2020).

Las diferencias entre muestras sanas y enfermas se contrastaron mediante el test de Wilcoxon no paramétrico para muestras independientes, considerando significativo un p-valor < 0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este TFM se ha procedido a identificar la diversidad fúngica total de muestras de madera mediante NGS; y se tratará de identificar entre ellos a los hongos fundamentalmente “beneficiosos” y fundamentalmente “perjudiciales”. Para ello se aplicarán técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) sobre muestras de madera de árboles sanos y enfermos, de cuatro especies distintas (*Quercus ilex*, *Quercus pyrenaica*, *Quercus suber* y *Castanea sativa*) y en cuatro zonas diferentes de dehesa de la provincia de Salamanca. Una vez obtenidas las secuencias, se compararán los resultados con distintas bases de datos de secuencias y se interpretarán en relación con la bibliografía disponible.

4.1. Comparativa entre métodos de extracción de ADN

El primer objetivo del presente trabajo consistió en obtener material genético de suficiente calidad para ser enviado al servicio de secuenciación. Para ello se compararon dos protocolos, el de Doyle & Doyle (1990) modificado para pequeños volúmenes (Doyle, 1991) y un kit comercial E.Z.N.A.[®] (Omega Bio-tek, USA). En la Figura 8A se observa que la relación absorbancia 260/230 se observa que la proporción obtenida con el kit indica una mayor proporción de ADN y menos compuestos contaminantes (sales, fenoles, otros reactivos, polisacáridos, etc.), que con el método de Doyle. En la relación 260/280 es más homogénea con el método del kit que con el Doyle, ya que los resultados obtenidos con el método Doyle indican cierta contaminación de las muestras por ARN al no presentar ARNasa este método (Figura 8B). Por tanto, se decidió emplear el kit comercial para realizar todas las extracciones de ADN. En la Figura 8C puede comprobarse que con el método del kit comercial se obtuvo en todas las muestras una concentración de ADN muy similar entre 1-2 ng/ μ L, mientras que con el método Doyle se obtuvieron resultados más variables en cuanto a la cantidad de ADN, desde concentraciones insuficientes de ADN para secuenciar hasta concentraciones de ADN más elevadas que con el kit comercial.

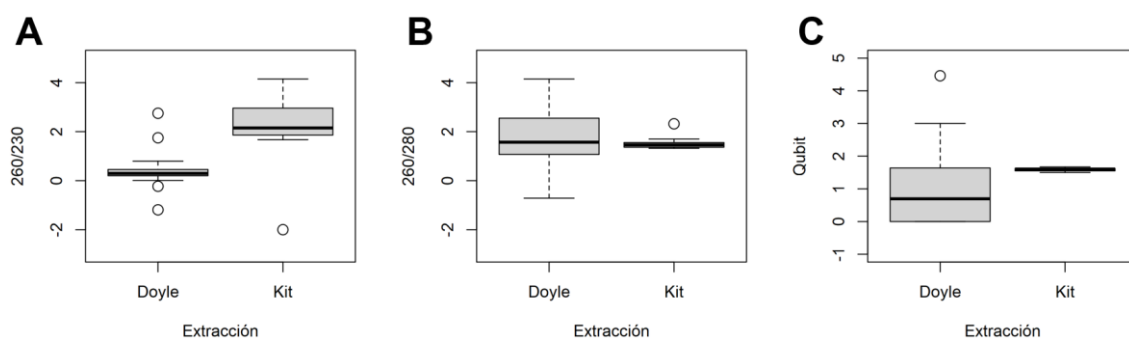


Figura 8. Comparativa entre el método de extracción de ADN de material vegetal Doyle & Doyle (1990) modificado y el kit E.Z.N.A.[®] de Omega Bio-tek. **A.** Relación absorbancia 260/230 indica la presencia de contaminantes (sales, reactivos, fenoles, polisacáridos etc.) en la proporción del método Doyle, mientras que la proporción del kit es favorable al DNA y no a los contaminantes. **B.** Relación de absorbancia 260/280 muestra contaminación de ARN en la proporción del método Doyle. **C.** Concentración de ADN en las muestras medidas con Qubit en función del método de extracción empleado.

La cantidad y pureza del ADN extraído es una de las diferencias más importantes a destacar en los resultados obtenidos entre los métodos empleados, al igual que se refleja en el estudio de (Cerutti *et al.*, 2019). En este caso, junto con la cantidad y la pureza de ADN obtenido, también se encuentra el tiempo necesario de ejecución de cada método. Apoyándose en los resultados obtenidos en el espectrofotómetro, el método del kit comercial de E.Z.N.A.[®] de Omega Bio-tek arroja resultados más

homogéneos en cuanto a cantidad y pureza de ADN y con un mayor rendimiento, debido a que la purificación del ADN con el kit es más eficaz, como demuestra la proporción de absorbancia a las distintas longitudes de onda. Con la fluorometría se obtuvieron valores de concentración de ADN más altos con las alícuotas de ADN extraído con el kit comercial, los cuales variaron alrededor de 1,5 ng/ μ L. Esto indica la dificultad de extraer ADN a partir de material vegetal como la madera, en comparación con la extracción de ADN a partir de tejidos de origen animal.

4.2. Análisis descriptivo de la biodiversidad

El segundo objetivo del presente trabajo consistió en cuantificar la biodiversidad de comunidades fúngicas presentes en los ecosistemas de bosque mediterráneo seleccionados. Las seis muestras analizadas en cada localización se corresponden con 3 parcelas sanas y 3 enfermas, cada una compuesta por cinco árboles.

4.2.1. Resultados de la secuenciación

Una vez purificado el ADN de cada muestra se mandaron a secuenciar a la empresa Biome Makers. En la Figura 9 puede comprobarse que el número de lecturas obtenidas en la secuenciación, a partir de las muestras procesadas con el kit comercial E.Z.N.A.[®] de Omega-Biotek, fue adecuado para continuar con el análisis bioinformático (profundidad media de lectura = 5×10^4).

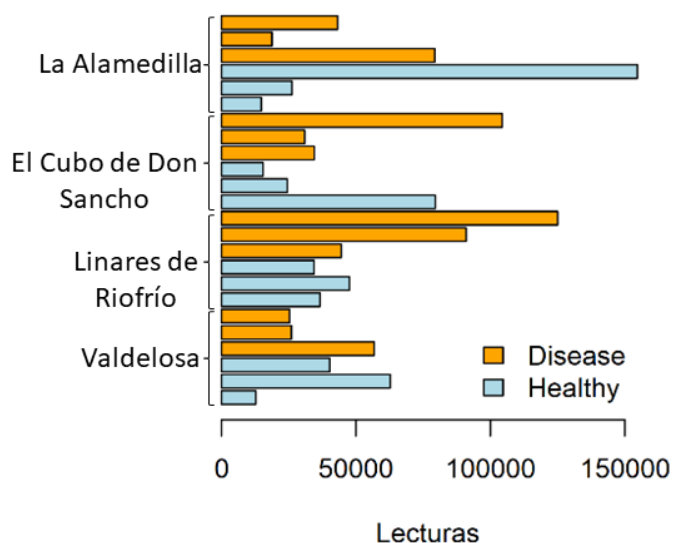


Figura 9. **Número de lecturas obtenidas por secuenciación en cada muestra de ADN extraída con el kit comercial.** En general, se observa un mayor número de lecturas en las muestras enfermas que en las sanas, independientemente del lugar de muestreo.

4.2.2. Descripción de la biodiversidad observada

En primer lugar, se representó la proporción de grupos taxonómicos a nivel de *phylum* (Figura 10). Se observa un predominio generalizado de los filos Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota, en ese orden y en todas las zonas de muestreo. Esta homogeneidad de filos fúngicos se observa tanto en muestras sanas como enfermas.

