



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS
AGRARIAS**

Grado en Ingeniería Forestal y del Medio Natural

Caracterización fitoquímica para la valorización y conservación de *Pseudomisopates rivas-martinezii*: un endemismo abulense en peligro de extinción

Estudiante: Mario Cano Pérez

Tutor: Pablo Martín Ramos
Cotutora: Eva Sánchez Hernández

Junio de 2025

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Presentación de la especie	1
1.1.1. Contexto	1
1.1.2. Características básicas.....	2
1.1.3. Ciclo vital.....	3
1.1.4. Distribución y hábitat	3
1.2. Aspectos evolutivos y taxonómicos.....	5
1.2.1. Dificultades de asignación taxonómica de la especie y diferencias frente a géneros afines	5
1.2.2. Origen evolutivo.....	7
1.2.3. Diversidad genética	7
1.3. Conservación	10
1.3.1. Estado de conservación e importancia.....	10
1.3.2. Retos para su conservación	11
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1. Recogida de muestras de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i>	21
3.2. Reactivos y aislados fúngicos.....	21
3.3. Preparación de los extractos	22
3.4. Caracterización fisicoquímica	22
3.5. Estudio de la actividad antioomicética <i>in vitro</i>	23
3.6. Protección <i>ex situ</i> de tallos de <i>Alnus glutinosa</i> inoculados artificialmente	24
3.7. Análisis estadístico de resultados <i>in vitro</i> y <i>ex situ</i>	25
3.8. Análisis metagenómico de rizosferas	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. Caracterización mediante análisis elemental	27
4.2. Caracterización de los extractos mediante GC-MS.....	28
4.2.1. Composición química de la parte radicular	28
4.2.2. Composición química de la parte aérea	30

4.3.	Análisis de las rutas biosintéticas	31
4.3.1.	<i>Metabolitos derivados de la histidina</i>	31
4.3.2.	<i>Metabolitos derivados de aminoácidos aromáticos</i>	32
4.3.3.	<i>Implicaciones ecológicas y evolutivas</i>	32
4.4.	Consideraciones quimiotaxonómicas	33
4.5.	Actividad antioomycética	33
4.5.1.	<i>Actividad in vitro</i>	33
4.5.2.	<i>Actividad ex situ</i>	39
4.6.	Características generales de la composición microbiana de las rizosferas analizadas ..	41
4.6.1.	<i>Comunidades microbianas fúngicas</i>	43
4.6.2.	<i>Comunidades microbianas bacterianas</i>	49
4.6.3.	<i>Discusión de los resultados del análisis metagenómico de la composición microbiana de las rizosferas analizadas</i>	52
5.	PROPUESTA DE PLAN DE CONSERVACIÓN	57
5.1.	Justificación técnica del emplazamiento y de la estrategia de conservación	57
5.2.	Preparación del terreno: descepado y quema prescrita	59
5.2.1.	<i>Descepado</i>	59
5.2.2.	<i>Quema prescrita</i>	61
5.3.	Plantación del rodal	67
5.4.	Polinización del rodal	70
5.5.	Vallado del rodal para evitar la herbivoría	71
5.6.	Plan de seguimiento	73
5.6.1.	<i>Reposición de marras y control de nascencia</i>	74
5.6.2.	<i>Desbroces perimetrales periódicos</i>	74
5.6.3.	<i>Eliminación de rebrote del piornal en la zona protegida</i>	75
5.6.4.	<i>Mantenimiento del vallado perimetral</i>	76
5.6.5.	<i>Recogida de semillas</i>	77
6.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	79
7.	CONCLUSIONES	81
	BIBLIOGRAFÍA	83

ANEXOS	93
Anexo I: Detalles de la caracterización de los extractos mediante gc-ms	95
Anexo II: Condicionantes del plan de conservación.....	109
Anexo III: Planificación del plan de conservación	116
Anexo IV: Maquinaria y equipos del plan de conservación	119
Anexo V: Normas para la ejecución del plan de conservación.....	123
Anexo VI: Presupuesto del plan de conservación.....	127
Anexo VIII: Planos del plan de conservación.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Ficha taxonómica de la especie objeto de estudio.	5
FIGURA 2.	Éxito reproductivo según las distintas etapas de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> . Fuente: ME-Amat 2010.	12
FIGURA 3.	Situación actual de la zona vallada, repleta de piornales.	16
FIGURA 4.	Sendas de animales que en el interior del vallado.	17
FIGURA 5.	Estructuras químicas de las especies más abundantes identificadas mediante GC- MS en los extractos de raíces de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i>	29
FIGURA 6.	Estructuras químicas de las especies más abundantes identificadas mediante GC- MS en los extractos de parte aérea de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> procedentes de La Serrota.....	30
FIGURA 7.	Estructuras químicas de las especies más abundantes identificadas mediante GC- MS en los extractos de parte aérea de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> procedentes de Gredos.	30
FIGURA 8.	Estructuras químicas de los potenciales precursores de algunas de las especies químicas identificadas en los extractos.	31
FIGURA 9.	Inhibición del crecimiento micelial obtenida con extractos hidrometanólicos de la parte aérea e hidroamoniacaes del rizoma de <i>P. rivas-martinezii</i> del material vegetal recolectado en Gredos o La Serrota contra <i>P. plurivora</i> a concentraciones que van desde 46,8 hasta 1500 µg/mL.....	34
FIGURA 10.	Longitud de los canchros observados en tallos extirpados de aliso inoculados artificialmente con <i>P. plurivora</i> : (a) control, sin tratamiento; tratados con extracto hidrometanólico de la parte aérea de <i>P. rivas-martinezii</i> de ejemplares recolectados en La Serrota a una concentración de (b) CMI = 110 µg/mL; (c) CMI×5 = 550 µg/mL; (d) CMI×10 = 1100 µg/mL. Solo se muestra una réplica por tratamiento.....	40
FIGURA 11.	Comparativa de número total de OTUs resueltos tras el total de lecturas, mostrando las diferencias entre cada grupo de organismos por planta y localidad muestreada	42

FIGURA 12. Histograma de barras compuestas mostrando las clases taxonómicas representadas en las comunidades microbianas fúngicas presentes en las plantas muestreadas en ambas localizaciones.	43
FIGURA 13. Valores de diversos índices de α -diversidad fúngica según planta y localidad prospectada.	45
FIGURA 14. Análisis de Componentes Principales (PCoA) de comunidades microbianas fúngicas asociadas al suelo rizosférico de las plantas pertenecientes a las poblaciones de Gredos y La Serrota, obtenido empleando el índice de Bray-Curtis.	46
FIGURA 15. Histograma de barras compuestas mostrando las familias taxonómicas fúngicas representadas en las comunidades microbianas presentes en el total de plantas/localidades muestreadas.	47
FIGURA 16. Histograma de barras compuestas mostrando los 15 OTUs fúngicos más frecuentes agrupados por planta y localidad muestreada.	48
FIGURA 17. Histograma de barras compuestas mostrando las clases taxonómicas representadas en las comunidades microbianas bacterianas presentes en el total de rizosferas muestreadas.	49
FIGURA 18. Valores de diversos índices de α -diversidad bacteriana según planta y localidad prospectada.	50
FIGURA 19. Análisis de Componentes Principales (PCoA) de comunidades microbianas bacterianas asociadas al suelo rizosférico de las plantas pertenecientes a las poblaciones de Gredos y La Serrota, obtenido empleando el índice de Bray-Curtis.	51
FIGURA 20. Histograma de barras compuestas mostrando los 10 OTUs bacterianos más frecuentes agrupados por planta y localidad muestreada	52
FIGURA 21. Zonas que rodean al rodal objeto de estudio	62
FIGURA 22. Nieve en La Serrota el día 14/04/2025. Fuente: Copernicus Browser.	64

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Diferencias morfológicas entre los géneros <i>Misopates</i> y <i>Pseudomisopates</i>	6
TABLA 2.	Resultados de análisis elemental de muestras compuestas de parte radicular y parte aérea de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> procedentes de las poblaciones de La Serrota y Gredos, y poderes caloríficos estimados.....	27
TABLA 3.	Comparativa de especies químicas más abundantes identificadas mediante GC-MS en los extractos derivatizados de muestras compuestas de raíces y parte aérea de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> procedentes de las poblaciones de La Serrota y Gredos.....	29
TABLA 4.	Concentraciones efectivas (CE, expresadas en $\mu\text{g/mL}$) frente a <i>P. plurivora</i> de extractos hidrometanólicos de la parte aérea e hidroamoniacaes del rizoma de <i>P. rivas-martinezii</i> preparados a partir del material vegetal recolectado en Gredos o La Serrota.....	34
TABLA 5.	Eficacia de distintos productos naturales frente a <i>Phytophthora</i> spp.	36
TABLA 6.	Inhibición del crecimiento micelial obtenida con Fosetil-Al a una décima parte de la dosis recomendada ($\text{Dr}/10 = 200 \mu\text{g/mL}$), a la dosis recomendada ($\text{Dr} = 2000 \mu\text{g/mL}$), a cinco y diez veces la dosis recomendada ($\text{Dr} = 10000$ y $20000 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) contra <i>P. plurivora</i>	39
TABLA 7.	Análisis de las diferencias en la longitud de la necrosis entre los tratamientos con un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0,0001$).....	40
TABLA 8.	Tratamientos de protección <i>ex situ</i> frente a <i>Phytophthora</i> spp. basados en productos naturales.....	41
TABLA 9.	Resumen de las características del rodal y las elecciones de la quema prescrita. ..	65
TABLA 10.	Plan de contingencia de la quema prescrita.....	66
TABLA 11.	Resumen de los tiempos de operación.....	73

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Jesús Martín Gil, referente en la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, por brindarme la oportunidad de aprender de su amplia experiencia.

Al Profesor Pablo Martín Ramos y a la Dra. Eva Sánchez Hernández, mis tutores del TFG, por su constante orientación y por el amplio tiempo dedicado a resolver mis dudas durante todo el proceso. Su supervisión ha sido clave para llevar adelante este trabajo. Gracias a su apoyo constante, he logrado adquirir metodologías de trabajo rigurosas y comprender el verdadero valor del conocimiento científico. Sus conocimientos han sido, sin duda, una fuente de inspiración que marcará mi trayectoria.

A la Institución Gran Duque de Alba y a la Diputación de Ávila, por el apoyo económico a través de las Ayudas a la Investigación sobre Temas Abulenses, sin el cual no habría sido posible abordar el estudio de *Pseudomisopates* con la profundidad necesaria.

A la Dra. María Elena Amat, por enseñarme las particularidades de esta planta y por embarcarse en las salidas de campo a La Serrota y Gredos durante el verano para recolectar muestras de *Pseudomisopates*. Las patatas revolconas y el chuletón abulense fueron la excusa perfecta para combinar trabajo y un inmejorable ambiente.

Al Dr. Vicente González García, del Instituto de Ciencias Agrarias ICA-CSIC, por su ayuda en el diseño y ejecución de los análisis de metagenómica, así como por sus valiosas explicaciones para interpretar correctamente los datos obtenidos.

Al Dr. Julio Diez Casero, por facilitarme el material biológico necesario para los ensayos, en particular el aislado del oomiceto que ha sido central en este trabajo.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por brindarme el acceso a una educación, por celebrar mis logros como propios y por depositar en mí una confianza que ha sido sostén y motor en cada etapa de este camino. También a mi hermana, por demostrar que todo es posible con trabajo.

A mi luz, por ayudarme y guiarme siempre en la dirección correcta.

A mi pareja, por su paciencia, comprensión y apoyo constante a lo largo de este proceso. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, y por caminar a mi lado con generosidad, afecto y firmeza.

Gracias a cada uno de vosotros por hacer posible este TFG. Sin vuestra colaboración y conocimientos, este trabajo no habría sido lo mismo.

RESUMEN

Pseudomisopates rivas-martinezii constituye el único representante de su género y uno de los endemismos más amenazados de la flora ibérica, catalogado en peligro crítico de extinción. Esta especie monotípica presenta poblaciones fragmentadas en las sierras de Gredos y La Serrota (Ávila), enfrentando múltiples amenazas que incluyen baja producción de semillas, competencia con matorrales y presión por herbivoría. El presente estudio tuvo como objetivo ampliar el conocimiento científico sobre esta especie mediante análisis fitoquímicos y microbiológicos que contribuyan al desarrollo de estrategias de conservación fundamentadas. Se realizó una caracterización química mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas de extractos de parte radicular y aérea de especímenes procedentes de ambas poblaciones, evaluándose además su actividad antioomicética frente a *Phytophthora plurivora*. Paralelamente, se caracterizaron las comunidades microbianas fúngicas y bacterianas asociadas a los suelos rizosféricos mediante técnicas metagenómicas. Los resultados revelaron un perfil fitoquímico distintivo dominado por derivados de aminoácidos aromáticos e imidazólicos, con convergencia química en extractos radiculares entre poblaciones y divergencia en la parte aérea. Los extractos hidrometanólicos de la parte aérea mostraron notable actividad antioomicética con concentraciones mínimas inhibitorias de 110 µg/mL, comparable a fungicidas sintéticos convencionales. El análisis metagenómico evidenció comunidades microbianas altamente diversas, dominadas por Ascomycetes y Actinobacteriota, sin indicios de agotamiento microbiológico. Integrando estos hallazgos con el conocimiento previo, se desarrolló un plan de conservación técnicamente fundamentado que incluye la implementación de quemas controladas, vallado protector y estrategias de seguimiento adaptativo. Este trabajo contribuye a la base científica necesaria para la conservación de *P. rivas-martinezii* y abre nuevas perspectivas de valorización biotecnológica de esta especie única.

Palabras clave: metabolitos secundarios, microbioma rizosférico, actividad antimicrobiana, *Phytophthora plurivora*, especies amenazadas, restauración ecológica, Sierra de Gredos, La Serrota, cromatografía de gases, metagenómica, quema controlada, diversidad microbiana

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Presentación de la especie

1.1.1. Contexto

En los ecosistemas montanos de Castilla y León se observa una amplia riqueza de especies animales y vegetales, como sucede en la mayoría de formaciones orográficas (Körner & Spehn, 2002) debido, en gran medida, a los aislamientos que se produjeron en la formación de dichas montañas y las condiciones que se formaron. De hecho, el número de especies vegetales estudiadas en la península ibérica aumenta con la altitud en la mayoría de los ecosistemas estudiados (Kessler, 2000), lo que sugiere que los ecosistemas montanos actúan como refugios y albergan muchos de los taxones más interesantes de la botánica de nuestro país, como son las especies endémicas (Vargas, 2008).

En las montañas más meridionales de Castilla y León también afecta el hecho de que se vean sometidas a un amplio aislamiento topográfico respecto a la altimetría de las zonas que les rodean, como son los páramos y valles de Ávila, Salamanca, Madrid o Cáceres. Esto contribuye a que en el Sistema Central exista una gran diversidad de especies, puesto que ofrece una gran variedad de altimetrías, suelos y refugios que permiten albergar un amplio espectro de especies vegetales y animales.

En el caso concreto de la Sierra de Gredos, se ha observado la presencia de ocho especies endémicas, pese a tratarse de un territorio de 4.800 km² con más de 2500 especies de flora inventariadas. La presencia de tan pocos endemismos se atribuye a falta de investigación (Vargas, 2008).

Las principales especies endémicas de la Sierra de Gredos pertenecen a estratos de pendiente o ladera, lo que se atribuye a las extinciones masivas tras episodios de glaciaciones, que afectaron en mayor medida a los estratos más alpinos y de cumbre (Vargas, 2008). La especie objeto del presente Trabajo Fin de Grado es una de ellas: *Pseudomisopates rivas-martinezii* (Sánchez Mata) Güemes, descubierta por el Dr. Daniel Pablo de la Cruz Sánchez-Mata en los años 80.

Martínez *et al.* (2004) señalan que *P. rivas-martinezii* posee muy pocos organismos vivos localizados. Las poblaciones se encuentran en el ámbito del Parque Regional de la Sierra de Gredos, concretamente en los LIC “Sierra de Gredos” y “Sierra de Paramera y Serrota”. También se mantienen ejemplares vivos en el Jardín Botánico de Madrid (Martínez *et al.*, 2004).

En un contexto de clara regresión de los pastizales de montaña mediterráneos debido a la desaparición de sus usos tradicionales, así como al avance de los matorrales, piornales y enebrales (Sanz-Elorza, 2003), el hecho de que la especie sufra de baja producción de frutos, así como una presumiblemente baja variabilidad genética y una ocupación de área bastante reducida (ME-Amat, 2013a) hacen necesario el desarrollo de planes de conservación de la misma.

1.1.2. Características básicas

Pseudomisopates rivas-martinezii es una planta perenne y considerada leñosa, en el ámbito reproductivo es monoica y alógama. Posee un rizoma largo y presenta una cualidad bastante relevante para el entendimiento de su biología, puesto que tiene una multiplicación vegetativa muy marcada por rizomas, lo que permite observar extensos rodales de individuos clónicos (ramets) densamente asociados entre sí.

Posee tallos aéreos de una longitud de 20-40 cm, leñosos en la base, laxos y con pequeños pelos patentes. Estos tallos aéreos desaparecen en invierno y rebrotan en primavera, aunque a veces algunos se mantienen. La estructura de las hojas es linear-lanceoladas. Son hojas de un tamaño de 2-2,5 cm, contienen la particularidad de poseer un surco longitudinal en el haz, además de ser algo pilosas y agudas.

La floración es heterogénea, tanto en el mes como en el número de flores, puede llegar a tener 1500 flores si el ramet es grande. Las flores son personadas, de color púrpura y con partes blanquecinas, de hasta 1,5 cm. Tiene una cápsula ovoidea, con poros en la parte superior y semillas con gruesos tubérculos (Martínez *et al.*, 2004)

El tanto por ciento de fructificación y el número de semillas son extremadamente bajos, lo que hace sospechar que sufre algún problema en la viabilidad de polen/primordios seminales. Los tallos son comidos por el ganado vacuno y las flores son depredadas por insectos

1.1.3. Ciclo vital

La especie *Pseudomisopates* tiene un ciclo vital curioso, pues no siempre se presenta visible en la superficie. En el invierno, los tallos aéreos de la planta desaparecen casi por completo debido a las condiciones adversas. Este mecanismo permite su supervivencia mediante el uso del rizoma subterráneo como órgano de almacenamiento de nutrientes.

En primavera, con el aumento de las temperaturas y la disponibilidad de agua, el rizoma se encarga de producir nuevos brotes que emergen desde el suelo. Estos nuevos tallos aéreos se desarrollan con celeridad hasta alcanzar los 15-40 cm de altura. Tras ello, se transformarán en tallos leñosos en la base, y herbáceos en su parte superior. Se forman también hojas alternas, con bordes engrosadas, las cuales son características del género *Pseudomisopates*.

En verano, durante los meses de julio a septiembre, ocurre la floración. Las flores son hermafroditas y presentan polinización entomófila. Cada ramet, en condiciones óptimas, es capaz de producir hasta 1500 flores. La floración es mediante inflorescencias paucifloras (3-10 flores por tallo) con corolas rosadas o blanquecinas para atraer a los polinizadores.

En otoño se da paso a la fructificación, la cual ocurre principalmente entre los meses de septiembre a octubre. La fructificación es en forma de cápsulas, las cuales contienen semillas con asimetría dorsiventral, ciatiformes, y con una tasa de germinación baja.

La especie puede reproducirse tanto de manera sexual, gracias a la polinización entomófila, como mediante reproducción vegetativa con rizomas. Generalmente, la estrategia adaptativa que toma la especie se basa en la perennidad y la clonalidad de la planta gracias al rizoma. Estas características le permiten sobrevivir en un hábitat restringido, así como bajo presión ambiental y de pastoreo.

1.1.4. Distribución y hábitat

Pseudomisopates rivas-martinezii está presente en distintos puntos de los sistemas montañosos abulenses, principalmente en Gredos y en La Serrota . Los dos grandes grupos de población conocidos están separados unos 20 km de distancia (Martínez *et al.*, 2004).

En la Sierra de Gredos, *P. rivas-martinezii* habita el paisaje claramente antropogénico de este sistema montañoso, que incluye una combinación de manchas forestales, pastizales y matorrales generalizados, generados en su mayor parte durante la transición entre los siglos XVII y XVIII, cuando las actividades de gestión forestal, incluyendo el fuego y el pastoreo intenso, provocaron la progresiva deforestación y, en consecuencia, la expansión del actual matorral propenso al fuego (López-Merino, 2009).

En el caso de La Serrota, la especie ocupa algunos puntos en las partes más elevadas de esta sierra. Las poblaciones que se encuentran en esta zona son las mejor conservadas, estando estas en muy buenas condiciones y con una amplia cantidad de individuos.

La notable dificultad de la localización de las poblaciones halladas, debido a su presencia en lugares poco transitables como son los piornales, pedreras y morrenas, unido a sus orientaciones variables (aunque siempre soleadas), hace posible su presencia en otras zonas (ME-Amat, 2013a).

Las poblaciones hasta ahora conocidas se hallan en laderas preferiblemente soleadas (normalmente con orientación sur), con altitudes que van de los 1.300 m.s.n.m. de Garganta Lóbrega (Candeleda) hasta los 2.200 m.s.n.m. de La Honda (Villatoro) (ME-Amat, 2013a).

La especie prospera en suelos rocosos que pueden incluir varios tipos de granito (Vargas, 2008). Prefiere suelos ácidos. Generalmente, se encuentra en pastizales y piornales supra- y oromediterráneos (Martínez *et al.*, 2004) Acompaña a *Genista cinerascens* Lange, *Cytisus oromediterraneus* Rivas Mart. *et al.*, *Festuca indigesta* Boiss., *Festuca elegans* Boiss., *Arenaria querioides* Pourr. *ex Willk.*, *Linaria elegans* Cav., *Linaria nivea* Boiss. & Reut., *Trisetum ovatu* Pres. o *Arrhenatherum carpetanum* P.Beauv. Como hábitat secundario crece también en fisuras de rocas graníticas.

1.2. Aspectos evolutivos y taxonómicos

1.2.1. Dificultades de asignación taxonómica de la especie y diferencias frente a géneros afines

La especie *P. rivas-martinezii* se describió inicialmente, en el año 1988, como *Misopates rivas-martinezii* Sanchez-Mata. La inclusión a este grupo taxonómico se debió a las características morfológicas de la especie, que, al ser simétrica y tener semillas ornamentadas, se confunde fácilmente con el género *Misopates*. Posteriormente, pasó a ser *Acanthorrhinum rivas-martinezii*, en base a rasgos fenológicos tales como la cortedad de los sépalos, que contrastaba con los sépalos largos y desiguales del género *Misopates*. El número cromosómico resultó ser de $n=7$, respecto al $n=8$ del género *Misopates*, lo que reforzó la no pertenencia de la especie a este género. También se observó que la especie era perennifolia. En base a la morfología y fisiología de sus semillas, la cápsula con dos lóculos subiguales, el indumento de la planta, sus tallos rizomatosos y los sépalos subiguales, Güemes propuso en 1997 la creación de un nuevo género ibérico: *Pseudomisopates* (FIGURA 1).

Reino: Plantae
Filo: Tracheophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Lamiales
Familia: Plantaginaceae
Género: *Pseudomisopates* Güemes
Especie: *Pseudomisopates rivas-martinezii*
 (Sanchez-Matas) Güemes



FIGURA 1. Ficha taxonómica de la especie objeto de estudio.

Estudios filogenéticos posteriores, realizados por Vargas *et al.*, 2008, con marcadores ITS sobre la tribu que se creía perteneciente a Antirrhineae, apoyan este tratamiento de género monotípico debido principalmente a su historia evolutiva, la cual la separaba de manera consensuada y correcta a los géneros a los que fue previamente asignado (ME-Amat, 2013a). De acuerdo con los niveles de variación de secuencias ITS, un notable proceso de aislamiento debe haber precedido la divergencia del género monotípico *Pseudomisopates* y de sus parientes más próximos, como son *Misopates* o *Acanthorrhinum* (Vargas, 2008). Las principales diferencias frente al primero de estos dos géneros se resumen en la TABLA 1.

TABLA 1. Diferencias morfológicas entre los géneros *Misopates* y *Pseudomisopates*.

Órgano	<i>Misopates</i>	<i>Pseudomisopates</i>
Hojas	Sésiles	Pecioladas, bordes engrosados
Cáliz	Más cortos que el tubo de la corola y que la cápsula	Más largos que el tubo de la corola y que la cápsula
Cápsula	Lóculos iguales	Lóculos desiguales
Semillas	Muy numerosas, simétricas	Pocos numerosas, ciatiformes y con asimetría dorsiventral

Aparte de las diferencias en sus órganos, también existen diferencias en su ecología y distribución, aunque ciertas especies concretas de estos géneros se distribuyen también en los hábitats en los que puede encontrarse *P. rivas-martinezii*.

Las especies más similares conocidas son:

- *Misopates orontium* (L.) Raf.: Especie perteneciente al género *Misopates*, comparte similitudes con *P. rivas-martinezii* sobre todo en la forma general de las flores y en el hábito de crecimiento. Aun así, se observa la característica diferenciadora de que en esta especie las semillas son simétricas, a diferencia de la forma ciatiforme y asimétrica de *Pseudomisopates*.
- *Acanthorrhinum ramosissimum* (Coss. & Durieu) Rothm.: En este caso, presenta similitudes en las semillas ciatiformes y en la relación fitogenética con el género *Pseudomisopates*. Se diferencian en el hábito de crecimiento y en la morfología floral.

1.2.2. *Origen evolutivo*

La compleja geografía del Mediterráneo, marcada por montañas e islas, ha propiciado unas condiciones que favorecen el aislamiento de las poblaciones vegetales. Originariamente se creía que muchas de estas especies se desarrollaron recientemente debido a adaptaciones hacia cambios medioambientales, en un proceso de especiación geográfica (Vargas, 2017). Sin embargo, un estudio con ITS sobre endemismos concluyó que se produjeron importantes procesos de aislamiento antes del Cuaternario (en el Mioceno), lo que contribuyó a la divergencia de *Pseudomisopates* de otros géneros relacionados (Vargas, 2008).

La especie *P. rivas-martinezii* se originó entre el Mioceno tardío y el Pleistoceno. A medida que la planta se adaptó a las condiciones ambientales específicas de su hábitat aislado, desarrolló rasgos que le permitieron prosperar en microclimas o tipos de suelo únicos de la región. Esta especialización pudo mejorar su competitividad dentro de su hábitat nativo, pero también puede aumentar su vulnerabilidad a los cambios medioambientales (Vargas, 2017)

En el estudio de Jiménez-Mejías, 2015 se estimaron los tiempos de divergencia entre las poblaciones de Gredos y La Serrota, sugiriendo que divergieron durante el Pleistoceno tardío. Este hallazgo fue corroborado por los árboles filogenéticos generados a partir de secuencias de ADN plastidial, indicando un aislamiento a largo plazo debido a las condiciones climáticas que moldearon su distribución histórica (Jiménez-Mejías, 2015).

1.2.3. *Diversidad genética*

La especie *P. rivas-martinezii* presenta un tipo de genética diferente al de otros géneros de la misma familia. Es por ello, y por los fenotipos asociados a esta genética, que la especie fue considerada diferente, y por lo que se creó el taxón concreto de *Pseudomisopates*. De hecho, la especie está reconocido como un micro-endemismo, que se caracterizan por tener una distribución muy reducida (Jiménez-Mejías, 2015).

El estudio de la genética de estos micro-endemismos es de suma importancia puesto que puede ayudar a concienciar a la población sobre el tamaño efectivo de la especie y su aislamiento a largo plazo, el cual supone una amenaza para su conservación. Además, la diversidad genética

permite a las poblaciones adaptarse a un entorno cambiante y es vital para evaluar estrategias de conservación adecuadas (Falk-Holsinger, 1991).

Un estudio llevado a cabo por Jiménez-Mejías, 2015 analizó la variación genética de las distintas poblaciones de *P. rivas-martinezii* y evaluó espacio-temporalmente la distribución que posee. El estudio utilizó polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), secuencias de ADN nuclear y plastidial y modelización de la distribución de la especie. Para ello, se tomaron hasta 188 muestras de *P. rivas-martinezii* de 8 poblaciones conocidas, y se les aplicaron los métodos previamente mencionados. Gracias a este método de AFLP, se lograron detectar 42 genotipos, en comparación con los 23 genotipos que se identificaron con el método de repeticiones de secuencias simples (SSR) que se había utilizado en anteriores estudios en el mismo sitio.

Las especies que componen los micro-endemismos generalmente han recibido bastante poca atención biogeográfica. (Jiménez-Mejías, 2015), lo que hace que carezcamos de información al respecto de la genética que han de tener, aunque, en general, se podría esperar que, al estar todas localizadas en un mismo sistema montañoso, tengan una genética muy similar o casi idéntica (Mertens, 2018).

Uno de los resultados más significativos del análisis AFLP fue la detección de un número considerable de clones dentro de las poblaciones. Los datos AFLP indicaron que aproximadamente el 27% de los individuos muestreados fueron detectados como clones putativos con una tasa de error del 2%, y que la tasa aumentó al 36% cuando se aplicaba una tasa de error del 3%. Esto sugiere un alto nivel de reproducción asexual o crecimiento clonal en *Pseudomisopates*, lo que conduce a una densa estructuración genética dentro de las poblaciones.

Se observó una diversidad genética significativa entre las poblaciones una vez eliminados los clones, con Gredos mostrando métricas de diversidad ligeramente superiores ($0,255 \pm 0,170$) que La Serrota ($0,237 \pm 0,191$). Los resultados se asemejan mucho a los obtenidos con SSR en estudios anteriores, con valores bajos (0,23), pues hay muchos clones (ME-Amat, 2013b). Se observó que el 91,48% de la variación genética se atribuía a diferencias entre individuos dentro de las poblaciones, lo que indica una baja diferenciación a mayor escala geográfica pero una rica diversidad genética mantenida dentro de las poblaciones locales. Este resultado cuestiona la idea

convencional de que los micro-endemismos poseen intrínsecamente bajos niveles de diversidad genética (Jiménez-Mejías, 2015)

Los autores del estudio afirmaron que *P. rivas-martinezii* ejemplifica cómo los hábitats adecuados y la estabilidad ambiental a largo plazo pueden preservar la diversidad genética a pesar del aislamiento al que se ha visto sometida por estar en 2 sierras distintas como son Gredos y La Serrota. El problema actualmente es que el clima es cambiante, y, si bien es cierto que esto puede no afectar negativamente a corto plazo (pues se están intensificando los incendios y esto resulta en una ventaja para la especie), a largo plazo el aumento de temperaturas puede hacer que las condiciones ecológicas varíen y se presenten nuevos problemas de conservación.

Aunque la clonación puede amortiguar la deriva genética y la pérdida de alelos en poblaciones pequeñas, también plantea riesgos, como una menor adaptabilidad a entornos cambiantes, algo crucial para poder conservar la especie en un futuro (Jiménez-Mejías, 2015). Conforme a lo indicado más arriba, este crecimiento clonal se ve potenciado por condiciones ambientales desfavorables, permitiendo a *P. rivas-martinezii* persistir y escapar a la extinción en un entorno de matorral sucesional (ME-Amat, 2013b). En la reproducción asexual también existe adaptación, y es relevante, puesto que puede modificar las semillas y se pueden generar adaptaciones futuras. (Pan and Price, 2002)

La diferenciación entre distintas manchas podría deberse a la fragmentación pasada de la población y a la colonización a partir de semillas, mientras que la mayor diferenciación dentro de las parcelas apunta a una dispersión limitada tanto del polen como de las semillas. Además, la diferenciación entre pastizales y matorrales podría deberse a diferencias de hábitat, el pastoreo intenso y la forma de crecimiento (ME-Amat, 2013b)

Según Jiménez-Mejías, 2015, para la conservación de esta especie a largo plazo se requieren estrategias que hagan hincapié en la importancia de mantener la conectividad del hábitat y permitir el flujo potencial de genes entre poblaciones aisladas. De este modo, la diversidad genética no sólo se preservaría, sino que se potenciaría activamente con el paso del tiempo. A pesar de estar en peligro crítico, la clonalidad representa probablemente la mejor estrategia para la supervivencia de esta especie hasta que acontezca la siguiente perturbación.

1.3. Conservación

1.3.1. Estado de conservación e importancia

La especie se recoge en la Lista Roja de la Flora Vascular Española (Martínez et al., 2004). Se encuentra catalogada como “en peligro crítico” según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). En concreto, los criterios que se siguieron para determinar esta categorización fueron la pequeña superficie, de tan solo 0,7 km², y la baja cantidad de individuos que existen (ME-Amat, 2013a). Además, se ha de tener en cuenta que la mayoría de los individuos que existen son clones los unos de los otros, pues en cada población la práctica totalidad de los individuos que se observan provienen de la misma estructura de ramet. Esto hace que disminuya la variabilidad genética que existe entre los distintos individuos. La distancia entre las distintas poblaciones tampoco sugiere un futuro próspero para esta especie por la dificultad de que exista una reproducción sexual entre estos grupos de individuos.

La especie *P. rivas-martinezii* es la única especie conocida de su género, *Pseudomisopates*. Esta característica por sí sola justifica la necesidad de su conservación. No obstante, las especies monotípicas han sufrido de un constante y generalizado abandono en pro de aquellas especies más productivas por parte de las Administraciones (ME-Amat, 2013a). Esto se atribuye a la carencia o desconocimiento de los usos que podrían tener estas especies, así como a la rentabilidad de las especies tradicionalmente más productivas y con usos marcados.

Otro motivo que justifica su conservación es que se trata de un endemismo. Las especies endémicas son apreciadas por la población, así como por la comunidad científica, y tienen interés social y ecológico: perder una especie como es esta, sería perder herencia de la región (Nieto, 1999). Las especies endémicas son la representación más clara de la historia y evolución de una región, puesto que son el resultado de millones de años de adaptaciones al medio particular. Esta característica hace que puedan adquirir un valor cultural bastante elevado al ser asociadas a estandartes, laureadas, blasones, emblemas, escudos o representaciones artísticas e institucionales.

Aparte de su importancia cultural, las plantas endémicas suelen tener propiedades fitoquímicas únicas que pueden resultar beneficiosas con fines medicinales. Por ejemplo, investigaciones sobre plantas endémicas de Hawái han demostrado que poseen distintas actividades

biológicas que pueden aprovecharse para aplicaciones sanitarias (Meesakul, 2023). Este potencial de uso medicinal subraya la importancia de conservar estas especies, ya que su pérdida podría significar la desaparición de recursos valiosos para las generaciones futuras.

Además, la conservación de plantas endémicas también puede contribuir a la resiliencia de los ecosistemas frente a los cambios ambientales. Por ejemplo, se ha demostrado que regiones con altos niveles de endemismo como la meseta Qinghai-Tíbet son cruciales para mantener la diversidad de plantas y las funciones ecológicas, como sustentar a diversas comunidades biológicas (Li, 2024). La protección de estas especies endémicas puede ayudar a garantizar que los ecosistemas sigan siendo robustos y capaces de adaptarse a las condiciones climáticas cambiantes.

1.3.2. Retos para su conservación

1.3.2.1. Limitaciones asociadas al polen

La especie tiene una polinización principalmente entomófila, lo que significa que en la mayoría de los casos tiene una dependencia en los insectos para poder lograr polinizar las flores. La ventaja que tiene es que no es dioica, pues esto complicaría aún más si cabe la polinización. Tiene flores hermafroditas, pero requiere de los insectos para que las células germinativas del polen puedan alcanzar los óvulos y el núcleo polar, donde se crearán respectivamente el cigoto y el endospermo.

Las especies entomófilas pueden padecer de una baja densidad de polen o bien una baja calidad del mismo (ME-Amat, 2010). En un estudio previo, ME-Amat, 2010 trató de determinar el sistema de apareamiento y evaluar las limitaciones del polen y de la producción de semillas. Para ello, realizó una caracterización de las especies visitantes, abundancia y comportamiento. También analizó la cantidad y calidad del polen para determinar la capacidad reproductiva sexual de la especie. El estudio se realizó en una población de La Serrota. Dicha población tenía una densidad de 27 ramets/km². Las poblaciones más cercanas se encontraban a 1 y 2,5 km, respectivamente, y no existían individuos aislados entre poblaciones. De ese modo, se pudo estudiar la agamosperma, la autogamia espontánea, la autogamia obligada, la polinización cruzada, y la suplementación de polen respecto a un control.

Los resultados mostraron que la metodología de polinización que mejor éxito reproductivo tiene es la polinización cruzada, que produjo un 53% más de frutos y un 46% más de semillas que el control. A pesar de ello, las pérdidas a lo largo de las distintas etapas del ciclo reproductivo llevan a que tenga tan solo un 10% de éxito (FIGURA 2).

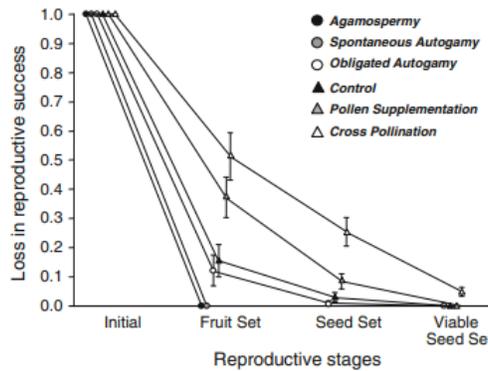


FIGURA 2. Éxito reproductivo según las distintas etapas de *Pseudomisopates rivas-martinezii*. Fuente: ME-Amat 2010.

También se estudió la cantidad de insectos que visitaban a la especie, tomándose solo en cuenta aquellos que se posaban en las anteras o el estigma, de modo que puedan diseminar el polen. Se observaron 26 especies de insectos, principalmente coleópteros e himenópteros (ME-Amat, 2010).

El estudio concluyó que una limitación es la de cantidad de polen que llega al estigma, pero que también padece de limitaciones de calidad de polen. Esto se debe a que, al haber grandes cantidades de especies clonales en un mismo área (pues la reproducción asexual mediante ramets es más efectiva) no encuentran manera de realizar la polinización cruzada. Al ser una planta predominantemente autoincompatible, la reproducción sexual surte muy poco efecto. Tampoco es probable que las poblaciones reciban polen de otras poblaciones cercanas, puesto que las distancias entre las mismas son grandes (ME-Amat, 2010).