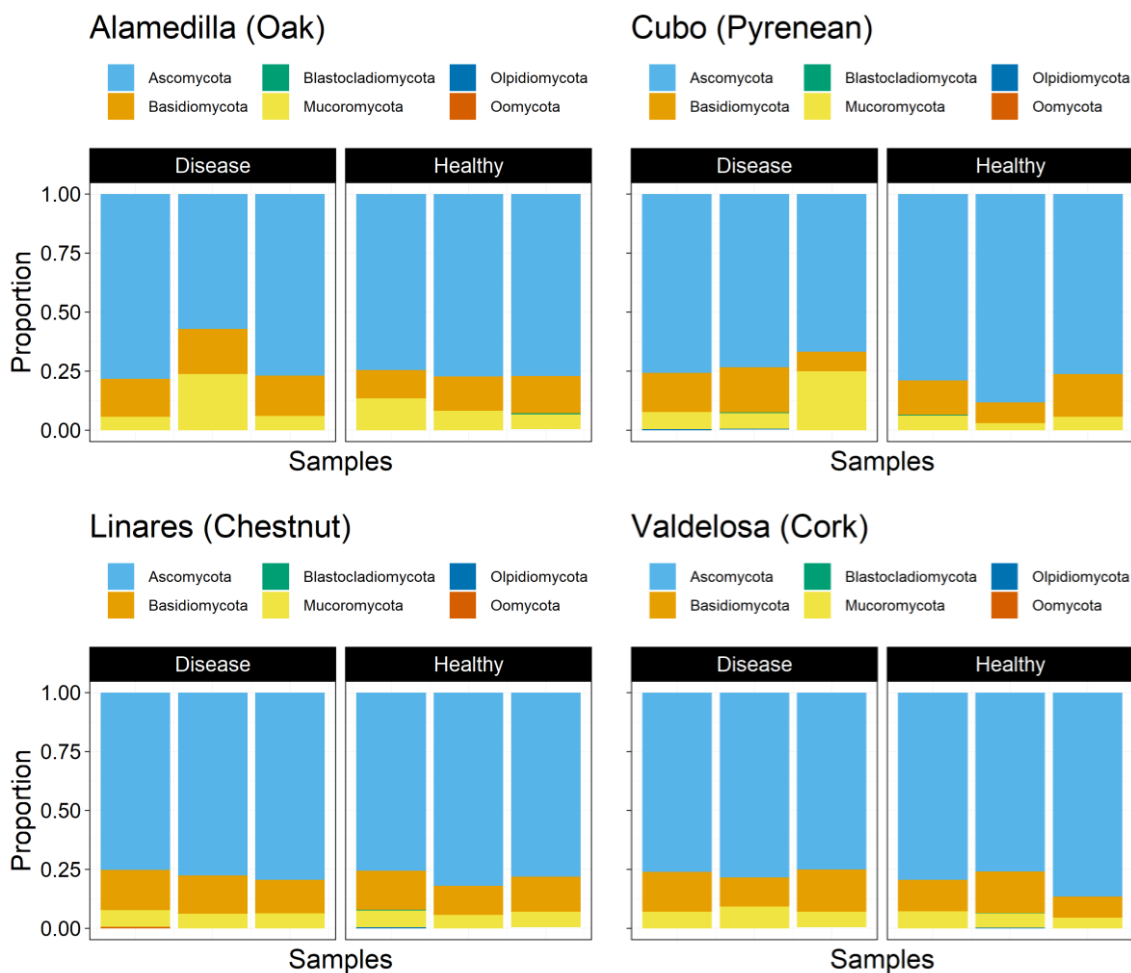
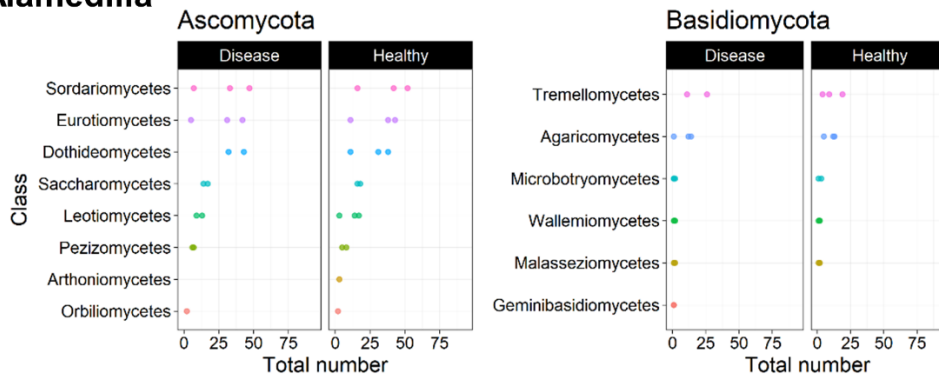


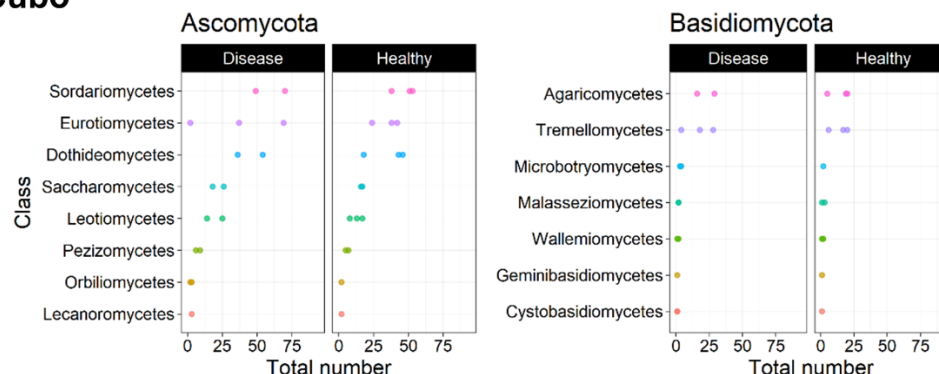
Figura 10. **Abundancia relativa a nivel de filo taxonómico.** En el eje horizontal se representan las parcelas, divididas en sanas y enfermas. En el eje vertical se muestra la abundancia proporcional por parcela.

En la Figura 11 se representa la distribución de clases dentro de los dos filos mayoritarios mencionados. El filo Ascomycota está dominado por la clase Sordariomycetes, tanto en las muestras sanas como en las enfermas de todos los lugares de muestreo. Además, respecto al filo Basidiomycota se puede observar la dominancia de dos tipos de clases: Agaricomycetes, en muestras de madera sana y enferma de El Cubo de Don Sancho y Valdelosa y Tremellomycetes, en muestras de madera sana y enferma de La Alamedilla y Linares de Riofrío.