La existencia de pequeñas poblaciones clonales, alejadas las unas de las otras, autoincompatibles y con una polinización ineficiente puede llevar esta especie a la extinción, como ha sido el caso de otras especies en similares circunstancias y condiciones (Silverton, 2008).

1.3.2.2. Especialización de la flor

La familia Plantaginaceae (anteriormente conocida como Antirrhineae) presenta floración personada. Esta característica, en la mayoría de los casos, hace que se ocluya parcialmente la entrada al tubo floral. Se creía que era una característica derivada, pero se ha demostrado que es una característica ancestral (Guzmán, 2015). Una ventaja de las flores personadas es que generalmente ayudan a evitar que exista una geitonogamia, es decir, una transferencia de polen de una flor a otra de la misma planta.

Este tipo de floración puede hacer que ciertas especies de polinizadores estén mejor adaptadas que otras. Por ejemplo, en flores personadas, la especie *Anthophora* spp., aún visitando menos flores que otras especies como *Apis* spp., es capaz de producir más semillas por visita (Sánchez-Lafuente, 2011).

Este tipo de especialización genera una fuerte dependencia de las abejas, pues 18 géneros de la familia son principalmente visitados por abejas, seguido de colibríes y coleópteros en algunos de los casos (Guzmán, 2017). En el caso concreto de *P. rivas-martinezii*, las especies que están mejor adaptadas a la polinización de la misma son las distintas especies de abejas (Vargas, 2008). No obstante, en el estudio llevado a cabo por Guzmán, 2017 se descubrió que en realidad esta especie es considerada como algo más generalista, puesto que es visitada también por otras especies como escarabajos, mariposas, moscas y polillas (Guzmán, 2017).

La tasa de visitas de insectos en la especie *P. rivas-martinezii* es suficientemente alta como para que no se pueda considerar que existe una clara carencia de visitas a las flores. El mayor problema al que está expuesta esta especie es que las poblaciones de sí misma están tan separadas y son tan escasas que es muy improbable que un insecto se pose en una población y posteriormente se pose en otra población de la misma especie.

1.3.2.3. Requerimientos para la germinación

La especie *P. rivas-martinezii* tiene un requisito fundamental para la correcta germinación de las semillas, común a gran parte de las especies de montaña (Körner, 2003): un periodo frío, o de estratificación en frío natural. De hecho, la especie *P. rivas-martinezii* presenta clara evidencia de la fuerte dormancia de sus semillas (Martínez et al., 2004).

También se ve favorecida por los efectos del fuego, los claros de vegetación y el rebrote, que logran una mejoría en la germinación de las semillas (ME-Amat, 2014). En el caso del fuego, elimina la competencia y mejora los recursos disponibles. La ceniza afecta al suelo, variando el pH y la concentración de sales, generando así un entorno favorable para la germinación. En Gredos, tras un incendio en una ladera de la montaña, se pudo observar cómo se pobló el área con múltiples ejemplares de *P. rivas-martinezii*, hasta ser posteriormente dominados por las escobas típicas de estos paisajes montañosos del sur de Ávila.

En el estudio de ME-Amat, 2014, se analizó la germinación de semillas de *P. rivas-martinezii* sometidas a tratamientos en condiciones controladas: exposición a calor, a frío, a oscuridad permanente, adición de cenizas, aplicación de ácido giberélico, estratificación y estratificación con ácido giberélico. Las semillas que no recibieron ningún tipo de tratamiento presentaron una tasa de germinación de tan solo el 1% (ME-Amat, 2014). Esto confirma que *P. rivas-martinezii* tiene unos requerimientos muy exigentes para una germinación efectiva. El mejor resultado se produjo en condiciones de adición de ceniza, pues aumentó el ratio de germinación hasta 0,32 unidades, seguido de la estratificación, y de la estratificación con ácido giberélico, ambas con un ratio de germinación de 0,15-0,2 unidades en el día 60 del estudio. Menos favorable, aunque con mejores resultados que el control, fue la exposición a altas temperaturas, que aumentó el ratio de germinación hasta en 0,10 unidades. También se observó que la oscuridad reduce la germinación incluso después de la estratificación, lo que pone de relieve el papel de la luz en el proceso de germinación de esta especie. Esto sugiere que las semillas podrían estar adaptadas para germinar en zonas abiertas donde pueda penetrar la luz solar, favoreciendo su supervivencia en entornos moldeados por el fuego. En cambio, las semillas enterradas en matorrales densos donde la luz es limitada muestran tasas de germinación reducidas, lo que implica que la sucesión ecológica y la estructura del hábitat afectan significativamente al ciclo vital de las semillas (ME-Amat, 2014).

1.3.2.4. Dominancia de los piornales y herbivoría

La mayoría del territorio de la especie se encuentra dominado por piornales. Cuando esto sucede, se observa una reducción significativa en la capacidad de la planta de reproducirse sexualmente, entre otros motivos, porque reduce significativamente la cantidad de flores y semillas que produce. También sucede que, ante la dominancia de las escobas y piornales, la especie disminuye considerablemente su tamaño, quedando menos ramificada y en una forma recta y ascendente, en 1 único tallo.

Como se ha indicado anteriormente, la especie presenta un sistema de reproducción mixto que le permite beneficiarse de distintas estrategias y escapar de la estocasticidad ambiental. La reproducción sexual es el principal factor que determina la formación de nuevos genets mientras que el crecimiento clonal es uno de los principales factores que determinan el crecimiento de la población (ME-Amat, 2013b). En situaciones de dominancia por parte del piornal, la especie opta por la reproducción asexual, como otras especies de plantas que translocan los recursos disponibles para priorizar un crecimiento clonal (D'Hertefeldt, 1994).

La consecuencia directa de la reproducción asexual son poblaciones de menor tamaño, entre otros motivos, por la dificultad de escapar de la dominancia del piornal mediante la generación de nuevas poblaciones, de manera sexual, en zonas en las que no exista presencia de las escobas. Las poblaciones que se encuentran dominadas disminuyen drásticamente el número de clones presentes.

Es preciso recordar que, en el caso de las especies clonales que germinan en respuesta a las perturbaciones (como puede ser el fuego), y que posteriormente son cubiertas por arbustos, el rebrote y la siembra desempeñan un papel crucial (Ojeda Copete, 2005), por lo que lógico que adopten la reproducción asexual. En las zonas asoladas por el fuego, la especie se expande rápidamente hasta ocupar gran parte de la zona quemada. Posteriormente, el piornal comienza a poblar estas mismas superficies, resultando en una clara dominancia de este sobre *P. rivasmartinezii*, cuyas poblaciones se ven drásticamente reducidas.

El otro problema de la especie es la herbivoría y el pastoreo al que se enfrenta esta especie en la naturaleza. Las principales especies animales que se alimentan de ella son vacas y cabras, siendo las segundas las más habituales en las altitudes donde se distribuye este endemismo.

En estudios anteriores, se realizó un plan de conservación que evitaba la herbivoría en “La Covacha”. En esta experiencia, se aisló la especie, dejando un trozo de terreno totalmente baldío y sin piornal o especies que puedan dominar sobre *Pseudomisopates*. A esta superficie en la montaña de Ávila se le construyó un vallado exterior para evitar que las especies rumiantes típicas de estos sistemas montañosos pudiesen tener acceso a ellas, depredándolas y disminuyendo la cantidad de individuos presentes en ella (Vargas).

El resultado de la experiencia no fue alentador: el piornal acabó ocupando toda el área vallada (FIGURA 3), encontrándose mayor número de individuos de *Pseudomisopates* en el exterior de la zona vallada que en el interior de la misma.

La conclusión que se puede extraer es, que, aún en la situación de no existencia de herbivoría y pastoreo en un área (o de menor presión, habida cuenta la falta de mantenimiento del vallado, que permite observar caminos y sendas de animales en el interior del área cercada; FIGURA 4, la especie se ve demasiado dominada por parte del piornal, por lo que tenderá a colonizar otras zonas.



FIGURA 3. Situación actual de la zona vallada, repleta de piornales.



FIGURA 4. Sendas de animales que en el interior del vallado.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Hipótesis de partida: La caracterización fitoquímica de *P. rivas-martinezii* y el análisis de sus comunidades microbianas rizosféricas aportarán información complementaria sobre la biología de la especie que, integrada con el conocimiento previo, contribuirá al desarrollo de recomendaciones técnicas más fundamentadas para su conservación.

Objetivo general: Ampliar el conocimiento científico sobre *P. rivas-martinezii* mediante análisis fitoquímicos y microbiológicos que contribuyan al desarrollo de estrategias de conservación para esta especie monotípica en peligro crítico de extinción.

Este objetivo general se concreta en tres objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Analizar el perfil fitoquímico de P. rivas-martinezii

Caracterizar mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas la composición química de extractos de parte radicular y aérea de especímenes procedentes de las poblaciones de La Serrota y Gredos. Se evaluarán las posibles diferencias interpoblacionales y se explorará la actividad antibioicética de los extractos como aproximación a su potencial valorización.

Objetivo específico 2: Estudiar la microbiota del suelo rizosférico

Caracterizar mediante técnicas metagenómicas las comunidades microbianas fúngicas y bacterianas asociadas a los suelos rizosféricos de *P. rivas-martinezii* en ambas poblaciones. Este análisis permitirá describir la diversidad y composición microbiana, así como evaluar posibles diferencias relacionadas con la localización geográfica y el estado de conservación de las poblaciones.

Objetivo específico 3: Formular recomendaciones técnicas para la conservación

Desarrollar un plan de conservación que integre los hallazgos fitoquímicos y microbiológicos obtenidos con el conocimiento previo disponible sobre la especie. Este plan incluirá propuestas específicas de manejo del hábitat, estrategias de seguimiento y recomendaciones para la protección de las poblaciones existentes.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Recogida de muestras de *Pseudomisopates rivas-martinezii*

Las muestras de *P. rivas-martinezii* objeto de estudio se recogieron en agosto de 2024 en la Sierra de Gredos y la Sierra de La Serrota (Ávila). Los especímenes fueron identificados y autenticados por la Dra. María Elena Amat de León (CSIC), con autorización de la Dirección General de Patrimonio Natural y Política Forestal de la Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio de la Junta de Castilla y León.

Las muestras de distintos especímenes ($n = 20$) de cada población se mezclaron para obtener muestras compuestas, que se secaron a la sombra, se pulverizaron hasta obtener un polvo fino en un molino triturador, se homogeneizaron, y se tamizaron (malla de 1 mm) para su posterior análisis elemental y la obtención de extractos.

3.2. Reactivos y aislados fúngicos

El hidróxido de amonio (solución acuosa al 50% v/v) se adquirió a Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EE.UU.). El ácido acético (80% en H₂O, grado *purum*) y el agar de patata y dextrosa (PDA) fueron suministrados por Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, España).

El fungicida comercial utilizado como control positivo en los experimentos *in vitro*, Fosbel[®] (fosetil-Al 80%, n.º reg. 25502; Probelte, Murcia, España), fue proporcionado por el Servicio de Sanidad Vegetal y Certificación (CSCV) del Gobierno de Aragón.

El aislado de *Phytophthora plurivora* T.Jung & T.I.Burgess fue suministrado por el área de Producción Vegetal (Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid).

3.3. Preparación de los extractos

El proceso de extracción mediante ultrasonidos fue similar al descrito en Sánchez-Hernández *et al.* (2022a y 2023a). Se optó por una digestión en una solución acuosa de amoníaco para disolver los polifenoles y otros compuestos bioactivos de interés contenidos en los rizomas de *P. rivas-martinezii*; mientras que para la parte aérea se optó por un medio hidrometanólico que ofrece versatilidad, rentabilidad y extracción eficiente de una amplia gama de fitoquímicos. La extracción asistida por ultrasonidos permite aumentar la eficacia de la extracción, reducir el tiempo de extracción, preservar la integridad de los compuestos y ahorrar energía.

Brevemente, la muestra de polvo de rizomas se digirió en una solución acuosa de amoníaco (200 mL de H₂O + 50 mL de NH₃) durante 2 horas, y luego se sometió a sonicación en modo pulsado durante 10 minutos (con una parada de 2 minutos cada 2,5 minutos), empleando un ultrasonicador modelo UP400St (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Alemania). La solución se dejó reposar durante 24 horas, se neutralizó a pH 7 con ácido acético, se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró con papel Whatman n.º 1. Para la parte aérea se siguió el mismo procedimiento de extracción, pero empleando un medio hidrometanólico (100 mL de H₂O + 50 mL de metanol).

Tras la extracción, se liofilizaron alícuotas de los extractos de los rizomas y la parte aérea. Para su caracterización por cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS), los extractos liofilizados se redisolviaron en metanol (de grado HPLC) para obtener soluciones con una concentración de 5 mg/mL, que se filtraron antes de su inyección.

3.4. Caracterización fisicoquímica

Los análisis elementales de las muestras molidas secas (3 mg/muestra) se realizaron con un equipo CHNS-932 (LECO, St. Joseph, MI, EE.UU.). Los valores caloríficos se calcularon a partir de los datos de los análisis elementales según Talwalkar (1981), utilizando la siguiente ecuación

$$\text{HHV} = (0,341 \times \%C) + (1,322 \times \%H) - 0,12 (\%O + \%N)$$

donde el *higher heating value* (HHV) es el valor calorífico para el material seco, expresado en kJ/g, y %C, %H, %O y %N son las fracciones de masa, expresadas en % de peso de material seco.

Los extractos se analizaron mediante por CG-MS en los Servicios Técnicos de Investigación (SSTTI) de la Universidad de Alicante (Alicante, España), utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890A acoplado a un espectrómetro de masas de cuatro polos modelo 5975C. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: volumen de inyección = 1 μ L; temperatura del inyector = 280 °C, en modo *splitless*; temperatura inicial del horno = 60 °C, 2 min, seguida de una rampa de 10 °C/min hasta una temperatura final de 300 °C, 15 min. La columna cromatográfica utilizada para la separación de los compuestos fue una columna HP-5MS UI de Agilent Technologies con una longitud de 30 m, un diámetro de 0,250 mm y un espesor de película de 0,25 μ m. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: temperatura de la fuente de impacto de electrones del espectrómetro de masas = 230 °C; temperatura del cuadrupolo = 150 °C; energía de ionización = 70 eV. La identificación de los componentes se basó en la comparación de sus espectros de masas y su tiempo de retención con las bases de datos del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST11) y Wiley.

3.5. Estudio de la actividad antioomycética *in vitro*

La actividad antioomycética de los extractos de rizomas y parte aérea de *P. rivas-martinezii* de las dos localidades muestreadas se examinaron utilizando el método estándar EUCAST (Arendrup *et al.*, 2012). Se añadieron alícuotas de las soluciones madre al medio PDA para obtener concentraciones finales en el intervalo de 46,8-1500 μ g/mL. Se transfirieron tapones de micelio del margen de un cultivo de PDA de *Phytophthora plurivora* (de una semana) a placas con las distintas concentraciones arriba indicadas. Para cada combinación de tratamiento y concentración se utilizaron tres placas y cada experimento se realizó dos veces. El control sin tratamiento consistió en sustituir el extracto por el disolvente utilizado para la extracción en el medio PDA. El control positivo consistió en el fungicida comercial Fosbel® (fosetil-Al 80%) y se realizó de acuerdo con las indicaciones y dosis recomendadas por el fabricante. También se incluyeron controles adicionales, consistentes en medio PDA puro y PDA con la menor concentración del tratamiento, para confirmar la ausencia de contaminación.

Se decidió segregar el análisis de los fungicidas del de la evaluación de los extractos por varias razones: por un lado, las concentraciones recomendadas de los productos comerciales suelen ser muy diferentes de las utilizadas en los estándares de laboratorio para la actividad antibiótica; por otro, los productos fungicidas comerciales suelen formularse con niveles de pureza específicos y a menudo contienen sustancias adicionales que mejoran su eficacia (y, en consecuencia, su curva dosis-respuesta), mientras que los extractos de plantas son matrices complejas de varios componentes activos, en las que el ajuste de las concentraciones finales empleadas se realiza en conjunto en cada extracto específico.

En todos los bioensayos, el crecimiento del micelio se evaluó midiendo la media de dos diámetros de colonia perpendiculares entre sí en cada repetición. La supresión del crecimiento se determinó mediante la siguiente fórmula tras una incubación de una semana en completa oscuridad a una temperatura de 25 °C: $((d_c - d_t)/d_c) \times 100$, donde d_c denota el diámetro medio de la colonia en el control no tratado, y d_t representa el diámetro medio de la colonia tratada. Las concentraciones efectivas se estimaron ajustándolas a una ecuación logística de cuatro parámetros (curva dosis-respuesta).

3.6. Protección *ex situ* de tallos de *Alnus glutinosa* inoculados artificialmente

Dadas las restricciones que se aplican a los ensayos *in vivo* con *P. plurivora*, se investigó la eficacia del tratamiento más activo en las pruebas *in vitro* (es decir, el extracto de la parte aérea de ejemplares recolectados en La Serrota) mediante inoculación artificial de tallos extirpados de aliso común (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) en condiciones controladas de laboratorio. La inoculación se realizó según el procedimiento propuesto por Matheron y Mircetich (1985), con ligeras modificaciones (descritas en Sánchez-Hernández *et al.*, 2023b). Los tallos jóvenes (1,5-2 cm de diámetro) de plantas sanas de *A. glutinosa* se cortaron en secciones de 5,5 cm de longitud utilizando un cuchillo de injerto esterilizado. Los trozos de tallo extirpados se envolvieron inmediatamente en papel absorbente estéril humedecido. En el laboratorio, los segmentos de tallo recién extirpados se sumergieron primero en una solución de NaClO al 3% durante 10 minutos, luego en etanol al 70% durante 10 minutos, y después se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril, para evitar contaminantes superficiales en el tejido.

Algunos de los segmentos de tallo ($n = 12$ para el control positivo y $n = 12$ para el control negativo) se empaparon durante una hora en agua destilada estéril para utilizarlos como controles, mientras que los segmentos de tallo restantes se empaparon durante una hora en el extracto hidrometanólico de la parte aérea de ejemplares de *P. rivas-martinezii* recolectados en La Serrota para obtener concentraciones de MIC, MIC $\times 5$ y MIC $\times 10$ ($n = 12$ segmentos/concentración). Se añadió un coadyuvante (Alkir[®], 1% v/v) a todas las soluciones, incluido el control, para facilitar la humectación y la penetración del tratamiento en la corteza. Tras el remojo, se dejaron secar los trozos de tallo y se retiró cuidadosamente la corteza con un bisturí para dejar al descubierto el cambium. A continuación, la corteza se colocó en una placa de Petri de agar y, en el caso del control positivo y las muestras tratadas, se inoculó colocando un tapón (diámetro = 5 mm) del margen de un cultivo de PDA de una semana de *P. plurivora* en el centro de la superficie interna de la corteza. Tras la inoculación, los segmentos de tallo se incubaron en una cámara húmeda durante 4 días a 24 °C y 95-98% de humedad relativa. La eficacia de los tratamientos se evaluó midiendo la longitud de los canchros que se desarrollaron en los lugares de inoculación.

3.7. Análisis estadístico de resultados *in vitro* y *ex situ*

Los resultados de la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* y de las longitudes de necrosis *ex situ* se sometieron a análisis estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA). Las comparaciones *post hoc* de las medias se realizaron mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los requisitos de homogeneidad y homocedasticidad se comprobaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics v.25.

3.8. Análisis metagenómico de rizosferas

Se recogieron muestras de suelo rizosférico correspondientes a 2 + 2 ejemplares muestreados en dos localizaciones (Sierra de Gredos y Sierra de La Serrota) respectivamente, para después mezclarlas y obtener dos submuestras por cada uno de los ejemplares muestreados (con la excepción de la segunda planta recogida en la localización Gredos, de la que únicamente se obtuvo

una muestra con suelo rizosférico). Cada una de las submuestras (7 en total) fue empleada para realizar la caracterización del microbioma.

Las mencionadas rizosferas (aquella porción edáfica en contacto íntimo con los sistemas radiculares de los individuos muestreados) se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesado. Tras esto, éstas fueron tamizadas y deshidratadas en horno seco, seleccionando (alícuotando) finalmente 3 tubos Eppendorf de 1,5 mL con 400 μg de suelo rizosférico por cada muestra original. Para la extracción del ADN genómico total de cada muestra se empleó el kit de extracción DNeasy Power Soil PRO-kit[®] de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante con ligeras modificaciones. Finalmente se cuantificó la concentración de ADN presente en cada muestra extraída usando un espectrofotómetro de microvolumen (Nanodrop[®]) y las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su secuenciación. Las reacciones de secuenciación de alto rendimiento (NGS) fueron llevadas a cabo por StabVida Lda. (Caparica, Portugal), y consistieron en la caracterización metagenómica en la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA) de la diversidad microbiana fúngica y bacteriana en cada muestra mediante la amplificación selectiva de la región ITS ribosomal (fragmento ITS2 empleando los *primers* ITS1f e ITS2 como *forward* y *reverse*, respectivamente) y el fragmento 16S ribosómico (regiones variables V3–V4, empleando la combinación de *primers* 16S_F(341F) y 16S_R(785R) como *forward* y *reverse*, respectivamente). Tras esto, se llevó a cabo un análisis bioinformático para la caracterización taxonómica de las diferentes Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) secuenciadas, su abundancia y distribución por planta y localización geográfica, o varios índices de diversidad asociados a cada planta (α -diversidad) y/o comparativamente entre localidades de muestreo (β -diversidad). Para la visualización de los resultados del estudio del microbioma se empleó el visor de la plataforma bioinformática QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019), incluyendo varios análisis de Componentes Principales en EMPEROR (Vázquez-Baeza *et al.*, 2013) basados en la métrica de diversidad de Bray-Curtis (Sørensen, 1948).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización mediante análisis elemental

Los resultados del análisis elemental de las muestras compuestas de *P. rivas-martinezii* procedentes de las poblaciones de La Serrota y Gredos se presentan en la TABLA 2.

TABLA 2. Resultados de análisis elemental de muestras compuestas de parte radicular y parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de las poblaciones de La Serrota y Gredos, y poderes caloríficos estimados.

Muestra	Procedencia	Nitrógeno (%)	Carbono (%)	Hidrógeno (%)	Azufre (%)	Oxígeno (% , por diferencia)	HHV (kJ/g)
Parte radicular	La Serrota	0,74±0,01	44,48±0,06	6,00±0,00	0,00±0,00	48,77	20,23
	Gredos	0,68±0,07	46,07±0,40	6,14±0,08	0,00±0,00	47,11	21,27
Parte aérea	La Serrota	1,89±0,22	44,80±0,55	6,23±0,13	0,00±0,00	47,09	20,73
	Gredos	1,00±0,02	45,29±0,15	6,09±0,04	0,00	47,61	20,79

El análisis elemental reveló una composición relativamente homogénea entre las dos poblaciones estudiadas, con valores de carbono que oscilaron entre 44,48±0,06% y 46,07±0,40% y de hidrógeno entre 6,00±0,00% y 6,23±0,13%. Estos valores se encuentran dentro del rango típico reportado para especies herbáceas mediterráneas (Telmo & Lousada, 2011). La población de Gredos mostró valores ligeramente superiores de carbono en la parte radicular (46,07% vs 44,48%) comparada con La Serrota.

Notablemente, no se detectó azufre en ninguna de las muestras analizadas, lo que sugiere una ausencia de aminoácidos azufrados o metabolitos secundarios sulfurados en cantidades significativas. Esta característica ha sido observada en otras especies de ambientes mediterráneos con limitaciones nutricionales (Sardans et al., 2012).

El contenido de nitrógeno mostró diferencias marcadas entre órganos, siendo consistentemente superior en la parte aérea (1,89±0,22% en La Serrota y 1,00±0,02% en Gredos) frente a la parte radicular (0,74±0,01% en La Serrota y 0,68±0,07% en Gredos). Esta distribución diferencial del nitrógeno refleja probablemente la mayor concentración de proteínas estructurales y enzimáticas en los tejidos fotosintéticos, así como la presencia de alcaloides y otros metabolitos nitrogenados en la parte aérea (Matile et al., 1999).

La variabilidad interpoblacional en el contenido de nitrógeno aéreo es notable, con La Serrota mostrando valores significativamente superiores (1,89%) respecto a Gredos (1,00%). Las causas de esta diferencia requieren estudios adicionales que incluyan análisis edáficos y ambientales específicos de cada localidad.

Respecto a los valores de poder calorífico superior (HHV) calculados, oscilaron entre 20,23 y 21,27 kJ/g. La parte radicular de la población de Gredos presentó el HHV más elevado (21,27 kJ/g), coincidiendo con su mayor contenido de carbono (46,07%). Los HHV obtenidos son comparables a los reportados para otras especies herbáceas mediterráneas y se encuentran en el rango típico de biomasa herbácea (18-22 kJ/g) (Vega-Nieva et al., 2015).

4.2. Caracterización de los extractos mediante GC-MS

El análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió identificar un perfil químico complejo en los extractos derivatizados de las muestras compuestas de parte aérea y parte radicular de *P. rivas-martinezii* procedentes de las poblaciones de La Serrota y Gredos. Los cromatogramas obtenidos (FIGURA A1) y las especies químicas identificadas (TABLA A1 a la TABLA A4) revelaron patrones de distribución específicos tanto a nivel de órgano como de población. Es preciso aclarar que el componente principal (50%) en todos los extractos fue el agente de derivatización (ácido trifluoroacético), que debe ser obviado. También se detectó contaminación por siloxanos (señalados en rojo en las tablas), que deben ser referidos a la columna de cromatografía, los septum y las líneas de transferencia, pero en cantidad que no afectan a la interpretación de resultados.

4.2.1. Composición química de la parte radicular

Los extractos de la parte radicular de ambas poblaciones mostraron una notable similitud en su composición química (TABLA 3, FIGURA 5), con la presencia consistente de tres compuestos principales: 1H-imidazol-1-metil-4-nitro, formamida N-metil y 3-metoxi-1H-pirazol-5-ilacetamida.

TABLA 3. Comparativa de especies químicas más abundantes identificadas mediante GC-MS en los extractos derivatizados de muestras compuestas de raíces y parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de las poblaciones de La Serrota y Gredos.

Población “La Serrota”	
Parte radicular	Parte aérea
Ácido acético, trifluoro-	Ácido acético, trifluoro-
1H-Imidazol, 1-metil-4-nitro-	Ciclohexanopropanol, α ,2,2,6-tetrametil-
Formamida, N-metil-	3,5-Dihidroxibenzamida
3-Metoxi-1H-pirazol-5-ilacetamida	Ácido 4H-Piran-3-carboxílico, 2-amino-5-ciano-6-etil-4-(3-piridinil)-, éster metílico
2-(4-Fluorofenil) indol	Benzo[h]quinolina, 2,4-dimetil-
3-Quinuclidinol	2,6-Di-n-propil-4-fenilpiridina
Di(1-metilciclobutil) éter	Ácido tereftalaldeídico, éster metílico, p-(O-metiloxima)
Catecol	Acetamida, N-[4-(fenil)-
(Butilamino)acetonitrilo	Ácido bencenoacético, α -hidroxi-, (R)-
Hidrazina, 1,2-dimetil-	Bencenotiol, 4-metoxi-
Ácido butanoico	
Población “Gredos”	
Parte radicular	Parte aérea
Ácido acético, trifluoro-	Ácido acético, trifluoro-
1H-Imidazol, 1-metil-4-nitro-	Ciclohexanopropanol, α ,2,2,6-tetrametil-
Formamida, N-metil-	Acetamida, 2,2,2-trifluoro-N-metil-
3-Metoxi-1H-pirazol-5-ilacetamida	Ácido benzoico, 2-(1,3-benzotiazol-2-il)-
2-(4-Fluorofenil) indol	1H-Pirrol, 3-metil-
3-Quinuclidinol	N-Acridin-9-il-N'-fenil-hidrazina
Acetamida, N-tetrahidrofurfuril	Piridina-2,3,5,6-tetraamina
(S)-(+)-3-Metil-1-pentanol 2-Propenamida	Dianhidromanitol
Ácido ciclopropanocarboxílico, éster tridec-2-inil	
Ciclohexeno,3-(2-propenil)-	
3,4-Metilpropilsuccinimida	
3-Formil-4,5-dimetil-pirrol	

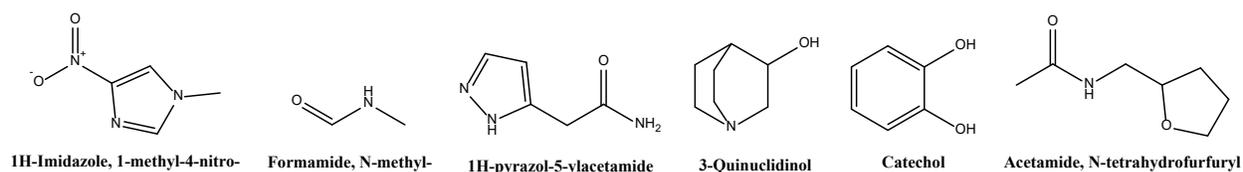


FIGURA 5. Estructuras químicas de las especies más abundantes identificadas mediante GC-MS en los extractos de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii*

Esta convergencia fitoquímica entre poblaciones geográficamente separadas sugiere un papel funcional importante de estos metabolitos en el sistema radicular, posiblemente relacionado con la defensa contra patógenos del suelo o la regulación del crecimiento radicular (Wink, 2003).

4.2.2. Composición química de la parte aérea

En contraste con la homogeneidad observada en las raíces, la composición química de la parte aérea mostró diferencias significativas entre poblaciones. Los especímenes de La Serrota presentaron un perfil dominado por derivados fenólicos (3,5-dihidroxibenzamida, ácido bencenoacético α -hidroxi, bencenotiol 4-metoxi; FIGURA 6), mientras que los de Gredos mostraron una mayor presencia de compuestos heterocíclicos nitrogenados (1H-pirrol 3-metil, N-acridin-9-il-N'-fenil-hidrazina, piridina-2,3,5,6-tetraamina; FIGURA 7).

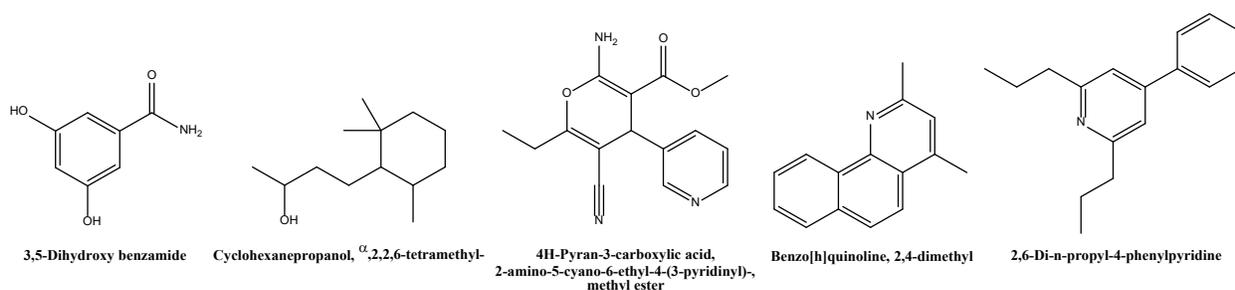


FIGURA 6. Estructuras químicas de las especies más abundantes identificadas mediante GC-MS en los extractos de parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de La Serrota.

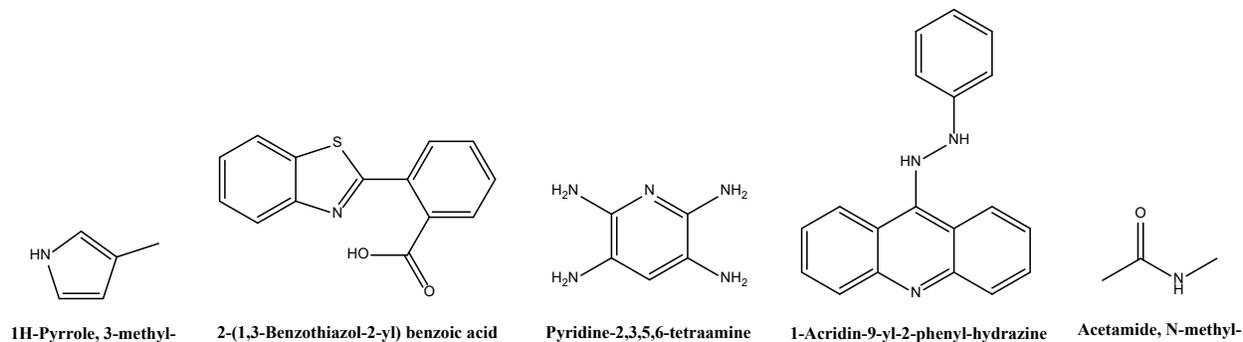


FIGURA 7. Estructuras químicas de las especies más abundantes identificadas mediante GC-MS en los extractos de parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de Gredos.

4.3. Análisis de las rutas biosintéticas

El análisis de las estructuras químicas identificadas en los extractos radiculares sugiere que varios de los compuestos principales podrían derivar de la L-histidina, la fenilalanina o el triptófano a través de diferentes rutas de degradación (FIGURA 8).

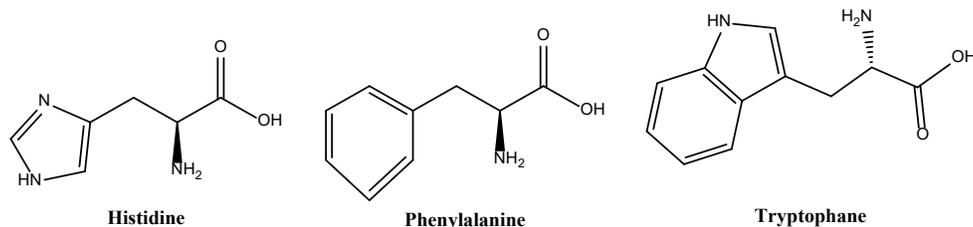


FIGURA 8. Estructuras químicas de los potenciales precursores de algunas de las especies químicas identificadas en los extractos.

4.3.1. Metabolitos derivados de la histidina

La presencia del 1H-imidazol-1-metil-4-nitro puede explicarse mediante la descarboxilación de la histidina seguida de metilación (del nitrógeno) y nitración (en posición 4) del anillo imidazólico mediante reacciones adicionales. Este tipo de transformaciones ha sido documentado en otras especies vegetales que producen alcaloides imidazólicos (Kutchan, 1995). La formamida N-metil podría originarse mediante la escisión oxidativa de la cadena lateral de la histidina, un proceso análogo al observado en la degradación de aminoácidos en condiciones de estrés oxidativo (Stadtman y Levine, 2003). En cuanto al catecol, aunque menos directo, la degradación oxidativa del anillo imidazólico de la histidina podría llevar potencialmente a la formación de este compuesto.

La acumulación preferencial de estos metabolitos en el sistema radicular podría estar relacionada con la función de la histidina en la quelación de metales pesados y la tolerancia al estrés abiótico en suelos graníticos, característicos del hábitat de *P. rivas-martinezii* (Krämer *et al.*, 1996).

4.3.2. Metabolitos derivados de aminoácidos aromáticos

Los compuestos identificados en la parte aérea muestran una clara diferenciación biosintética entre poblaciones. En La Serrota, la predominancia de derivados fenólicos sugiere una actividad elevada de la ruta del ácido shikímico y la posterior metabolización de la fenilalanina (Herrmann y Weaver, 1999). La 3,5-dihidroxibenzamida podría formarse mediante hidroxilación del anillo aromático de la fenilalanina seguida de descarboxilación y amidación, mientras que el ácido bencenoacético α -hidroxi representa probablemente un producto de la desaminación oxidativa de este aminoácido.

Por el contrario, los especímenes de Gredos mostraron un perfil químico que sugiere una mayor actividad de las rutas biosintéticas del triptófano. La presencia de 1H-pirrol 3-metil y derivados de acridina (como N-acridin-9-il-N'-fenil-hidrazina) apunta hacia procesos de degradación del anillo indólico característicos del catabolismo del triptófano (Radwanski y Last, 1995). La piridina-2,3,5,6-tetraamina representa un metabolito inusual que podría originarse mediante una reorganización oxidativa compleja del sistema indólico. Asimismo, el ácido benzoico, 2-(1,3-benzotiazol-2-il)- también se puede justificar por oxidación y reorganización del anillo indólico.

4.3.3. Implicaciones ecológicas y evolutivas

La divergencia química observada entre las poblaciones de La Serrota y Gredos en la parte aérea, contrastada con la convergencia en la parte radicular, sugiere diferentes presiones selectivas actuando sobre estos órganos. Mientras que el ambiente edáfico relativamente homogéneo de los suelos graníticos podría haber favorecido la conservación de un perfil químico radicular específico, las diferencias microclimáticas y de otros factores entre las dos localizaciones podrían haber promovido la diversificación de los metabolitos secundarios en la parte aérea (Hartmann, 2007).

La presencia de alcaloides imidazólicos en el rizoma de ambas poblaciones merece especial atención. Como señalan Rosenthal y Berenbaum (1991), estos compuestos suelen estar asociados con la defensa contra patógenos fúngicos del suelo, particularmente relevante en plantas que colonizan sustratos extremos donde la competencia microbiana es intensa.

4.4. Consideraciones quimiotaxonómicas

El perfil fitoquímico de *P. rivas-martinezii* muestra características distintivas dentro del género *Pseudomisopates* y, más ampliamente, dentro de la familia Plantaginaceae. La presencia de alcaloides imidazólicos es relativamente rara en esta familia, siendo más común en Rutaceae y Cactaceae (Wink, 2003). Esta singularidad química podría reflejar la evolución adaptativa de la especie a su hábitat especializado o representar una reliquia química de un ancestro común con un perfil metabólico diferente.

La variabilidad interpoblacional observada en los metabolitos de la parte aérea plantea interrogantes sobre el grado de aislamiento genético entre las poblaciones de La Serrota y Gredos. Estudios futuros deberían abordar si estas diferencias químicas se correlacionan con divergencia genética neutral o representan adaptaciones locales mediadas por selección natural.

4.5. Actividad antioomycética

4.5.1. Actividad *in vitro*

Los resultados de la prueba de susceptibilidad antioomycética se muestran en la FIGURA 9. Un aumento de la concentración de los tratamientos provocó una disminución del crecimiento del micelio para los cuatro extractos evaluados —extractos hidrometanólicos de la parte aérea y extractos hidroamoniacaes de rizoma de *P. rivas-martinezii*, obtenidos del material vegetal recolectado en Gredos o La Serrota—. Estos cambios resultaron en diferencias estadísticamente significativas.

El extracto hidrometanólico de la parte aérea de *P. rivas-martinezii* demostró una actividad antioomycética superior en comparación con el extracto hidroamoniacaal de su rizoma, con Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de 110 µg/mL y 250–375 µg/mL, respectivamente. Esta mayor efectividad se puede observar con mayor claridad en las concentraciones efectivas al 50 y 90% (CE₅₀ y CE₉₀, respectivamente) presentadas en la TABLA 4.

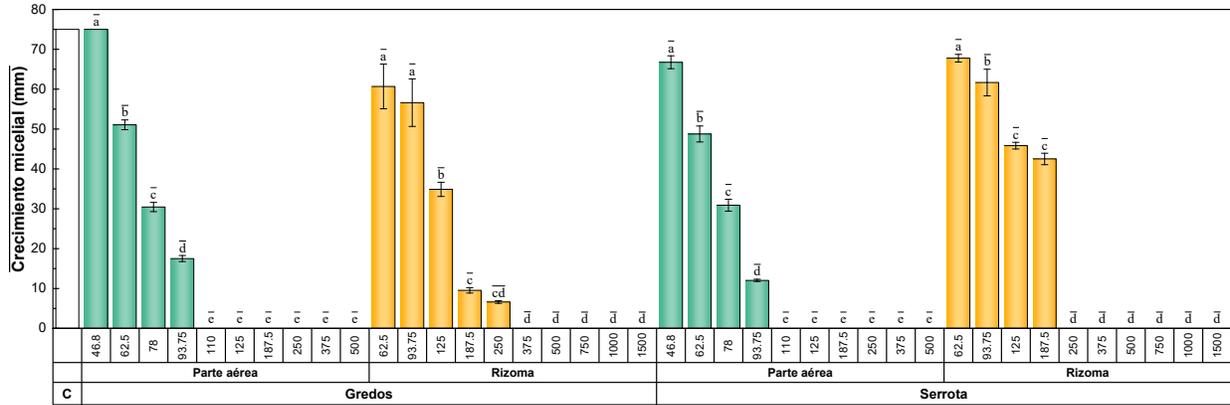


FIGURA 9. Inhibición del crecimiento micelial obtenida con extractos hidrometanólicos de la parte aérea e hidroamoniacaes del rizoma de *P. rivas-martinezii* del material vegetal recolectado en Gredos o La Serrota contra *P. plurivora* a concentraciones que van desde 46,8 hasta 1500 µg/mL. Las mismas letras sobre las concentraciones indican que no son significativamente diferentes a $p < 0,05$. Las barras de error representan las desviaciones estándares ($n = 6$). 'C' representa el control no tratado (es decir, medio PDA al que solo se añadió el disolvente utilizado para la extracción).

TABLA 4. Concentraciones efectivas (CE, expresadas en µg/mL) frente a *P. plurivora* de extractos hidrometanólicos de la parte aérea e hidroamoniacaes del rizoma de *P. rivas-martinezii* preparados a partir del material vegetal recolectado en Gredos o La Serrota.

Patógeno	CE	Extractos de <i>P. rivas-martinezii</i>			
		Parte aérea–Gredos	Rizoma–Gredos	Parte aérea–La Serrota	Rizoma–La Serrota
<i>P. plurivora</i>	CE ₅₀	72,7	121,2	72,3	194,9
	CE ₉₀	103,0	231,3	99,9	239,0

A efectos comparativos, los resultados de una revisión bibliográfica sobre la eficacia de sustancias bioactivas de origen natural contra *Phytophthora* spp. se recopilan en la TABLA 5. Los valores de inhibición que se indican deben utilizarse con precaución, ya que el perfil de susceptibilidad varía en función de la especie o cepa, el procedimiento de obtención del extracto, el disolvente y las técnicas de ensayo utilizadas, y también las unidades utilizadas para expresarlos pueden diferir significativamente (por ejemplo, cuando se utilizan aceites esenciales).

No obstante, puede observarse que los tratamientos a base de *P. rivas-martinezii*, en especial el extracto hidrometanólico de su parte aérea (CMI = 110 µg/mL), exhiben una notable actividad antioomicética contra *Phytophthora* spp., solo superados por el extracto hidroamniacal de corteza de *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. (CMI = 78,12 µg/mL) (Sánchez-Hernández *et al.*, 2022b) y por los complejos conjugados de extractos con oligómeros de quitosano (COS), en concreto COS–*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (Sánchez-Hernández *et al.*, 2023b) y COS–

Uncaria tomentosa (Willd. ex Schult.) DC. (Sánchez-Hernández *et al.*, 2022a), con CMI₅₀ de 78,1 y 39 µg/mL, respectivamente. Los extractos etanólicos de corteza de coníferas –*Pinus sylvestris* L. y *Pinus abies* (L.) H.Karst.– presentaron valores de inhibición de 100 µg/mL (Minova *et al.*, 2015), con una eficacia comparable a la observada para *P. rivas-martinezii*.

En cuanto a la comparación con aceites esenciales, la eficacia del extracto de la parte aérea de *P. rivas-martinezii* (CE₅₀ de 72 µg/mL) solo se ve superada por la del aceite esencial de hojas de *Cymbopogon citratus* Stapf, con valores de CE₅₀ de entre 31,5 y 69,6 µg/mL (Amini *et al.*, 2016).

TABLA 5. Eficacia de distintos productos naturales frente a *Phytophthora* spp.

Producto natural	Medio de extracción	Eficacia	Ref.
<i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i>	Metanol	CMI = 250–375 µg/mL	Este trabajo
	Agua:amoniaco (1:1)	CMI = 110 µg/mL	
<i>Ganoderma lucidum</i>	Amoniaco:agua (1:1)	CMI = 187,5 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2023b)
COS– <i>G. lucidum</i>		CMI = 78,1 µg/mL	
<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	Amoniaco:agua (1:1)	CMI = 78,1 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2022b)
<i>Plantago major</i>	Etanol 50%	PI = 32,2%, a 2000 µg/mL	Ferreira y Oliveira (2021)
<i>Medicago</i> sp.		PI = 21,5%, a 2000 µg/mL	
<i>Melilotus indicus</i>		PI = 87,5%, a 2000 µg/mL	
<i>Urtica dioica</i>		PI = 40%, a 2000 µg/mL	
<i>Medicago</i> sp., <i>M. indicus</i> , <i>P. major</i> , y <i>U. dioica</i>		PI = 72,6%, a 2000 µg/mL	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Agua o etanol	PI = 33,9%, a 1500 µg/mL	Freitas (2022)
<i>Musa</i> sp.	Etanol 80%	n.a.	Teixeira <i>et al.</i> (2023)
<i>Allium sativum</i>		PI > 50%, at 750 µg/mL	
<i>Citrus × limon</i>		PI = 21–49%, a 750 µg/mL	
<i>Citrus × sinensis</i>		PI = 21–49%, a 750 µg/mL	
<i>Allium cepa</i>		PI > 50%, a 750 µg/mL	
<i>Punica granatum</i>		n.a.	
<i>Solanum tuberosum</i>		n.e.	
<i>Eucalyptus</i> sp.		n.a.	
<i>Pinus</i> sp.		PI = 21–49%, at 750 µg/mL	
<i>Olea europea</i>		n.a.	
<i>Arbutus unedo</i>	Metanol	CMI = 5990 µg/mL	Moiteiro <i>et al.</i> (2013)
<i>P. granatum</i> cv. ‘Wonderful’	Agua	PI < 40%, a 10000 µg/mL	Elshafie <i>et al.</i> (2021)
<i>Larrea tridentata</i>	Agua, etanol 70%, lanolina 10% o Manteca de cacao 10%	CMI ₉₀ = 11,2–7213 µg/mL	Castillo-Reyes <i>et al.</i> (2015)
<i>Flourencia cernua</i>		CMI ₉₀ = 23,6–619 µg/mL	
<i>Agave lechuguilla</i>		CMI ₉₀ = 58,5–327 µg/mL	
<i>Opuntia ficus-indica</i>		CMI ₉₀ = 3595–409.181 µg/mL	
<i>Lippia graveolens</i>		CMI ₉₀ = 4825 µg/mL–n.a.	
<i>Carya illinoensis</i>		n.a.	
<i>Yucca filifera</i>		n.a.	

TABLA 5 (cont.). Eficacia de distintos productos naturales frente a *Phytophthora* spp.

Producto natural	Medio de extracción	Eficacia	Ref.
<i>A. unedo</i>	Metanol	CMI = 5990 µg/mL	Martins <i>et al.</i> (2021)
<i>Quercus suber</i>	Amoniaco:agua (1:1)	CMI = 750 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2022c)
COS- <i>Q. suber</i>		CMI = 375 µg/mL	
<i>Uncaria tomentosa</i>	Amoniaco:agua (1:1)	CMI = 187,5 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2022a)
COS- <i>U. tomentosa</i>		CMI = 39 µg/mL	
<i>Origanum heracleoticum</i>	Agua	CMI > 500000 µg/mL	Salamone <i>et al.</i> (2006)
<i>Salvia officinalis</i>		CMI > 500000 µg/mL	
<i>R. officinalis</i>		CMI > 500000 µg/mL	
<i>Pinus sylvestris</i>	Etanol 96 %	CMI = 100 µg/mL	Minova <i>et al.</i> (2015)
<i>Pinus abies</i>		CMI = 100 µg/mL	
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Metanol	CE ₅₀ = 190,1 µg/mL	Luong <i>et al.</i> (2024)
<i>Blumea balsamifera</i>	Etanol	CMI = 117–269 µg/mL	Membang <i>et al.</i> (2024)
<i>Cymbopogon citratus</i>		CMI = 146–233 µg/mL	
<i>Chromolaena odorata</i>	Agua fría o etanol	CMI = 12500–25000 µg/mL	Adeyemi <i>et al.</i> (2018)
<i>Origanum elongatum</i>	Metanol, cloroformo, hexano o agua	PI = 92,2–100 %	Hari <i>et al.</i> (2024)
<i>Tephrosia vogelii</i>	Metanol y acetato de etilo	PI = 16 %	Ndala <i>et al.</i> (2019)
<i>Plectranthus barbatus</i>		PI = 94 %	
<i>Sphaeranthus suaveolens</i>		PI = 80 %	
<i>Lantana camara</i>		PI = 91 %	
<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	Aceite esencial, metanol, exudado acetónico, fracción metanólica polar o fracción no polar	PI = 51–86%	Lyubenova <i>et al.</i> (2024)
<i>C. citratus</i>	Aceite esencial	CE ₅₀ = 31,5–69,6 µg/mL	Amini <i>et al.</i> (2016)
<i>Ocimum basilicum</i>		CE ₅₀ = 135,4–200,8 µg/mL	
<i>Monarda didyma</i>		PI = 100 % con 1–2 µL	Christova <i>et al.</i> (2021)
<i>Eucalyptus citriodora</i>		CMI > 28000 µg/mL	Lee <i>et al.</i> (2008)

TABLA 5 (cont.). Eficacia de distintos productos naturales frente a *Phytophthora* spp.

Producto natural	Medio de extracción	Eficacia	Ref.
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Aceite esencial	CMI > 28000 µg/mL	Kim <i>et al.</i> (2008)
<i>Leptospermum pertersonii</i>		CMI > 28000 µg/mL	
<i>Polylepis racemosa</i>		CMI > 28000 µg/mL	
<i>Junierus oxycedrus</i>		CMI > 28000 µg/mL	
<i>Cymbopogon nardus</i>		CMI > 28000 µg/mL	
<i>Pelargonium graveolens</i>		CMI = 28000 µg/mL	
<i>Cuminum cyminum</i>		CMI > 28000 µg/mL	
<i>Myrristica fragrans</i>		CMI > 28000 µg/mL	
<i>Cymbopogon martini</i>		CMI = 28000 µg/mL	
<i>Mentha pulegium</i>		n.a.	
<i>Mentha spicata</i>		n.a.	
<i>Thymus vulgaris</i>		CMI = 14000 µg/mL	Ramadan <i>et al.</i> (2012)
<i>Ageratum houstonianum</i>		CE ₉₀ = 422 µg/mL	
<i>Beilschmiedia miersii</i>		CMI = 300 µg/mL	Carvajal <i>et al.</i> (2016)
<i>S. officinalis</i>		CMI > 1600 µg/mL	Giamperi <i>et al.</i> (2011)
<i>Salvia rosmarinus</i>		CMI > 1600 µg/mL	
<i>O. vulgare</i>		CMI > 200 µg/mL	
<i>Laurus nobilis</i>		CMI > 1600 µg/mL	
<i>Coriandrum sativum</i>		CMI = 800 µg/mL	
<i>T. vulgaris</i>		CMI = 200 µg/mL	
<i>Mentha piperita</i>	CMI = 800 µg/mL		
<i>Lavandula intermedia</i>	CMI = 1600 µg/mL		

n.a. = no hay actividad a la mayor concentración estudiada, CMI = Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL), PI = Porcentaje de inhibición (%), COS = oligómeros de quitosano

Para establecer una referencia comparativa, se utilizó Fosetil-Al como control positivo, un fungicida sintético convencional ampliamente empleado contra *Phytophthora* spp. Como se indica en la TABLA 6, cuando se administró a la dosis recomendada de 2000 µg/mL (equivalente a 2,5 g/L para Fosbel[®], fosetil-Al 80%), se logró una inhibición completa de *P. plurivora*, incluso cuando se aplicó a una décima parte de la dosis recomendada se inhibió un 85,3% del oomiceto.

TABLA 6. Inhibición del crecimiento micelial obtenida con Fosetil-Al a una décima parte de la dosis recomendada (Dr/10 = 200 µg/mL), a la dosis recomendada (Dr = 2000 µg/mL), a cinco y diez veces la dosis recomendada (Dr = 10000 y 20000 µg/mL, respectivamente) contra *P. plurivora*.

Fungicida Comercial	Patógeno	Crecimiento micelial (mm)				Inhibición (%)			
		Dr/10	Dr*	Dr×5	Dr×10	Dr/10	Dr*	Dr×5	Dr×10
Fosetil-Al	<i>P. plurivora</i>	11	0	0	0	85,3	100	100	100

El crecimiento del micelio para el control (solo PDA) fue de 75 mm. Todos los valores de crecimiento del micelio (en mm) son valores medios ($n = 3$).

Al comparar los valores de inhibición del crecimiento micelial del Fosetil-Al (TABLA 6) con las concentraciones mínimas inhibitorias para los extractos de *P. Rivas-martinezii* (TABLA 4), se puede observar que la actividad *in vitro* de los extractos fue comparable o superior a la del fungicida convencional. Concretamente, en el caso de *P. plurivora*, se logró una inhibición completa a concentraciones de 110 µg/mL y 250–375 µg/mL para los extractos de parte aérea o rizoma, respectivamente, mientras que el Fosetil-Al mostró una inhibición del 85,3 % a una concentración de 200 µg/mL.

4.5.2. Actividad ex situ

El extracto hidrometanólico de la parte aérea de *P. rivas-martinezii*, que fue el tratamiento más efectivo en las pruebas *in vitro*, posteriormente se evaluó como tratamiento protector contra *P. plurivora* en tallos cortados de aliso. Se utilizaron tres concentraciones diferentes, correspondientes a la CMI, CMI×5 y CMI×10 (es decir, 110, 550 y 1100 µg/mL, respectivamente). Los resultados se presentan en la FIGURA 10. La TABLA 7 muestra una comparación de la longitud de los canchros.

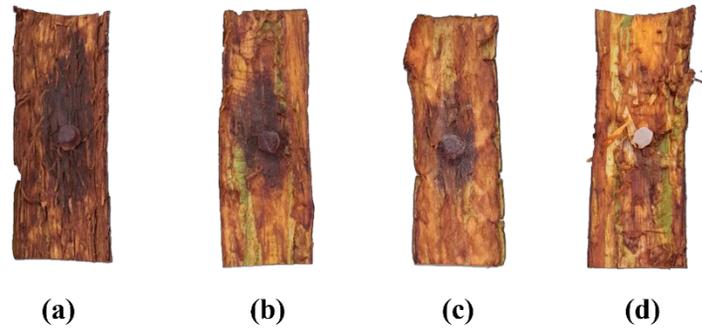


FIGURA 10. Longitud de los cancos observados en tallos extirpados de aliso inoculados artificialmente con *P. plurivora*: (a) control, sin tratamiento; tratados con extracto hidrometanólico de la parte aérea de *P. rivas-martinezii* de ejemplares recolectados en La Serrota a una concentración de (b) CMI = 110 µg/mL; (c) CMI×5 = 550 µg/mL; (d) CMI×10 = 1100 µg/mL. Solo se muestra una réplica por tratamiento.

TABLA 7. Análisis de las diferencias en la longitud de la necrosis entre los tratamientos con un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0,0001$).

Tratamiento	Longitud Media Necrosis (mm)	Grupo
C+	38,8±1,5	A
CMI	26,2±2,1	B
CMI×5	14,8±1,9	C
CMI×10	0	D

C+: control positivo (inoculado, sin tratamiento).

A la dosis más baja ensayada (es decir, con el valor de la CMI obtenido en las pruebas *in vitro*), el efecto protector fue muy limitado, con longitudes de cancos un 32.5% menores que las del control positivo (tallos no tratados e infectados con el oomiceto). A una dosis equivalente a cinco veces la CMI, se observaron longitudes de cancos un 61.9% menores que las del control positivo. No obstante, fue necesario aumentar la concentración hasta 10 veces la CMI para lograr una protección completa.

En cuanto a la eficacia del extracto de la parte aérea de *P. rivas-martinezii* como tratamiento protector contra *P. plurivora*, la TABLA 8 presenta una comparación con tratamientos alternativos dirigidos a *Phytophthora* spp. Como en el caso de las eficacias *in vitro*, al tratarse de diferentes especies de *Phytophthora* spp., las comparaciones son orientativas. No obstante, se observa que la eficacia del extracto de la parte aérea de *P. rivas-martinezii* es ligeramente inferior a la del complejo conjugado de oligómeros de quitosano (COS) con un extracto acuoso de amoniaco de carpóforos de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Karst. (Sánchez-Hernández *et al.*, 2023b) y a la del extracto hidroamoniaco de corteza de *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Bonafé (Sánchez-Hernández *et*

al., 2022b). No obstante, es superior a la del extracto hidroamoniaco de flores de *Sambucus nigra* L. (Sánchez-Hernández *et al.*, 2023c), a la del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (Cruz *et al.*, 2024) y a la del complejo conjugado COS—extracto de *Quercus suber* L. (Sánchez-Hernández *et al.*, 2022c).

TABLA 8. Tratamientos de protección *ex situ* frente a *Phytophthora* spp. basados en productos naturales.

Fuente de tallos extirpados	Oomiceto	Producto Natural	Eficacia	Ref.
<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Phytophthora plurivora</i>	<i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i>	Protección completa a 1100 µg/mL	Este trabajo
<i>Malus domestica</i>		<i>Curcuma longa</i>	Protección completa a 3000 µg/mL	Cruz <i>et al.</i> (2024)
<i>Quercus ilex</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	COS— <i>Ganoderma lucidum</i>	Protección completa a 782 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2023b)
		<i>Q. ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	Protección completa a 782 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2022b)
<i>Prunus amygdalus</i> x <i>Prunus persica</i>	<i>Phytophthora cactorum</i>	COS— <i>Q. suber</i>	Protección completa a 3750 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2022c)
	<i>Phytophthora megasperma</i>	<i>Sambucus nigra</i>	Protección completa a 1875 µg/mL	Sánchez-Hernández <i>et al.</i> (2023c)

4.6. Características generales de la composición microbiana de las rizosferas analizadas

Se llevó a cabo una secuenciación de alto rendimiento para caracterizar la diversidad microbiana asociada a suelo rizosférico de 4 plantas de *P. rivas-martinezii* asociadas a dos poblaciones endémicas en localizaciones de la Sierra de Gredos, tanto a nivel de especies bacterianas (basadas en la secuenciación del fragmento 16S ribosomal) y fúngicas (secuenciando para ello la región ITS ribosomal). Para cada una de las dos submuestras compuestas que se obtuvieron de cada una de las 4 plantas muestreadas en las mencionadas dos localizaciones (Gredos y La Serrota), se caracterizaron taxonómicamente, junto a las frecuencias absolutas (número de lecturas) y relativas (porcentajes) de aparición, las distintas Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) asociadas a las mismas. En el caso de la diversidad bacteriana, tras la caracterización vía comparación de las secuencias obtenidas frente a bases de datos públicas (SILVA), se identificaron (en el conjunto de todos los muestreos) un total de 3.766 OTUs que representan 288 taxones diferentes. Para las especies fúngicas, tras la comparación de las secuencias obtenidas con bases de datos (UNITE), se caracterizaron (en ambos muestreos) un total de 1.332 OTUs únicos que se corresponden con 473 taxones diferentes. Como se desprende de estos datos, la diversidad

rizosférica fúngica (incluyendo hongos verdaderos y otros grupos minoritarios) fue mayor que la encontrada para bacterias. El número y distribución por muestreo (localización geográfica) de taxones de hongos y bacterias (OTUs) caracterizados se muestra en la comparativa de la FIGURA 11.

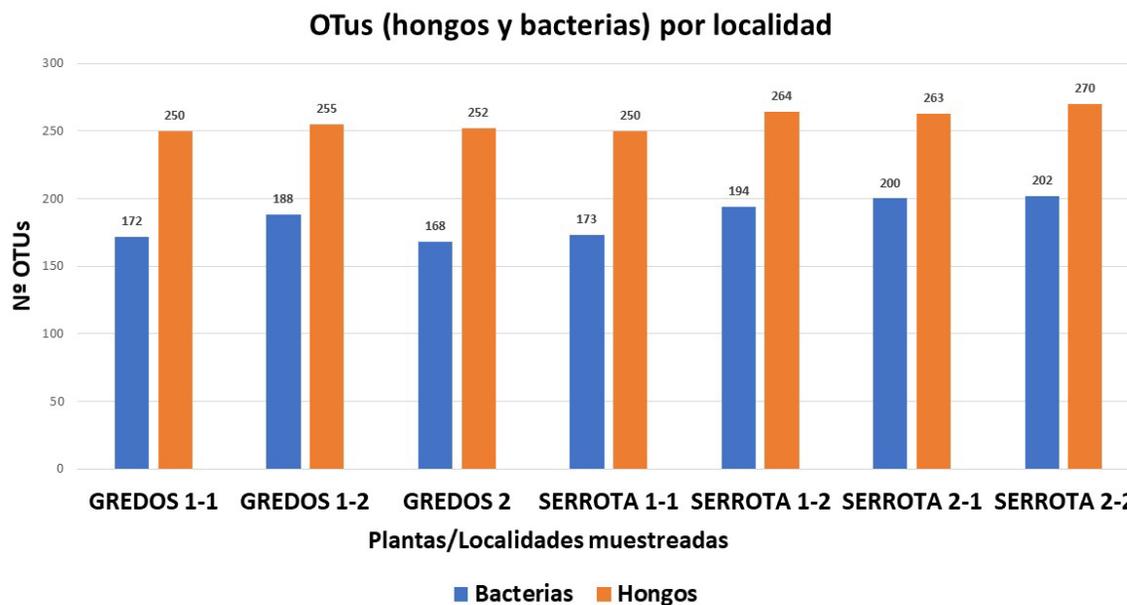


FIGURA 11. Comparativa de número total de OTUs resueltos tras el total de lecturas, mostrando las diferencias entre cada grupo de organismos por planta y localidad muestreada

Pese a lo aquí observado, es habitualmente aceptado que, en las rizosferas vegetales, los microbiomas bacterianos suelen ser más diversos y abundantes que los fúngicos (Guo *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022). Sin embargo, también existen evidencias de que, en las rizosferas de ciertos vegetales y ecosistemas, la diversidad fúngica suele ser mayor que la bacteriana, especialmente en comparación con el suelo desnudo. Esta diferencia puede atribuirse a diversos factores, como el impacto de las raíces de las plantas y las condiciones únicas de la rizosfera. De este modo, las raíces de las plantas secretan sustancias que influyen en la comunidad microbiana de la rizosfera, lo que provoca un cambio en las poblaciones de hongos en comparación con las bacterias. Además, el entorno rizosférico, caracterizado por mayores niveles de nutrientes y humedad, suele favorecer el crecimiento y la diversidad de los hongos en comparación con las poblaciones microbianas procariotas. Pese a las diferencias en la estructura y diversidad poblacional microbiana, tanto las bacterias como los hongos desempeñan un papel crucial en la salud y el crecimiento de las plantas,

influyendo en el ciclo de nutrientes, la defensa contra patógenos y el desarrollo general de las mismas. En el caso del presente estudio, factores como el tipo de ciclo vital de la especie vegetal prospectada (planta anual) y el tipo de ecosistema en el que ésta prospera (hábitats de alta montaña mediterránea que sufren una cierta degradación de origen antropogénico), podrían explicar la existencia de mayor diversidad microbiana de origen fúngico, posiblemente relacionado con la mayor plasticidad y menor exigencia ecológica de este grupo de organismos para adaptarse a las condiciones reinantes y el poco tiempo de exposición a la colonización microbiana disponible.

4.6.1. Comunidades microbianas fúngicas

En líneas generales, las comunidades microbianas de hongos asociadas a las rizosferas muestreadas estuvieron dominadas por la presencia mayoritaria de géneros y especies pertenecientes a la clase Ascomycetes (293 OTUs) y, en menor medida, por taxones (102 OTUs) de la clase Basidiomycetes (FIGURA 12).

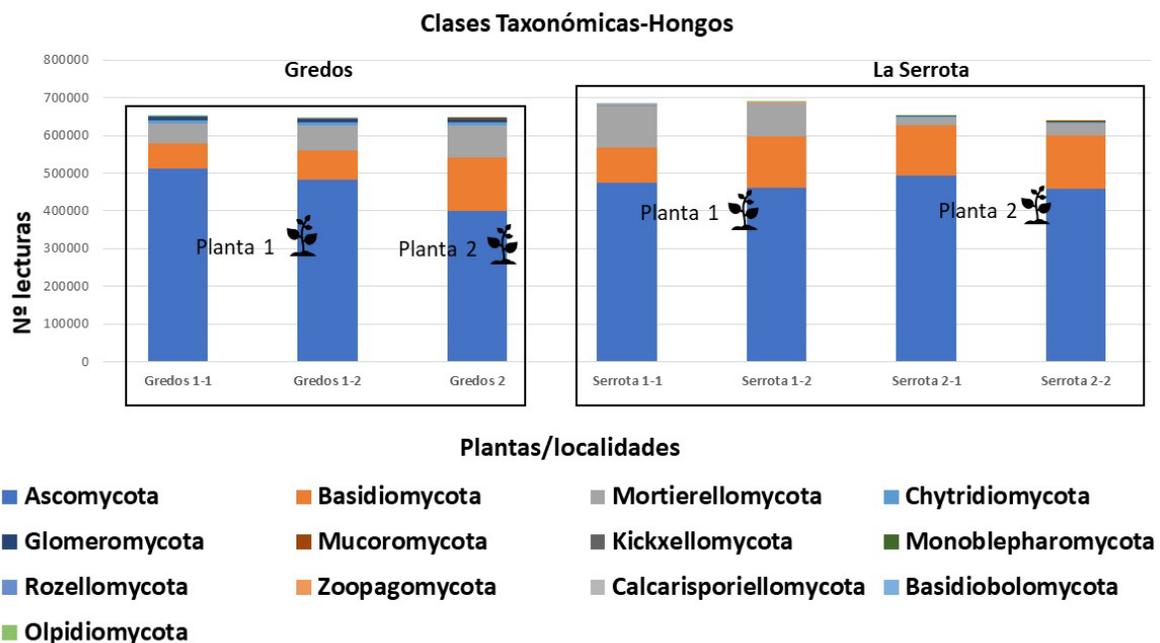


FIGURA 12. Histograma de barras compuestas mostrando las clases taxonómicas representadas en las comunidades microbianas fúngicas presentes en las plantas muestreadas en ambas localizaciones.

Además de los anteriores grupos dominantes, se detectó la presencia de representantes (13 OTUs) de la clase Mortierellomycota (Zigomicetes) y Glomeromycota (9 OTUs). Sorprendentemente los representantes simbiotes de este último grupo de hongos micorrícicos resultaron más abundantes en las muestras provenientes de la localización Gredos, una zona con poblaciones de *P. rivas-martinezii* en peor estado de conservación. Además, los suelos rizosféricos asociados a las plantas de la mencionada población exhibieron la presencia (en contraste con lo observado en las plantas de La Serrota) de representantes de algunas clases taxonómicas menores de hongos verdaderos (tales como los *Kickxellomycota*, *Rozellomycota*, *Chytridiomycota*, etc.). Desde el punto de vista de la distribución de especies por grandes grupos taxonómicos, el peso y porcentaje de representación de los mencionados grupos de hongos coincide, en líneas generales, con la de estudios similares sobre las comunidades microbianas fúngicas asociadas a rizosferas vegetales (Liu et al., 2015; Deakin et al., 2018; Yurgel et al., 2023). Además, cabe destacar la ausencia de especies pertenecientes al grupo de los Oomicetos (Stramenopila), un grupo de pseudohongos de importancia en patología vegetal ya que, en el mismo, se encuentran numerosos géneros y especies patógenas de plantas. La no detección de este tipo de géneros (*Pythium*, *Peronospora*, *Phytophthora*, etc.) puede ser debida a algún tipo de sesgo experimental en la toma de muestras, o a una ausencia real de estos patógenos en los suelos muestreados, dadas las particularidades bioclimáticas de los hábitats muestreados.

Desde el punto de vista de la diversidad en cada localidad y población muestreada (α -diversidad) en el presente estudio, los valores obtenidos para los distintos índices considerados se encontraron en un rango alto para lo esperado para un análisis de comunidades de rizosfera (FIGURA 13), oscilando entre 6.82-7.23 para el índice de Entropía de Shannon (H'). Valores de H' por encima de 3 indican altas tasas de diversidad, lo que sugiere que los suelos rizosféricos muestreados poseen una elevada diversidad en la composición y estructura de sus comunidades microbianas fúngicas. Cabe destacar que todas las rizosferas muestreadas mostraron valores de H' superiores a 6, siendo bastantes similares entre plantas, independientemente de la población muestreada. Algo similar se observó para el caso del índice de Equidad de Pielou (con un rango de valores entre 7.23-7.66). Finalmente, y en lo referente al otro índice de diversidad calculado, el Filogenético de Faith, los valores claramente altos obtenidos (8.28-8.77) sugieren una diversidad filogenética alta (baja abundancia de taxones emparentados filogenéticamente), como cabe esperar de comunidades fúngicas diversas en cuanto a su composición taxonómica.

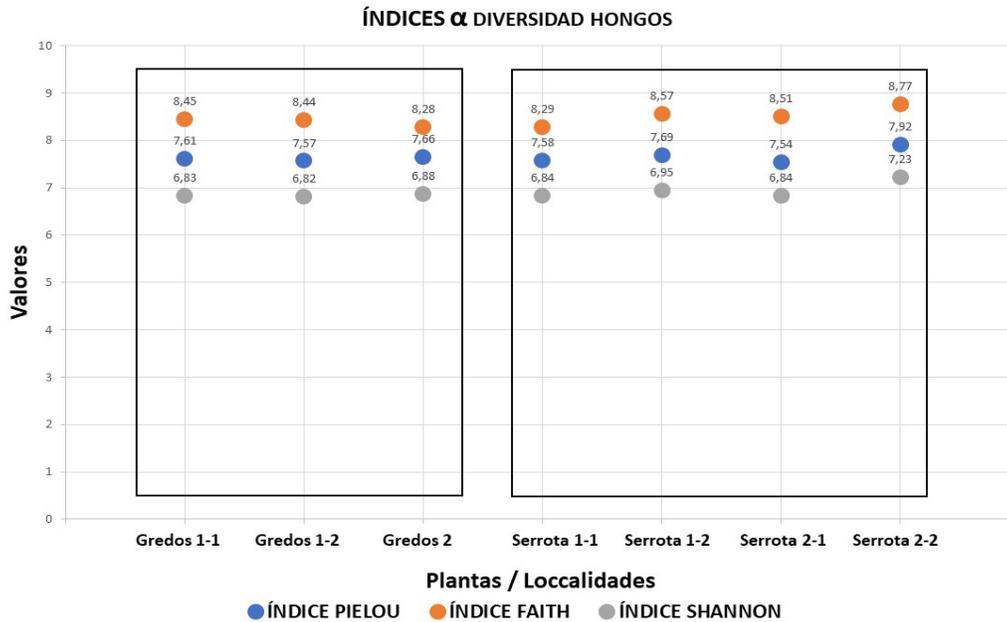


FIGURA 13. Valores de diversos índices de α -diversidad fúngica según planta y localidad prospectada.

En lo referente a la diversidad comparativa entre las diferentes plantas y localidades muestreadas (β -diversidad), los resultados del análisis mostraron que tanto el genotipo vegetal (individuo) como la localización geográfica de la población analizada resultaba determinante en la composición de las comunidades microbianas fúngicas en todos los casos. De este modo, en el Análisis de Componentes Principales (FIGURA 14) las comunidades microbianas fúngicas se separaban en función de las rizosferas individuales muestreadas, siendo éste el factor determinante de la agrupación y no la localización geográfica de las poblaciones, al menos en una de las localizaciones, como lo demostró el hecho de que los microbiomas fúngicos de los dos individuos muestreados en la población situada en La Serrota estuvieran claramente diferenciados en el mencionado análisis. Por el contrario, las comunidades analizadas a partir de los dos individuos de Gredos agruparon conjuntamente y muy distantes de aquellas de La Serrota, sugiriendo una mayor homogeneidad en la composición microbiana en esta población.

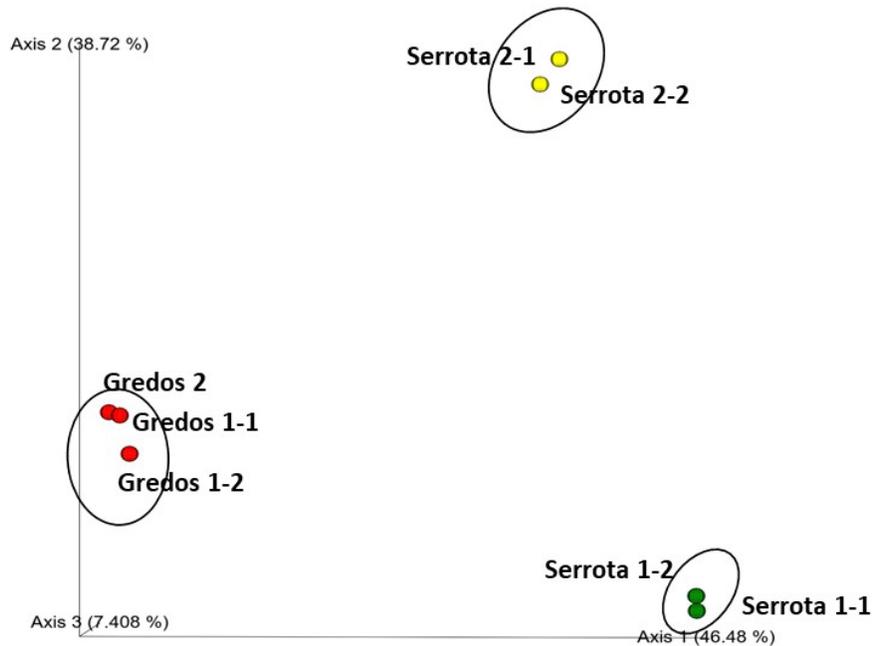


FIGURA 14. Análisis de Componentes Principales (PCoA) de comunidades microbianas fúngicas asociadas al suelo rizosférico de las plantas pertenecientes a las poblaciones de Gredos y La Serrota, obtenido empleando el índice de Bray-Curtis.

Desde el punto de vista de la composición taxonómica, las familias fúngicas más abundantes (FIGURA 15) en las plantas y poblaciones muestreadas pertenecieron a representantes de la clase de los Ascomicetos, destacando en ambas poblaciones la presencia de miembros de *Aspergillaceae* y *Trichocomaceae* (Eurotiales) incluyendo géneros y especies muy cosmopolitas ligadas a suelos y con una amplia gama de funciones ecológicas, incluida la descomposición, el reciclaje de nutrientes, el deterioro de plantas y alimentos, o la producción de micotoxinas.

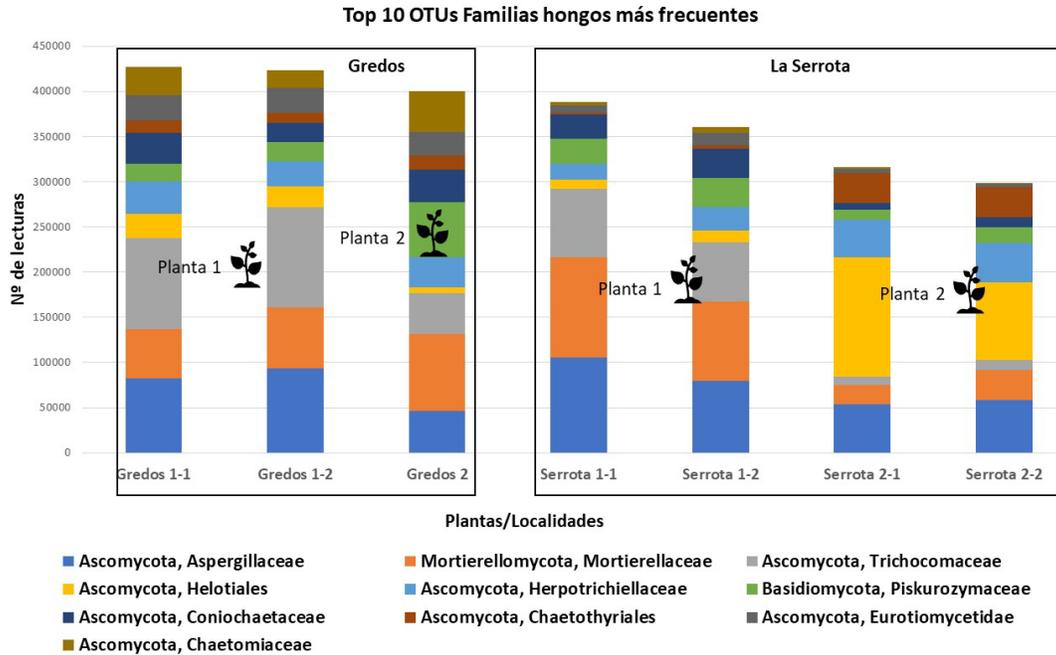


FIGURA 15. Histograma de barras compuestas mostrando las familias taxonómicas fúngicas representadas en las comunidades microbianas presentes en el total de plantas/localidades muestreadas.