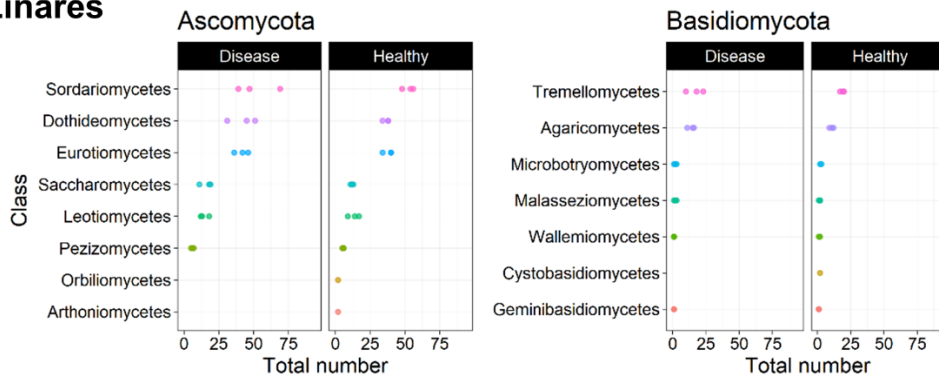
Alamedilla



Cubo



Linares



Valdelosa

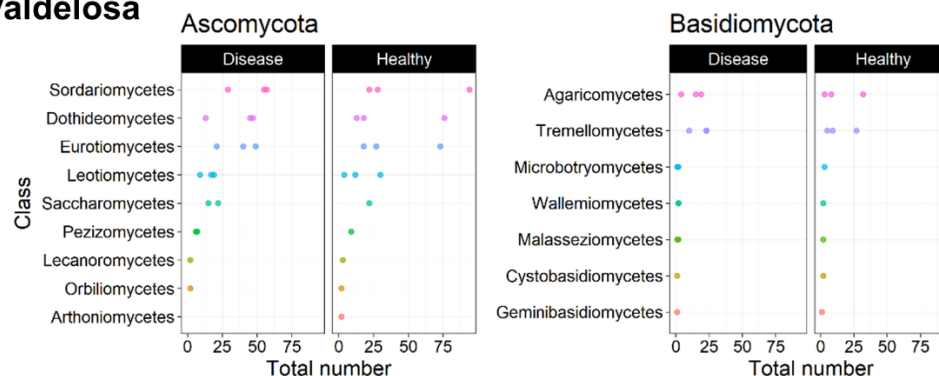


Figura 11. **Abundancia a nivel taxonómico de clase.** Se representa la distribución a nivel taxonómico de clase para los filos más abundantes. En el eje vertical se indican las clases taxonómicas de Ascomycota y Basidiomycota presentes en las muestras de cada uno de los lugares de muestreo. En el eje horizontal se muestra el número total de cada una de las clases taxonómicas encontradas en las muestras sanas y enfermas de cada lugar de muestreo.

En segundo lugar, se analizó la biodiversidad interna de las muestras mediante la estimación de índices de diversidad alfa (Figura 12). Para mayor claridad, el número total de especies también aparece representado en la Tabla 4. No se encontraron diferencias significativas entre parcelas sanas y enfermas en las zonas de muestreo seleccionadas (p -valor > 0.05). Se observa que existe una gran variabilidad dentro de las réplicas sanas y enfermas. Esto implica que es posible encontrar muestras con elevada riqueza de especies que están dominadas por unas pocas especies muy abundantes (por ejemplo, en las réplicas sanas de Linares de Riofrío), así como muestras con escaso número de especies con abundancias repartidas de forma equilibrada (por ejemplo, en réplicas enfermas de La Alamedilla y El Cubo de don Sancho).

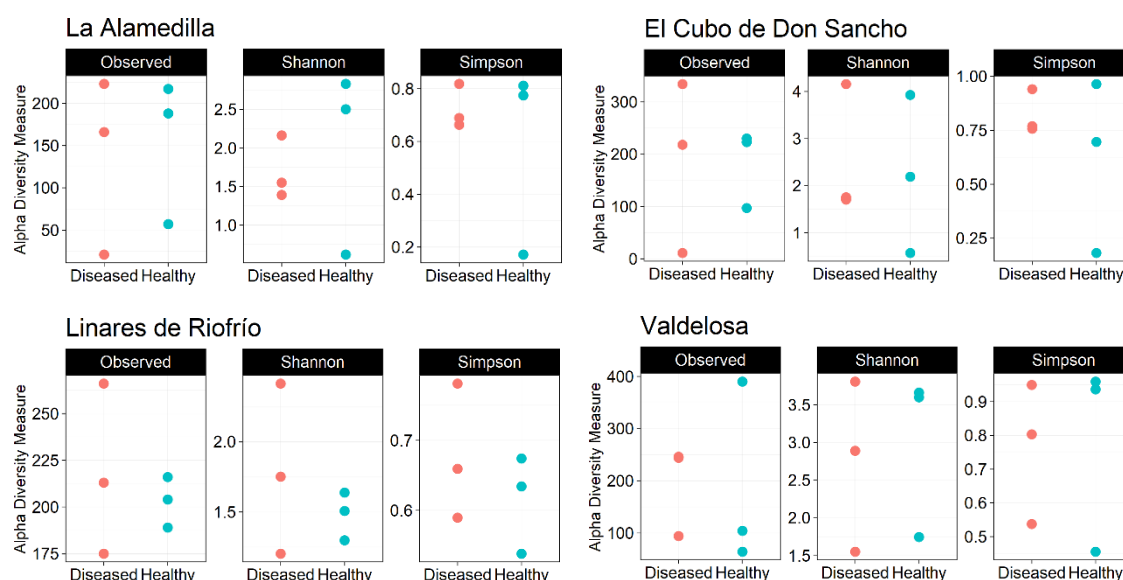


Figura 12. **Análisis de diversidad alfa.** Se representa la diversidad alfa de cada zona de muestreo mediante la estimación de los siguientes índices: la riqueza (número de especies observadas), el índice de Shannon (uniformidad en la distribución de abundancias de las especies) y el índice de Simpson (el inverso de la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar pertenezcan a la misma especie). En el eje vertical se muestra la medida de la diversidad alfa y en el eje horizontal si corresponde a una muestra sana o enferma. Los puntos de color naranja hacen referencia a las muestras enfermas (*diseased*), mientras que los puntos de color azul corresponden a las muestras sanas (*healthy*).

Tabla 4. **Riqueza de especies.** Se representa el número total de especies detectado en cada muestra. Las columnas “1”, “2” y “3” hacen referencia a las tres parcelas muestreadas para cada estado sanitario.

	Parcelas enfermas			Parcelas sanas		
	1	2	3	1	2	3
La Alamedilla	177	21	234	60	195	229
El Cubo de Don Sancho	226	352	12	246	104	237
Linares de Riofrío	184	279	221	217	197	231
Valdelosa	261	99	262	113	418	68

Por último, se analizaron las diferencias en la composición de especies entre muestras mediante el índice de Bray-Curtis (Figura 13). En este sentido, cabe destacar la elevada variabilidad presente entre parcelas con la misma condición sanitaria. En el caso de La Alamedilla, es posible distinguir dos grupos bien definidos: uno formado por muestras sanas (AH2 y AH3) y otro formado por muestras enfermas (AD1 y AD3). Junto a estos dos grupos, se observa otro formado por las muestras AH1 (sana) y AD2 (enferma), que guardan más parecido entre sí que con sus agrupaciones esperadas. En las muestras de El Cubo de Don Sancho se pueden observar tres agrupaciones: una formada por CD1 (enferma) y CH3 (sana), otra compuesta por la muestra enferma CD3 y una última formada por una muestra sana CH2 y una agrupación de orden inferior de las muestras CD2 (enferma) y CH1 (sana). En las muestras de Linares de Riofrío se observan dos grupos bien diferenciados: uno compuesto por las muestras LD2 (enferma) y LH1 (sana), y otro grupo de muestras formado, por un lado, por la muestra enferma LD1 y, por otro lado, compuesto por la muestra LD3 (enferma) y un subgrupo de muestras sanas (LH2 y LH3), las que presentan cierto parecido por su condición sanitaria. Por último, en el caso de las muestras de Valdelosa, se pueden diferenciar dos grupos con sus respectivos subgrupos. Por un lado, un grupo con la muestra enferma VD2, junto con el subgrupo de muestras sanas (VH1 y VH3) y, por otro lado, otro grupo con la muestra sana VH2, junto con el subgrupo de muestras enfermas (VD1 y VD3). En general, los resultados obtenidos indican la similitud de las muestras de cada uno de los lugares de muestreo a pesar de la condición sanitaria.