Entre estos, cabe destacar la presencia en el análisis de especies de los géneros *Talaromyces*, *Eupenicillium*, *Aspergillus*, *Sagenomella*, o *Penicillium*. También resultó especialmente abundante el grupo de los *Mortierellaceae* (Zygomycetes), un grupo de hongos del suelo, cuyos representantes desempeñan un papel importante en diversos procesos ecológicos, como el ciclo de nutrientes, la promoción del crecimiento vegetal y las interacciones microbianas, representados en el top 15 de especies (FIGURA 16) por frecuencia de aparición fundamentalmente por táxones de los géneros *Mortierella*, *Podila*, *Entomortierella* o *Linnemannia*. Resulta también destacable la presencia de una alta diversidad (quizás el grupo de hongos más diversificado del análisis) de táxones pertenecientes al grupo de los Helotiales (Ascomycetes), especialmente abundantes en las rizosferas de la población de La Serrota y representado por familias como *Sclerotiniaceae*, *Pezizellaceae*, *Mollisiaceae*, *Hyaloscyphaceae* o *Myxotrichaceae*. Interesantemente, esta última familia estuvo representada por el género *Oidiodendron* exclusivamente en las rizosferas de los individuos de La Serrota, sugiriendo la presencia de hongos formadores de micorrizas ericoides en dicha población. Finalmente, se detectó también la presencia de especies de ascomicetos pertenecientes a géneros relacionados con un estilo de vida coprófilo como *Sordaria*, *Preussia*, etc., posiblemente asociados a la actividad ganadera. En el caso de los basidiomycetes, la familia

taxonómica más abundante fue *Piskurozymaceae*, representada por el género levaduriforme *Solicoccozyma*, que junto a otros de similar morfología como *Malassezia* o *Rhodotorula*, especies de levaduras de comportamiento nutricional y estilos de vida variados (parásitas de otras especies de hongos, habitantes de las rizosferas vegetales, parásitos débiles en mamíferos, etc.), representaron el mayor contingente de esta clase de hongos verdaderos. Cuando se analizó la composición taxonómica fúngica de forma global, se encontró que los suelos de las parcelas analizadas, mostraban una alta diversidad taxonómica especialmente en la población de La Serrota, y no parecían presentar síntomas de agotamiento microbiológico, definido éste habitualmente por la presencia mayoritaria de especies patógenas de suelo, en relación con el resto de microorganismos saprófitos o simbioses caracterizados. En ninguna de las rizosferas se detectó una alta frecuencia de aparición táxones patogénicos de suelo clásicos, como representantes de géneros tan conocidos como *Verticillium*, *Phoma*, *Ceratobasidium*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* o *Fusarium*.

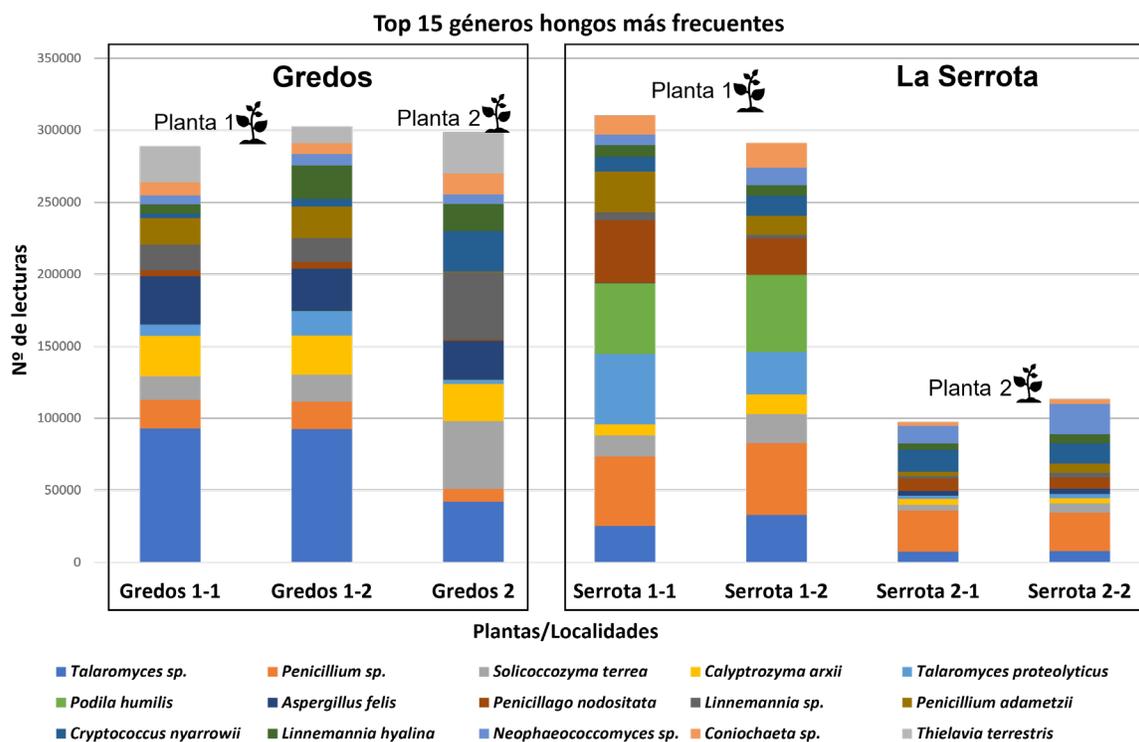


FIGURA 16. Histograma de barras compuestas mostrando los 15 OTUs fúngicos más frecuentes agrupados por planta y localidad muestreada.

4.6.2. Comunidades microbianas bacterianas

El análisis de las comunidades bacterianas asociadas a las rizosferas de las plantas analizadas mostró, en líneas generales, que los grupos dominantes que aparecieron a nivel global fueron sobre todo representantes de Actinobacteriota (bacterias filamentosas) y Proteobacteriota, un grupo muy diverso de bacterias en donde pueden encontrarse especies degradadoras de materia orgánica, simbioses, patógenos (humanos y vegetales) o productores de compuestos de interés biotecnológico e industrial (FIGURA 17). Además de los anteriores, cabe destacar la abundancia de representantes de la clase Planctomycetota, un grupo de bacterias quimiolitotrofas de ambientes acuáticos o húmedos, de Acidobacteriota, bacterias básicamente asociadas a suelos en ambientes acidófilos, o del filo Chloroflexi, tradicionalmente denominadas como bacterias verdes no sulfurosas.

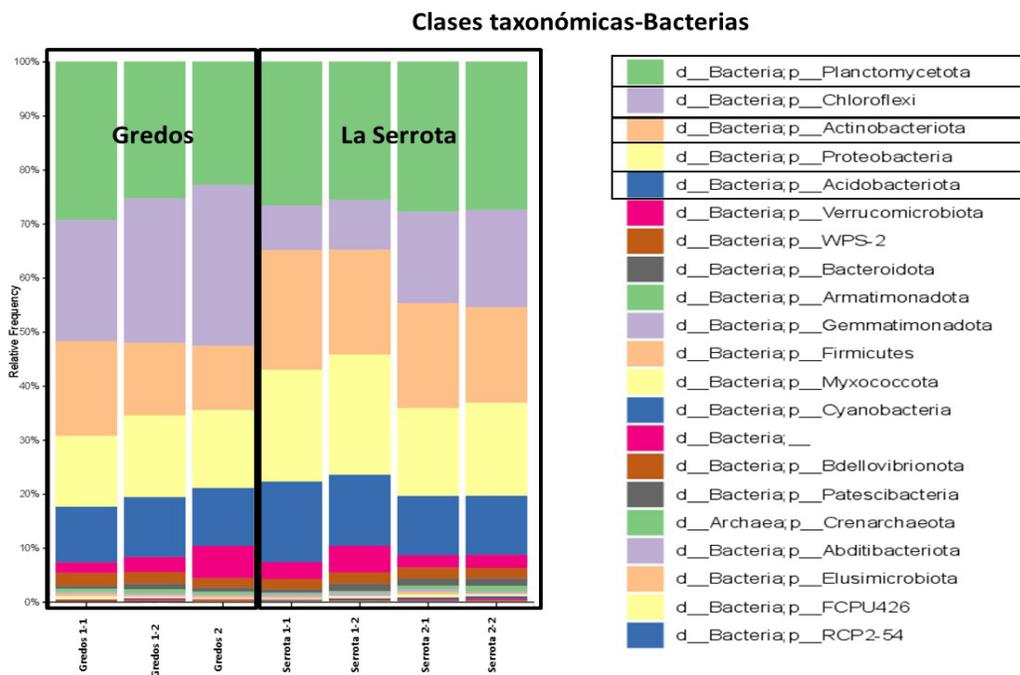


FIGURA 17. Histograma de barras compuestas mostrando las clases taxonómicas representadas en las comunidades microbianas bacterianas presentes en el total de rizosferas muestreadas.

Al analizar la diversidad bacteriana (α -diversidad) asociada a cada planta y población muestreada (FIGURA 18), los valores del índice de Entropía de Shannon (H') oscilaron entre 9.42-9.75, lo que sugiere una alta diversidad media, superior en algunos casos a los valores esperables para el estudio de comunidades procariotas incluso en suelos desnudos. Similares resultados fueron

obtenidos para el caso del índice de equidad de Pielou, con valores en el rango de 9.27-9.42. Interesantemente, los valores del índice de Faith que relaciona diversidad total con distancia filogenética, los valores de la diversidad procariota fueron claramente más bajos (5.90-7.07) que los registrados para el microbioma fúngico, sugiriendo una diversidad filogenética baja, lo que parece implicar una gran abundancia de taxones emparentados filogenéticamente, lo que puede interpretarse como indicativo de una comunidad microbiana poco dispar en cuanto a su composición sistemática y/o taxonómica.

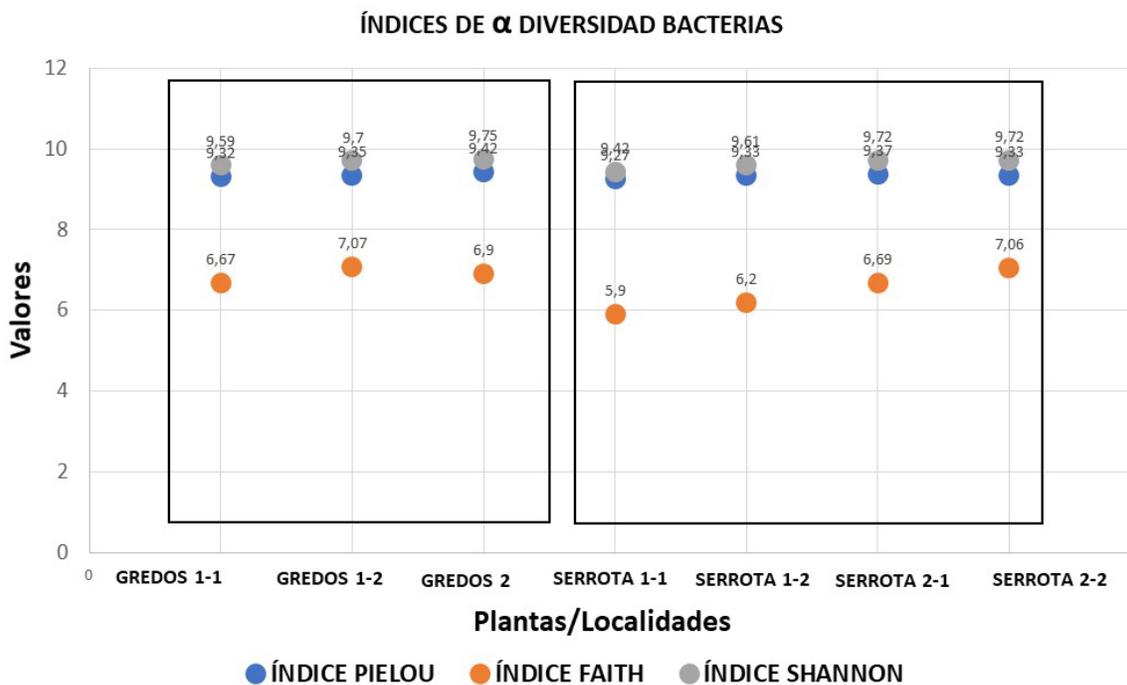


FIGURA 18. Valores de diversos índices de α -diversidad bacteriana según planta y localidad prospectada.

En los análisis sobre diversidad comparativa (β -diversidad) entre las comunidades bacterianas caracterizadas en las dos poblaciones muestreadas, se obtuvieron resultados y efectos similares a los observados para el caso de la diversidad fúngica. De este modo, un análisis de Componentes Principales (PCoA) (FIGURA 19) mostró que, para el caso de la diversidad procariótica, el genotipo vegetal (individuo) ejercía un efecto modelador de la composición de las poblaciones bacterianas (especialmente en la población de La Serrota con un mejor estado de conservación ecológico), en donde el microbioma no estaba relacionado en cuanto a su composición taxonómica según su origen geográfico del muestreo, sugiriendo un efecto de

“primado” o selección de bacterias por parte del cada genotipo vegetal. Estos efectos de “reclutamiento” microbiano no se observaron tan claramente en la población del paraje Gredos, en donde las comunidades bacterianas asociadas a las rizosferas de los dos individuos muestreados resultaron ligeramente similares entre sí, aunque con bastante dispersión.

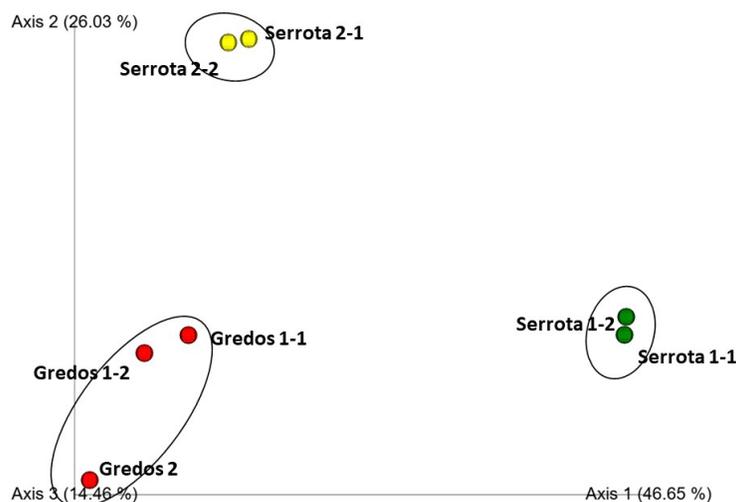


FIGURA 19. Análisis de Componentes Principales (PCoA) de comunidades microbianas bacterianas asociadas al suelo rizosférico de las plantas pertenecientes a las poblaciones de Gredos y La Serrota, obtenido empleando el índice de Bray-Curtis.

Desde el punto de vista de los OTUs bacterianos más abundantes (FIGURA 20), los resultados mostraron que en la distribución por frecuencia de aparición y parcela de las 15 OTUs más frecuentes del estudio, un representante de los Gemmataceae (Planctomycetota), conocidos por su capacidad para degradar polímeros de origen vegetal, resultó ser el taxón más abundante, mostrando frecuencias de aparición (secuencias resueltas) de moderadas a altas en todas las plantas, seguido de especies pertenecientes a los Tepidisphaerales (bacterias ubiquistas que se suelen encontrar en diversos entornos terrestres como el suelo, las turberas y la rizosfera ártica.), y especialmente de representantes de diversos grupos de bacterias filamentosas (Actinobacteriota), un filo diverso de bacterias, desempeñan un papel crucial en diversos procesos y servicios ecosistémicos, tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica, la simbiosis con plantas o la producción de moléculas bioactivas, algunas de las cuales poseen propiedades antibióticas.

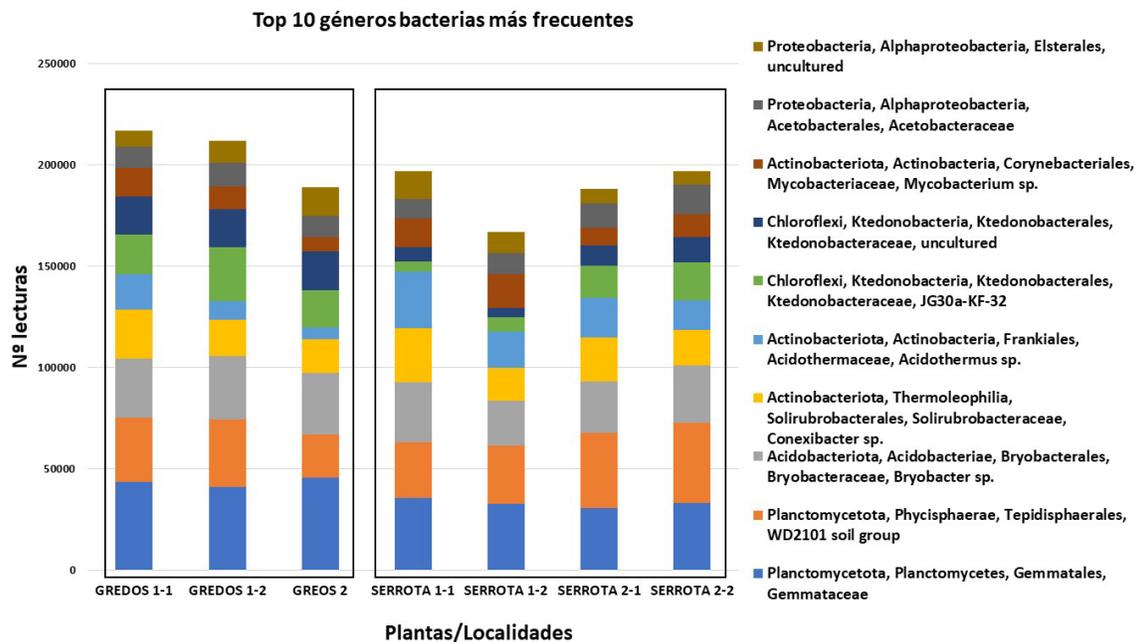


FIGURA 20. Histograma de barras compuestas mostrando los 10 OTUs bacterianos más frecuentes agrupados por planta y localidad muestreada

4.6.3. *Discusión de los resultados del análisis metagenómico de la composición microbiana de las rizosferas analizadas*

4.6.3.1. Diversidad y estructura de las comunidades microbianas rizosféricas

Los resultados obtenidos en este estudio revelan una composición microbiana rizosférica (hongos y bacterias) compleja y altamente diversa asociada a *P. rivas-martinezii*, con patrones distintivos de composición y abundancia de microorganismos que reflejan el efecto modelador, tanto de factores intrínsecos de la planta hospedadora como las condiciones ambientales específicas de cada localización. La mayor diversidad fúngica observada (1.332 OTUs, 473 taxones) en comparación con la bacteriana (3.766 OTUs, 288 taxones) contrasta con el paradigma generalmente aceptado para las rizosferas vegetales, donde las comunidades bacterianas suelen dominar en términos de diversidad y complejidad taxonómica (Berendsen et al., 2012; Bulgarelli et al., 2013).

Esta inversión del patrón típico puede atribuirse a las características específicas del ecosistema de alta montaña mediterránea donde prospera *P. rivas-martinezii*. Las condiciones bioclimáticas extremas, caracterizadas por fluctuaciones térmicas pronunciadas, períodos de sequía estacional y suelos oligotróficos, pueden favorecer la proliferación de hongos debido a su mayor resistencia y plasticidad frente a condiciones de estrés abiótico y su capacidad superior para degradar compuestos orgánicos complejos (Tedersoo et al., 2014; Bahram et al., 2018). Además, el ciclo vital anual de la especie estudiada limita el tiempo disponible para el establecimiento y colonización por parte de las comunidades microbianas, condiciones bajo las cuales los hongos, con su estrategia reproductiva más eficiente y su capacidad de formar estructuras de resistencia, pueden presentar ventajas competitivas frente a las bacterias.

4.6.3.2. Efectos de la degradación ambiental sobre las comunidades microbianas

Los resultados evidencian diferencias significativas en la composición microbiana entre las dos poblaciones estudiadas, que pueden interpretarse en el contexto del estado de conservación diferencial de los ecosistemas vegetales en ambas localidades. La mayor abundancia de especies de hongos micorrícicos arbusculares (VAM, Glomeromycota) en la población de Gredos, paradójicamente asociada a un peor estado de conservación, sugiere una respuesta adaptativa de la planta hospedadora ante condiciones de estrés. Esta observación es consistente con estudios previos que demuestran el incremento en la dependencia micorrícica en plantas sometidas a estreses ambientales (Smith & Read, 2008; Genre et al., 2020).

La presencia exclusiva de clases taxonómicas fúngicas menores (Kickxellomycota, Rozellomycota, Chytridiomycota) en Gredos puede interpretarse como indicadora de una comunidad microbiana en transición, donde la perturbación del ecosistema ha creado nichos ecológicos disponibles para grupos taxonómicos minoritarios, que no suelen tener tanto peso específico en comunidades maduras. Este fenómeno es coherente con la hipótesis de la perturbación intermedia (Connell, 1978), según la cual niveles moderados de degradación ecosistémica pueden incrementar la diversidad mediante la prevención de la exclusión competitiva.

4.6.3.3. Implicaciones funcionales de la composición microbiana

El predominio de grupos de Ascomicetos en el microbioma fúngico está en concordancia con lo reportado habitualmente en estudios metagenómicos, especialmente en comunidades asociadas a tejidos o compartimentos vegetales. En el presente estudio, resultaron especialmente abundantes representantes pertenecientes a las familias *Aspergillaceae* y *Trichocomaceae*, lo que sugiere una funcionalidad ecosistémica centrada en los procesos de descomposición y reciclaje de nutrientes. Estos grupos taxonómicos son reconocidos por su versatilidad metabólica y su capacidad para degradar una amplia gama de compuestos orgánicos (Spatafora et al., 2006; Houbraeken et al., 2014). La abundancia asimismo de *Mortierellaceae* refuerza esta interpretación, dado su papel fundamental en la mineralización de la materia orgánica y la promoción del crecimiento vegetal a través de la producción de metabolitos bioactivos (Ozimek & Hanaka, 2021).

La detección de lecturas asociadas al género *Oidiodendron* exclusivamente en La Serrota resulta particularmente relevante, ya que este género forma micorrizas ericoides que proporcionan a las plantas hospedadoras una ventaja competitiva significativa en suelos ácidos y oligotróficos (Martino et al., 2018). Su ausencia en la población de Gredos podría reflejar una pérdida de funcionalidad simbiótica asociada a la degradación del hábitat, con potenciales implicaciones negativas para la capacidad de supervivencia de *P. rivas-martinezii* en condiciones ambientales adversas.

En el caso de las comunidades bacterianas, el predominio de Actinobacteriota y Proteobacteriota es consistente con su papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos y la supresión de patógenos en la rizosfera (Mendes et al., 2013; Santoyo et al., 2021). La alta abundancia de Planctomycetota, particularmente del grupo Gemmataceae, sugiere una capacidad elevada para la degradación de polímeros vegetales complejos, lo que podría ser especialmente relevante en ecosistemas donde la disponibilidad de nutrientes es limitada.

4.6.3.4. Especificidad genotípica y selección microbiana

Los análisis de β -diversidad revelan un patrón consistente tanto en hongos como en bacterias: la separación de las comunidades microbianas según el genotipo individual de la planta hospedadora más que según la localización geográfica. Este hallazgo sugiere la existencia de mecanismos de selección microbiana mediados por el genotipo vegetal, posiblemente a través de la composición específica de exudados radiculares (Zhalnina et al., 2018; Pascale et al., 2020).

La mayor homogeneidad observada en las comunidades microbianas de Gredos podría interpretarse como una respuesta al estrés ambiental, donde las condiciones adversas limitan el rango de microorganismos capaces de establecerse exitosamente, resultando en una convergencia hacia comunidades menos diversas, pero más resilientes. Este fenómeno ha sido documentado previamente en estudios de gradientes ambientales, donde el incremento del estrés tiende a reducir la β -diversidad microbiana (Shade et al., 2012; Maestre et al., 2015).

4.6.3.5. Implicaciones para la conservación

Los valores excepcionalmente altos de α -diversidad observados tanto para hongos (Shannon $H' = 6.82-7.23$) como para bacterias (Shannon $H' = 9.42-9.75$) indican que las rizosferas de *P. rivas-martinezii* albergan comunidades microbianas extraordinariamente diversas. Estos valores, superiores a los típicamente reportados para plantas en ecosistemas mediterráneos (Delgado-Baquerizo et al., 2018), sugieren que esta especie endémica parece actuar como un *hotspot* de diversidad microbiana en un contexto general de baja diversidad vegetal ligada a este tipo de ambientes de alta montaña Mediterránea, incrementando su valor para la conservación.

La ausencia de patógenos clásicos de suelo como *Verticillium*, *Fusarium*, o *Phytophthora* en ambas poblaciones indica que, a pesar de las presiones antropogénicas, los ecosistemas estudiados mantienen un equilibrio microbiano relativamente saludable, en donde estos suelos oligotróficos y con baja fertilidad y disponibilidad de nutrientes parecen estar lejos del agotamiento microbiológico. Sin embargo, las diferencias observadas entre localidades subrayan la vulnerabilidad de estas comunidades microbianas especializadas ante perturbaciones adicionales, generalmente de carácter antrópico.

5. PROPUESTA DE PLAN DE CONSERVACIÓN

5. PROPUESTA DE PLAN DE CONSERVACIÓN

5.1. Justificación técnica del emplazamiento y de la estrategia de conservación

La presente propuesta de plan de conservación contempla el establecimiento sistemático de poblaciones de *P. rivas-martinezii* en el término municipal de Garganta del Villar, con coordenadas geográficas ETRS89/UTM zona 30N: X: 321986; Y: 4481694 (ver Anejo 7, Plano 1). El emplazamiento seleccionado corresponde al polígono cartográfico 3620688 del Mapa Forestal Español (MFE), de 8,3 ha, ubicado a una distancia de 3,2 km del núcleo urbano de referencia (ver Anejo 7, Plano 2).

La selección de este emplazamiento específico se fundamenta en la observación empírica de que las poblaciones naturales de La Serrota presentan un estado de conservación mejor que las de la Sierra de Gredos. Puede asociarse principalmente a la incidencia histórica de incendios recurrentes que han generado condiciones edáficas y de competencia interespecífica más favorables para la especie. Adicionalmente, la evidencia científica disponible (ME Amat, 2013a) sugiere que las intervenciones de conservación en La Serrota presentan probabilidades de éxito superiores.

El rodal seleccionado presenta características biogeográficas y microclimáticas óptimas para los objetivos de conservación. La orientación meridional maximiza la radiación fotosintéticamente activa (un factor determinante, dado que las poblaciones de mayor calidad se desarrollan en laderas soleadas). La altitud del rodal (1700-1800 m.s.n.m.) garantiza temperaturas estivales significativamente menores que en experiencias previas: aplicando los principios del gradiente adiabático estándar, la temperatura a esta altitud resulta 1,95-3 °C inferior al fondo del valle, y este diferencial térmico puede favorecer la resistencia fisiológica de la especie ante episodios de sequía prolongada.

Un factor complementario es la proximidad espacial a una población natural de alta calidad, situada a 800 metros del área de intervención. Esta proximidad garantiza condiciones edafoclimáticas similares y puede facilitar los procesos de polinización cruzada necesarios para el mantenimiento de la diversidad genética poblacional. En este sentido, las distancias típicas entre poblaciones naturales (hasta 20 km) representan una limitación severa para la polinización por

insectos vectores, por lo que la proximidad constituye una ventaja operativa para el flujo génico interpoblacional y la producción de semillas viables.

Finalmente, el área seleccionada presenta condiciones técnicas favorables para la viabilidad operativa del proyecto: autorización administrativa para quemas prescritas, régimen pluviométrico elevado que potenciaría la germinación y el crecimiento inicial, una edafología que se adapta a *P. rivas-martinezii* (ver Anejo 2), y accesibilidad directa mediante pista forestal de 4 metros de anchura en estado operativo funcional que facilitaría las operaciones mecanizadas y reduce significativamente los costes operativos.

Respecto a la estrategia de conservación a adoptar, como se ha indicado subapartado 1.3.2, *P. rivas-martinezii* presenta severas limitaciones caracterizadas por problemas de germinación, calidades y cantidades de polen extremadamente reducidas, especialización floral que determina su dependencia exclusiva de la polinización entomófila, presión significativa por herbivoría de ungulados, y desplazamiento competitivo progresivo por formaciones densas de piornales. La convergencia de estos factores bióticos y abióticos configura un escenario de eventual extinción en ausencia de intervención, siendo necesario un plan de conservación orientado a preservar la especie, incrementar sus poblaciones efectivas y mejorar su calidad genética mediante el establecimiento de nuevas poblaciones viables.

Las iniciativas de conservación documentadas para *P. rivas-martinezii* han sido limitadas, tanto en número como en alcance temporal y metodológico. La experiencia más relevante y documentada consistió en una repoblación experimental realizada en la cara septentrional de la Sierra de Gredos, específicamente en la localidad denominada "La Covacha", situada a 1540 m.s.n.m, conforme a lo indicado en el subapartado 1.3.2.1. La intervención incluyó plantación mediante dispersión de semillas, establecimiento de vallado perimetral para prevenir herbivoría, y eliminación previa de la competencia interespecífica del piornal mediante desbroces mecánicos convencionales. No obstante, los resultados de esta experiencia ponen en evidencia deficiencias que comprometieron la eficacia de la intervención: el vallado perimetral presentó deterioro estructural progresivo con rupturas en diversos puntos del perímetro y el piornal recolonizó el rodal tratado, generando competencia interespecífica que obligó a *P. rivas-martinezii* a colonizar áreas exteriores al vallado (donde, paradójicamente, las poblaciones mostraron mejor desarrollo vegetativo y reproductivo que en el interior teóricamente protegido).

Un análisis *ex post* de esta experiencia permite identificar tres factores limitantes a evitar en futuras intervenciones: ausencia de seguimiento técnico continuado, aplicación exclusiva de desbroces mecánicos como método de eliminación del piornal y selección de orientación septentrional.

La estrategia de conservación propuesta en este documento incluye las siguientes actuaciones, que se justifican desde el punto de vista técnico más adelante, en cada una de las subsecciones asociadas:

- Preparación del terreno mediante despejado mecánico y quema prescrita controlada
- Plantación mediante dispersión aérea con UAVs
- Implementación de polinización asistida mediante colmenas y hoteles de insectos
- Vallado protector contra herbivoría
- Seguimiento técnico continuado durante cinco años

Desde la perspectiva de la evaluación de impacto ambiental, la Ley 21/2013, del 9 de diciembre, sobre evaluación ambiental, determina qué proyectos han de someterse al proceso de evaluación de impacto ambiental y regula el procedimiento administrativo correspondiente. El Anexo I de la citada ley especifica los proyectos que requieren una evaluación ambiental ordinaria, mientras que el Anexo II señala los proyectos sujetos a evaluación ambiental simplificada. La actuación prevista en este plan de conservación no se encuentra incluida en ninguno de los casos recogidos en los Anexos I y II de la legislación citada, por lo que no resulta preciso realizar ni la evaluación ambiental ordinaria ni la simplificada, permitiendo la implementación directa del proyecto una vez obtenidas las autorizaciones administrativas pertinentes.

5.2. Preparación del terreno: despejado y quema prescrita

5.2.1. Despejado

La eliminación del matorral de *C. oromediterraneus* mediante labores de despejado responde a necesidades ecológicas. La presencia del piornal constituye una importante limitación tanto para el establecimiento de *P. rivas-martinezii* como para el desarrollo vegetativo de sus plántulas. Conforme a lo indicado en el subapartado 1.3.2.4, el piornal es un competidor directo

por recursos esenciales como luz, agua y nutrientes del suelo durante las fases críticas del establecimiento de la especie objetivo. La notable capacidad de rebrote que presenta el piornal una vez cortado o quemado, debida a su sistema radicular vigoroso y su alta resiliencia morfofisiológica frente a perturbaciones, le permite una rápida reexpansión, alcanzando coberturas elevadas en un plazo de apenas dos años tras la intervención. La acción mecánica del descepado, por tanto, permite interrumpir y reducir eficazmente este ciclo de rebrote, al eliminar tanto la parte aérea como la estructura radicular de los individuos.

Las quemas prescritas (analizadas en el siguiente subapartado), aunque efectivas para reducir biomasa aérea y modificar características del suelo a corto plazo, resultan insuficientes para controlar el piornal a medio plazo. La raíz principal y los rebrotes basales de *C. oromediterraneus* permanecen intactos tras el fuego, especialmente cuando este no alcanza temperaturas suficientes en el estrato basal del suelo. Transcurridas varias semanas, el piorno emite brotes nuevos desde el rizoma, lo que justifica la necesidad de combinar quema prescrita y descepado mecánico.

El plan de trabajo del descepado propuesto contempla un calendario intensivo de máximo 20 días laborables (ver [Anejo 3](#)). Para abordar la eliminación del piornal en el tiempo requerido sobre 7,3 hectáreas del rodal (1 ha restante corresponde a una faja, posteriormente descrita), se propone ejecutar un descepado mecanizado mediante miniexcavadora equipada con garra forestal especializada (ver [Anejo 4](#)). Esta configuración proporciona precisión operativa, maniobrabilidad en terreno accidentado y potencia mecánica apropiada para la orografía del área. La miniexcavadora dispone de una productividad media estimada de 0,4 hectáreas por jornada, considerando desplazamientos, limpieza de restos y adaptabilidad al terreno. Con una máquina en funcionamiento continuo, el plazo total sería de 18-19 jornadas efectivas, reduciéndose a 15 días en condiciones favorables (suelo con humedad óptima, acceso facilitado y pendiente moderada).

El desarrollo técnico incluirá apertura de accesos, preparación de líneas de actuación y arranque metódico de piornal, que será acumulado para su eliminación posterior durante la quema prescrita. Esta planificación debería garantizar la supresión del potencial de rebrote y establecer las condiciones edáficas apropiadas para el establecimiento exitoso de *P. rivas-martinezii*. Adicionalmente, debido a la presencia de un descepado, en la quema se lograría aportar una mayor cantidad de cenizas y materia orgánica al suelo.

5.2.2. *Quema prescrita*

Para la preparación del terreno resulta fundamental eliminar completamente el piornal. Se contemplan dos alternativas metodológicas: el desbroce/triturado mecánico mediante maquinaria especializada (retroaraña con trituradora de cadenas o tractor forestal con trituradora-desbrozadora para pendientes moderadas), y la quema controlada, procedimiento que requiere medidas preventivas específicas para evitar la expansión descontrolada del fuego.

La selección de la segunda opción se justifica por dos motivos: en primer lugar, *P. rivasmartinezii* presenta limitaciones germinativas documentadas, y esta metodología generaría un entorno edáfico enriquecido con cenizas que favorecería significativamente la germinación del endemismo (ME-Amat, 2014). En segundo lugar, aunque inicialmente se reduzca la materia orgánica por la combustión, transcurridos algunos meses se produciría un incremento considerable, ya que las cenizas actúan como depósito de materia orgánica, mejorando este parámetro edáfico. Tras un incendio controlado, la vegetación desarrolla un crecimiento más acelerado y vigoroso, por lo que es una técnica frecuentemente utilizada por explotaciones ganaderas para regenerar pastizales.

Antes de discutir el diseño de la quema prescrita, es preciso analizar el marco normativo que condiciona la realización de dicha quema, así como cumplir con las especificaciones de manejo del humo:

En Castilla y León, las quemas prescritas requieren autorización previa del Servicio Territorial de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León, encontrándose reguladas por la Ley 3/2009 de Montes de Castilla y León, el Decreto 63/2009 que regula específicamente el uso del fuego, y la Orden FYM/510/2013 sobre épocas de peligro de incendios y procedimientos de autorización. La normativa interna del plan se recoge en el [Anejo 5](#).

Considerando que el área de intervención se localiza en zona protegida dentro de la Red Natura 2000, adicionalmente se requeriría una Evaluación de Repercusiones según el artículo 46 de la Ley 42/2007 del Patrimonio Natural y la Biodiversidad, implementación de limitaciones temporales para protección de especies en reproducción durante el período marzo-agosto (especialmente aguilucho cenizo, buitre negro, alimoche, chorlito y alondra ricotí), obtención de

informe favorable del organismo responsable del Espacio Natural Protegido de las Sierras de la Paramera y Serrota, y evaluación específica del efecto del humo sobre aves nidificantes.

El manejo del humo generado durante esta actuación debe cumplir obligaciones específicas establecidas para evitar afecciones a núcleos poblacionales, viviendas, infraestructuras de transporte y actividades económicas locales, particularmente las explotaciones ganaderas de la zona. Las condiciones meteorológicas durante la ejecución deben garantizar un viento suave y constante, ausencia de inversiones térmicas que mantengan el humo cerca del suelo, humedad relativa adecuada, y estabilidad atmosférica. El uso del fuego se limitaría exclusivamente a material vegetal natural, adecuadamente dispuesto para asegurar combustión eficiente y minimizar la generación de humo persistente, evitando brasas humeantes prolongadas. Se requeriría notificación previa a las autoridades competentes especificando fecha y horario de ejecución para prevenir despliegues accidentales de dispositivos de emergencia.

Respecto al diseño de la quema prescrita, el emplazamiento seleccionado presenta condiciones excepcionales para la implementación de quema controlada, atribuibles a la presencia de barreras naturales y artificiales en prácticamente la totalidad del perímetro que actúan como limitantes efectivos de la propagación descontrolada del fuego, tal como se puede apreciar en la FIGURA 21 y como se detalla a continuación.