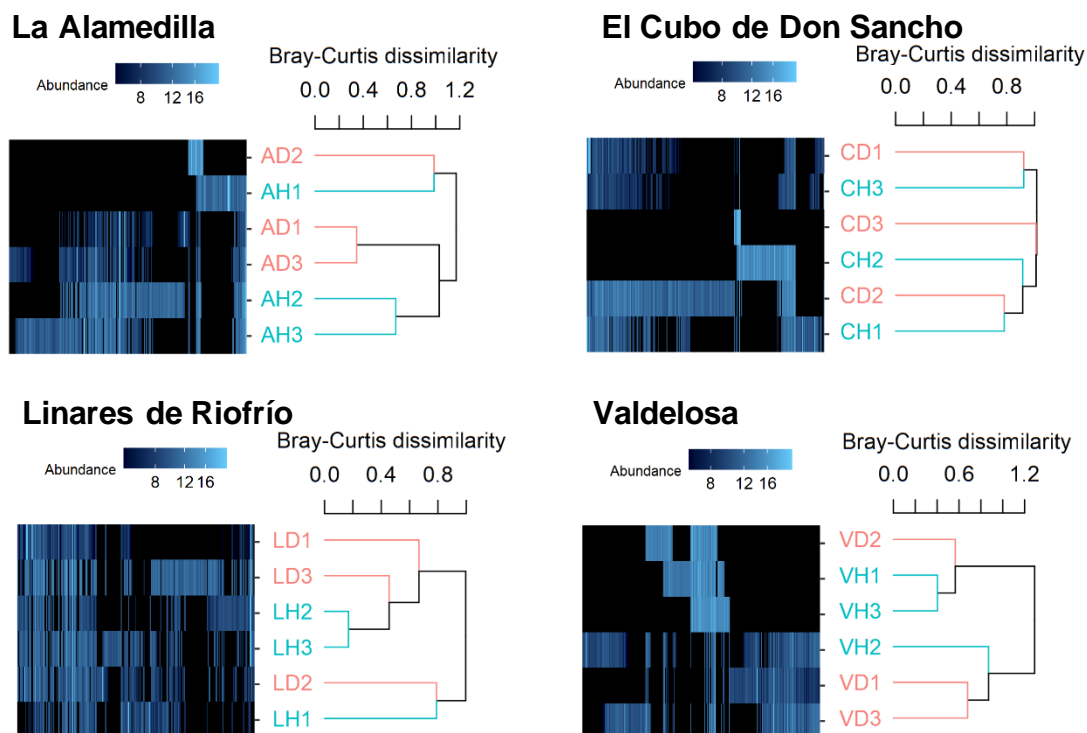


Figura 13. **Análisis de diversidad beta.** Se representan las abundancias de las comunidades fúngicas principales en forma de mapa de calor. La leyenda de color representa las abundancias (de 0 al valor máximo) mediante un gradiente de negro a azul. La ordenación de las muestras se representa en forma de dendrograma, elaborado a partir de escalado multidimensional no métrico (NMDS) sobre las matrices de distancia de Bray-Curtis. Las muestras enfermas se identifican con color rosa y la letra D (*diseased*). Las muestras sanas se identifican con color azul y la letra H (*healthy*).

En conjunto, los análisis de diversidad realizados indican que la composición de las comunidades fúngicas es heterogénea. La predominancia de Ascomicetos y Basidiomicetos se encuentra en sintonía con la diversidad descrita en bosques mediterráneos de especies del género *Quercus* similares a las zonas de estudio muestreadas (Ruiz Gómez *et al.*, 2019; Saitta *et al.*, 2018). Del mismo modo, la zona muestreada de castaños presenta coherencia con el predominio de ascomicetos seguido de basidiomicetos y, en menor proporción, los zigomicetos (Baptista *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2017).

A nivel de clase, la mayoría de los estudios realizados sobre ecosistemas mediterráneos coinciden con las zonas muestreadas en que la principal clase observada de Ascomycota es Sordariomycetes, junto con otras clases relevantes como Dothideomycetes y Letiomycetes (Baptista *et al.*, 2015; Ruiz Gómez *et al.*, 2019). De la misma manera, la clase taxonómica Agaricomycetes del filo Basidiomycota es la más abundante en los ecosistemas de muestreo, acorde con estudios similares (Baptista *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2017; Ruiz Gómez *et al.*, 2019) y asociado al posible efecto del

estado sanitario de los árboles del ecosistema con la abundancia de patógenos (Ruiz Gómez *et al.*, 2019).

Un aspecto para destacar es la variabilidad encontrada tanto a nivel de diversidad alfa (intra-muestra) como beta (entre-muestras). En general, la distribución de la diversidad dentro de las muestras se aleja de la dominancia por unas pocas especies. Esto indica que la diversidad interna de las muestras sanas y enfermas se distribuye de forma homogénea entre las especies que las forman, sin diferencias significativas. Una posible limitación es que los árboles muestreados con síntomas de enfermedades fueron identificados de forma visual en el momento de la toma de muestras en campo, pero la técnica molecular empleada no ha sido capaz de detectar la presencia de los hongos causantes de dichas enfermedades.

No se ha observado una composición fúngica estructurada que permita distinguir muestras sanas y enfermas. En su lugar, los perfiles de abundancia de especies difieren entre réplicas de una misma condición. Esto podría indicar que los cinco árboles muestreados por parcela, combinados para realizar la secuenciación, podrían haberse visto afectados por condiciones iniciales diferentes.

4.3. Análisis de nichos funcionales

El tercer objetivo del presente trabajo consistió en estudiar las diferencias entre los nichos funcionales desempeñados por las comunidades fúngicas en las muestras sanas y enfermas. Para ello, se representaron las principales funciones que presentan las comunidades fúngicas sanas y enfermas de cada lugar de muestreo (Figura 14), según (Nilsson *et al.*, 2019a). En general, los nichos funcionales más abundantes y comunes en los cuatro ecosistemas estudiados son los patógenos de la planta y los saprótrofos del suelo, tanto en muestras sanas como enfermas. No obstante, se observan diferencias de nichos funcionales dependiendo del estado sanitario de la muestra y del ecosistema.

En el caso de La Alamedilla, se observa que los principales nichos funcionales tanto en muestras sanas como enfermas son los patógenos de planta, los saprótrofos y los micoparásitos. Asimismo, se observa que la mayoría de las muestras sanas y enfermas presentan todos los nichos funcionales identificados, a excepción de las muestras

enfermas en las que no se encuentran los nichos funcionales referentes a los endófitos de la raíz y líquenes.

En las muestras sanas y enfermas de El Cubo de Don Sancho los principales grupos funcionales encontrados son los saprótrofos del suelo, los patógenos de planta y los endófitos de hojas. En este caso, se observa que en muestras sanas no hay presencia de nicho funcional de ectomicorrícicos, al igual que en muestras enfermas no hay presencia de parásitos de líquenes.

En las muestras de Linares de Riofrío los hongos encontrados actúan principalmente como patógenos de planta, saprótrofos de basura y saprótrofos de madera. En este caso, las comunidades fúngicas de las muestras enfermas no presentan función ectomicorrícica.

Las comunidades fúngicas que se recogen en las muestras sanas y enfermas de Valdelosa presentan como principales grupos funcionales los patógenos de plantas, los saprótrofos del suelo y los parásitos de algas. Además, se puede observar que las muestras sanas no presentan los nichos funcionales de hongos ectomicorrícicos, liquenizados y epífitos, mientras que las muestras sanas no presentan el nicho funcional de los hongos que habitan en las rocas.

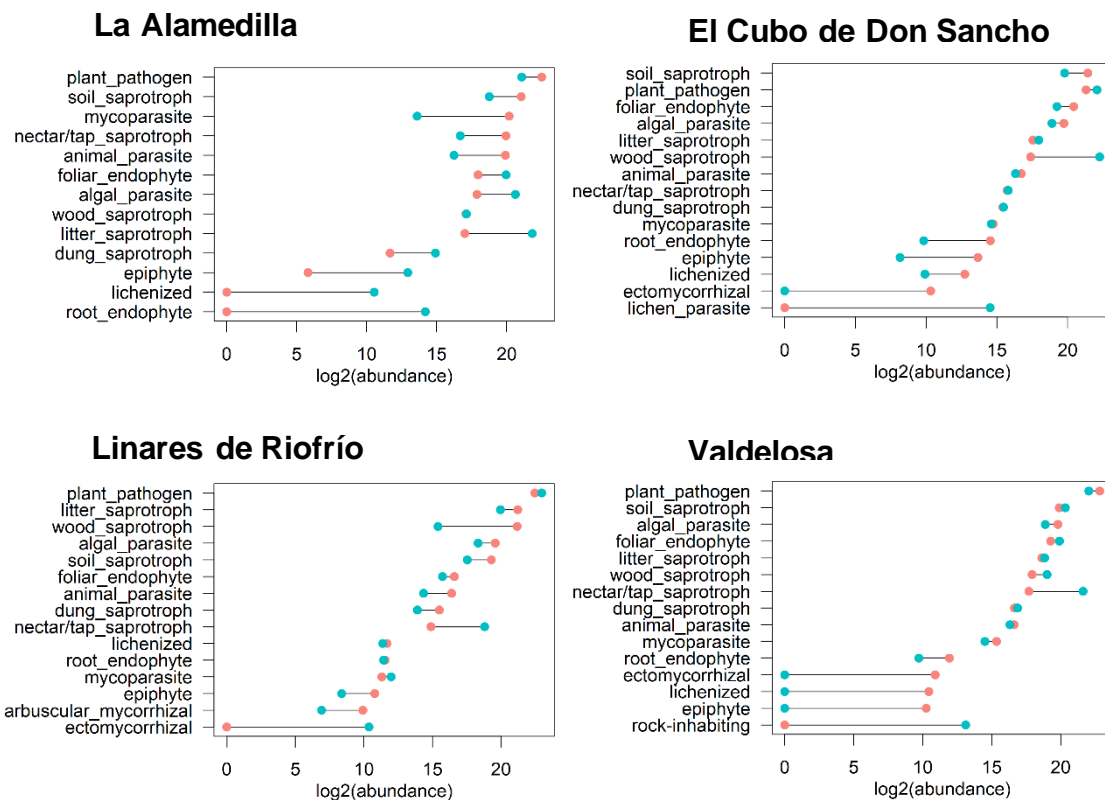


Figura 14. **Análisis de rasgos funcionales de hongos.** El eje x hace referencia a la suma de la abundancia de los rasgos funcionales de hongos, en escala logarítmica. La línea que une los puntos equivale a la distancia de la abundancia de un rasgo funcional entre muestras de madera sana (puntos azules) y enferma (puntos naranjas).

Las especies de hongos patógenos de planta del filo Ascomycota, *Cercospora sojina* (Dothideomycetes) y *Pestalotiopsis disseminata* (Sordariomycetes), están presentes en muestras enfermas de La Alamedilla, El Cubo de Don Sancho, Linares de Riofrío y Valdelosa. *Cercospora sojina* es principalmente conocida por la enfermedad de la mancha foliar de ojo de rana que causa en el cultivo de la soja en todo el mundo (Mian *et al.*, 2008), mientras que *Pestalotiopsis disseminata* causa la enfermedad del tizón gris en el árbol *Persea bombycina* del cual se alimenta un gusano de seda endémico del noreste de India (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Otras especies relevantes presentes en menor medida, por un lado, se encuentra *Gibellulopsis nigrescens* (Sordariomycetes) en El Cubo de Don Sancho y Linares de Riofrío y, por otro lado, dos especies del género *Plectosphaerella*, *Plectosphaerella cucumerina* (Sordariomycetes) y *Plectosphaerella oratosquillae* (Sordariomycetes) en La Alamedilla y Valdelosa, respectivamente.

No obstante, en las muestras sanas la dominancia de hongos patógenos de plantas está marcada por *Pestalotiopsis disseminata* (Sordariomycetes) y *Stemphylium vesicarium* (Dothideomycetes). *Pestalotiopsis disseminata* se encuentra presente en La Alamedilla y El Cubo de Don Sancho, y en Linares de Riofrío en menor proporción, mientras que *Stemphylium vesicarium* se encuentra en Valdelosa y en El Cubo de Don Sancho en menor medida. La especie *Stemphylium vesicarium* es la causante de distintas enfermedades en diversos cultivos como la mancha púrpura en el espárrago y la mancha marrón en el peral, entre otros (Graf *et al.*, 2016; Köhl *et al.*, 2009). Entre otras especies notorias se observa *Cercospora sojina* en Linares de Riofrío, *Gibellulopsis nigrescens* en La Alamedilla, *Alternaria eichhorniae* (Dothideomycetes) en Valdelosa y El Cubo de Don Sancho y *Plectosphaerella cucumerina* en La Alamedilla y Linares de Riofrío.

La presencia de géneros dominantes de hongos saprótrofos del suelo del filo Basidiomycota se observa en las muestras enfermas de cada lugar de muestreo, excepto en El Cubo de Don Sancho. Destacan los géneros *Mortierella* (filo Mucoromycota), *Malassezia* (filo Basidiomycota) y *Solicoccozyma* (filo Basidiomycota) en La Alamedilla, Linares de Riofrío y Valdelosa, respectivamente. Sin embargo, El Cubo de Don Sancho presenta tres especies de géneros diferentes, pero dos de ellas de los géneros *Mortierella* y *Solicoccozyma*. Entre las especies destacables y coincidentes en varios lugares de muestreo están *Solicoccozyma aerea* (Tremellomycetes) y *Malassezia restricta* (Malasseziomycetes).

Al igual que en las muestras enfermas, en las muestras sanas predominan como saprótrofos del suelo las especies *Solicoccozyma aerea* y *Malassezia restricta*. *Solicoccozyma aerea* está presente en todas las zonas de muestreo, mientras que *Malassezia restricta* (Malasseziomycetes) está en todas las zonas de muestreo menos en Valdelosa.

En conjunto, se observa que los hongos patógenos de plantas pertenecen al filo Ascomycota donde están dominados por las clases Sordariomycetes y Dothideomycetes. Sin embargo, los hongos saprótrofos del suelo corresponden al filo Basidiomycota, el cual está principalmente representado por las clases Tremellomycetes y Malasseziomycetes. Ambos nichos funcionales coinciden en que tanto las muestras sanas como las enfermas comparten las mismas especies fúngicas.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, enmarcado en el proyecto *LIFE Mycorestore* 2020, se han centrado en describir la composición fúngica de cuatro ecosistemas mediterráneos diferentes con distintas especies de árboles y condiciones sanitarias, analizando muestras de madera de árboles sanos y enfermos mediante *barcoding*.

Debido a lo novedoso del enfoque de este trabajo y a la consecuentemente escasa bibliografía disponible, la discusión se ha visto limitada. Sin embargo, hemos podido extraer las siguientes conclusiones, que corresponden con los objetivos indicados en el apartado correspondiente de esta memoria:

1. El kit comercial de extracción de ADN de plantas E.Z.N.A.[®] de Omega Bio-tek permitió obtener una cantidad suficiente de ADN a partir de muestras de madera para su posterior análisis mediante secuenciación de nueva generación (NGS).
2. El número de OTUs identificadas a nivel de especie en las muestras ascendió a 891, donde se detectaron un mayor número de especies tanto en las muestras sanas como enfermas en Linares de Riofrío, seguido de Valdelosa, El Cubo de Don Sancho y, por último, La Alamedilla.
3. En el análisis de secuencias el filo más abundante en todas las muestras analizadas ha sido Ascomycota, seguido de Basidiomycota y, en menor medida, Mucoromycota, independientemente de la condición sanitaria de las muestras. Las clases taxonómicas encontradas con mayor frecuencia fueron Sordariomycetes del filo Ascomycota y Agaricomycetes y Tremellomycetes del filo Basidiomycota.
4. No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la diversidad de especies entre las muestras sanas y las enfermas de cada una de las zonas muestreadas. En cambio, sí se ha observado variabilidad entre las réplicas sanas y entre las réplicas enfermas de cada lugar en cuanto a riqueza de especies y abundancia de estas.
5. Los nichos funcionales de hongos, según (Nilsson *et al.*, 2019a), predominantes tanto en las muestras sanas como en las enfermas son patógenos de planta y saprótrofos del suelo. Los hongos patógenos de planta pertenecen al filo Ascomycota representado por las clases Sordariomycetes y Dothideomycetes.