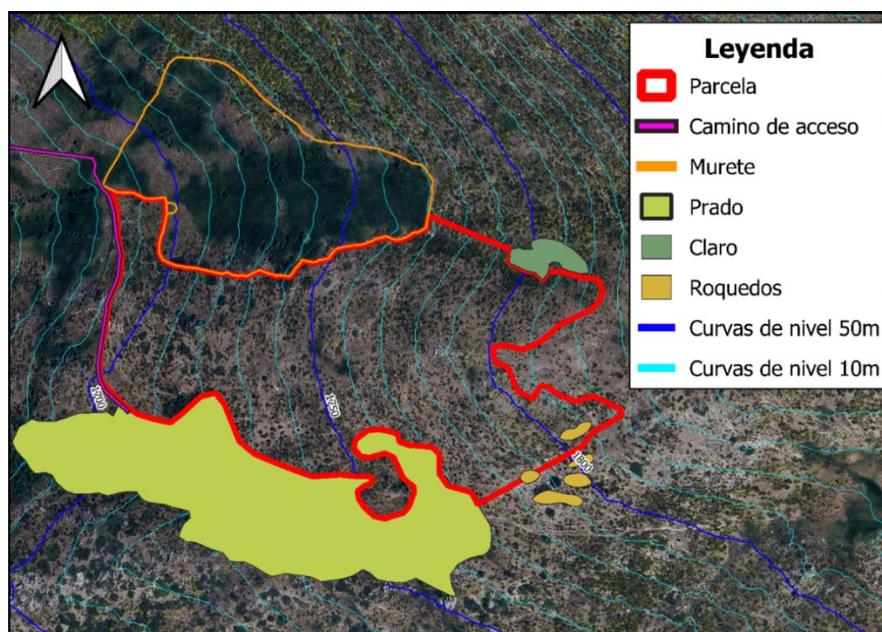


FIGURA 21. Zonas que rodean al rodal objeto de estudio

El sector septentrional limita con un prado ganadero delimitado por murete de piedra de 1,2 metros de altura que actúa como barrera física. El sector occidental presenta el camino de acceso de 4 metros de anchura que funciona como cortafuegos artificial. El sector meridional colinda con un pastizal completamente clareado que carece de material combustible continuo. El sector oriental constituye la zona de mayor riesgo potencial, al encontrarse en línea de máxima pendiente con continuidad de material combustible hacia el resto de la masa forestal, circunstancia que requiere de la implementación de medidas de protección durante la ejecución de la quema. El sector suroriental presenta un claro y el nororiental presenta formaciones rocosas naturales. Estas características facilitan el control del comportamiento del fuego en el sector oriental y proporcionan zonas de seguridad adicionales.

Como medidas de seguridad y tratamiento previo, se deberían de realizar 2 operaciones obligatorias:

La primera consistiría en ejecutar un desbroce perimetral interior de 5 metros de anchura para crear una faja cortafuegos, eliminando completamente los restos vegetales que puedan generar continuidad horizontal del fuego y comprometer el control de la quema. Los restos de la faja remanentes se depositarán distribuidos por el rodal junto con los decepados. Esta operación preparatoria se programará para finales de enero, optimizando las condiciones de humedad del material vegetal (ver [Anejo 3](#)).

La segunda operación consistiría en la intervención especializada del Equipo de Prevención Integral de Incendios Forestales (EPRIF) de Puerto del Pico durante la quema prescrita, siguiendo los protocolos establecidos de seguridad y control. Para el rodal de 8,3 hectáreas se necesitaría un mínimo de 4 motobombas equipadas con puntos de agua que garanticen un alcance operativo de 300 metros, supervisión por capataz especializado en quemas prescritas, y 2 dotaciones completas de bomberos forestales para ejecución segura del encendido por fajas.

Como medida preventiva adicional, es obligatorio notificar al Equipo de Lucha contra Incendios Forestales más cercano la programación de la quema, asegurando disponibilidad de medios aéreos en caso de requerirse intervención de emergencia ante eventualidades.

Las condiciones ambientales requeridas para realizar la quema incluyen: humedad del combustible fino muerto (HCFM) del 8-16%, velocidad del viento máxima de 10-15 km/h (preferentemente constante y con dirección oeste, acompañando a la pendiente), temperatura ambiente de 5-15 °C, humedad relativa del 30-60%, suelo con humedad apropiada para evitar propagación descontrolada, y ausencia de nieve o hielo.

Respecto a este último punto, en la FIGURA 22, tomada el 14/02/2025 mediante Sentinel, se observa que la cantidad de nieve es muy baja: tan solo se alcanzaron 4 cm (y a altitudes de 2100 m.s.n.m.). Esto sugiere que la nieve no es un factor limitante, y que, de hecho, podría utilizarse como línea natural de control.



FIGURA 22. Nieve en La Serrota el día 14/04/2025. Fuente: Copernicus Browser.

La quema se ejecutaría mediante el sistema de fajas sucesivas, aplicando la técnica de quema en cola (*headfire*) a favor de la pendiente, desde las cotas más elevadas hacia las zonas de menor altitud. El sistema seleccionado corresponde a una quema descendente escalonada, que consiste en quemar una faja, asegurar completamente su extinción y control, y proceder secuencialmente a la faja inmediatamente inferior. Esta técnica permite generar el máximo impacto sobre las formaciones de piornal, reducirlas eficazmente a cenizas y eliminar el banco de semillas existente. Además, el inicio en cotas elevadas minimiza el riesgo de descontrol y permite un mayor control del fuego, incrementando la producción de cenizas que favorecería la germinación posterior de *P. rivis-martinezii*.

En la TABLA 9 se presenta un resumen de la ejecución de la quema en base a las características del rodal:

TABLA 9. Resumen de las características del rodal y las elecciones de la quema prescrita.

Característica	Detalle de la característica
Ubicación	La Serrota, Ávila
Época de ejecución	Febrero
Altitud aproximada	1750 m.s.n.m.
Vegetación predominante	Piornal
Modelo de combustible	Modelo 5
Elección de la quema	
Sistema de quema	Fajas sucesivas, de este (cota más alta) a oeste (cota más baja), a favor de pendiente, pero con control desde arriba hacia abajo
Ancho de fajas	Variable (1 a 20 metros)
Faja perimetral	5 metros

El procedimiento se iniciaría en el sector este del rodal, donde se localizan las crestas topográficas más elevadas. Las fajas presentarían una anchura progresivamente creciente: 1-3 metros las iniciales, 5-10 metros las intermedias, y 15-20 metros las finales, variando la anchura según la pendiente, la acumulación de combustible y la maniobrabilidad del personal (ver [Anejo 7](#), Plano 3).

El protocolo técnico comprende cinco fases secuenciales:

- Primero, el encendido de la faja superior mediante antorcha de goteo, generando una quema suave y lenta, con vigilancia lateral y por retaguardia.
- Segundo, el aseguramiento de la faja quemada, esperando la extinción de puntos calientes y verificando que el frente esté completamente frío.
- Tercero, la ejecución de la faja inferior con superposición parcial, aprovechando la zona quemada como cortafuegos natural. Las líneas de fuego se encenderían desde el centro hacia los flancos (viento cruzado) o de extremo a extremo (viento constante).
- Cuarto, la repetición sistemática del proceso, incrementando progresivamente la anchura de las fajas conforme disminuye el riesgo.
- Quinto, la finalización en el sector oeste asegurando el contacto con la faja perimetral, manteniendo la vigilancia de puntos calientes durante un mínimo 24 de horas y disponiendo retenes ante previsión de viento.

Para garantizar la seguridad operativa se deberían posicionar dos motobombas en el sector este (subsectores noreste y sureste), accediendo por los prados circundantes, para humedecer las fajas e impedir la propagación. Las dos restantes se ubicarían en pastizales de los sectores norte y sur. Una vez completado el humedecimiento del sector este, una motobomba se trasladaría al sector oeste para dar fin a la quema prescrita. Se establecerían 2 posiciones clave para el personal de bomberos en el sector este, incluyendo el claro natural y las formaciones rocosas por seguridad. En el norte y sur se dispondrían 2 efectivos más, para evitar la dispersión del fuego. El coste asociado a esta operación se estima en 10.674,76 € (ver Anejo 6)

Respecto al plan de contingencia, durante la quema prescrita podrían presentarse múltiples situaciones que requieren protocolos de actuación específicos previamente establecidos. En la TABLA 10 se muestran las actuaciones a realizar en caso de accidente:

TABLA 10. Plan de contingencia de la quema prescrita.

Situación	Consecuencia	Actuación
Salto de llama fuera de la faja prevista	Propagación no deseada hacia monte sin tratar	Activar equipo de retén más cercano y avisar a ELIF
Cambio repentino del viento	Descontrol del frente o flancos de fuego	Parar incendio, establecer nuevas líneas de control y redirigir recursos a flancos afectados
Encendido múltiple descoordinado	Fusión de frentes, aumento de intensidad	Detener encendidos, identificar causa, reposicionar personal
Herida, desorientación o atrapamiento de un operario	Riesgo humano	Comunicar por radio, parar operaciones si hay riesgo vital, protocolo evacuación y 112
Fallo en comunicaciones o pérdida de señal	Pérdida de coordinación	Establecer puntos de contacto visual, interrumpir ignición hasta restablecer comunicación, silbatos, banderas y gestos pactados
Inicio de convección fuerte o columna convectiva inestable	Generación de fuego errático	Parar ignición, retirarse a zona segura, no reanudar hasta retomar estabilidad térmica y el comportamiento del fuego sea normal. De ser necesario, avisar a ELIF, en caso extremo de riesgo.

En caso de descontrol de la quema prescrita, presencia de pavesas o posible evolución hacia incendio forestal masivo, se movilizaría inmediatamente a la ELIF más cercana (previamente notificada de la quema prescrita), correspondiente al Barco de Ávila, con el operativo en helicóptero "LY-A3". La ELIF procedería al montaje del bambi para iniciar descargas de agua sobre la zona afectada con objeto de reducir la altura de llama. Simultáneamente, el operativo terrestre se encargaría de extinguir las llamas mediante batefuegos, con apoyo de las motobombas ya desplegadas en la zona para la quema prescrita.

Para la localización de puntos de agua más cercanos donde la ELIF podría obtener agua para extinguir cualquier incendio hipotético, se recurre a la cartografía de recursos hídricos próximos al rodal. En caso de que el piloto del helicóptero considere preferible cargar en zonas con aguas estancadas, se recurriría a embalses cercanos o, en situaciones extremas, a piscinas de la zona, tanto públicas como privadas (ver [Anejo 7](#), Plano 4).

5.3. Plantación del rodal

La estrategia de plantación de *P. rivas-martinezii* mediante dispersión de semillas requiere una planificación temporal que optimice las condiciones edafoclimáticas post-intervención. La secuencia metodológica inicialmente contemplada incluía la dispersión de semillas antes de la ejecución de la quema prescrita, en base a las características pirófitas de la especie. No obstante, la consulta al equipo de botánicos expertos en la especie desaconsejó esta estrategia. La incompatibilidad fundamental radica en la necesidad de introducir maquinaria pesada para la extracción de restos vegetales carbonizados tras la quema prescrita, pues esta operación comprometería gravemente la viabilidad de las semillas previamente dispersadas por enterramiento excesivo o daño mecánico directo (ver [Anejo 4](#)).

Toda vez que las investigaciones desarrolladas por ME Amat (2014) evidencian que la presencia de cenizas en el sustrato constituye el factor determinante para el incremento de las tasas de germinación en esta especie, superando significativamente el efecto de las temperaturas elevadas asociadas al paso del fuego, y habida cuenta la limitada disponibilidad de material seminal de *P. rivas-martinezii* y su elevado coste de obtención, se concluye que la dispersión debe ejecutarse exclusivamente cuando se garanticen las condiciones óptimas de germinación. La

implementación de la plantación debería, pues, ejecutarse tras la completa eliminación de los restos vegetales carbonizados y la estabilización del sustrato enriquecido con cenizas.

Establecida la secuencia más adecuada, la estrategia de plantación requiere de una planificación en relación al aprovisionamiento de semillas de *P. rivas-martinezii*. Este aprovisionamiento se realizará mediante recolecciones directas de las poblaciones naturales existentes. La densidad de siembra establecida se fija en 500 semillas por metro cuadrado, considerando el peso medio unitario de 0,15 mg por semilla documentado para la especie.

Bajo estos parámetros técnicos, la superficie total del rodal (7,37 hectáreas en el interior del vallado) requiere un volumen total de 5,52 kilogramos de semillas. La planificación contempla el acopio de 6 kilogramos de material seminal, estableciendo un margen de seguridad del 8,7% para compensar posibles pérdidas asociadas a problemas de germinación, predación por aves o marras post-establecimiento.

La estrategia de obtención priorizará la diversificación del origen genético mediante la incorporación de semillas procedentes de las diferentes poblaciones conocidas de la especie. Esta aproximación se fundamenta en las divergencias genéticas documentadas entre las poblaciones de Gredos y La Serrota (Jiménez-Mejías 2015), que sugieren la existencia de variabilidad intraespecífica con potencial adaptativo diferencial. La hibridación de genotipos procedentes de poblaciones espacialmente separadas podría implicar una mejora en la diversidad genética efectiva y potenciar la resistencia frente a factores de estrés, compensando los niveles de consanguinidad documentados en las poblaciones naturales derivados de la reproducción clonal predominante.

La ejecución de la plantación se programaría durante la transición de febrero a marzo, estableciendo una ventana temporal flexible que permitiría la adaptación a las condiciones meteorológicas específicas y la finalización de las operaciones de quema prescrita (ver [Anejo 3](#)). En circunstancias excepcionales que requieran demoras en la ejecución de la quema, se podría extender el plazo hasta finales de marzo, priorizando la evitación de períodos de heladas tardías que comprometan la viabilidad del material seminal.

Para la dispersión de semillas, en base a la superficie a cubrir y cantidad a dispersar, se propone el uso de drones (UAVs) especializados en aplicaciones agronómicas (ver [Anejo 4](#)), que garantizarían la distribución homogénea del material seminal sobre la totalidad de la superficie del rodal. Los parámetros técnicos de vuelo se establecen en un rango altitudinal de 5 a 15 metros sobre el nivel del suelo, con una velocidad de desplazamiento controlada entre 4 y 6 metros por segundo para optimizar la uniformidad de la dispersión. El sistema de navegación GPS de alta precisión implementado en este tipo de aeronaves debería permitir la cobertura sistemática de la superficie sin generar solapamientos o áreas deficitarias en la densidad de siembra. La planificación de vuelo debería incluir la delimitación de un camino de acceso interno que facilite las operaciones de seguimiento y mantenimiento posteriores, excluyendo específicamente esta área de la dispersión de semillas. La normativa sobre las condiciones operativas y los requerimientos ambientales de la plantación se recoge en el [Anejo 5](#).

Tras la dispersión de las semillas, pese a que las condiciones climatológicas de la zona son favorables (con amplitudes térmicas significativas y precipitaciones elevadas que pueden alcanzar los 932,2 milímetros anuales según los datos climáticos registrados, ver [Anejo 2](#)), resulta aconsejable contar con un sistema de riego post-siembra complementario mediante tractor equipado con depósito de agua y sistema de aspersion (ver [Anejo 4](#)).

La disponibilidad de recursos hídricos para la recarga del depósito del tractor estaría garantizada por la proximidad de múltiples cursos de agua semi-permanentes. En concreto, el Arroyo del Toro, ubicado a 500 metros del rodal mediante acceso directo por el camino existente, constituiría la fuente de abastecimiento primaria. No obstante, el Arroyo Gil (a 3 kilómetros de distancia) y el río Alberche (4 kilómetros del rodal) serían alternativas viables, y la segunda constituye una opción de reserva con caudal garantizado durante todo el año (ver [Anejo 7](#) – Plano 4).

La infraestructura de acceso interno proyectada facilitaría las operaciones de riego mediante la creación de un camino central que parta del límite occidental del rodal, optimizando así la maniobrabilidad del tractor equipado con el sistema de riego y garantizando el acceso para las operaciones de seguimiento y mantenimiento posteriores.

Los costes totales de todas las operaciones relacionadas con la plantación de *P. rivasmartinezii* en el rodal se estiman en 5.280,39 € (ver [Anejo 6](#)).

5.4. Polinización del rodal

La implementación de estrategias de polinización asistida constituye una medida técnica fundamental para lograr el éxito reproductivo de *P. rivas-martinezii*, considerando las severas limitaciones de calidad y cantidad de polen que caracterizan a esta especie endémica (ME Amat 2013a).

Conforme a lo indicado en el apartado 1.3.2.2, el análisis de los patrones de visitación floral realizados en poblaciones naturales sugiere que los taxones del orden Coleoptera constituyen los vectores de polinización más frecuentes para *P. rivas-martinezii*, registrándose las mayores tasas de contacto antera-estigma en representantes de diversas familias de escarabajos, seguidos por las abejas. Esto justifica la necesidad de implementar medidas de conservación que favorezcan el establecimiento y mantenimiento de poblaciones viables de estos insectos polinizadores en el área de intervención.

La estrategia de polinización asistida contempla la instalación de doce hoteles de insectos distribuidos estratégicamente en el perímetro del rodal, priorizando las zonas de mayor accesibilidad para optimizar la colonización por parte de coleópteros y otros polinizadores autóctonos. Paralelamente, se implementará un programa de polinización complementaria mediante seis colonias de *Apis mellifera* instaladas temporalmente conforme a un acuerdo de colaboración con un apicultor local. Las colonias se ubicarían estratégicamente para maximizar la cobertura espacial del rodal, evitando el tránsito de maquinaria sobre las áreas ocupadas por *P. rivas-martinezii*.

El protocolo temporal establece la instalación de las colonias durante julio, coincidiendo con el inicio de la floración, y su retirada en septiembre, al finalizar la antesis. Esta sincronización maximiza la eficiencia de la polinización entomófila durante el período crítico de receptividad estigmática. El apicultor lograría mayor cantidad de miel mediante este alquiler temporal, y recibiría la compensación económica de realizar el traslado. Los costes asociados al traslado de las colmenas se estiman en 200 euros anuales.

En total, los costes de la instalación de hoteles de insectos y de las colmenas durante 5 años ascenderían a 1.347,04 € (ver [Anejo 6](#)).

5.5. Vallado del rodal para evitar la herbivoría

La presión de pastoreo por parte de ungulados silvestres ha sido identificada como uno de los principales factores limitantes para la supervivencia de esta especie en peligro crítico de extinción (apartado 1.3.2.4), por lo que resulta imprescindible adoptar medidas de exclusión física que garanticen condiciones apropiadas para el desarrollo vegetativo de las poblaciones de *P. rivas-martinezii*.

El vallado cinegético propuesto presenta características técnicas optimizadas para ecosistemas montanos mediterráneos, con una altura de 1,6-2 metros que impide el salto de ungulados de gran tamaño y una malla de 5×5 centímetros que previene el paso de individuos adultos y crías. El material se ha seleccionado para ofrecer flexibilidad y resistencia frente a embestidas y roces constantes, adaptación a terrenos irregulares con pendientes del 30%, y minimización del impacto visual y medioambiental. La instalación modular garantiza su completa reversibilidad, un aspecto especialmente relevante en espacios de la Red Natura 2000. El diseño mantiene la compatibilidad con fauna no objetivo, preservando la conectividad ecológica para pequeños mamíferos, reptiles e insectos, fundamental para la funcionalidad ecosistémica del área intervenida.

La instalación se realizaría en el interior del rodal, manteniendo una distancia de 5 metros respecto al perímetro para crear una línea de separación exterior que facilite las labores de desbroce periódico necesarias para prevenir la invasión del piornal hacia el área de conservación de *P. rivas-martinezii*. Se iniciaría en el mes de febrero y finalizaría en marzo (ver [Anejo 3](#)).

El procedimiento técnico de instalación comenzaría con un reconocimiento topográfico del perímetro del rodal y su entorno inmediato y con la limpieza del trazado. Los análisis altimétricos confirman una pendiente media del 30,97% y mínima del 5,25%, datos que determinan las especificaciones técnicas del sistema de anclaje y la separación entre postes. La limpieza consistiría en la eliminación de maleza, ramas y piedras del perímetro para facilitar las operaciones posteriores. El eje del vallado se marcaría utilizando cinta de señalización para garantizar la precisión del trazado y la uniformidad de la instalación.

Conforme a las especificaciones técnicas del vallado antes mencionadas, adaptadas tanto los requerimientos de exclusión de herbívoros como a las condiciones topográficas y climáticas del emplazamiento, la altura mínima de 1,60 metros requiere de una longitud total de postes de 1,80 metros. Se incluye una sección enterrada de 0,20 metros para la estabilidad estructural. La malla seleccionada de 5×5 centímetros sería de hilo de acero galvanizado de 1,8 milímetros de grosor.

La colocación de postes requiere de la perforación de agujeros utilizando barrena manual o mecánica, según las condiciones de accesibilidad del terreno (ver [Anejo 4](#)). Los postes se instalan y nivelan utilizando nivel de burbuja o mira telescópica para garantizar la verticalidad. Los postes intermedios se entierran a 60 centímetros utilizando tacos de madera o hierro como apoyo lateral en terrenos rocosos para optimizar costes. En terrenos inclinados, los postes se colocan con inclinación contraria a la pendiente para mantener la verticalidad de la malla y garantizar la efectividad del sistema. Los postes tubulares de acero galvanizado presentan diámetro de 48 milímetros, espesor de chapa igual o superior a 2 milímetros y longitud total de 2,5 metros, con 0,6 metros enterrados. La separación entre postes se establece entre 3 y 5 metros en terreno llano, reduciéndose a 2-3 metros en pendientes para garantizar la estabilidad estructural.

El cimentado también es de crucial importancia para garantizar dicha estabilidad estructural. El sistema de cimentación propuesto ha sido diferenciado según la función específica de cada tipo de poste. Los postes de esquina y tensión requieren pozos de dimensiones 40×40×60 centímetros rellenos con hormigón HA-25 o similar, estableciéndose un tiempo de fraguado mínimo de 7 días antes de proceder al tensado de la malla. Los anclajes utilizan cables de acero inoxidable con tensores de tornillo cada 25 metros para mantener la tensión apropiada de la malla.

El tensado de cables y colocación de malla constituye una fase crítica del proceso de instalación. Se instalan cables horizontales en posiciones superior, central e inferior como refuerzo estructural del sistema. La malla se enrolla y fija utilizando grapas de acero inoxidable instaladas cada 30-50 centímetros, manteniendo algunos centímetros de holgura en la base para prevenir roturas causadas por movimientos del terreno.

Los elementos complementarios incluyen puertas de paso para mantenimiento, con una anchura de 4 metros (para permitir el acceso tanto del personal encargado del seguimiento del plan de conservación como de maquinaria) y equipadas con sistema de cierre mediante candado. Los

carteles informativos indicarían claramente que se trata de un vallado de protección de flora amenazada, con prohibición del paso, cumpliendo con los requerimientos de información pública establecidos para este tipo de actuaciones.

En relación con los tiempos de ejecución, dependerán del número de operarios. Teniendo en cuenta que el vallado cubre un perímetro de 1846 m, las estimaciones se recogen en la TABLA 11. Se ha considerado que en terrenos accidentados con pendientes del 30%, los tiempos de instalación se incrementan hasta un 30% respecto a terrenos llanos, debido a las dificultades inherentes al acceso y transporte de materiales en condiciones topográficas complejas.

TABLA 11. Resumen de los tiempos de operación.

Cantidad de operarios	Tiempo/100 m	Tiempo instalación completa
2 operarios	1 día	19 días
3-4 operarios	0,7 días	14 días

Para optimizar la duración de la instalación, se aconseja emplear equipos de 3-4 operarios, reduciendo el tiempo total a 14 días laborables (ver [Anejo 3](#)). Esta estimación incluye posibles paradas técnicas requeridas por condiciones meteorológicas adversas, como lluvia intensa o viento fuerte, que impidan el desarrollo seguro de los trabajos, estableciéndose una jornada laboral de 8 horas. El coste total del vallado se estima en 22.488,65 € (ver [Anejo 6](#)).

5.6. Plan de seguimiento

La implementación de cualquier plan de conservación de especies amenazadas requiere del establecimiento de un protocolo de seguimiento riguroso que permita evaluar el grado de consecución de los objetivos planteados y detectar prematuramente posibles desviaciones que comprometan la viabilidad del proyecto.

En el caso específico de *P. rivas-martinezii*, es preciso desarrollar un sistema de monitorización que trascienda el mero seguimiento de supervivencia, incorporando evaluaciones reproductivas y ecológicas que proporcionen información para la optimización de estrategias de conservación futuras.

El protocolo de seguimiento propuesto contempla un horizonte temporal de cinco años, período mínimo necesario para evaluar el establecimiento definitivo de la población y obtener datos representativos sobre el comportamiento demográfico de la especie bajo condiciones de manejo antropogénico. El coste total de estas operaciones, durante los 5 años, se estima en 37.639,03 € (ver [Anejo 6](#)).

5.6.1. *Reposición de marras y control de nascencia*

La evaluación inicial del establecimiento poblacional se ejecutaría durante marzo-abril del primer año post-plantación, coincidiendo con la emergencia de la parte aérea tras la dormancia invernal. Esta evaluación comprendería dos componentes metodológicos complementarios: análisis visual directo mediante cuadrillas forestales especializadas y evaluación mediante sistemas de teledetección.

Las cuadrillas forestales identificarían y cuantificarían los fallos de nascencia mediante transectos sistemáticos con cobertura representativa del área de intervención. En zonas con fallos significativos, se procedería a resiembra manual, a fin de permitir un control preciso de la profundidad de siembra y reducir la predación aviar, factor crítico durante la transición invierno-primaveral (ver [Anejo 3](#)).

Paralelamente, se implementaría un sistema de monitorización mediante vuelos de drones multispectrales o RGB, cuyos datos se cotejarían con los obtenidos por las cuadrillas. La validación de este enfoque permitiría la obtención de índices de verdor (NDVI), la evaluación cuantitativa de tasas de nascencia y el análisis de cobertura vegetal con resolución espacial y temporal superior a los métodos tradicionales, pudiendo aplicarse a la monitorización de otras poblaciones.

5.6.2. *Desbroces perimetrales periódicos*

El mantenimiento de las fajas perimetrales mediante desbroce mecánico periódico constituye la estrategia de contención más efectiva a corto plazo para prevenir la expansión del piornal hacia el interior del rodal protegido. Si bien el desbroce no eliminaría completamente las plantas, su aplicación sistemática reduciría significativamente la biomasa aérea, prevendría la floración y la subsecuente producción de semillas, creando una zona tampón que limitaría la

expansión hacia el área de conservación. Desde un punto de vista operativo, la estrategia de desbroce perimetral también facilitaría el acceso para las actividades de seguimiento y la vigilancia periódica del sistema de vallado.

El protocolo propuesto establece un régimen de desbroces con frecuencia trimestral a cuatrimestral (ver [Anejo 3](#)), ejecutando un mínimo de tres intervenciones anuales adaptadas a las condiciones climáticas locales (ver [Anejo 2](#)). La distribución temporal comprende una intervención en primavera temprana (marzo-abril) previa a la floración, una segunda intervención estival (julio-agosto) orientada al control de rebrotes, y una tercera intervención otoñal (octubre) para la eliminación de brotes post-estivales y la reducción de biomasa previa al período invernal. Este régimen de desbroces persigue el agotamiento progresivo de la capacidad de rebrote y la prevención de eventos reproductivos.

La metodología de desbroce sería exclusivamente mecanizada, mediante el alquiler de desbrozadoras de cadenas con especificaciones técnicas similares a las empleadas en el desbroce inicial previo a la quema prescrita (ver [Anejo 4](#)). El corte se ejecutaría a ras de suelo, evitando la formación de cepas altas que faciliten el rebrote posterior. El mantenimiento de este régimen se debería extender durante un período mínimo de cinco años consecutivos para disminuir la viabilidad del piornal en la faja perimetral.

5.6.3. Eliminación de rebrote del piornal en la zona protegida

El manejo de la competencia interespecífica ejercida por *C. oromediterraneus* constituye un aspecto crítico del plan de seguimiento. La capacidad de colonización rápida de zonas abiertas que presenta el piorno, especialmente en áreas de media montaña con suelos silíceos y climas húmedos o subhúmedos, combinada con su mecanismo de expansión basado en la producción masiva de semillas viables durante períodos superiores a diez años, configura un escenario de recolonización progresiva que puede comprometer gravemente los objetivos de conservación.

El protocolo de control se fundamenta en la implementación de desbroces manuales ejecutados por cuadrillas forestales especializadas, distribuyendo las intervenciones en dos períodos principales: durante la primavera (mayo) y a la transición verano-otoño (septiembre). Esta

distribución temporal responde a la fenología específica del piorno y busca optimizar la efectividad de las intervenciones al actuar sobre los momentos de mayor vulnerabilidad de los rebrotes.

Adicionalmente, se realizarán labores complementarias de seguimiento, que se desarrollarán durante los períodos establecidos para el monitoreo general (15 de abril al 1 de julio y del 12 de julio al 10 de septiembre, ver Anejo 3). Estas labores de seguimiento incluyen:

- Muestreos cuantitativos de rebrotes mediante evaluación de densidad, altura y cobertura.
- Registro de la aparición de nuevas plántulas procedentes de reproducción sexual.
- Evaluación del estado fenológico de *C. oromediterraneus* en el momento de ejecutar las operaciones de eliminación de rebrotes.

5.6.4. *Mantenimiento del vallado perimetral*

La preservación de la integridad estructural del sistema de vallado constituye otro componente crítico del plan de seguimiento, puesto que el fracaso en el control de la herbivoría es uno de los factores de mayor riesgo para el éxito del proyecto.

El protocolo de mantenimiento contempla un programa de inspecciones periódicas, durante un período mínimo de cinco años, con intervenciones de verificación del estado general del vallado (detección de roturas, evaluación de la estabilidad de postes, y análisis del estado de los elementos tensores). Las reparaciones puntuales comprenderían la sustitución de malla dañada, la reposición de elementos tensores defectuosos, y el reajuste de cables de tensión.

La responsabilidad de las inspecciones recaería en los agentes medioambientales de la zona, quienes mantendrán intervalos de inspección no superiores a un mes, garantizando así la detección temprana de posibles daños antes de que comprometa la efectividad del sistema de protección. El protocolo de inspección requiere un recorrido completo de la faja exterior, con particular atención a la identificación de daños susceptibles de permitir el paso de herbívoros, cuya detección deberá ser comunicada inmediatamente para su reparación urgente.

5.6.5. *Recogida de semillas*

La recolección sistemática de frutos durante el mes de septiembre constituye una actividad fundamental para garantizar la disponibilidad de material reproductivo destinado a futuras iniciativas de conservación de *P. rivas-martinezii*. La importancia estratégica de esta actividad radica en la necesidad de establecer reservorios de semillas que permitan la implementación de planes de conservación a corto plazo, incluyendo repoblaciones en áreas actualmente no colonizadas por la especie.

La estrategia de recolección priorizará los especímenes localizados en las áreas centrales del rodal, particularmente aquellos situados en las proximidades de las colmenas, donde se espera obtener frutos de mejor calidad y cantidad por la optimización de la polinización. Esta selección espacial responde también a criterios de practicidad, ya que los especímenes centrales tienen menor probabilidad de contribuir a la colonización de áreas exteriores al rodal mediante dispersión natural.

El protocolo operativo requiere de la participación de varias cuadrillas forestales, con una duración mínima de diez días dedicados exclusivamente a la recolección, ampliándose el plazo planificado a quince días para incorporar las fases de separación de semillas y procesamiento del material vegetal (ver [Anejo 3](#)). La ventana temporal óptima para la ejecución de esta actividad coincide con el mes de septiembre, período en el cual *P. rivas-martinezii* completa su ciclo reproductivo tras la floración estival y procede a la maduración de frutos.

El material recolectado será sometido a procesos de caracterización y almacenamiento, a fin de garantizar la viabilidad del material genético y su disponibilidad para futuras aplicaciones en programas de conservación.

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio, si bien proporciona avances en el conocimiento de *P. rivas-martinezii*, presenta limitaciones que deben considerarse para futuras investigaciones. En el ámbito de la caracterización fitoquímica, el análisis se restringió a dos poblaciones y empleó únicamente cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, lo que limita la detección de compuestos polares y de alto peso molecular. Estudios futuros deberían incorporar técnicas analíticas complementarias como HPLC-MS/MS y espectroscopía de RMN para obtener un perfil fitoquímico más exhaustivo, así como evaluar la variabilidad estacional y ontogenética en la producción de metabolitos secundarios. Asimismo, sería valioso establecer correlaciones entre la composición química y las funciones ecológicas específicas de estos compuestos, incluyendo estudios de expresión génica de las rutas biosintéticas identificadas.

Respecto a la evaluación de la actividad antioomycética, aunque los resultados obtenidos frente a *P. plurivora* son prometedores, la investigación se limitó a una sola especie patógena. Futuras investigaciones deberían ampliar el espectro de patógenos evaluados, incluyendo otras especies de *Phytophthora*, *Pythium* y hongos fitopatógenos relevantes en ecosistemas mediterráneos. Es fundamental desarrollar estudios de fraccionamiento bioguiado para identificar y aislar los principios activos responsables de la actividad observada, así como evaluar posibles efectos sinérgicos entre compuestos. Adicionalmente, se requieren ensayos de campo para validar la eficacia de los extractos en condiciones naturales y estudios de formulación para optimizar la estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos.

En cuanto al análisis metagenómico, presenta ciertas limitaciones que deben considerarse. El tamaño de muestra relativamente pequeño (4 individuos) y la ausencia de muestreos estacionales limitan la capacidad de generalización de los resultados. Estudios futuros deberían incluir un mayor número de individuos y poblaciones, así como la realización de muestreos a lo largo de varios momentos en el ciclo vital de la especie, de cara a maximizar el esfuerzo muestral para caracterizar la mayor cantidad de diversidad microbiana posible. Además, la realización de estudios de metagenómica dirigida o transcriptómica para caracterizar los procesos metabólicos activos y grupos de comunidades funcionales en estas comunidades, permitiría una mejor comprensión de

los procesos y rutas metabólicas que modelan el reclutamiento y la asociación de determinados microorganismos al huésped vegetal en cuestión. Sería recomendable implementar experimentos de inoculación controlada para evaluar el potencial de los microorganismos identificados a partir de análisis metagenómicos como promotores del crecimiento vegetal o agentes de biocontrol, especialmente aquellos que constituyen un "core" central reclutado y/o seleccionado a partir de la actividad metabólica del huésped, considerando las aplicaciones potenciales para programas de restauración ecológica de poblaciones de *P. rivas-martinezii*.

Finalmente, el plan de conservación propuesto, aunque técnicamente fundamentado, constituye una aproximación teórica que requiere validación empírica. Las proyecciones de éxito se basan en evidencia científica previa, pero la implementación real podría revelar desafíos no anticipados relacionados con la dinámica poblacional, las interacciones bióticas y los factores estocásticos. Investigaciones futuras deberían incluir modelos de viabilidad poblacional que incorporen escenarios de cambio climático, así como análisis de conectividad genética entre poblaciones para optimizar las estrategias de translocación y manejo. Sería especialmente valioso desarrollar protocolos de propagación *ex situ* y técnicas de mejora de la germinación que complementen las estrategias de conservación *in situ* propuestas, integrando los conocimientos fitoquímicos y microbiológicos obtenidos en este estudio para maximizar las probabilidades de éxito de las intervenciones de conservación.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

La caracterización fitoquímica de *Pseudomisopates rivas-martinezii* mediante GC-MS ha revelado un perfil químico distintivo dominado por derivados de aminoácidos aromáticos e imidazólicos. La convergencia química observada en los extractos radiculares de ambas poblaciones, contrastada con la divergencia en la parte aérea, sugiere diferentes presiones selectivas actuando sobre estos órganos. Mientras que los compuestos radiculares, principalmente 1H-imidazol-1-metil-4-nitro, formamida N-metil y 3-metoxi-1H-pirazol-5-ilacetamida, parecen conservarse entre poblaciones posiblemente por su función en las interacciones suelo-raíz, la parte aérea muestra especialización química interpoblacional. Los especímenes de La Serrota presentan mayor abundancia de derivados fenólicos, mientras que los de Gredos muestran predominio de compuestos heterocíclicos nitrogenados, lo que podría reflejar adaptaciones locales a diferentes condiciones microclimáticas.

El análisis de actividad antioomicética ha demostrado que los extractos hidrometanólicos de la parte aérea presentan mayor efectividad que los extractos hidroamoniacaes del rizoma, con concentraciones mínimas inhibitorias de 110 µg/mL frente a *Phytophthora plurivora*. Esta actividad resulta comparable a la de fungicidas sintéticos convencionales y superior a numerosos productos naturales evaluados en condiciones similares. Los ensayos *ex situ* en tallos de aliso confirmaron la eficacia protectora del extracto, aunque requirieron concentraciones diez veces superiores a la CMI para lograr protección completa. Estos resultados sugieren un potencial de valorización de la especie como fuente de compuestos bioactivos, aunque serían necesarios estudios de espectro más amplio para evaluar su aplicabilidad práctica.

La caracterización del microbioma rizosférico ha revelado comunidades microbianas diversas tanto fúngicas como bacterianas asociadas a *P. rivas-martinezii*. Los valores de diversidad de Shannon superiores a 6 para hongos y 9 para bacterias indican comunidades altamente diversas, dominadas por Ascomycetes y Actinobacteriota respectivamente. La ausencia de patógenos clásicos del suelo como *Verticillium*, *Phoma* o *Fusarium* en frecuencias elevadas sugiere que los suelos rizosféricos no presentan síntomas de agotamiento microbiológico. Los análisis de componentes principales evidencian que tanto el genotipo individual como la localización geográfica influyen en la composición microbiana, observándose mayor homogeneidad en las

comunidades de Gredos frente a la diferenciación individual detectada en La Serrota. Esta variabilidad podría estar relacionada con el diferente estado de conservación de ambas poblaciones.

El plan de conservación desarrollado integra estos hallazgos con el conocimiento previo sobre la biología de la especie para proponer una estrategia técnica fundamentada. La selección de La Serrota como ubicación del rodal de conservación se justifica tanto por el mejor estado de sus poblaciones naturales como por los resultados fitoquímicos que muestran mayor diversidad de compuestos bioactivos en esta localización. La propuesta de quema controlada como método de preparación del terreno se basa en la evidencia previa de que las cenizas favorecen la germinación de la especie, complementando así las limitadas tasas de nascencia natural. El diseño del vallado y el programa de seguimiento responden a los principales factores limitantes identificados: herbivoría y competencia con el piornal.