Los hongos saprótrofos del suelo son del filo Basidiomycota dominado por las clases Tremellomycetes y Malasseziomycetes. En ambos nichos funcionales, las especies encontradas están presentes tanto en las muestras sanas como en las enfermas.

6. En este estudio hemos constatado una serie de condicionantes que han limitado nuestra capacidad de análisis y que deberían revisarse en futuros estudios, entre las que podemos destacar las siguientes:
 - a. la condición de “enfermo” o “sano” de los ejemplares muestreados se estableció de forma visual. En subsiguientes estudios sería recomendable comprobar la presencia del patógeno causante de las enfermedades en estudio mediante técnicas de diagnóstico molecular como la PCR dirigida o la qPCR.
 - b. el margen de error de la plataforma de secuenciación para la identificación de las especies nos resulta desconocido, al haberse aplicado un protocolo protegido por una patente y sometido a confidencialidad. En futuros estudios sería deseable conocer previamente estos parámetros.

La caracterización de la diversidad fúngica a partir de muestras ambientales, como material vegetal, resulta ser una alternativa de gran interés complementaria a los métodos de identificación fúngica tradicional. En vistas de futuras líneas de investigación, una de las áreas más prometedoras consistirá en comparar la microbiota fúngica de diferentes cultivos afectados por alguna enfermedad de la que se desconoce el agente causante.

AGRADECIMIENTOS

El Trabajo de Fin de Máster se ha realizado en el marco del proyecto europeo *LIFE Mycorestore* (LIFE18/CCA/ES/001110) financiado por la Unión Europea para el Medio Ambiente y la Acción Climática para el periodo 2021-2027 y dirigido por el Dr. Julio Díez Casero. Especialmente, quiero agradecer a mi tutora, Elena Hidalgo Rodríguez, y a mi cotutor Sergio Díez Hermano, por darme la oportunidad de realizar mi TFM sobre este tema novedoso y ayudarme en todo momento. También quiero agradecer el apoyo recibido por los miembros integrantes del Área de Patología Forestal, ya que me han ayudado desde el primer día que llegué al laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelfattah, A., Malacrinò, A., Wisniewski, M., Cacciola, S. O., & Schena, L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120(March 2017), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009>
- Adamo, M., Voyron, S., Chialva, M., Marmeisse, R., & Girlanda, M. (2020). Metabarcoding on both environmental DNA and RNA highlights differences between fungal communities sampled in different habitats. *PLoS ONE*, 15(12): e(30 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244682>
- Aguilera, E., Díaz-Gaona, C., García-Laureano, R., Reyes-Palomo, C., Guzmán, G. I., Ortolani, L., Sánchez-Rodríguez, M., & Rodríguez-Estévez, V. (2020). Agroecology for adaptation to climate change and resource depletion in the Mediterranean region. A review. *Agricultural Systems*, 181(102809). <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.102809>
- Angelini, P., Compagno, R., Arcangeli, A., Bistocchi, G., Gargano, M. L., Venanzoni, R., & Venturella, G. (2014). Macrofungal diversity and ecology in two Mediterranean forest ecosystems. *Plant Biosystems*. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.987844>
- Anslan, S., Nilsson, R. H., Wurzbacher, C., Baldrian, P., Tedersoo, L., & Bahram, M. (2018). Great differences in performance and outcome of high-throughput sequencing data analysis platforms for fungal metabarcoding. *MycKeys*, 39, 29–40. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.39.28109>
- Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U., & Tedersoo, L. (2011). A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(2), 313–320. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01000.x>
- Bajpai, A., & Johri, B. N. (2017). Mycobiome: An emerging perspective in fungal biology! *Kavaka*, 48(2), 11–20.
- Baldrian, P., Větrovský, T., Lepinay, C., & Kohout, P. (2021). High - throughput

- sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. *Fungal Diversity*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00472-y>
- Bálint, M., Domisch, S., Engelhardt, C. H. M., Haase, P., Lehrian, S., Sauer, J., Theissinger, K., Pauls, S. U., & Nowak, C. (2011). Cryptic biodiversity loss linked to global climate change. *Nature Climate Change*, 1(6), 313–318. <https://doi.org/10.1038/nclimate1191>
- Balzan, M. V., Sadula, R., & Scalvenzi, L. (2020). Assessing ecosystem services supplied by agroecosystems in Mediterranean Europe: A literature review. *Land*, 9(8), 245. <https://doi.org/10.3390/LAND9080245>
- Baptista, P., Reis, F., Pereira, E., Tavares, R. M., Santos, P. M., Richard, F., Selosse, M. A., & Lino-Neto, T. (2015). Soil DNA pyrosequencing and fruitbody surveys reveal contrasting diversity for various fungal ecological guilds in chestnut orchards. *Environmental Microbiology Reports*, 7(6), 946–954. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12336>
- Bayat, A. (2002). Clinical review. *BMJ*, 324, 1018–1022. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7369.881>
- Biome Makers. [web en línea]. Disponible en: <<https://biomemakers.com/>> [con acceso el 28 de septiembre de 2021]
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, ..., Zhu Q, Knight R, and Caporaso JG. (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>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs*, 27(4), 326-349.
- Caetano, P., Sánchez, J.E., Sánchez, M.E., & Trapero, A. (2010). Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente. [publicación en línea]. Disponible en: <<https://bit.ly/3DFmail>> [con acceso el 18 de agosto de 2021]
- Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., MacE, G. M., Tilman, D., Wardle, D. A., Kinzig, A. P., Daily, G. C.,

- Loreau, M., Grace, J. B., Larigauderie, A., Srivastava, D. S., & Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, *486*(7401), 59–67. <https://doi.org/10.1038/nature11148>
- Castro, H., & Castro, P. (2019). Mediterranean Marginal Lands in Face of Climate Change: Biodiversity and Ecosystem Services. *Climate Change-Resilient Agriculture and Agroforestry, Climate Change Management*, 175–187. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75004-0_10
- Cerutti, F., Cravero, D., Costantini, A., Pulcini, L., Modesto, P., Acutis, P. L., Vaudano, E., & Peletto, S. (2019). Impact of DNA purification method and primer selection on 16S rRNA gene metabarcoding on wine. *OENO One*, *53*(3). <https://doi.org/10.20870/oenone.2019.53.3.2368>
- Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., & Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species*, 78–79.
- Consejo Económico y Social de Castilla y León. (2020). El sector forestal en Castilla y León. [documento en línea]. Disponible en: <<https://bit.ly/3HUbuzt>> [con acceso el 28 de julio de 2021]
- Costa, D., Fernandes, T., Martins, F., Pereira, J. A., Tavares, R. M., Santos, P. M., Baptista, P., & Lino-Neto, T. (2021). Illuminating *Olea europaea* L. endophyte fungal community. *Microbiological Research*, *245*, 126693. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126693>
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., Potter, C., & Bik, H. M. (2016). The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, *7*, 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, *26*(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>

- Doolittle, W. F., & Zhaxybayeva, O. (2010). Metagenomics and the units of biological organization. *BioScience*, 60(2), 102–112. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.2.5>
- Doyle J. (1991). DNA Protocols for Plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Dupré, J., & O'Malley, M. A. (2007). Metagenomics and biological ontology. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 38(4), 834–846. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2007.09.001>
- EEA. (2021). Forest fires in Europe. European Environment Agency. [publicación en línea]. Disponible en: <<https://bit.ly/3kYLWam>> [con acceso el 26 de julio de 2021]
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Estensmo, E. L. F., Maurice, S., Morgado, L., Martin-Sanchez, P. M., Skrede, I., & Kauserud, H. (2021). The influence of intraspecific sequence variation during DNA metabarcoding: a case study of eleven fungal species. *Molecular Ecology Resources*, 21(4), 1141–1148. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13329>
- Faticov, M., Abdelfattah, A., Roslin, T., Vacher, C., Hambäck, P., Blanchet, F. G., Lindahl, B. D., & Tack, A. J. M. (2021). Climate warming dominates over plant genotype in shaping the seasonal trajectory of foliar fungal communities on oak. *New Phytologist*, 1770–1783. <https://doi.org/10.1111/nph.17434>
- Fernandez-Conradi, P., Fort, T., Castagneyrol, B., Jactel, H., & Robin, C. (2019). Fungal endophyte communities differ between chestnut galls and surrounding foliar tissues. *Fungal Ecology*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100876>
- Fernández-Habas, J., Fernández-Rebollo, P., Casado, M. R., García Moreno, A. M., & Abellanas, B. (2019). Spatio-temporal analysis of oak decline process in open woodlands: a case study in SW Spain. *Journal of Environmental Management*, 248, 109308. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109308>

- Fernández, A., Sánchez, S., García, P., & Sánchez, J. (2020). Macrofungal diversity in an isolated and fragmented Mediterranean Forest ecosystem. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 154(2), 139–148. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1578285>
- Francaviglia, R., Renzi, G., Ledda, L., & Benedetti, A. (2017). Organic carbon pools and soil biological fertility are affected by land use intensity in Mediterranean ecosystems of Sardinia, Italy. *Science of the Total Environment*, 599, 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.021>
- Fontecha, G., Trabanino, R., Pérez- Borrero, B., & Catalán, P. (2012). Caracterización molecular de aislados centroamericanos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del Café. *Revista Ciencia y tecnología*. 10.5377/rct.v0i8.699.
- Fuhrman, J. A. (2009). Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 459(7244), 193–199. <https://doi.org/10.1038/nature08058>
- García-Vega, D., & Newbold, T. (2020). Assessing the effects of land use on biodiversity in the world's drylands and Mediterranean environments. *Biodiversity and Conservation*, 29(2), 393–408. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01888-4>
- Gomes, T., Pereira, J. A., Benhadi, J., Lino-Neto, T., & Baptista, P. (2018). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungal communities are shaped by different environmental factors in a mediterranean ecosystem. *Microbial Ecology*, 76(3), 668–679. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1161-9>
- Graf, S., Bohlen-Janssen, H., Miessner, S., Wichura, A., & Stammler, G. (2016). Differentiation of *Stemphylium vesicarium* from *Stemphylium botryosum* as causal agent of the purple spot disease on asparagus in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 144(2), 411–418. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0777-6>
- Guerrieri, A., Bonin, A., Münkemüller, T., Gielly, L., Thuiller, W., & Francesco Ficetola, G. (2021). Effects of soil preservation for biodiversity monitoring using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 30(13), 3313–3325. <https://doi.org/10.1111/mec.15674>
- Heilmann-Clausen, J., Barron, E. S., Boddy, L., Dahlberg, A., Griffith, G. W., Nordén, J., Ovaskainen, O., Perini, C., Senn-Irlet, B., & Halme, P. (2015). A fungal perspective

- on conservation biology. *Conservation Biology*, 29(1), 61–68. <https://doi.org/10.1111/cobi.12388>
- Henne, P. D., Elkin, C., Franke, J., Colombaroli, D., Caló, C., La Mantia, T., Pasta, S., Conedera, M., Dermody, O., & Tinner, W. (2015). Reviving extinct Mediterranean forest communities may improve ecosystem potential in a warmer future. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13(7), 356–362. <https://doi.org/10.1890/150027>
- Hernández-Lambraño, R. E., de la Cruz, D. R., & Sánchez-Agudo, J. Á. (2019). Spatial oak decline models to inform conservation planning in the Central-Western Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management*, 441, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.03.028>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2019). Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Hua, C., Zhao, J. H., & Guo, H. S. (2018). Trans-kingdom RNA silencing in plant–fungal pathogen interactions. *Molecular Plant*, 11(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.001>
- Illumina. (2021a). Differences Between NGS and Sanger Sequencing. [publicación en línea]. Disponible en: < <https://bit.ly/3yKfKCe> > [con acceso el 12 de julio de 2021]
- Illumina. (2021b). Differences Between NGS and qPCR. [publicación en línea]. Disponible en: < <https://bit.ly/3qm3CyK> > [con acceso el 14 de julio de 2021]
- IPCC. (2013). Glosario [Planton, S. (ed.)]. En: Cambio Climático 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex y P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, Estados Unidos de América. [documento en línea]. Disponible en: <<https://bit.ly/2Zb8E7z>> [con acceso el 8 de julio de 2021]
- Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S. M., Edwards, D. P., Tang, Y., Nakamura, A., Kitching, R., Dolman, P. M., Woodcock, P., Edwards, F. A., Larsen, T. H., Hsu, W. W., Benedick,

- S., Hamer, K. C., Wilcove, D. S., Bruce, C., Wang, X., Levi, T., Lott, M., ... Yu, D. W. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters*, 16(10), 1245–1257. <https://doi.org/10.1111/ele.12162>
- Junta de Andalucía. Cryphonectria parasitica (Chancro del Castaño). CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE. Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera Servicio de Sanidad Vegetal. [documento en línea]. Disponible en: <<https://bit.ly/3qYq2HX>> [con acceso el 26 de julio de 2021]
- Junta de Castilla y León. (2021). Anuario de estadística agraria de Castilla y León 2019. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Kavadia, A., Omirou, M., Fasoula, D., & Ioannides, I. M. (2020). The importance of microbial inoculants in a climate-changing agriculture in eastern Mediterranean region. *Atmosphere*, 11(10), 1136. <https://doi.org/10.3390/atmos11101136>
- Köhl, J., Groenenboom-De Haas, B., Goossen-Van De Geijn, H., Speksnijder, A., Kastelein, P., De Hoog, S., & Gerrits Van Den Ende, B. (2009). Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology*, 124(1), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9402-2>
- Lasco, R. D., Delfino, R. J. P., & Espaldon, M. L. O. (2014). Agroforestry systems: helping smallholders adapt to climate risks while mitigating climate change. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 5(6), 825–833. <https://doi.org/10.1002/wcc.301>
- Lahti L. (2019). Microbiome R package. [publicación en línea]. Disponible en: <<http://microbiome.github.io>> [con acceso el 25 de octubre de 2021]
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Aoki, T., Ariyawansa, H. A., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Meyer, W., Nilsson, H. R., Öpik, M., Robert, V., & Stadler, M. (2021). Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology*, 6(5), 540–548.
- Maghnia, F. Z., Abbas, Y., Mahé, F., Prin, Y., El Ghachtouli, N., Duponnois, R., & Sanguin, H. (2019). The rhizosphere microbiome: A key component of sustainable

- cork oak forests in trouble. *Forest Ecology and Management*, 434, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.12.002>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). Pestalotiopsis-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50(1), 167–187. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x>
- Makiola, A., Dickie, I. A., Holdaway, R. J., Wood, J. R., Orwin, K. H., & Glare, T. R. (2019). Land use is a determinant of plant pathogen alpha- but not beta-diversity. *Molecular Ecology*, 28(16), 3786–3798. <https://doi.org/10.1111/mec.15177>
- Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D., Pisabarro, A., Spatafora, J. W., Baker, S. E., & Grigoriev, I. V. (2011). Sequencing the fungal tree of life. *New Phytologist*, 190(4), 818–821. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03688.x>
- McCarthy, C. G. P., & Fitzpatrick, D. A. (2017). Multiple approaches to phylogenomic reconstruction of the fungal kingdom. In *Advances in Genetics* (1st ed., Vol. 100). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.006>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mian, M.A.R., Missaoui, A.M., Walker, D.R., Phillips, D.V. & Boerma, H.R. (2008). Frog-eye Leaf Spot of Soybean: A Review and Proposed Race Designations for Isolates of *Cercospora sojina* Hara. *Crop Science*, 48: 14-24. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0432>
- Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico. Programa LIFE. ¿Qué es el LIFE? [web en línea]. Disponible en: <<https://bit.ly/30PgIB6>> [con acceso el 31 de octubre de 2021]
- Molik, D. C., Tomlinson, D., Davitt, S., Morgan, E. L., Sisk, M., Roche, B., Meyers, N., & Pfrender, M. E. (2021). Combining natural language processing and metabarcoding to reveal pathogen environment associations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(4), e0008755. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008755>
- Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 1–5.