La supervivencia a largo plazo de *P. rivas-martinezii* dependerá de la implementación de estrategias de conservación activa que aborden simultáneamente sus múltiples vulnerabilidades. Los resultados de este trabajo proporcionan una base científica más sólida para estas intervenciones, aunque la efectividad de las medidas propuestas requerirá validación a través de su implementación y seguimiento adaptativo. La caracterización realizada también abre nuevas perspectivas de investigación, particularmente en la evaluación del potencial biotecnológico de la especie y en el estudio de las interacciones planta-microbioma como factores determinantes de su establecimiento y supervivencia en diferentes condiciones ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adeyemi, A. I., Vincent, O. I., & Olujenyo, O. M. (2018). Phytochemical screening and antifungal activity of *Chromolaena odorata* extracts against isolate of *Phytophthora megakarya* using agar-well diffusion method. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 4(1), 7–13. <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v4i1.36815>.
- Amat, M. E., Vargas, P., & Gómez, J. M. (2010). Pollen quality limitation in the Iberian critically endangered genus *Pseudomisopates* (Antirrhinaceae). *Plant Ecology*, 212, 1069-1078. <https://doi.org/10.1007/s11258-010-9887-6>
- Amat de León Arce, M. (2013a). Biología de la conservación de *Pseudomisopates rivasmartinezii* y *Erysimum penyalarensis*, dos táxones amenazados de la Cordillera Carpetana
- Amat, M. E., Silvertown, J., & Vargas, P. (2013b). Strong spatial genetic structure reduces reproductive success in the critically endangered plant genus *Pseudomisopates*. *Journal of Heredity*, 104(5), 692-703. <https://doi.org/10.1093/jhered/est042>
- Amat, M. E., Vargas, P., & Gómez, J. M. (2014). Factors controlling seed germination of the Iberian critically endangered *Pseudomisopates* (Antirrhinaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 300, 2127-2134. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1045-5>
- Amini, J., Farhang, V., Javadi, T., & Nazemi, J. (2016). Antifungal effect of plant essential oils on controlling *Phytophthora* species. *The plant pathology journal*, 32(1), 16–24. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2015.0091>.
- Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., & EUCAST-AFST. (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), E246–E247. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x>.

- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- Carvajal, M. A., Vergara, A. P., Santander, R., & Osorio, M. E. (2016). Chemical composition and anti-phytopathogenic activity of the essential oil of *Beilschmiedia miersii*. *Natural Product Communications*, 11(9). <https://doi.org/10.1177/1934578X16011009>.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F. D., Clemente-Constantino, J. A., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., & Noé-Aguilar, C. (2015). *In vitro* antifungal activity of polyphenols-rich plant extracts against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *African Journal of Agricultural Research*, 10(50), 4554–4560. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8072>.
- Christova, P. K., Dincheva, I. N., Slavov, S. B., Dobreva, A. M., Yordanova, Z. P., Dimkova, S. D., Zaprianova, N. G., Atanassova, B. Y., Sobiczewski, P., & Iakimova, E. T. (2021). Evaluation of growth response of phytopathogens *Alternaria alternata*, *Diaporthe nobilis* and *Phytophthora plurivora* to inhibitory potential of three essential oils of *Monarda didyma* genotypes. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(6), 1531–1545. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00536-w>.
- Cruz, A., Sánchez-Hernández, E., Teixeira, A., Martín-Ramos, P., Cunha, A., & Oliveira, R. (2024). Antifungal and antioomycete activities of a *Curcuma longa* L. hydroethanolic extract rich in bisabolene sesquiterpenoids. *Horticulturae*, 10(2), 124–140. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10020124>
- Deakin, G., Tilston, E. L., Bennett, J., Passey, T., Harrison, N., Fernández-Fernández, F., & Xu, X. (2018). Spatial structuring of soil microbial communities in commercial apple orchards. *Applied Soil Ecology*, 130, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.015>.
- D'hertefeldt, T., & Jónsdóttir, I. S. (1994). Effects of resource availability on integration and clonal growth in *Maianthemum bifolium*. *Folia Geobotanica*, 29, 167-179. <https://doi.org/10.1007/BF02803793>

- Elshafie, H. S., Caputo, L., De Martino, L., Sakr, S. H., De Feo, V., & Camele, I. (2021). Study of bio-pharmaceutical and antimicrobial properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) leathery exocarp extract. *Plants*, *10*(1), 153–162. <https://doi.org/10.3390/plants10010153>.
- Falk, D. A., & Holsinger, K. E. (Eds.). (1991). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press.
- Feliner, G. N. (1999). Vascular plant distribution in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands: current projects. *Acta Bot. Fennica*, *162*, 23-33.
- Ferreira, C.S.d.S. (2021). *Survey of Antifungal Activity of Plant Extracts for the Development of Natural Products for Agriculture* [Trabajo Fin de Máster]. Universidade do Minho (Braga, Portugal).
- Ferreira, C., & Oliveira, R. (2021). Protective antifungal activity of *Plantago major* extract against the phytopathogenic fungi *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia corticola* and *Colletotrichum* species. *Proceedings*, *70*(1), 94–100. https://doi.org/10.3390/foods_2020-07678.
- Freitas, L. P. (2021). *Analysis of antifungal plant extracts against phytopathogenic fungi* [Trabajo Fin de Máster]. Universidade do Minho (Braga, Portugal).
- Giamperi, L., Fraternali, D., & Ricci, D. (2002). The *in vitro* action of essential oils on different organisms. *Journal of Essential Oil Research*, *14*(4), 312–318. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699865>.
- Guo, Y., Yi, J., Doughty, R., & Zhao, F. (2020). Contrasting responses of rhizosphere bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi along an elevational gradient in a temperate montane forest of China. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2042. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02042>.
- Guzmán, B., Gómez, J. M., & Vargas, P. (2015). Bees and evolution of occluded corollas in snapdragons and relatives (Antirrhineae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *17*(6), 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2015.07.003>

- Guzmán, B., Gómez, J. M., & Vargas, P. (2017). Is floral morphology a good predictor of floral visitors to Antirrhineae (snapdragons and relatives)? *Plant Biology*, 19(4), 515-524. <https://doi.org/10.1111/plb.12567>
- Hari, A., Echchgadda, G., Darkaoui, F. A., Taarji, N., Sahri, N., Sobeh, M., Ezrari, S., Laasli, S.-E., Benjelloun, M., & Lahlali, R. (2024). Chemical composition, antioxidant properties, and antifungal activity of wild *Origanum elongatum* extracts against *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1278538. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1278538>.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>.
- Herrmann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 473-503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>.
- Jiménez-Mejías, P., Fernández-Mazuecos, M., Amat, M. E., & Vargas, P. (2015). Narrow endemics in European mountains: high genetic diversity within the monospecific genus *Pseudomisopates* (Plantaginaceae) despite isolation since the late Pleistocene. *Journal of Biogeography*, 42(8), 1455-1468. <https://doi.org/10.1111/jbi.12507>
- Kessler, M. (2000). Elevational gradients in species richness and endemism of selected plant groups in the central Bolivian Andes. *Plant ecology*, 149(2), 181-193. <https://doi.org/10.1023/A:1026500710274>
- Kim, J., Lee, Y. S., Lee, S. G., Shin, S. C., & Park, I. K. (2008). Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 272–277. <https://doi.org/10.1002/ffj.1882>.
- Korner, C., & Spehn, E. M. (Eds.). (2002). *Mountain biodiversity: a global assessment*. CRC Press. <https://doi.org/10.4324/9780429342585>
- Körner C. 2003. Mountain biodiversity, its causes and function. *AMBIO Suppl.*13: 11-17. <https://doi.org/10.1007/0044-7447-33.sp13.11>

- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J., & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(6566), 635-638. <https://doi.org/10.1038/379635a0>.
- Kutchan, T. M. (1995). Alkaloid biosynthesis—The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell*, 7(7), 1059-1070. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1059>.
- Lee, Y. S., Kim, J., Shin, S. C., Lee, S. G., & Park, I. K. (2008). Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(1), 23–28. <https://doi.org/10.1002/ffj.1850>.
- Li, Y., Liu, F., Zhou, Y., Liu, X., & Wang, Q. (2024). Large-scale geographic patterns and environmental and anthropogenic drivers of wetland plant diversity in the Qinghai-Tibet Plateau. *BMC Ecology and Evolution*, 24(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12862-024-02263-w>
- Liu, J., Tang, Y., Bao, J., Wang, H., Peng, F., Tan, P., Chu, G., & Liu, S. (2022). A stronger rhizosphere impact on the fungal communities compared to the bacterial communities in pecan plantations. *Frontiers in Microbiology*, 13, 899801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.899801>.
- López-Merino, L., López-Sáez, J. A., Alba-Sánchez, F., Pérez-Díaz, S., & Carrión, J. S. (2009). 2000 years of pastoralism and fire shaping high-altitude vegetation of Sierra de Gredos in central Spain. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 158(1-2), 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2009.07.003>
- Luong, T. H., Nguyen, V. V., & Jung, W. J. (2024). Antifungal activity of a methanolic extract of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. root against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici*. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 66(1), 46–52. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.66\(1\).46-52](https://doi.org/10.31276/VJSTE.66(1).46-52).
- Lyubenova, A., Nikolova, M., & Slavov, S. B. (2024). Impact of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart derived extracts and essential oil on plant pathogens from genus *Phytophthora*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 30(5), 833–838.

- Martínez J, Fiz O, Valcárcel V, Vargas P. 2004. *Pseudomisopates rivas-martinezii* En: Bañares A, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S (Eds). *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid, pp. 450-451.
- Martins, J., Batista, T., Pinto, G., & Canhoto, J. (2021). Seasonal variation of phenolic compounds in Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves and inhibitory potential on *Phytophthora cinnamomi*. *Trees*, 35(5), 1571–1586. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02137-4>.
- Matheron, M. E., & Mircetich, S. M. (1985). Seasonal variation in susceptibility of *Juglans hindsii* and paradox rootstocks of English walnut trees to *Phytophthora citricola*. *Phytopathology*, 75(9), 970–972.
- Matile, P., Hörtensteiner, S., & Thomas, H. (1999). Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 67-95. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.067>.
- Meesakul, P., Shea, T., Fenstemacher, R., Wong, S. X., Kuroki, Y., Wada, A., & Cao, S. (2023). Phytochemistry and Biological Studies of Endemic Hawaiian Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16323. <https://doi.org/10.3390/ijms242216323>
- Membang, G., Tchoumi, J. M. T., Ntsefong, G. N., Ela, E. Y. M., Dida, S. L. L., Tsango, L. T., Mbondjo, P. L. E., & Tabi, F. O. (2024). Assessing the Efficacy of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and sambong (*Blumea balsamifera*) extracts in Combating black pod disease: sustainable solutions for controlling *Phytophthora megakarya* in Cameroon's cocoa plantations. *American Journal of Plant Sciences*, 15(7), 519–537. <https://doi.org/10.4236/ajps.2024.157036>.
- Mertens, A., Brys, R., Schoupe, D., & Jacquemyn, H. (2018). The impact of floral morphology on genetic differentiation in two closely related biennial plant species. *AoB Plants*, 10(5), ply051. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply051>

- Minova, S., Sešķēna, R., Voitkāne, S., Metla, Z., Daugavietis, M., Jankevica, L. (2015). Impact of pine (*Pinus sylvestris* L.) and spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) bark extracts on important strawberry pathogens. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 69, 62–67, <https://doi.org/10.1515/prolas-2015-0008>.
- Moiteiro, C., Esteves, T., Ramalho, L., Rojas, R., Alvarez, S., Zacchino, S., & Bragança, H. (2013). Essential oil characterization of two Azorean *Cryptomeria japonica* populations and their biological evaluations. *Natural Product Communications*, 8(12). <https://doi.org/10.1177/1934578X13008012>.
- Ndala, R., Mbega, E., & Ndakidemi, P. (2019) Different plant extracts against *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in tomato *in vitro*. *American Journal of Plant Sciences*, 10, 698–708. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.104050>.
- Ojeda, F., Brun, F. G., & Vergara, J. J. (2005). Fire, rain and the selection of seeder and resprouter life-histories in fire-recruiting, woody plants. *New Phytologist*, 168(1), 155-165. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01486.x>
- Pan, J. J., & Price, J. S. (2002). Fitness and evolution in clonal plants: the impact of clonal growth. In *Ecology and Evolutionary Biology of Clonal Plants: Proceedings of Clone-2000. An International Workshop held in Obergurgl, Austria, 20–25 August 2000* (pp. 361-378). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1345-0_20
- Radwanski, E. R., & Last, R. L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: Biochemical and molecular genetics. *The Plant Cell*, 7(7), 921-934. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.921>.
- Ramadan, K.M.A., Ali, M.K., Georghiou, P.E. (2012). Natural fungitoxicants of essential oil from *Ageratum houstonianum* L. and its application in control the root-rot diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 7(3), 437–453.
- Rosenthal, G. A., & Berenbaum, M. R. (Eds.). (1991). *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites* (2nd ed., Vol. 1). Academic Press.

- Salamone, A., Zizzo, G. V., & Scarito, G. (2006). The antimicrobial activity of water extracts from Labiatae. En *I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation* 723 (pp. 465–470). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.723.67>.
- Silvertown, J. (2008). The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International journal of plant sciences*, 169(1), 157-168. <https://doi.org/10.1086/523357>
- Sánchez-Hernández, E., Martín-Ramos, P., Martín-Gil, J., Santiago-Aliste, A., Hernández-Navarro, S., Oliveira, R., & González-García, V. (2022a). Bark extract of *Uncaria tomentosa* L. for the control of strawberry phytopathogens. *Horticulturae*, 8(8), 672–689. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080672>.
- Sánchez-Hernández, E., Balduque-Gil, J., Barriuso-Vargas, J. J., Casanova-Gascón, J., González-García, V., Cuchí-Oterino, J. A., Lorenzo-Vidal, B., Martín-Gil, J., & Martín-Ramos, P. (2022b). Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) bark aqueous ammonia extract for the control of invasive forest pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11882–11898. <https://doi.org/10.3390/ijms231911882>.
- Sánchez-Hernández, E.; González-García, V.; Casanova-Gascón, J.; Barriuso-Vargas, J.J.; Balduque-Gil, J.; Lorenzo-Vidal, B.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. (2022). Valorization of *Quercus suber* L. bark as a source of phytochemicals with antimicrobial activity against apple tree diseases. *Plants*, 11(24), 3415–3433. <https://doi.org/10.3390/plants11243415>.
- Sánchez-Hernández, E., Álvarez-Martínez, J., González-García, V., Casanova-Gascón, J., Martín-Gil, J., & Martín-Ramos, P. (2023a). *Helichrysum stoechas* (L.) Moench inflorescence extract for tomato disease management. *Molecules*, 28(15), 5861–5878. <https://doi.org/10.3390/molecules28155861>.
- Sánchez-Hernández, E., Teixeira, A., Pereira, C., Cruz, A., Martín-Gil, J., Oliveira, R., & Martín-Ramos, P. (2023b). Chemical constituents and antimicrobial activity of a *Ganoderma lucidum* (Curtis.) P. Karst. aqueous ammonia extract. *Plants*, 12(12), 2271–2288. <https://doi.org/10.3390/plants12122271>.

- Sánchez-Hernández, E.; Balduque-Gil, J.; González-García, V.; Barriuso-Vargas, J.J.; Casanova-Gascón, J.; Martín-Gil, J.; Martín-Ramos, P. (2023c) Phytochemical profiling of *Sambucus nigra* L. flower and leaf extracts and their antimicrobial potential against almond tree pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1154–1171. <https://doi.org/10.3390/ijms24021154>.
- Sánchez-Lafuente, A. M., Rodríguez-Gironés, M. A., & Parra, R. (2012). Interaction frequency and per-interaction effects as predictors of total effects in plant–pollinator mutualisms: a case study with the self-incompatible herb *Linaria lilacina*. *Oecologia*, 168, 153-165. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2084-z>
- Sanz-Elorza, Mario, Dana, E. D., González, A., & Sobrino, E. (2003). Changes in the high-mountain vegetation of the central Iberian Peninsula as a probable sign of global warming. *Annals of Botany*, 92(2), 273-280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg130>
- Sardans, J., Rivas-Ubach, A., & Peñuelas, J. (2012). The elemental stoichiometry of aquatic and terrestrial ecosystems and its relationships with organismic lifestyle and ecosystem structure and function: A review and perspectives. *Biogeochemistry*, 111, 1-39. <https://doi.org/10.1007/s10533-011-9640-9>
- Sørensen, T. A. (1948). A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content, and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Skrifter*, 5(4), 1-34.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207-218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>.
- Talwalkar, A. T. (1981). *IGT/DOE coal-conversion systems technical data book* (Nº. CONF-811108-18). Institute of Gas Technology, Chicago, IL (USA).

- Teixeira, A.; Sánchez-Hernández, E.; Noversa, J.; Cunha, A.; Cortez, I.; Marques, G.; Martín-Ramos, P.; Oliveira, R. (2023). Antifungal activity of plant waste extracts against phytopathogenic fungi: *Allium sativum* peels extract as a promising product targeting the fungal plasma membrane and cell wall. *Horticulturae*, 9(2), 136–152. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020136>.
- Telmo, C., & Lousada, J. (2011). Heating values of wood pellets from different species. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 2634-2639. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.043>
- Vargas, P., & García, B. (2008, December). Plant endemics to Sierra de Gredos (central Spain): taxonomic, distributional, and evolutionary aspects. In *Anales del Jardín botánico de Madrid* (Vol. 65, No. 2, pp. 353-366). <https://doi.org/10.3989/ajbm.2008.v65.i2.298>
- Vargas, P., Fernández-Mazuecos, M., & Heleno, R. (2017). Phylogenetic evidence for a Miocene origin of Mediterranean lineages: species diversity, reproductive traits and geographical isolation. *Plant Biology*, 20, 157-165. <https://doi.org/10.1111/plb.12626>
- Vázquez-Baeza, Y., Pirrung, M., González, A., & Knight, R. (2013). EMPERor: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-16>.
- Vega-Nieva, D. J., Ortiz, L., Poblete, P., & Galindo, M. F. (2015). Caracterización bioenergética de los residuos de cosecha de las principales especies forestales del noroeste de España. *Información Tecnológica*, 26(4), 11-20. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000400002>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5).
- Yurgel, S., Sallato, B., & Cheeke, T. (2023). Exploring microbial dysbiosis in orchards affected by little cherry disease. *Phytobiomes Journal*, 7(3), 375-384. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-10-22-0072-R>.

ANEJOS

ANEXOS

- ANEXO I: DETALLES DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE GC-MS
- ANEXO II: CONDICIONANTES DEL PLAN DE CONSERVACIÓN
- ANEXO III: PLANIFICACIÓN DEL PLAN DE CONSERVACIÓN
- ANEXO IV: MAQUINARIA Y EQUIPOS DEL PLAN DE CONSERVACIÓN
- ANEXO V: NORMAS PARA LA EJECUCIÓN DEL PLAN DE CONSERVACIÓN
- ANEXO VI: PRESUPUESTO DEL PLAN DE CONSERVACIÓN
- ANEJO VII: PLANOS DEL PLAN DE CONSERVACIÓN

ANEXO I: DETALLES DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE GC-MS

TABLA A1. Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de La Serrota, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
13.3370	65.5093	Acetic acid, trifluoro-	90	
7.1168	3.1597	1H-Imidazole, 1-methyl-4-nitro-	42	
3.2589	1.8200	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	83	
3.1224	1.7308	Formamide, N-methyl-	59	
6.8853	1.6124	3-Methoxy-1H-pyrazol-5-ylacetamide	53	
4.6181	1.4150	2-(4-Fluorophenyl) indole	50	
6.7251	1.3870	Arsenous acid, tris(trimethylsilyl) ester	78	Arsenous acid
7.4967	1.1451	Di(1-methylcyclobutyl) ether	37	
8.6006	1.0509	Catechol	78	
8.2801	1.0261	3-Quinuclidinol	32	
9.8174	0.9737	(Butylamino)acetonitrile	14	
4.2441	0.9155	Hydrazine, 1,2-dimethyl-	30	
5.1997	0.8816	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	30	
3.4251	0.8458	Butanoic acid	38	
9.6690	0.8365	2-Propenoic acid, 2-methyl-, 1,2-ethanediylobis(oxy-2,1-ethanediy) ester	35	
7.6213	0.7674	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	42	
8.7787	0.6754	(S)-(+)-3-Methyl-1-pentanol	38	
8.1318	0.6514	3,3-Dimethyl-2,4-pentane dione	43	
8.3336	0.4914	3,4-Methylpropylsuccinimide	72	
7.2593	0.4586	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-5,6-dimethyl-, trans-	38	
9.3900	0.3965	2,6,10,14-Tetramethyl-7-(3-methylpent-4-enylidene) pentadecane	50	
8.6897	0.3632	Ethyl trifluoromethanesulfonate	11	
6.9210	0.3589	4-Heptanone	52	
3.7693	0.3313	1-Butene, 3-methyl-3-(1-ethoxyethoxy)	27	
7.7756	0.3014	Trideca-1,7,11-triene-1,1-dicarbonitrile, 4,8,12-trimethyl-	22	
3.5794	0.2936	3-Nitropropanoic acid	22	
15.3135	0.2657	4-Cyclopentene-1,2,3-trione, 4,5-dihydroxy-	43	
7.3246	0.2543	Ornithine	16	
14.4351	0.2539	β -D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	86	
6.5530	0.2417	2-Cyclopentene-1-carboxylic acid, 1-methyl-	30	
16.3640	0.2336	1-Methyl-1-ethyl-1-silacyclobutane	52	Silane cyclization product

TABLA A1 (cont.). Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de La Serrota, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
5.8526	0.2203	1-Methyl-4-cyclohexylaminocytosine	47	
15.8417	0.2183	Phosphinic acid amide, diisopropyl-N-phenyl-	45	
14.5775	0.2155	1,4-Butanediamine, 2,3-dimethoxy-N,N,N',N'-tetramethyl-, [S-(R*,R*)]-	47	
9.2179	0.1999	7,11-Dimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol	14	
17.0169	0.1975	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-	52	
14.6547	0.1864	2-Amino-5-methyl-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine	55	
13.6634	0.1776	1-Bromo-11-iodoundecane	25	
14.9514	0.1600	Tetrahydro-22-desoxy-tomatillidine	70	
7.1940	0.1594	5-Methyl-1,3-cyclohexanedione	27	
15.5568	0.1536	Pyrrolidine, 1,2-dedihydro-5-[3-acetoxy-1-butyl]-2-methylthio-	53	
15.6102	0.1500	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	53	
15.0523	0.1405	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3-hexanone	27	
20.0736	0.1393	Pyrimidine, 5-butyl-2-(4-pentylphenyl)-	47	
14.2748	0.1238	Silane, [[4-[1,2-bis(trimethylsilyloxy)ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis(trimethyl-	38	4-(1,2-dihydroxyethyl)benzene-1,2-diol
14.1679	0.1211	Benzophenone, 2-(methylamino)-5-methyl-	25	
3.6447	0.1211	Cyclohexanepropanol, α ,2,2,6-tetramethyl-	38	
14.8446	0.1195	Silacyclohexan-4-one, 1,1-dimethyl-	60	Silane cyclization product
15.7289	0.1076	Benzoisothiazole, 3-(2-methoxyethyl)amino-, 1,1-dioxide	45	
23.4567	0.1029	N-[5-(3-Hydroxy-2-methylpropenyl)-1,3,4,5-tetrahydrobenzo[cd]indol-3-yl]-N-methylacetamide	91	
16.6192	0.0946	Methyl 6,8-dodecadienyl ether	64	
15.9960	0.0843	4H-Pyran-4-one, 5-hydroxy-2-methyl-	46	
5.6805	0.0763	2-Pentenoic acid, 2-methyl-	22	
17.5273	0.0760	Cyclodecasiloxane, eicosamethyl-	64	
20.2160	0.0696	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	50	
19.3020	0.0661	2-Hydrazino-6-methoxymethyl-4-methyl-nicotinonitrile	78	
17.0881	0.0639	6-Octenoic acid, 3,7-dimethyl-	30	
16.5361	0.0622	8-(2-Nitrophenoxy)octan-1-ol	41	
5.9238	0.0619	2-Propenenitrile, 3-(phenylsulfonyl)-	25	
16.2512	0.0608	3,7,11-Trimethyl-dodeca-2,6,10-trienoic acid	35	
17.3730	0.0595	Tricyclo[3.3.1.1(3,7)]decane-1-acetamide, N-(2-methyl-4-oxazolo[4,5-b]pyridin-2-yl)phenyl-	38	
19.6700	0.0581	N-Methyldodecanamide	58	
19.8184	0.0577	Bis(trifluoromethylthio)selenide	44	
15.1592	0.0557	1-Chloro-4-methoxy-2-phenylbutane	41	
16.9338	0.0537	3(2H)-Benzofuranone, 5,6-dimethyl-	47	

TABLA A1 (cont.). Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de La Serrota, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
14.3460	0.0438	1-Methoxy-3-phenylpropane	45	
15.6815	0.0419	2,4-Dihydroxy-5,6-dimethylpyrimidine	46	
15.4559	0.0412	Benzenethiol, 4-methoxy-	58	
19.4979	0.0337	3-(2-Methoxymethoxyethylidene)-2,2-dimethylbicyclo[2.2.1]heptane	59	
17.6045	0.0285	8-[4-[N-Aziridyl]butyl]amino-2,6-dimethyl-2,6-octadiene	38	
17.4086	0.0267	Naphthalene-2-sulfonamide	49	
21.0589	0.0267	Trimethylsilyl-di(trimethylsiloxy)-silane	15	Silicic acid
17.7469	0.0266	3,7,11-Trimethyl-dodeca-2,4,6,10-tetraenal	41	
19.4504	0.0265	Ethyl 7-chlorocinchoninate	38	
16.0376	0.0260	Benzene, 1-ethyl-3,5-diisopropyl-	50	
19.0290	0.0249	Bornylamine, N-cyclopropylcarbonyl	35	
17.4858	0.0232	Acetamide, 2-(4-amino-2-methoxyphenoxy)-	52	
19.1595	0.0230	Cyclooctane, (methoxymethoxy)-	25	
17.6876	0.0215	Cyclobuta[1,2:3,4]dicyclooctene-1,7(2H,6bH)-dione, dodecahydro-, (6 α ,6 β ,12 α ,12 β)-	86	
18.6313	0.0204	Alachlor	53	
18.5838	0.0202	2(1H)-Naphthalenone, octahydro-4a-methyl-7-(1-methylethyl)-, (4 α ,7 β ,8 α β)-	91	
18.8687	0.0200	Morpholine, 4-[5,5-dimethyl-3-(1-methylethylidene)-1-cyclohexen-1-yl]-	74	
21.3972	0.0195	Tri(trimethylsilyl) derivative of estriol	45	Estriol
21.1835	0.0188	1-Formyl-2,2-dimethyl-3-cis-(2-methyl-but-2-enyl)-6-methylidene-cyclohexane	35	
20.3407	0.0166	2,6-Lutidine, 3,5-dichloro-4-ethylthio-	70	
20.4831	0.0155	4-Hexenoic acid, 2-acetyl-2,3-dimethyl-, ethyl ester, (E)-	46	
18.1684	0.0144	9-Undecenal, 2,6,10-trimethyl-	64	
26.2701	0.0137	Propiophenone, 2'-(trimethylsiloxy)-	49	
25.5400	0.0136	4-Dehydroxy-N-(4,5-methylenedioxy-2-nitrobenzylidene)tyramine	70	
20.2694	0.0130	1,3,5-Triazine, 2-(2-furfuryloxy)-4,6-bis(dimethylamino)-	70	
18.1209	0.0126	Zinc, dicyclopentyl-	44	
25.4450	0.0123	2-Ethylacridine	62	
20.7621	0.0113	4-Bromophenethyl alcohol, methyl ether	25	
20.9580	0.0102	Isothiourea, 1,1,2-trimethyl-3-(2,4,6-trimethylphenyl)-	42	
23.5576	0.0091	2-(Acridin-9-ylamino)-3-methyl-butyric acid	41	
25.1067	0.0052	Silicic acid, diethyl bis(trimethylsilyl) ester	52	Diethyl silicic acid
14.5003	0.2320	Propanamide, N,2-dimethyl-	46	
6.1494	0.2246	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	59	
8.0546	0.2211	4-Penten-2-ol, 3-methyl-	35	

TABLA A2. Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de Gredos, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
14.4350	80.7046	Acetic acid, trifluoro-	89	
5.2116	1.8695	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	72	Siloxane degradation product
7.1287	1.8543	1H-Imidazole, 1-methyl-4-nitro-	42	
3.2470	1.7327	Formamide, N-methyl-	59	
3.3894	1.7315	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	87	Siloxane degradation product
6.9091	1.6122	3-Methoxy-1H-pyrazol-5-ylacetamide	59	
4.7011	0.9389	2-(4-Fluorophenyl) indole	50	
6.9981	0.5943	Acetamide, N-tetrahydrofurfuryl-2,2,2-trifluoro-	59	
8.7905	0.5696	(S)-(+)-3-Methyl-1-pentanol	38	
5.4074	0.4948	Ethanone, 1-[4-methyl-2-[(trimethylsilyl)oxy]-3-cyclohexen-1-yl]-, cis-(+)-	37	1-[4-methyl-2-hydroxy-3-cyclohexen-1-yl]ethanone
8.3039	0.4899	3-Quinuclidinol	50	
8.1436	0.4444	2-Propenamide	43	
9.3604	0.3662	Cyclopropanecarboxylic acid, tridec-2-ynyl ester	14	
6.5055	0.3654	Cyclohexene,3-(2-propenyl)-	53	
8.3454	0.3363	3,4-Methylpropylsuccinimide	59	
7.7459	0.3311	3-Formyl-4,5-dimethyl-pyrrole	43	
8.2326	0.3176	2-Ethoxyethanol, trifluoroacetate	37	
8.0724	0.2997	2,5-Hexanediol	27	
7.2889	0.2931	13H-Dibenzo[a,i]carbazole	27	
8.7075	0.2608	d-Threo-O-ethylthreonine	18	
15.5806	0.2553	2-Propanamine, N-methyl-N-(1-methylethyl)-	43	
6.7251	0.2533	Tetrasiloxane, decamethyl-	35	Siloxane degradation product
7.9240	0.2433	Benzo[d,E]isoindolo[2,1-a]quinazolin-12-one, 11-amino-	42	
3.5259	0.2119	3,6-Diamino-9-methylcarbazole	38	
22.5130	0.2038	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-	62	Siloxane degradation product
16.5243	0.1757	4-[2-(Dimethylamino)ethyl]morpholine	30	
5.0454	0.1708	Pyrido(2,3-b)pyrazine, 6-amino-8-(p-chloroanilino)-3-methyl-	45	
15.2600	0.1700	3H-Pyrazol-3-one, 1,2-dihydro-5-methyl-	72	
24.4479	0.1685	Pyrimidine, 5-butyl-2-(4-pentylphenyl)-	15	
14.9217	0.1663	3-Cyclobutene-1,2-dione, 3,4-dihydroxy-	53	
15.3491	0.1611	N-Ethylformamide	38	
7.8706	0.1600	6-Amino-2,3-diphenyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine	45	
8.5413	0.1594	1-Butene, 3-methyl-3-(1-ethoxyethoxy)	25	

TABLA A2 (cont.). Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de Gredos, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
14.8089	0.1575	β -D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	91	
17.3730	0.1560	Tricyclo[3.3.1.1(3,7)]decane-1-acetamide, N-(2-methyl-4-oxazolo[4,5-b]pyridin-2-ylphenyl)-	47	
15.8417	0.1464	2,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazepine	25	
8.9805	0.1454	7,11-Dimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol	22	
5.9832	0.1426	Propane, 2-ethoxy-	14	
6.2740	0.1294	Pentane, 1-bromo-5-methoxy-	38	
5.3362	0.1244	3-Methyl-7-(4-methyl-piperazin-1-yl)-3H-thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2-thione	43	
5.2591	0.1241	trans-4-(2-(5-Nitro-2-furyl)vinyl)-2-quinolinamine	38	
21.3972	0.1216	Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethyl-	38	Siloxane degradation product
19.3435	0.1197	Quinaldic acid, 1,2,3,4-tetrahydro-8-hydroxy-4-oxo-, L-	38	
16.0672	0.1186	1,4-Benzenediol, 2-methoxy-	53	
4.0126	0.1156	Cyclohexene, 3,3,5,5-tetramethyl-1-(trimethylsilyloxy)-	43	3,3,5,5-tetramethyl-cyclohexen-1-ol
5.0751	0.1132	3,4,5,6-Tetrachlorophthalimide	43	
14.8564	0.1101	9-Azabicyclo[6.1.0]non-4-en-9-amine, (1 α ,4Z,8 α)-	60	
15.7942	0.1101	l-Glutamic acid, monobenzyl ester	58	
21.2784	0.1028	4-Nitro-4'-chlorodiphenylsulfoxide	53	
15.9842	0.0887	4H-Pyran-4-one, 2-methoxy-6-methyl-	50	
18.7737	0.0875	Methyl 4-(1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydropyrido[2,1-a]- β -carbolin-12b-yl)butanoate	25	
14.2689	0.0852	1-Bromo-11-iodoundecane	20	
23.4567	0.0852	Androsta-4,16-dien-3-one, O-methyloxime	56	
15.9545	0.0804	meta-Methoxybenzenethiol	46	
6.1137	0.0767	2-(2-Pyrrol2-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethoxy]-phenoxy)morpho-ethoxy)-ethanol	14	
16.2037	0.0762	Benzeneethanamine, N,N-dimethyl-	25	
3.6981	0.0707	Acetamide, N-methyl-	46	
6.6657	0.0655	Arsenous acid, tris(trimethylsilyl) ester	27	Arsenous acid
19.6700	0.0612	Dodecanal, O-methyloxime	46	
4.4875	0.0607	Benzothiazole, 2-phenyl-	47	
16.7142	0.0592	9-Undecenol, 2,10-dimethyl-	52	
18.3345	0.0586	Farnesol isomer a	72	
3.7752	0.0585	Ethanamine, 2-propoxy-	14	
4.8614	0.0547	Bis(trimethylsilyl)phosphite	47	Phosphorous acid
25.3797	0.0513	N-[5-(3-Hydroxy-2-methylpropenyl)-1,3,4,5-tetrahydrobenzo[cd]indol-3-yl]-N-methylacetamide	90	
5.5677	0.0492	1-Propanol, 2-ethoxy-	25	
14.9989	0.0470	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-	25	

TABLA A2 (cont.). Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de Gredos, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
19.1833	0.0419	2-Hydrazino-6-methoxymethyl-4-methyl-nicotinonitrile	49	
4.2500	0.0416	Hydrazine, 1,1-dimethyl-	52	
25.4391	0.0410	1H-Indole-2-carboxylic acid, 6-(4-ethoxyphenyl)-3-methyl-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-, isopropyl ester	46	
26.2700	0.0390	2-(Acetoxymethyl)-3-(methoxycarbonyl)biphenylene	35	
17.2187	0.0382	Pentanoic acid, 2-hydroxy-4-methyl-, methyl ester	43	
4.9029	0.0378	2-Fluoro-9-methylacridine	38	
17.5214	0.0368	Thiophene-2-carboxamide, 3-ethoxy-N-(4-chlorophenyl)-	52	
3.8524	0.0367	Hydrazine, 1,2-dimethyl-	38	
16.4352	0.0343	1-Methyl-3-ethyladamantane	81	
16.9635	0.0330	4(equaoriat)-Ethenyl-1,2(equatorial)-dimethyl-trans-decahydroquinol-4-ol,N-oxide	38	
15.4500	0.0323	6-Ethyl-2,3-dihydropyran-2,4-dione	43	
21.0588	0.0316	2-Pyridinemethanol 3,5-dichloro-4-hydroxy-6-methyl-	52	
18.5838	0.0311	Methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate	93	
18.4235	0.0309	7-Azabicyclo[4.1.0]heptane, 2-methyl-	25	
19.4979	0.0295	2-Quinolincarboxylic acid, 1,2,3,4-tetrahydro-1-hydroxy-4-oxo-, (S)-	38	
17.6638	0.0275	2,4-Dichloro-5-fluoroacetophenone	38	
17.0881	0.0244	3,7-Nonadienoic acid, 4,8-dimethyl-, methyl ester, (E)-	42	
21.1835	0.0242	cis-3,5-Dimethoxy- β -methyl- β -nitrostyrene	55	
17.7647	0.0233	9-Undecenal, 2,6,10-trimethyl-	43	
18.9340	0.0217	3,4-Dihydroisoquinoline, 6,7,8-trimethoxy-1-methyl-	41	
19.1536	0.0205	3-Hydroxy- β -damascone	35	
4.1017	0.0196	Tris(trifluoromethylthio)methane	43	
25.2848	0.0194	2-Ethylacridine	56	
19.0824	0.0192	Cyclohexane, 1,2,4-trimethoxy-, stereoisomer II	46	
17.8538	0.0187	Ethanal, 2-(3-ethyl-2,2-dimethylcyclobutyl)-, semicarbazone	30	
18.6847	0.0183	1,3-Dioxolane, 4-ethyl-5-octyl-2,2-bis(trifluoromethyl)-, trans-	43	
17.6045	0.0172	Benzene, 1-methyl-3-(methylthio)-	46	
20.2160	0.0169	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	30	Siloxane degradation product
4.3569	0.0167	2-Butenoic acid, 3-methyl-	25	
19.8183	0.0163	Cyclodecasiloxane, eicosamethyl-	41	Siloxane degradation product
20.0024	0.0163	4-(3-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)pent-3-en-2-one	42	
18.4770	0.0161	Bis(trifluoromethylthio)selenide	41	
20.3407	0.0158	Acetamide, 2-[[3-cyano-4-(methoxymethyl)-6-methyl-2-pyridinyl]thio]-N-(2-phenylethyl)-	59	
20.5247	0.0156	Purine-2,6(1H,3H)-dione, 7-(2-ethenyloxyethyl)-1,3-dimethyl-	53	

TABLA A2 (cont.). Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de raíces de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de Gredos, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
19.0289	0.0152	2-((E)-([3-(2-Dimethylanilino)-1-benzofuran-2-yl]imino)methyl)phenol	43	
17.1297	0.0145	(2-Nonyloxy-benzyl)-phenyl-amine	46	
20.7799	0.0145	2,6-Methano-3-benzazocine, 1,2,3,4,5,6-hexahydro-8-methoxy-6,11-dimethyl-3-(3-methyl-2-butenyl)-, (2 α ,6 α ,11R*)-	91	
17.0347	0.0139	2-Amino-4,6-dihydroxypyrimidine, N,O,O'-tris(trifluoroacetyl)-	22	
20.9935	0.0136	Antra-9,10-quinone, 1-(3-hydroxy-3-phenyl-1-triazenyl)-	44	
18.6313	0.0132	1,5-Anhydro-D-sorbitol, tetrakis(trifluoroacetate)	43	
17.7173	0.0126	2,5-Cyclohexadien-1-one, 3,5-dihydroxy-4,4-dimethyl-	35	
18.0496	0.0110	3,4-Dimethyl cyclohexanone	38	
18.2099	0.0104	1-Methoxy-3-(2-hydroxyethyl)nonane	55	
4.5350	0.0103	Ethanamine, 2-chloro-N,N-dimethyl-	25	
22.2044	0.0099	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	90	
18.3701	0.0094	2-Furancarboxylic acid, 3,4-dimethoxy-	53	
18.2455	0.0091	2,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl-, ethyl ester	70	
4.3094	0.0088	(2-Chloro-phenyl)-(2-methoxy-6-methoxymethoxy-phenyl)-methanol	38	
23.2846	0.0088	9H-Imidazo[1,2-a]benzimidazole, 2-(4-chlorophenyl)-9-methyl-	47	
16.9100	0.0086	6-Bromohexanoic acid, but-3-yn-2-yl ester	44	
3.5853	0.0080	3-(4'-Methoxy-1,1'-biphenyl-4-yl)butanenitrile	45	
20.4416	0.0073	Silanamine, N-[2,6-dimethyl-4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl]-1,1,1-trimethyl-	44	4-amino-3,5-dimethylphenol
23.5576	0.0072	Benzene, 2-[(tert-butyl)dimethylsilyl]oxy]-1-isopropyl-4-methyl-	35	2-isopropyl-4-methylphenol
21.6286	0.0045	1-Benzazirene-1-carboxylic acid, 2,2,5a-trimethyl-1a-[3-oxo-1-butenyl] perhydro-, methyl ester	44	

TABLA A3. Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedente de La Serrota, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
4.0484	48.3972	Acetic acid, trifluoro-	46	
3.4133	13.6055	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	83	Siloxane degradation product
3.1224	12.7239	3,5-Dihydroxybenzamide	59	
3.9296	4.1808	Cyclohexanepropanol, α ,2,2,6-tetramethyl-	40	
3.1877	2.4247	1,1,3,3-Tetramethyl-1,3-bis[(2Z)-pent-2-en-1-yloxy]disiloxane	16	Siloxane derivative
7.0991	2.4093	4H-Pyran-3-carboxylic acid, 2-amino-5-cyano-6-ethyl-4-(3-pyridinyl)-, methyl ester	50	
3.2590	2.3214	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	22	
20.0737	1.9036	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-	62	Siloxane degradation product
3.2946	1.8776	2-Hydroxyethyl vinyl sulfide	22	
4.7190	1.6418	2,6-Di-n-propyl-4-phenylpyridine	40	
6.6302	1.5915	1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene	64	1,4-Dihydroxybenzene (Hydroquinone)
7.6095	1.5049	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	70	Siloxane degradation product
7.0397	1.1931	5-[Cyano(4,4-dimethyl-5-methylene-4,5-dihydro-3H-pyrrol-2-yl)methylene]-2,3,3-trimethylpyrrolidine-2-carbonitrile	38	
5.4491	1.0747	4-Fluoro-3-trifluoromethylbenzoic acid, isoheptyl ester	14	
4.8615	1.0237	Terephthalaldehydic acid, methyl ester, p-(O-methyloxime)	35	
5.0514	0.8698	Acetamide, N-[4-(trimethylsilyl)phenyl]-	10	4-Aminophenol
9.2536	0.8636	Benzeneacetic acid, α -hydroxy-, (R)-	64	
8.7847	0.7395	Benzenethiol, 4-methoxy-	18	
6.5946	0.6589	2-Cyclopentene-1-carboxylic acid, 1-methyl-	27	
10.5475	0.6371	3-Allyl-6-methoxyphenol	98	
4.7962	0.6266	2-Anthracenammine	27	
9.0577	0.5812	4H-3,1-Benzoxazine, 6,7-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-propyl-	35	
11.6930	0.5556	Silane, [[4-[1,2-bis[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis[trimethyl-	38	4-(1,2-dihydroxyethyl)benzene-1,2-diol
13.6695	0.5391	Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethyl-	25	Siloxane degradation product
8.5592	0.5344	Butylamine, N-methyl-N-propyl-	43	
12.2866	0.4930	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	93	Siloxane degradation product
10.0727	0.4860	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	91	Siloxane degradation product
6.8557	0.4508	4-(1,1-Dimethylpropyl)phenol, trimethylsilyl ether	35	4-(1,1-Dimethylpropyl)phenol
9.5029	0.4329	2',6'-Dihydroxyacetophenone, bis(trimethylsilyl) ether	64	2',6'-Dihydroxyacetophenone
8.8559	0.3428	6-Chloro-2-(p-methoxyphenyl)-4-phenylquinoline	30	
18.5780	0.3165	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	99	
9.5504	0.3040	9,10-Dimethylenetricyclo[4.2.1.1(2,5)]decane	59	
10.0311	0.2638	Hexasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethyl-	47	Siloxane degradation product

TABLA A3 (cont.). Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedente de La Serrota, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
8.6838	0.2480	Benzofuran, 2,3-dihydro-	38	
7.9716	0.2460	Benzoic acid	55	
18.6314	0.2146	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	99	
11.6218	0.1980	Silane, chloroethylmethyl-	50	Chloroethylmethylsilanol
9.9658	0.1940	2-Methoxy-4-vinylphenol	87	
16.9636	0.1838	Hexadecanoic acid, methyl ester	95	
5.9833	0.1771	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-	22	
10.2329	0.1683	Methanone, [4-(1-piperazinyl)phenyl]3-pyridinyl-	38	
13.0700	0.1590	7-Chloro-2,3-dihydro-3-(4-N,N-dimethylaminobenzylidene)-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin-2-one	27	
18.6848	0.1571	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	95	
8.0487	0.1532	1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-butyl-4,5,6,7-tetrahydro-	43	
6.3750	0.1251	2H-Pyran-2-one, 4-hydroxy-6-methyl-	35	
18.4236	0.1220	Methyl 8,11,14-heptadecatrienoate	43	
15.9902	0.1104	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	60	Siloxane degradation product
21.2726	0.1046	1,2-Bis(trimethylsilyl)benzene	42	1,2-Dihydroxybenzene (Catechol)
13.8891	0.1042	Cyclobutanone, 2-(2,6-dimethylheptyl)-	44	
17.3019	0.0977	n-Hexadecanoic acid	56	

TABLA A4. Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedente de Gredos, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
6.3869	54.5895	Acetic acid, trifluoro-	81	
3.2768	36.6254	Acetamide, 2,2,2-trifluoro-N-methyl-	72	
4.7369	4.7932	Benzoic acid, 2-(1,3-benzothiazol-2-yl)-	37	
3.4727	1.6718	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	83	Siloxane degradation product
4.0306	1.6211	Cyclohexanepropanol, α ,2,2,6-tetramethyl-	50	
4.3749	0.8178	Ditri fluoromethyl(trifluorocarbonyloxy)amine	17	
7.6155	0.7475	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	76	Siloxane degradation product
9.5564	0.5739	1H-Pyrrole, 3-methyl-	53	
14.1622	0.3992	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-	58	Siloxane degradation product
5.9952	0.3902	2,6,10,14-Tetramethyl-7-(3-methylpent-4-enylidene) pentadecane	50	
9.0400	0.3887	N-Acridin-9-yl-N'-phenyl-hydrazine	38	
10.8799	0.3817	Pyridine-2,3,5,6-tetraamine	58	
8.5770	0.3644	Dianhydromannitol	64	
10.0787	0.3232	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	90	Siloxane degradation product
11.7228	0.2501	Hexasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethyl-	52	Siloxane degradation product
12.2926	0.2494	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	90	Siloxane degradation product
8.7966	0.2358	1,3,5-Benzenetricarboxylic acid, triphenyl ester	30	
8.6720	0.2210	1-[4-(tert-Butyl)phenyl]-2-(4-toluidino)-1-ethanone	38	
9.2596	0.2101	Benzeneacetic acid, α -hydroxy-, (S)-	60	
10.5476	0.1940	3-Allyl-6-methoxyphenol	98	
3.6448	0.1608	Di(1-methylcyclobutyl) ether	56	
11.0402	0.1533	2-(6-Ethoxy-4-methyl-quinazolin-2-ylamino)-5-methyl-pyrimidine-4,6-diol	95	
17.3672	0.1328	Formic acid, 1-(4,7-dihydro-2-methyl-7-oxopyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5-yl)-, methyl ester	25	
23.4509	0.1194	1H-Indole-2-carboxylic acid, 6-(4-ethoxyphenyl)-3-methyl-4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-, isopropyl ester	55	
17.3019	0.1174	n-Hexadecanoic acid	99	
20.0737	0.1118	1,2-Benzenediol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	46	
8.2803	0.1093	1H-Imidazole, 1-methyl-4-nitro-	43	
18.7739	0.1092	2H-Benzotriazole, 2-(2-butoxy-5-methylphenyl)-	30	
16.9636	0.1046	O-Nitroacetophenone oxime	53	
10.2389	0.1025	Methyl 4-(1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydropyrido[2,1-a]- β -carbolin-12b-yl)butanoate	30	
13.0701	0.1003	7-Chloro-2,3-dihydro-3-(4-N,N-dimethylaminobenzylidene)-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin-2-one	43	
3.3480	0.0979	2,6,10-Undecatrien-8-ol, 2,6-dimethyl-	22	
21.2786	0.0919	6-Chloro-3-ethyl-2-methyl-4-phenylquinoline	25	
22.4004	0.0893	2-(Acetoxymethyl)-3-(methoxycarbonyl)biphenylene	43	

TABLA A4 (cont.). Resultados del análisis GC-MS del extracto derivatizado de una muestra compuesta de parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedente de Gredos, con las especies químicas identificadas ordenadas en base a su abundancia.

RT (min)	Area (%)	Especies Identificadas	Qual	Especies no sililadas
7.8233	0.0850	3,4-dimethyl-1H-pyrrole-2-carboxaldehyde	46	
7.9123	0.0765	[1,2,4]Triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole, 6-(3-pyridinyl)-3-(2-thienyl)-	27	
14.2690	0.0752	Benzeneacetic acid, α ,3,4-tris[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	43	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyacetic acid
8.1260	0.0723	Cyclopentanol, 1-methyl-	22	
18.5780	0.0682	Methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate	97	
8.3278	0.0649	2-Propenoic acid, 2-methyl-, 1,2-ethanediylbis(oxy-2,1-ethanediyl) ester	27	
14.8625	0.0593	6H-Dibenzo[a,g]quinolizine, 5,8,13,13a-tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxy-, (.+/-.)-	18	
9.9718	0.0567	Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-	58	
11.6219	0.0557	2(equat)-Methyl-trans-decahydroquinol-4-one	25	
9.7760	0.0533	1H-Pyrrole-3-carboxylic acid, 2,5-dimethyl-, methyl ester	30	
12.1976	0.0522	Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethyl-	43	Siloxane degradation product
16.4591	0.0503	4-Phenyl-3,4-dihydroisoquinoline	44	
15.9843	0.0475	1-(4-Methoxy-phenyl)-5,5-dioxo-hexahydro-5.lambda.(6)-thieno[3,4-b]pyrrol-2-one	30	
25.3740	0.0448	1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene	50	1,4-dihydroxybenzene
13.6755	0.0399	1,2-Benzisothiazole-3-acetic acid, methyl ester	53	
18.6315	0.0388	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	91	
14.1206	0.0332	4(1H)-Pyrimidinone, 2-amino-6-(methylamino)-	35	

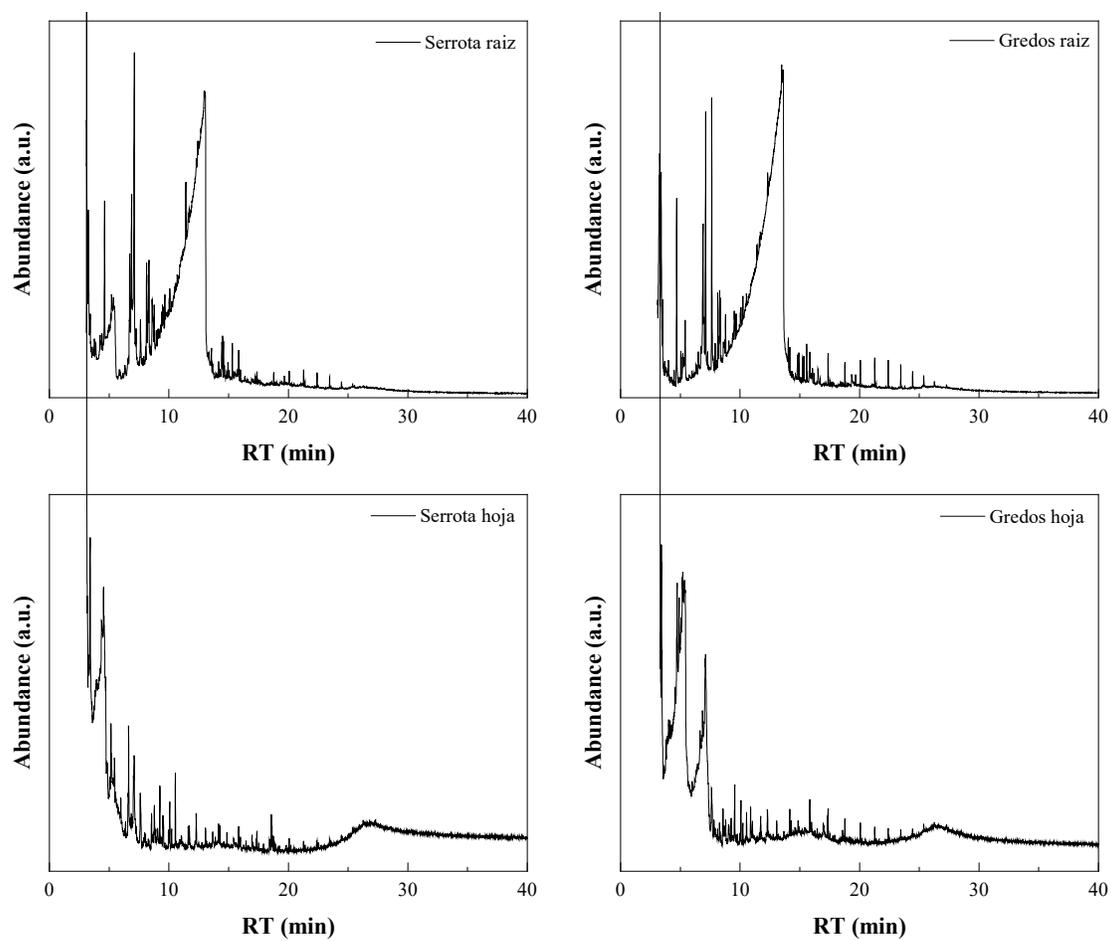


FIGURA A1. Cromatogramas de los extractos derivatizados de muestras compuestas de parte radicular y parte aérea de *Pseudomisopates rivas-martinezii* procedentes de La Serrota y Gredos.

ANEXO II: CONDICIONANTES DEL PLAN DE CONSERVACIÓN

1. Condicionantes climatológicos

La caracterización climática del área de intervención se fundamenta en el análisis de los datos disponibles en el diagrama ombrotérmico de Gausson correspondiente al municipio de Solosancho, situado a 18,7 km del rodal de Garganta del Villar.

La proximidad geográfica y la similitud altitudinal existente entre ambos emplazamientos proporcionan un marco de referencia válido para la extrapolación de los parámetros climáticos fundamentales que condicionarán el desarrollo del plan de conservación propuesto. En la FIGURA A2 se observa dicho diagrama:

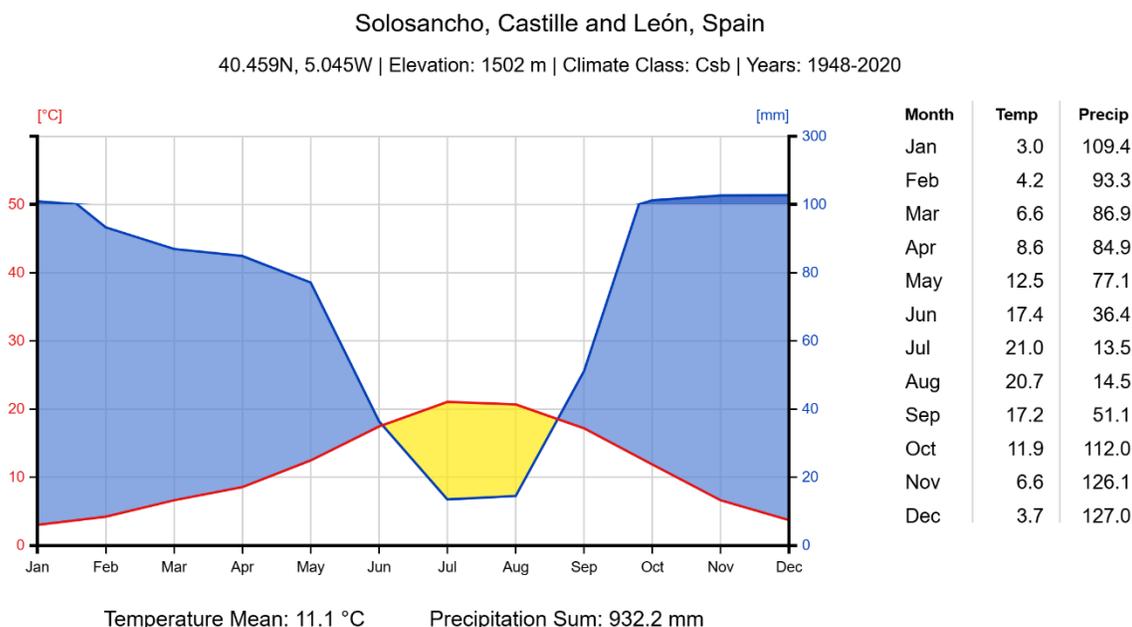


FIGURA A2. Diagrama ombrotérmico de Gausson

El diagrama ombrotérmico analizado se sustenta en datos meteorológicos procedentes del Global Historical Climatology Network (GHCN), que constituye un análisis de alta resolución espacial (0,5×0,5) de las temperaturas globales de superficie terrestre desde 1948 hasta el presente, así como en registros del Global Precipitation Climatology Centre (GPCC), que recopila datos de precipitación mensual en superficie terrestre basándose en aproximadamente 86.000 estaciones

meteorológicas distribuidas globalmente, todas ellas con registros de duración superior a una década.

El análisis de los datos climáticos revela que las precipitaciones medias anuales alcanzan los 932,2 mm, valor que sugiere un régimen hidrológico adecuado para asegurar la supervivencia de *P. rivas-martinezii* durante todo el ciclo anual. Durante los meses estivales, pese a observarse una reducción en la pluviometría, se mantienen condiciones de humedad edáfica suficientes para el mantenimiento de las poblaciones, fenómeno que ha sido corroborado mediante observaciones de campo en poblaciones naturales cercanas, las cuales no experimentan problemas de estrés hídrico severo durante los períodos estivales.

Como segunda comprobación de la pluviometría, y por referir a datos tomados por la AEMET, se utilizará el Atlas Agroclimático de CyL. Según el Atlas Agroclimático las precipitaciones medias mensuales del rodal donde se ubica el plan de conservación están entre 70-95 mm al mes, como se puede observar en la FIGURA A3:

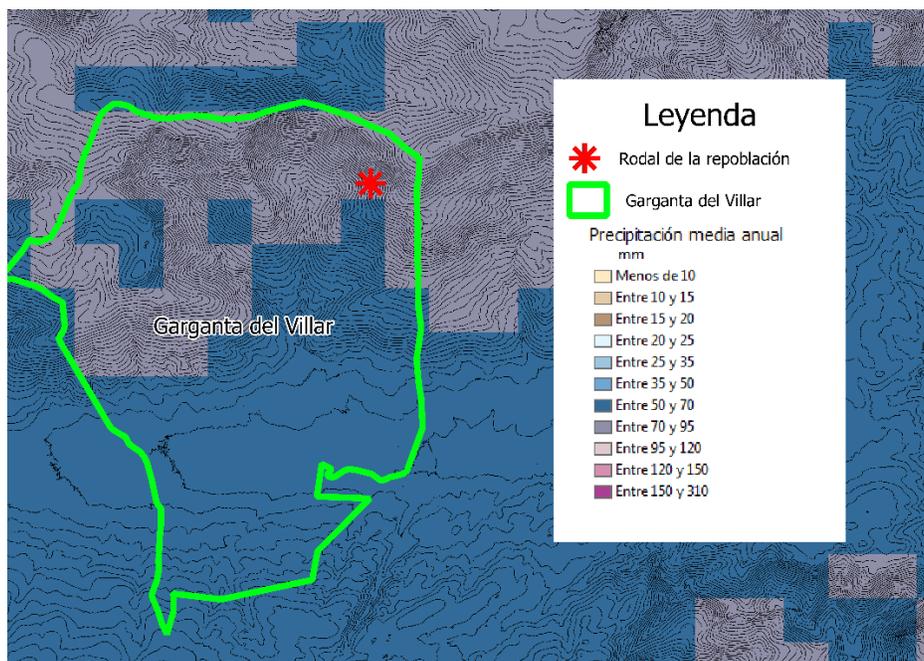


FIGURA A3. Pluviometría del rodal según el atlas agroclimático

Teniendo en cuenta que el resultado es de 70-95 mm de media al mes y que pertenece a una cuadrícula la cual se encuentra muy próxima a una cuadrícula de 50-70 mm, podemos intuir que la

pluviometría media mensual supera los 70 mm, pero no excesivamente. Mediante la adición de 1/3 de la diferencia entre los valores de la cuadrícula, obtenemos una pluviometría media mensual de 78 mm, los resultados anualmente son de 936 mm de media.

Esta estimación presenta una elevada concordancia con los 932,2 mm obtenidos mediante el diagrama ombrotérmico de Gaussen, lo que permite validar la consistencia de los datos climáticos utilizados para la caracterización del área de estudio.

El régimen térmico registra temperaturas medias de 3°C en invierno y 21°C en verano, similares a las de la meseta central, aunque La Serrota presenta valores 1-1,5°C superiores respecto a este, debido a su posición meridional.

La especie objeto de conservación presenta adaptaciones morfofisiológicas específicas que le permiten resistir las temperaturas extremas características del área de estudio. Durante el período invernal, la especie elimina completamente su parte aérea, manteniendo únicamente el sistema radicular rizomatoso hasta la llegada de la primavera. En los meses estivales, la especie aprovecha la altitud y el gradiente adiabático característico de las formaciones montañosas para mitigar las temperaturas extremas. Siguiendo la teoría del gradiente adiabático seco, que establece una disminución térmica de 1°C por cada 100 metros de ascensión altitudinal en condiciones estivales, la temperatura a la altitud del rodal resulta 3°C inferior a la registrada en el fondo del valle.

Se ha analizado una serie temporal de datos climáticos procedentes del GHCN-GPCC, que abarca el periodo comprendido entre los años 1948 y 2020. La base de datos incluye registros mensuales tanto de temperatura como de precipitación. A lo largo de la serie se observan variaciones interanuales significativas, evidenciando la existencia de oscilaciones climáticas a diferentes escalas temporales.

Para facilitar la interpretación visual de estos patrones en la FIGURA A4, se ha empleado una representación gráfica con colorimetría estandarizada, lo que permite resaltar de manera eficaz los extremos térmicos e hídricos —tanto positivos como negativos— en los distintos años analizados. Esta estrategia visual resulta especialmente útil para identificar anomalías climáticas, así como posibles tendencias a largo plazo en el contexto del cambio climático.

Condicionantes climatológicos

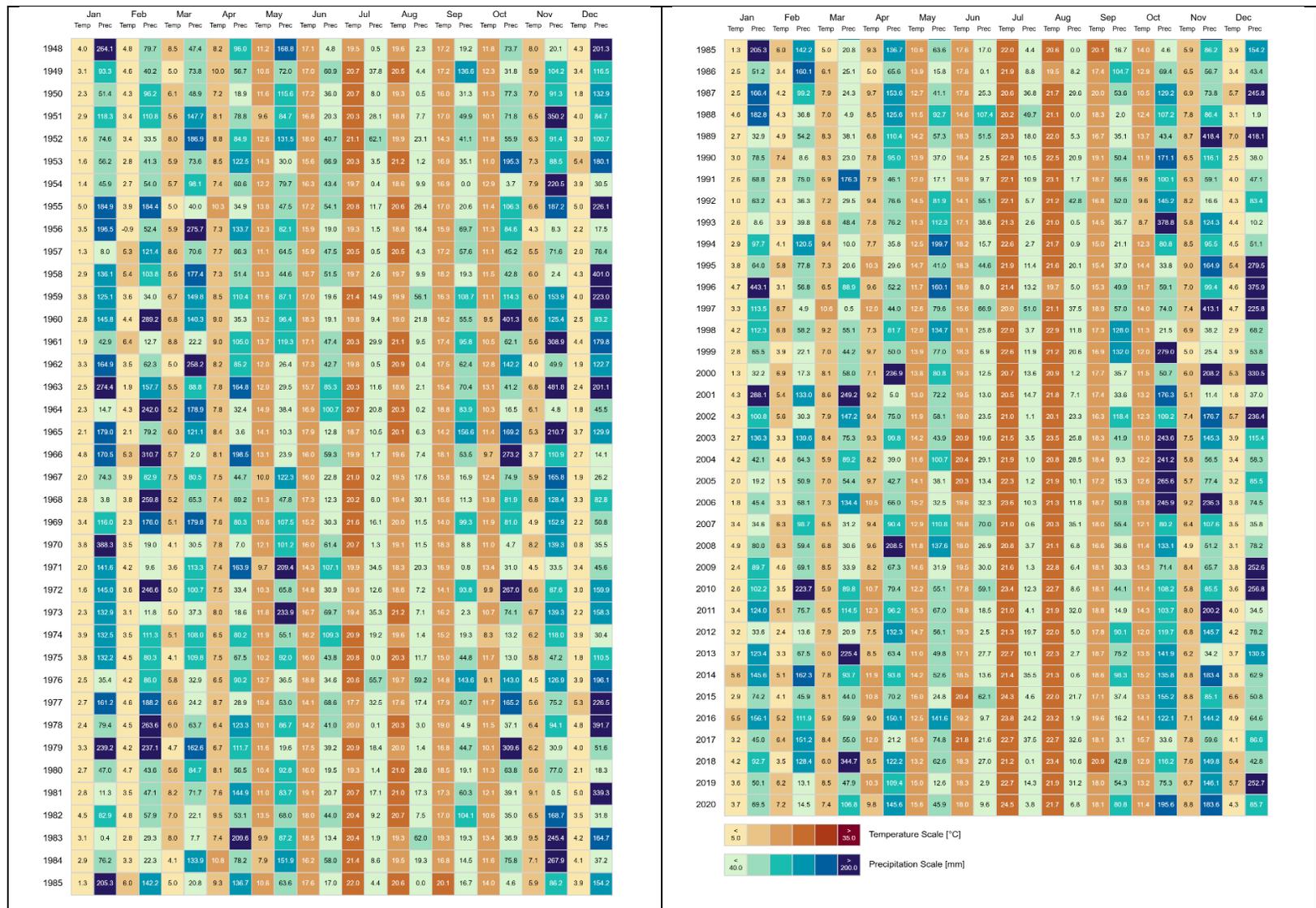


FIGURA A4. Serie de datos del GHCN-GPCC desde 1948 hasta 2020 en Solosancho, Castilla y León

En la FIGURA A5 se analizan también las temperaturas y precipitaciones representadas en diagramas de cajas y bigotes, los cuales muestran de manera muy precisa las variaciones y situaciones puntuales que se han observado en la secuencia de datos escogida.

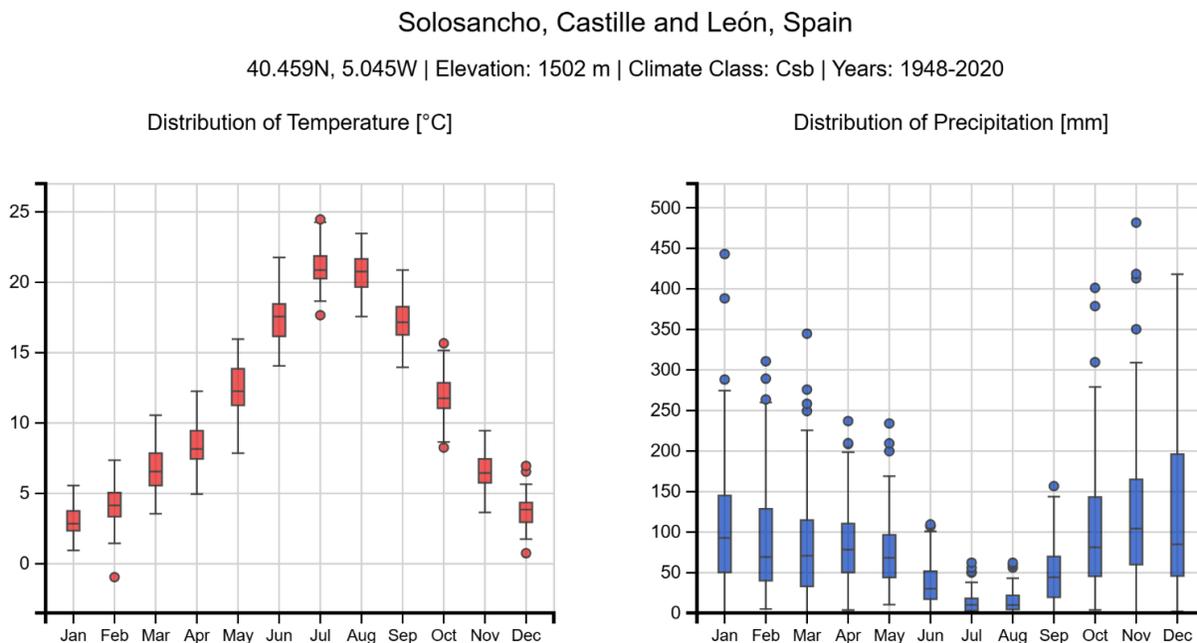


FIGURA A5. Temperaturas y precipitaciones medias, con variaciones y valores atípicos

El análisis estadístico mediante diagramas de cajas y bigotes revela la existencia de valores atípicos de precipitación intensa, especialmente durante los meses de invierno y otoño. Estas situaciones meteorológicas extremas favorecen el rebrote primaveral de la parte aérea de *P. rivasmartinezii*, contribuyendo al vigor vegetativo de la especie. Asimismo, se observan variaciones significativas en los cuartiles Q1 y Q3 durante los meses de finales de otoño e inicios del invierno, indicando una elevada variabilidad interanual en el régimen pluviométrico durante estos períodos críticos.

En cuanto a los elementos climáticos secundarios, los vientos no constituyen un factor limitante significativo, dado que su intensidad es moderadamente reducida y su frecuencia limitada. Esta situación parece deberse a la posición topográfica del rodal en una depresión natural la cual proporciona cierta protección. La insolación disponible resulta suficiente para optimizar la eficiencia fotosintética de la especie sin generar estrés térmico en los diferentes órganos vegetales. En realidad, las condiciones de solana del emplazamiento escogido resultan particularmente favorables.

2. Condicionantes edafológicos

Según los datos proporcionados por el Atlas Agroclimático de Castilla y León, el suelo del área de intervención corresponde a un leptosol úmbrico. En el marco de la Taxonomía de Suelos del USDA (Soil Taxonomy), esta tipología edáfica se clasifica como un suelo somero y pedregoso, con un horizonte úmbrico en la superficie

Los leptosoles constituyen suelos de escasa profundidad efectiva, frecuentemente con afloramientos rocosos en superficie. La presencia del horizonte úmbrico indica procesos de acumulación de materia orgánica característicos de suelos ácidos sometidos a condiciones de elevada humedad. Estos son típicos de climas atlánticos como los que caracterizan las formaciones montañosas de La Serrota y Gredos. El horizonte úmbrico se distingue por presentar una estructura bien desarrollada, coloración oscura y profundidad significativa del horizonte Ah.

Para la caracterización edáfica detallada se utilizaron los datos procedentes de calicatas realizadas por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) en la zona de estudio. Se seleccionaron los resultados de la calicata más próxima al rodal objeto de intervención, situada igualmente en orientación sur a una altitud de 1690 m.s.n.m., con respecto a los 1700 m.s.n.m. donde se inicia el área de estudio. Esta calicata presenta características topográficas y edáficas similares al rodal del plan de conservación, incluyendo su ubicación en una depresión natural, la presencia de cobertura de piornal, así como la misma clasificación edáfica de leptosol úmbrico.

Los resultados de los análisis de la calicata se observan en la TABLA A5:

TABLA A5. Resumen de las características edáficas

Parámetro	Cantidad	Valoración
Textura	Arena 67,75 %	Franco arenoso
	Limo 12,50 %	
	Arcilla 19,75 %	
Densidad aparente	1330 kg/m ³	Valor normal
pH	5,54	Muy ácido
Conductividad eléctrica	0,13 mmhos/cm	No salino
Materia Orgánica	9,11 %	Muy alta
Carbonatos	0,1 %	Normal
Caliza activa	Aprox. 0 %	Muy bajo
Nitrógeno	0,11 %	Ligeramente Bajo
Fósforo	24,90 ppm	Alto
Potasio	148,2 ppm	Ligeramente Bajo

El contenido en materia orgánica alcanza el 9,11%, valor considerado como muy alto y directamente atribuible a la presencia del horizonte úmbrico característico de estos suelos. El contenido en carbonatos es de 0,1%, clasificado como normal. Paralelamente, la caliza activa presenta valores próximos a cero, característica que, junto a la ausencia de salinidad, facilita el desarrollo óptimo de la especie objetivo.

La clasificación textural corresponde a franco arenosa, confirmada mediante el diagrama triangular del USDA en la FIGURA A6, proporciona características de drenaje y aireación adecuadas para el desarrollo radicular de la especie, evitando problemas de encharcamiento durante los períodos de máxima pluviometría.

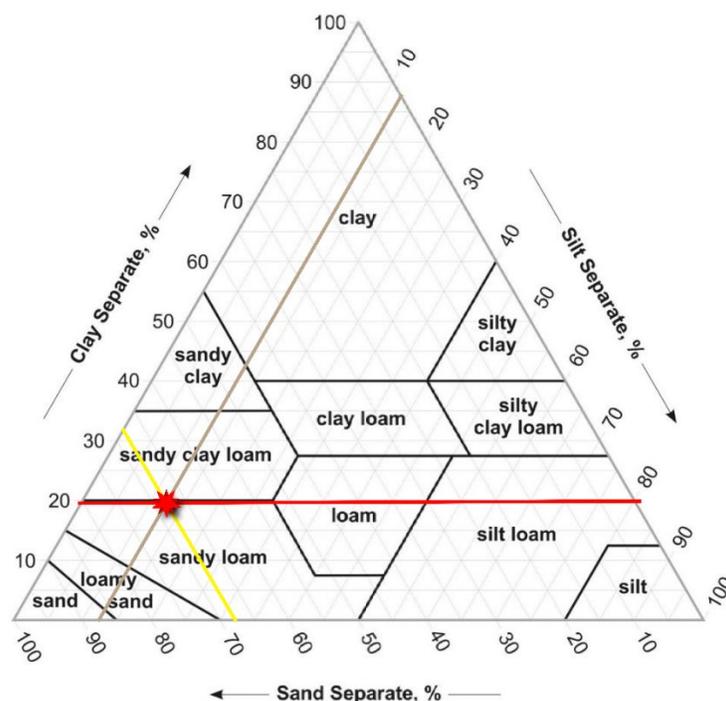


FIGURA A6. Textura del suelo según USDA.

Los leptosoles, debido a su naturaleza pedregosa y escasa profundidad efectiva, presentan limitaciones significativas para el desarrollo de grandes rizomas, dado que frecuentemente la roca madre aflora en superficie o en proximidad inmediata. Esta característica edáfica, junto con los resultados analíticos obtenidos, confirma que la mejor alternativa de uso para el rodal objeto de estudio es su destinación a la conservación de *P. rivas-martinezii*, ya que la parcela no presenta aptitud para repoblaciones de especies arborescentes. La no actuación genera un entorno de pironal.

ANEXO III: PLANIFICACIÓN DEL PLAN DE CONSERVACIÓN

La planificación temporal constituye un elemento fundamental para lograr la consecución exitosa de cualquier plan de conservación de especies amenazadas en el ámbito de la Ingeniería Forestal y del Medio Natural. En el presente documento técnico se establece la programación cronológica detallada necesaria para la materialización del plan de conservación de *P. rivas-martinezii*, determinando la secuenciación óptima de actividades y estableciendo los plazos precisos para cada fase operativa.

El propósito de esta planificación consiste en establecer una calendarización minuciosa y fundamentada de la totalidad de operaciones necesarias para la ejecución material del plan de conservación, permitiendo determinar con precisión el período temporal mínimo requerido para la correcta ejecución tanto de las obras como de las labores de establecimiento de la plantación.

La implementación efectiva de las actuaciones proyectadas podrá iniciarse únicamente tras la obtención de todas las autorizaciones administrativas pertinentes y la selección de las empresas contratistas responsables de su ejecución. Así mismo, resulta imperativo que estos procedimientos administrativos previos se resuelvan con la mayor diligencia posible, evitando demoras innecesarias que pudieran comprometer el calendario general de ejecución establecido en este documento técnico.

La secuenciación temporal de las actividades responde a criterios técnicos específicos. Estos criterios optimizan tanto la eficacia de las intervenciones como la supervivencia de la especie objetivo. Las operaciones de preparación del terreno mediante descepado y quema prescrita se programan durante el período invernal, aprovechando las condiciones meteorológicas favorables para la ejecución de quemas controladas y minimizando el riesgo de incendios forestales accidentales. La fase de plantación se establece coincidiendo con el período de máxima receptividad edáfica y según los periodos de germinación, mientras que las actividades de polinización asistida se sincronizan con el ciclo fenológico natural de la especie.