<https://doi.org/10.1007/s10531-006-9117-7>

- National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. (2007). *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. National Academies Press (US).
- Newbold, T., Oppenheimer, P., Etard, A., & Williams, J. J. (2020). Tropical and Mediterranean biodiversity is disproportionately sensitive to land-use and climate change. *Nature Ecology and Evolution*, 4(12), 1630–1638. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01303-0>
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019a). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95–109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019b). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Ojeda, F. (2020). Pine afforestation, herriza and wildfire: a tale of soil erosion and biodiversity loss in the Mediterranean region. *International Journal of Wildland Fire*, 29(12), 1142–1146. <https://doi.org/10.1071/WF20097>
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Talbot, J. M. (2016). Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 434–447. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>
- Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Bueno-Herrera, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2015). Grape variety, aging on lees and aging in bottle after disgorging influence on volatile composition and foamability of sparkling wines. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.011>
- Pölme, S., Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Lindahl, B. D., Clemmensen, K. E., Kauserud, H., Nguyen, N., Kjøller, R., Bates, S. T., Baldrian, P., Frøslev, T. G.,

- Adojaan, K., Vizzini, A., Sujja, A., Pfister, D., Baral, H. O., Järv, H., Madrid, H., Nordén, J., ... Tedersoo, L. (2020). FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. *Fungal Diversity*, 105(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00466-2>
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <<https://www.R-project.org/>> [con acceso el 26 de octubre de 2021]
- Raftoyannis, Y., Nocentini, S., Marchi, E., Sainz, R. C., Guemes, C. G., Pilas, I., Peric, S., Paulo, J. A., Moreira-Marcelino, A. C., Costa-Ferreira, M., Kakouris, E., & Lindner, M. (2014). Perceptions of forest experts on climate change and fire management in European Mediterranean forests. *IForest-Biogeosciences and Forestry*, 7(1), 33–41. <https://doi.org/10.3832/ifor0817-006>
- Reinhold-Hurek, B., Bünge, W., Burbano, C. S., Sabale, M., & Hurek, T. (2015). Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 403–424. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102342>
- Reis, F., Pereira, E., Tavares, R., Baptista, P., & Lino-Neto, T. (2017). Fungal community in chestnut orchards with different *Hypholoma fasciculare* aboveground abundance: potential implications for sustainable production. *Revista de Ciências Agrárias*, 40(1), 124–132. <https://doi.org/10.19084/rca15153>
- Richards, T. A., Leonard, G. U. Y., & Wideman, J. G. (2017). What defines the “Kingdom” Fungi? *Microbiology Spectrum*, 5(3), 1–21. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0044-2017.Correspondence>
- Rigling, D., & Prospero, S. (2018). *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 7–20. <https://doi.org/10.1111/mpp.12542>
- Ruiz Gómez, F. J., Navarro-Cerrillo, R. M., Pérez-de-Luque, A., Oßwald, W., Vannini, A., & Morales-Rodríguez, C. (2019). Assessment of functional and structural changes of soil fungal and oomycete communities in holm oak declined dehesas through metabarcoding analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41804-y>

- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Saitta, A., Anslan, S., Bahram, M., Brocca, L., & Tedersoo, L. (2018). Tree species identity and diversity drive fungal richness and community composition along an elevational gradient in a Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza*, 28(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0806-8>
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L. R., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M., & Wall, D. H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287(5459), 1770–1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>
- San Miguel Ayanz, A., Perea García-Calvo, R., Roig Gómez, S. & Fernández Olalla, M. (2011). Bosques y matorrales mediterráneos continentales. *Revista Ambienta*, 98 (marzo), 7-9. <https://bit.ly/3HEqgu1>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Santamaría González, M., & Lezana Rosales, J. M. (2018). Técnicas de secuenciación masiva (NGS). *Ed. Cont. Lab. Clin*, 37(APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS ACTUALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR), 33–40. <https://www.seqc.es/download/tema/25/5627/770422855/826284/cms/tema-5-tecnicas-de-secuenciacion-masiva-ngs.pdf>
- Scarascia-Mugnozza, G., Oswald, H., Piussi, P., & Radoglou, K. (2000). Forests of the Mediterranean region: gaps in knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management*, 132(1), 97–109. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00383-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00383-2)
- Schlegel, M., Queloz, V., & Sieber, T. N. (2018). The endophytic mycobiome of European ash and Sycamore maple leaves - geographic patterns, host specificity and influence of ash dieback. *Frontiers in Microbiology*, 9(october), 2345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02345>

- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Scoma, A., & Vorholt, J. A. (2018). Editorial overview: Environmental microbiology: Environmental and engineered microbiomes. *Current Opinion in Microbiology*, *43*, v–vii. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.05.004>
- Seddon, N., Chausson, A., Berry, P., Girardin, C. A. J., Smith, A., & Turner, B. (2020). Understanding the value and limits of nature-based solutions to climate change and other global challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *375*(1794). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0120>
- Sena, K., Crocker, E., Vincelli, P., & Barton, C. (2018). Phytophthora cinnamomi as a driver of forest change: Implications for conservation and management. *Forest Ecology and Management*, *409*, 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.12.022>
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, *27*(3), 379-423.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *nature*, *163*(4148), 688-688.
- Singh, J., Behal, A., Singla, N., Joshi, A., Birbian, N., Singh, S., Bali, V., & Batra, N. (2009). Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal*, *4*(4), 480–494. <https://doi.org/10.1002/biot.200800201>
- Spatafora, J. W., Aime, M. C., Grigoriev, I. V., Martin, F., Stajich, J. E., & Blackwell, M. (2017). The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum*, *5*(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0053-2016>

SULFATO CALCICO DEL MEDITERRANEO. La Seca de la encina. La aplicación de

yescal frena la expansión del patógeno que causa esta enfermedad. [web en línea].
Disponible en: <<https://bit.ly/2Z5QJPj>> [con acceso el 25 de octubre de 2021]

- Taş, N., de Jong, A. E., Li, Y., Trubl, G., Xue, Y., & Dove, N. C. (2021). Metagenomic tools in microbial ecology research. *Current Opinion in Biotechnology*, 67, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.019>
- Taudière, A., Bellanger, J. M., Carcaillet, C., Hugot, L., Kjellberg, F., Lecanda, A., Lesne, A., Moreau, P. A., Scharmann, K., Leidel, S., & Richard, F. (2018). Diversity of foliar endophytic ascomycetes in the endemic Corsican pine forests. *Fungal Ecology*, 36, 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.07.008>
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Valverde, A., González-Tirante, M., Medina-Sierra, M., Rivas, R., Santa-Regina, I., & M. Igual, J. (2017). Culturable bacterial diversity from the chestnut (*Castanea sativa* Mill.) phyllosphere and antagonism against the fungi causing the chestnut blight and ink diseases. *AIMS Microbiology*, 3(2), 293–314. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.2.293>
- Venice, F., Vizzini, A., Frascella, A., Emiliani, G., Danti, R., Della Rocca, G., & Mello, A. (2021). Localized reshaping of the fungal community in response to a forest fungal pathogen reveals resilience of Mediterranean mycobiota. *Science of the Total Environment*, 800, 149582. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149582>
- Wood, J. R., Holdaway, R. J., Orwin, K. H., Morse, C., Bonner, K. I., Davis, C., Bolstridge, N., & Dickie, I. A. (2017). No single driver of biodiversity: divergent responses of multiple taxa across land use types. *Ecosphere*, 8(11). <https://doi.org/10.1002/ecs2.1997>
- Xu, J. (2006). Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, 15(7), 1713–1731. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02882.x>