El programa de seguimiento se estructura en función de los requerimientos específicos de monitorización de cada fase del desarrollo de la plantación, estableciendo intervalos de observación que permitan la detección temprana de factores limitantes y la implementación de medidas

correctivas oportunas. La duración total del plan abarca un período de cinco años, considerando tanto las fases de establecimiento inicial como el período de consolidación necesario para garantizar la viabilidad poblacional a largo plazo. Las actividades programadas durante el programa de seguimiento se han estructurado considerando las interdependencias operativas, los condicionantes meteorológicos estacionales y los requerimientos técnicos específicos de cada intervención.

La flexibilidad del calendario permite adaptaciones en función de variables climáticas imprevistas, manteniendo la integridad temporal del conjunto de actuaciones programadas, las cuales se pueden observar de forma detallada en la TABLA A6.

TABLA A6. Tiempos a cumplir en el plan de conservación

Operación	Inicio	Días	Fin
Obtención de permisos	01/12/2025	37	07/01/2026
Desbroce de faja perimetral	07/01/2026	5	12/01/2026
Descepar piornal	12/01/2026	20	01/02/2026
Quema prescrita	01/02/2026	15	15/02/2026
Vallado de la finca	15/02/2026	15	01/03/2026
Plantación de la finca	01/03/2026	7	07/03/2026
Instalación hoteles insectos	07/03/2026	3	10/03/2026
Seguimiento de la plantación	10/03/2026	31	10/04/2026
Desbroce de faja perimetral	10/04/2026	5	15/04/2026
Seguimiento de la plantación	15/04/2026	77	01/07/2026
Desbroce de faja perimetral	01/07/2026	5	05/07/2026
Instalación colmenas de abejas	05/07/2026	7	12/07/2026
Seguimiento de la plantación	12/07/2026	60	10/09/2026
Recogida de semillas	10/09/2026	15	25/09/2026
Retirada de colmenas	25/09/2026	7	02/10/2026
Desbroce de faja perimetral	02/10/2026	5	07/10/2026
Seguimiento del rodal (5 años)	07/10/2026	5 años	5 años

Complementariamente, en la FIGURA A7 se presentan las actividades en un gráfico Gantt, el cual permite visualizar de forma sencilla la distribución de las labores a lo largo del tiempo.

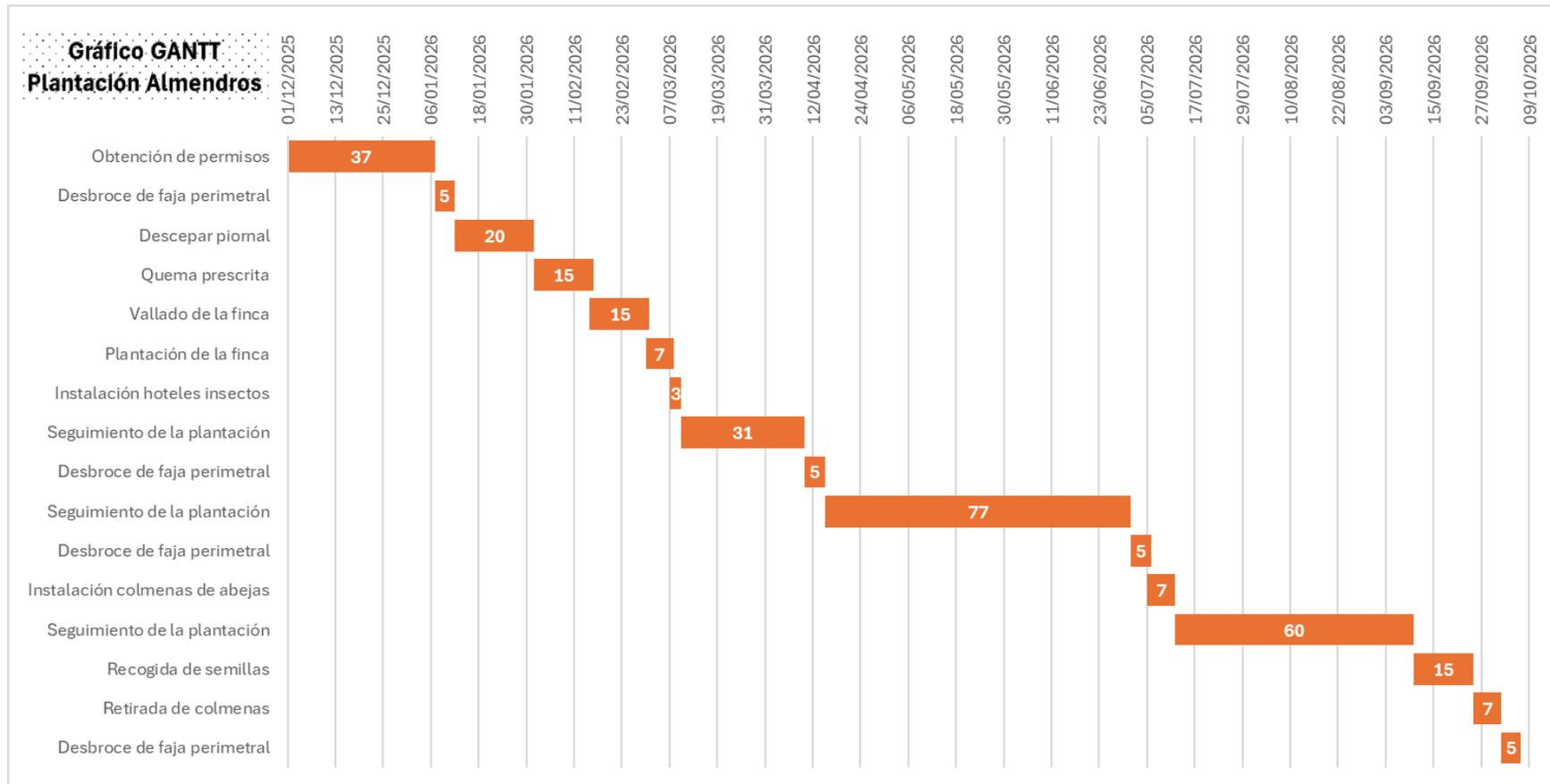


FIGURA A7. Gráfico Gantt para representar la planificación temporal del plan de conservación

ANEXO IV: MAQUINARIA Y EQUIPOS DEL PLAN DE CONSERVACIÓN

La implementación de *P. rivas-martinezii* requiere una planificación detallada de los recursos materiales necesarios, con especial atención a la maquinaria requerida en las distintas fases de su ciclo. Determinadas operaciones, particularmente aquellas asociadas a la fase de implantación de la especie demandan equipos específicos con elevados requerimientos de potencia, cuya adquisición no resulta económicamente justificable dada su utilización puntual.

Para estos casos, la estrategia óptima consiste en recurrir al alquiler de maquinaria especializada, reservando la inversión en equipos propios para aquellos de uso recurrente durante la vida útil de la plantación. A continuación, se presenta la maquinaria y equipos requeridos:

Tractor forestal: Se requiere un tractor con una potencia nominal de al menos 140 CV (equivalente a 104,40 kW), específicamente para ejecutar las labores de preparación del terreno previas a la plantación. Este equipo proporciona la capacidad de tracción necesaria para implementar operaciones de gran demanda energética como el desbroce de las fajas que previenen el descontrol de la quema prescrita y conversión de esta en un incendio forestal.

Desbrozadora de cadenas: Se ha planificado el alquiler de un equipo polivalente que cumple la función de triturar completamente el piornal presente en los cinco metros más cercanos al perímetro del rodal. Esta operación resulta fundamental para establecer una faja de protección que previene la propagación descontrolada del fuego durante la quema prescrita. El implemento, que se acopla al sistema hidráulico tripuntal del tractor, está equipado con un rotor horizontal configurable con martillos o cadenas según la naturaleza del material a procesar. La versatilidad operativa de este equipo permite optimizar el período de alquiler. La configuración con cadenas resulta más eficiente para el objetivo planteado, dado que permite dejar la zona con la cantidad óptima de restos vegetales y garantiza el alcance efectivo en todo tipo de superficie. Este equipo será requerido adicionalmente en períodos posteriores para asegurar el mantenimiento periódico de la faja desbrozada.

Miniexcavadora con garra: Este implemento especializado, que se acopla a la toma de fuerza del tractor, está diseñado para realizar el despejado del piornal, el cual habrá de ser extraído del suelo para asegurar que no rebrotará, debido a que en caso de que rebrote, establecerá una competencia

sobre el endemismo, además de que acabará dominándolo, viéndose la especie a implantar desplazada del rodal. En el caso de que suceda, habrá mejores poblaciones de la misma en el exterior de la finca que en el interior, como nos parece indicar la experiencia previa de “La Covacha”

Camión de transporte: Se requerirá del uso de un camión de transporte para extraer los restos de la quema del rodal. Este camión deberá de tener un ancho menor de 4 metros para poder acceder por el camino. Además, deberá de ser de un solo eje, pues requerimos de realizar maniobras en espacios medianamente reducidos, asegurando así que el camión tenga acceso a la finca pisando el camino central que se mantendrá sin vegetar, tan solo habrá de pisar el resto del rodal cuando sea irremediable por el requerimiento de alguna maniobra. (Pues se precisa evitar en la medida de lo posible que el camión cargado pise mucho las cenizas).

Tractor con pala: Se requiere un tractor con una potencia nominal de al menos 85 CV (equivalente a 62,52 kW), específicamente para ejecutar las labores de extracción de los restos de la quema del terreno previo a la plantación. Es preferible un tractor con una potencia muy limitada, pues se quiere evitar que tractores muy potentes, y con excesivo peso, puedan dejar una gran suela de labor en el terreno. Por ello, se opta por maquinaria mucho menos pesada, de entorno a las 3,5-4 toneladas, adecuada para labores ligeras como esta, Se apoyará en varios trabajadores, los cuales, a mano, irán ayudando al operario de cabina a tomar con el cazo de la pala los restos de los piornos muertos.

Dron agrícola con dispersión media-alta: Se requerirá del uso de un dron para diseminar las semillas, dotado de un sistema de esparcido centrífugo y control electrónico de dosis. El modelo ideal debe contar con una tolva de al menos 15 a 25 litros, lo que permite operar con semillas de distintos calibres sin necesidad de recarga constante. Asimismo, es conveniente que el dron tenga una capacidad de carga útil de entre 15 y 25 kilogramos, lo que reduce los ciclos de vuelo y mejora la productividad diaria. El dron debe estar equipado con un sistema de navegación GPS de alta precisión (RTK o PPK), para garantizar una distribución homogénea y evitar solapes o zonas sin sembrar. Además, debe incluir una interfaz de planificación de vuelos que permita definir con precisión las parcelas, la densidad de siembra y los patrones de vuelo. Es deseable que el equipo disponga de sensores de altura (LiDAR o radar) que ajusten automáticamente la altitud de vuelo, manteniendo una distancia constante respecto al terreno, incluso en superficies irregulares.

En cuanto a la autonomía, se recomienda un sistema de baterías intercambiables con una duración mínima de 10 a 15 minutos por vuelo con carga completa, lo que permitiría cubrir de 1 a 2 hectáreas por batería, dependiendo de la densidad de siembra y las condiciones climáticas. El sistema de control debe permitir un manejo sencillo y seguro, preferiblemente mediante una estación terrestre con pantalla táctil o mediante aplicación móvil con funciones de seguridad, como regreso automático al punto de origen en caso de batería baja o pérdida de señal.

Ejemplos de modelos que cumplen con estas características: El DJI Agras T10 o T20P, el XAG V40 con módulo de dispersión, o drones profesionales personalizados por fabricantes como Hylío o Terra Drone.

Barrena manual o motorizada: Se requiere para realizar los agujeros de los postes en el vallado. En terrenos duros o rocosos, se puede utilizar un martillo rompedor portátil

Carretilla o cuatrimoto con remolque: Se precisa en el levantamiento del vallado para transportar materiales (postes, malla, herramientas) en terrenos con pendiente, como es el caso del rodal.

Hormigonera: Este equipo será necesario para poder plantar los postes, pues es preciso que estos postes estén hormigonados para evitar que los animales o un día de fuertes tormentas y viento pueda resultar en la caída del vallado, lo que generaría un grave problema de herbivoría.

ANEXO V: NORMAS PARA LA EJECUCIÓN DEL PLAN DE CONSERVACIÓN

1. Equipamiento mecánico y tecnológico

La operación de los equipos mecánicos queda exclusivamente reservada a personal técnico especializado que acredite la cualificación pertinente mediante certificación oficial, garantizando así el manejo seguro y eficiente de la maquinaria durante todas las fases de ejecución. Todos los componentes mecánicos deberán someterse a programas de mantenimiento preventivo conforme a las especificaciones técnicas del fabricante, prestando especial atención a intervalos de servicio y utilización de lubricantes y repuestos homologados. El incumplimiento resultará en la exclusión inmediata del equipamiento, correspondiendo a la empresa propietaria sufragar los costes derivados.

El personal operario deberá observar estrictamente los protocolos de seguridad establecidos, utilizando elementos de protección individual homologados y respetando las especificaciones técnicas del fabricante.

La dirección técnica queda facultada para implementar modificaciones metodológicas técnicamente justificadas, siempre que no supongan alteración sustancial de los objetivos orientados a prevenir la extinción de *P. rivas-martinezii*.

2. Gestión de recursos humanos

La contratación de personal se ajustará estrictamente a la normativa laboral vigente en el sector forestal. La dotación de mano de obra especializada deberá corresponder con las especificaciones establecidas en el protocolo de monitorización, adaptándose a las necesidades operativas específicas según la naturaleza técnica de las tareas y requerimientos de cualificación profesional.

La duración de la jornada laboral presentará flexibilidad operativa según condiciones meteorológicas. Se implementará un sistema riguroso de control horario y registro de operaciones técnicas, garantizando la trazabilidad completa de actividades desarrolladas.

La supervisión técnica será desempeñada por un profesional seleccionado mediante evaluación de capacitaciones, análisis curricular y verificación de conocimientos especializados en conservación de flora amenazada. Su responsabilidad consistirá en coordinar y supervisar la correcta ejecución de labores forestales, garantizando la comprensión de instrucciones técnicas por parte del personal subordinado. El incumplimiento implicará responsabilidad económica y civil respecto a contratiempos operativos o accidentes laborales derivados de supervisión deficiente.

El capataz contratado será encargado del seguimiento permanente del estado fitosanitario de la plantación, evaluación de calidad de labores ejecutadas y control del mantenimiento de la faja cortafuegos perimetral.

3. Protocolos de seguridad y protección laboral

La evaluación de riesgos específicos asociados a la utilización de cada equipo mecánico requiere la implementación de medidas preventivas descritas pormenorizadamente en los manuales técnicos operativos proporcionados por los fabricantes. Todo el personal desarrollará sus actividades laborales utilizando indumentaria técnica adecuada a las condiciones específicas de cada tarea, incluyendo calzado de seguridad apropiado para cada tipo de operación forestal.

Se mantendrá permanentemente operativo un botiquín de primeros auxilios equipado con elementos sanitarios básicos para atención de emergencias en el vehículo de transporte de trabajadores, sometido a revisión y reposición trimestral.

4. Normativa de las condiciones operativas del dron y la plantación

La ejecución de las operaciones de plantación queda condicionada al cumplimiento de parámetros meteorológicos específicos que garanticen la viabilidad del proceso. Las condiciones de viento deben mantenerse por debajo de 10 km/h para evitar la deriva del material seminal durante la dispersión aérea, mientras que la programación temporal debe coincidir con períodos de precipitaciones previstas que aseguren la disponibilidad hídrica sostenida en el sustrato.

La selección de condiciones térmicas moderadas resulta fundamental para evitar el estrés térmico del material seminal, descartando específicamente la ejecución durante eventos de calor extremo o en proximidad temporal a heladas previstas. El régimen pluviométrico medio de marzo

en la zona de estudio proporciona las condiciones hídricas mínimas necesarias para el establecimiento exitoso.

La maximización de la disponibilidad lumínica constituye un requerimiento crítico para el éxito del establecimiento, condición que se deberá de satisfacer plenamente mediante la eliminación previa de la cobertura arbustiva a través de la quema prescrita. La ausencia de competencia por radiación fotosintéticamente activa representa una ventaja competitiva fundamental para las plántulas durante las fases críticas de desarrollo inicial.

5. Prevención de incendios en operaciones forestales

Todo personal operativo de maquinaria en entornos forestales deberá acreditar formación específica en prevención de incendios forestales, manejo básico de extintores y reconocimiento de riesgos asociados al uso de equipos mecánicos en ecosistemas boscosos. Esta capacitación debe certificar conocimiento práctico suficiente sobre prevención de situaciones de riesgo derivadas del manejo de equipamiento mecánico en contacto directo con vegetación.

La ejecución de labores con maquinaria en zona forestal requiere comunicación previa ante los servicios competentes en materia de protección civil o forestal, elaboración de estudio previo de riesgo de incendio específico del área de actuación, y desarrollo de Plan de Trabajo que incluya medidas de autoprotección y coordinación con organismos locales de defensa contra incendios.

La maquinaria utilizada en zonas arboladas deberá encontrarse en perfecto estado de mantenimiento, verificando regularmente el estado del sistema de escape para asegurar ausencia de fugas, comprobando posibles pérdidas de aceite, combustible o líquidos inflamables, y revisando el correcto funcionamiento del sistema eléctrico para evitar cables deteriorados o conexiones defectuosas que generen puntos de ignición.

Cada unidad móvil deberá equiparse con extintor portátil de polvo ABC de 6 kilogramos de capacidad, además de herramientas manuales básicas como pala, rastrillo o cubo para sofocar focos iniciales. Las máquinas pesadas requerirán sistemas de detección térmica o cámaras termográficas para detectar sobrecalentamientos. Los escapes contarán siempre con protección anti-chispas, especialmente en zonas de alta carga de biomasa seca.

Queda prohibida la utilización de maquinaria con tubo de escape descubierto o sin protección adecuada, así como unidades que presenten fallos reiterados en sistemas de refrigeración o sobrecalentamiento constante. Se prohíbe igualmente el uso de herramientas de corte o soldadura sin autorización expresa y sin adopción de medidas adicionales de seguridad.

Paralelamente, antes de iniciar cada jornada laboral se ejecutará inspección visual y funcional de la maquinaria, asegurando ausencia de restos vegetales adheridos al motor o sistema de escape, y verificando niveles de combustible y lubricantes. El repostaje se realizará exclusivamente en zonas despejadas, lejos de elementos combustibles, con motor apagado, utilizando recipientes homologados y evitando derrames accidentales.

Durante la ejecución de trabajos se establecerán paradas técnicas cada dos horas de funcionamiento continuado para inspeccionar posibles puntos calientes en la maquinaria. Los trabajos quedarán suspendidos bajo condiciones climáticas adversas que incrementen el riesgo de ignición, incluyendo vientos superiores a 40 km/h, temperaturas elevadas combinadas con baja humedad relativa (superior a 35°C y humedad inferior al 30%), niveles altos o extremos de peligro de incendio según mapas oficiales de alerta, o presencia de zonas próximas con gran acumulación de biomasa seca.

En caso de detectar principio de incendio, el operario detendrá inmediatamente la maquinaria y actuará para extinguirlo mediante extintor disponible, informando simultáneamente al coordinador del proyecto y, si fuera necesario, alertando a servicios de emergencias. Así mismo, durante época de mayor riesgo de incendio se evitará el desarrollo de actividades entre las doce del mediodía y las seis de la tarde, priorizando el inicio temprano de jornadas laborales o trabajo en horas más frescas para mejorar las condiciones generales de seguridad.

Se mantendrá registro diario de actividades en libro de incidencias, anotando fecha y hora de inicio y finalización de trabajos, condiciones climáticas reinantes, y cualquier incidente, fallo mecánico o situación de riesgo detectada. Este documento constituirá herramienta de control interno y evidencia para auditorías o inspecciones.

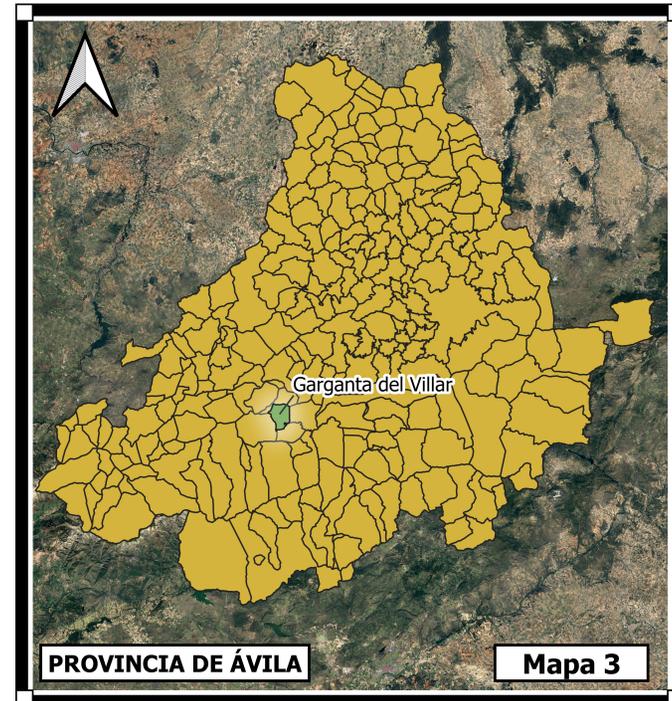
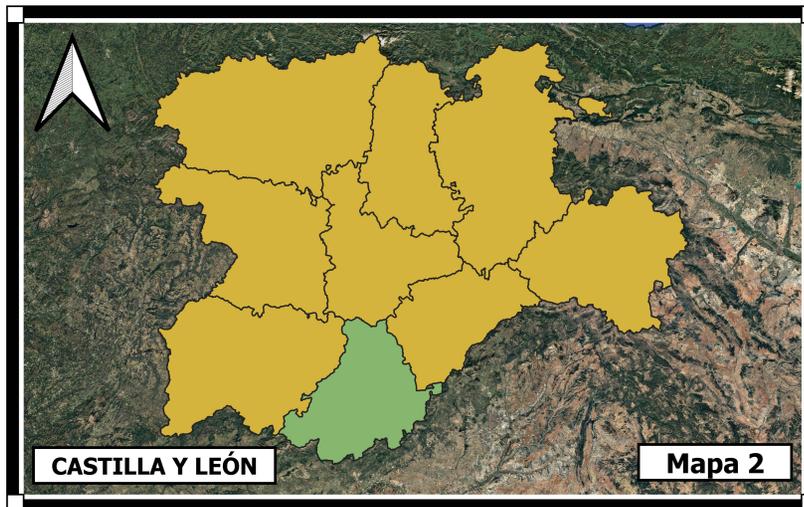
Las responsabilidades derivadas de daños causados por incendios forestales serán imputables a la empresa responsable del trabajo, quedando sujetas a sanciones administrativas correspondientes según legislación autonómica o nacional vigente en materia de medio ambiente y protección civil.

ANEXO VI: PRESUPUESTO DEL PLAN DE CONSERVACIÓN

Capítulo	Importe (€)
1 PREPARACIÓN DEL TERRENO Y QUEMA	10.674,76
2 PLANTACIÓN DEL RODAL	5.280,39
3 POLINIZACIÓN DEL RODAL	1.347,04
4 VALLADO DEL RODAL	22.488,65
5 SEGUIMIENTO DEL PLAN DE CONSERVACIÓN (5 AÑOS)	37.639,03
<hr/>	
Presupuesto de ejecución material (PEM)	77.429,87
13% de gastos generales	10.065,88
6% de beneficio industrial	4.645,79
Presupuesto de ejecución por contrata (PEC = PEM + GG + BI)	92.141,54
21% IVA	19.349,72
Presupuesto de ejecución por contrata con IVA (PEC = PEM + GG + BI + IVA)	111.491,26
<hr/>	
Honorarios	
<hr/>	
Proyecto	2% s/ PEM
	1.548,59
21% IVA	325,20
TOTAL HONORARIOS PROYECTO	1.873,79
<hr/>	
Dirección de obra	2% s/ PEM
	1.548,59
21% IVA	325,20
TOTAL HONORARIOS PROYECTO	1.873,79
<hr/>	
TOTAL PRESUPUESTO GENERAL	115.238,84

Asciende el presupuesto de ejecución por contrata con IVA a la expresada cantidad de CIENTO QUINTE MIL DOSCIENTOS TREINTA Y OCHO EUROS CON OCHENTA Y CUATRO CÉNTIMOS

ANEXO VII: PLANOS DEL PLAN DE CONSERVACIÓN



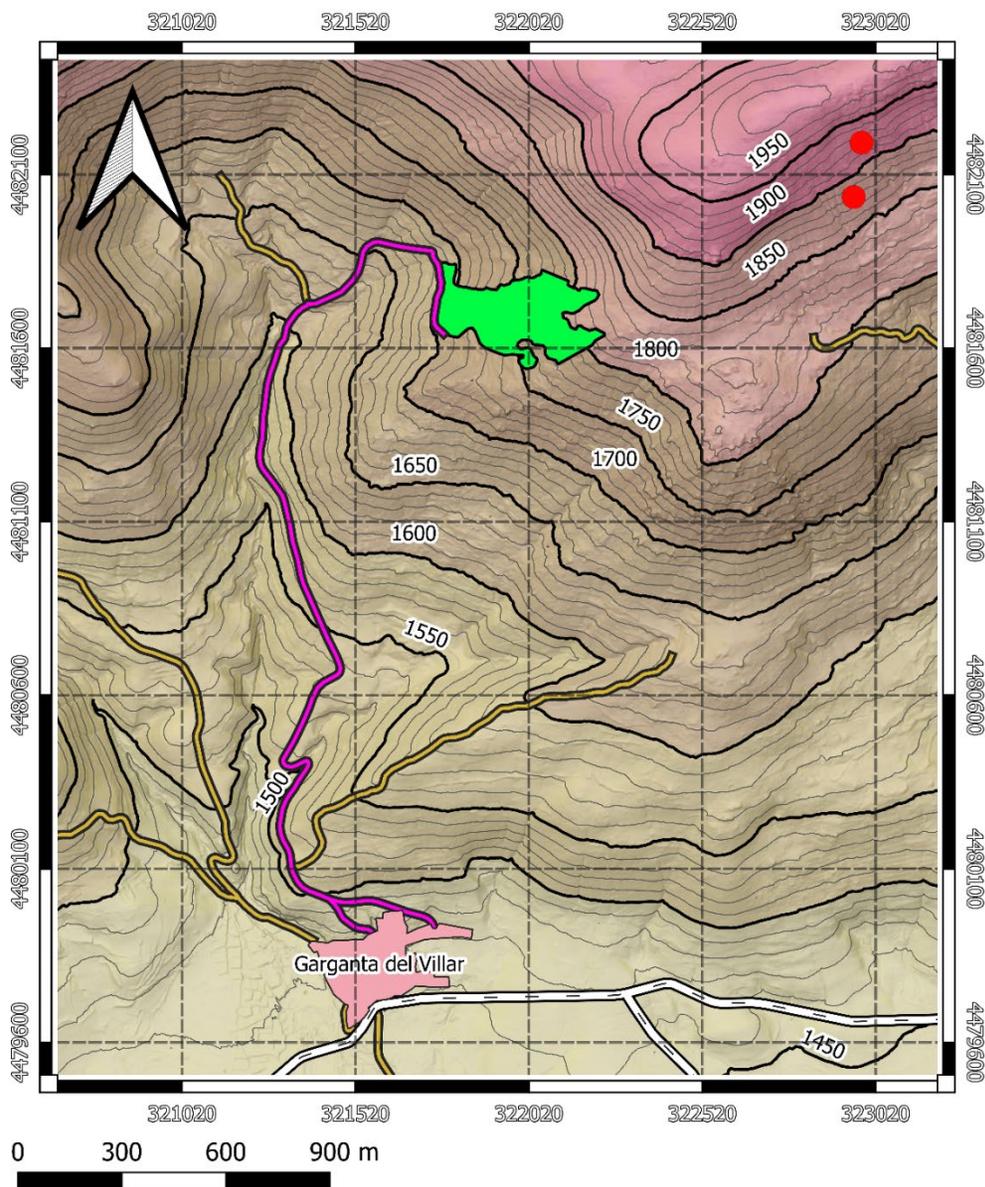
0 200 400 600 km 0 50 100 150 km 0 10 20 30 km

Mapa 1

Mapa 2

Mapa 3

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS (PALENCIA)		
Título del proyecto: Caracterización fitoquímica para la valorización y conservación de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> : un endemismo abulense en peligro de extinción	Escala: 1: 1/11400000 2: 1/4500000 3: 1/1200000	Nº del plano: 1
Promotor: Institución Gran Duque de Alba	Alumno: Mario Cano Pérez	
Título del plano: Situación del plan de conservación	Lugar y fecha: Garganta del Villar 01/06/2025	
Titulación: Ingeniería Forestal y Del Medio Natural	Firma: 	

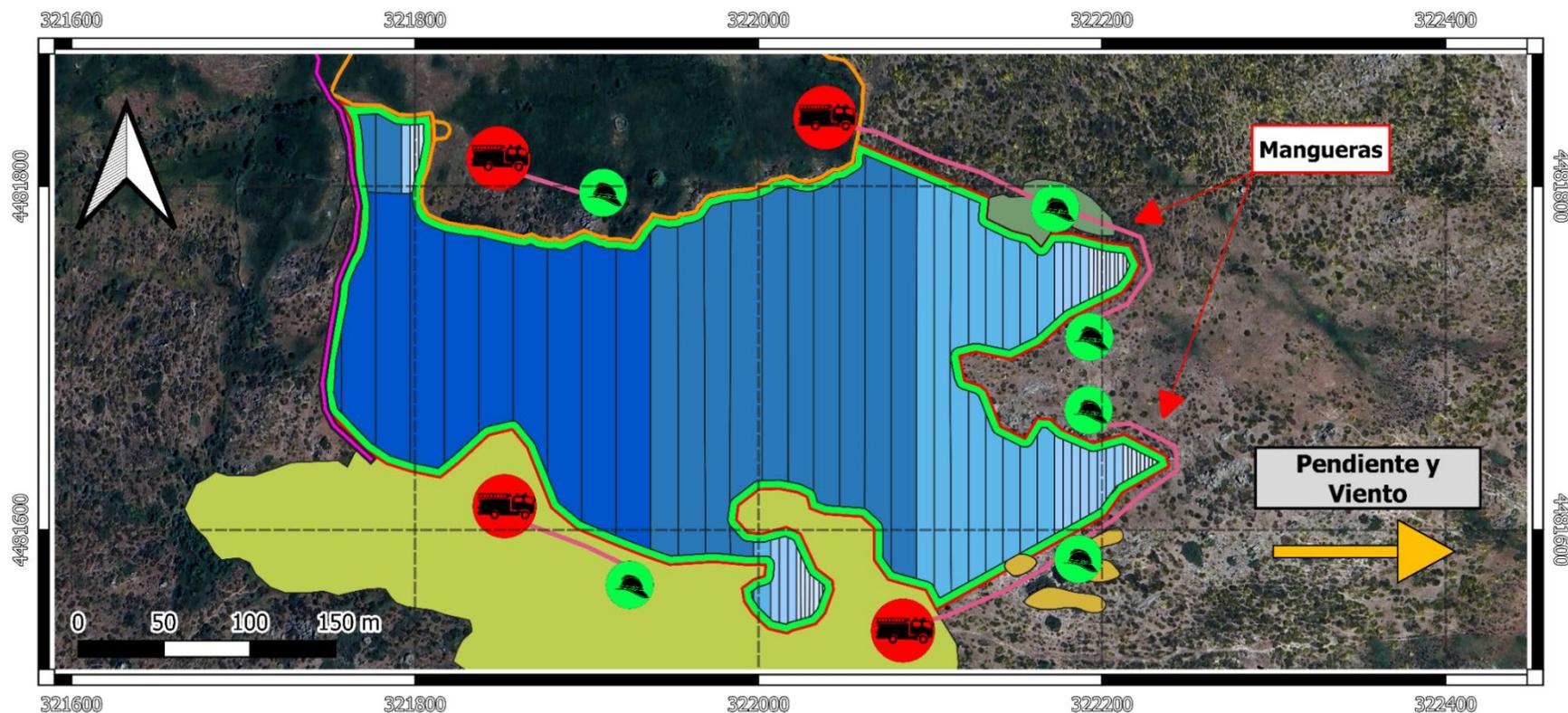


Leyenda

<p>Zonas de interés</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Poblaciones <i>P. rivas martinezii</i> Garganta del Villar Rodal elegido 	<p>Accesos</p> <ul style="list-style-type: none"> Carreteras Camino parcela Caminos
---	--

Característica	Valor
Longitud del camino	3,25 km
Estado del camino	Aceptable
Ancho del camino	4 m
Pendiente media del Rodal	30,97 %
Área del Rodal	8,3 ha

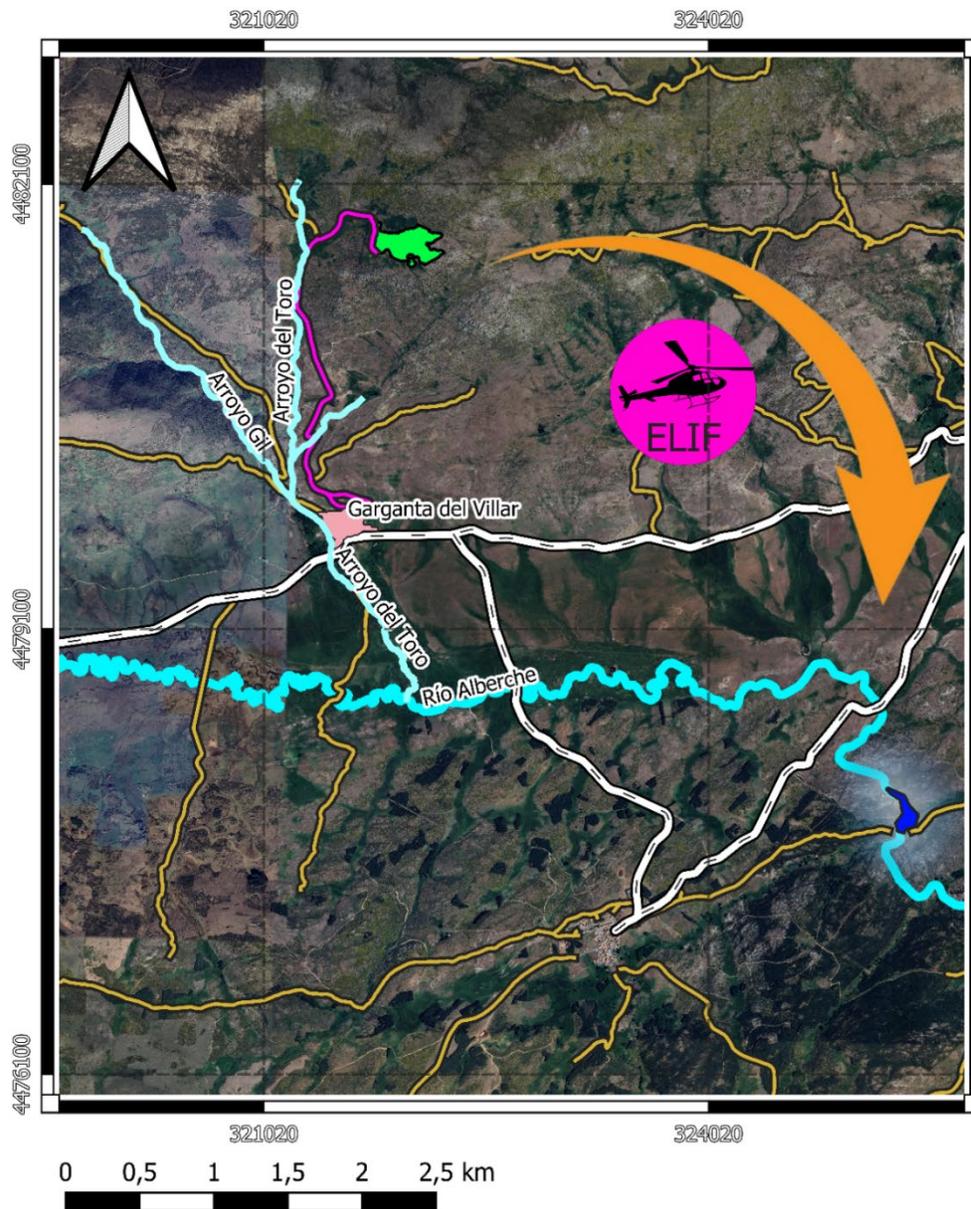
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS (PALENCIA)		
Título del proyecto:	Escala:	Nº del plano:
Caracterización fitoquímica para la valoración y conservación de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> : un endemismo abulense en peligro de extinción	1/17000	2
Promotor:	Alumno	
Institución Gran Duque de Alba	Mario Cano Pérez	
Título del plano:	Lugar y fecha:	
Localización del rodal	Garganta del Villar 01/06/2025	
Titulación:	Firma	
Ingeniería Forestal y Del Medio Natural		



Leyenda

Distintas zonas	Fajas de la quema	Posiciones del operativo
Parcela	Ancho de las fajas	Roquedos
Faja perimetral	1-3 m	Claro
Camino parcela	5 m	Camiones
Murete	10 m	Bomberos
Prado	15 m	
	20 m	

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS (PALENCIA)		
Título del proyecto:	Escala:	Nº del plano:
Caracterización fitoquímica para la valorización y conservación de <i>Pseudomisopates rivis-martinezii</i> : un endemismo abulense en peligro de extinción	1/3000	3
Promotor:	Alumno	
Institución Gran Duque de Alba	Mario Cano Pérez	
Título del plano:	Lugar y fecha:	
Ejecución de la quema prescrita	Garganta del Villar 15/02/2026	
Titulación:	Firma	
Ingeniería Forestal y Del Medio Natural		



Leyenda

Zonas de interés

- Garganta del Villar
- Rodal elegido

Accesos

- Carreteras
- Camino parcela
- Caminos

Puntos de agua para la ELIF

- Arroyos
- Río Alberche
- Presa

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS (PALENCIA)		
Título del proyecto:	Escala:	Nº del plano:
Caracterización fitoquímica para la valorización y conservación de <i>Pseudomisopates rivas-martinezii</i> : un endemismo abulense en peligro de extinción	1/40000	4
Promotor:	Alumno	
Institución Gran Duque de Alba	Mario Cano Pérez	
Título del plano:	Lugar y fecha:	
Puntos de agua	Garganta del Villar 15/02/2026	
Titulación:	Firma	
Ingeniería Forestal y Del Medio Natural		