

# Recuperación de las interacciones entre el haya (*Fagus sylvatica*) y los hongos ectomicorrícicos 140 años después del fin de la actividad minera

Asun Rodríguez-Uña<sup>1,2,\*</sup>, June Hidalgo-Castañeda<sup>3</sup>, Isabel Salcedo<sup>2</sup>, David Moreno-Mateos<sup>1,4</sup>

(1) Basque Centre for Climate Change - BC3. Edif. Sede 1, 1º. Parque Científico UPV/EHU. 48640 Leioa, Spain.

(2) Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain.

(3) NEIKER-Tecnalia, Departamento de Conservación de Recursos naturales, c/ Berreaga 1, E-48160 Derio, Spain.

(4) IKERBASQUE Basque Foundation for Science. María Díaz de Haro 3, 6º. 48013 Bilbao, Spain.

\* Autor de correspondencia: A. Rodríguez-Uña [[asun.rodriguez@bc3research.org](mailto:asun.rodriguez@bc3research.org)]

> Recibido el 18 de junio de 2019 - Aceptado el 09 de julio de 2019

Rodríguez-Uña, A., Hidalgo-Castañeda, J., Salcedo, I., Moreno-Mateos, D. 2019. Recuperación de las interacciones entre el haya (*Fagus sylvatica*) y los hongos ectomicorrícicos 140 años después del fin de la actividad minera. *Ecosistemas* 28(2): 61-68. Doi.: 10.7818/ECOS.1790

A pesar del rápido crecimiento del uso de la restauración, esta no siempre genera una respuesta a corto plazo en los ecosistemas que garantice la recuperación de su estructura, funciones y servicios. Hasta ahora, la mayoría de los estudios que han evaluado la recuperación de ecosistemas utilizaban métricas que ignoran la complejidad necesaria para estructurar las comunidades de organismos que conforman los ecosistemas. Este estudio analiza la recuperación de las interacciones entre especies (métrica con un creciente nivel de complejidad) en una escala temporal amplia (>100 años). Para ello, mediante identificación molecular se caracterizaron las comunidades de hongos ectomicorrícicos (EcM) presentes en 18 hayas del interior y siete del exterior de una antigua mina de hierro en Navarra (norte de España), operativa desde el siglo XIV hasta hace 140 años, así como de siete hayas de un bosque primigenio cercano. La riqueza de especies de hongos EcM obtenida fue similar en las tres ubicaciones, mientras que existen diferencias en la composición de especies en la zona afectada por la minería con respecto al exterior de la mina y al hayedo de referencia. Estos resultados sugieren la necesidad de evaluar la recuperación de los ecosistemas mediante métricas más complejas (p.e. arquitectura de las redes de interacción) para poder estimar con mayor certeza el tiempo realmente requerido para alcanzar dicha recuperación.

**Palabras clave:** degradación; identificación molecular; mutualismo; restauración

Rodríguez-Uña, A., Hidalgo-Castañeda, J., Salcedo, I., Moreno-Mateos, D. 2019. Interaction recovery between European beech (*Fagus sylvatica*) and ectomycorrhizal fungi 140 years after the end of mining. *Ecosistemas* 28(2): 61-68. Doi.: 10.7818/ECOS.1790

Even the increasing use of restoration, it does not always imply a short-term answer in ecosystems that guarantees the recovery of their structure, functions, and services. So far, most studies evaluating ecosystem recovery have used metrics that ignore the complexity needed to structure communities of organisms that form ecosystems. Here, we analyze the recovery of species interactions (metric with a certain level of complexity) in a large time scale (>100 years). In particular, we characterized, using molecular identification, the ectomycorrhizal (EcM) fungal communities present in 18 beech trees inside and seven outside an ancient iron in Navarra (northern Spain), in use from the XIV century until 140 years ago, as well as seven beech trees from a nearby old-growth forest. Species richness of EcM fungi was similar for the three locations, while differences were found for species composition in the area damaged by mining and compare to outside the mine and the reference beech forest. Our results suggest the need to assess ecosystem recovery with more complex metrics (e.g. architecture of interaction networks) in order to accurately estimate the real time required for ecosystems to fully recover.

**Key words:** degradation; molecular identification; mutualism; restoration

## Introducción

En la actualidad, la mayor parte de los ecosistemas del planeta se encuentran degradados, en mayor o menor medida, debido a las diferentes actividades antrópicas (Haddad et al. 2015; Jones et al. 2018b). Esta degradación reduce la capacidad de los ecosistemas para mantener su diversidad, funciones y servicios a la sociedad (Cardinale et al. 2012; Newbold et al. 2015). Una de las herramientas que puede frenar esta cre-

ciente degradación es la restauración ecológica, ya que permite recuperar la biodiversidad y las funciones y servicios ecosistémicos perdidos (Rey Benayas et al. 2009). Conscientes de su importancia, múltiples agencias internacionales y gobiernos están creando estrategias de restauración a gran escala (UN General Assembly 2015; Climate Focus 2016). De hecho, recientemente se ha declarado la década 2021–2030 como la Década de las Naciones Unidas para la Restauración (UN General Assembly 2019).

No obstante, a pesar del rápido crecimiento del uso de la restauración, ésta no siempre genera una respuesta a corto plazo en los ecosistemas que garantice la recuperación de su estructura, funciones y servicios (Moreno-Mateos et al. 2017; Jones et al. 2018a). Existen multitud de factores que pueden estar limitando la eficiencia de la restauración. Nosotros consideramos que uno de ellos es la falta de conocimiento sobre las dinámicas a largo plazo (>100 años) de los ecosistemas, en particular a nivel de ensamblaje de comunidades. Esta limitación es salvable si se estudian ecosistemas que fueron degradados en épocas históricas y que posteriormente no sufrieron una alteración importante. Otro de los aspectos fundamentales que consideramos que pueden estar causando una efectividad limitada de la restauración es el enfoque que convencionalmente se ha hecho en aspectos relativamente "simples" de los ecosistemas, es decir, atributos que implicaban la recuperación de un único proceso (incremento de la cobertura vegetal, reducción de la erosión) o elemento (biodiversidad, población de una especie amenazada). Nuestro estudio se centra en dar un paso más para entender cómo se recuperan métricas que impliquen un creciente nivel de complejidad al estar relacionadas con las interacciones entre especies en una escala temporal amplia (>100 años).

Una de las interacciones más relevantes en los ecosistemas forestales es el mutualismo entre las plantas y los hongos micorrízicos del suelo. Estos le aportan nutrientes como el nitrógeno y el fósforo a la planta y ésta carbono al hongo. A escala global, la mayoría de estos ecosistemas se encuentran dominados por especies arbóreas asociadas a hongos ectomicorrízicos (EcM) (Smith y Read 1997), siendo esta simbiosis esencial para su funcionamiento y conservación.

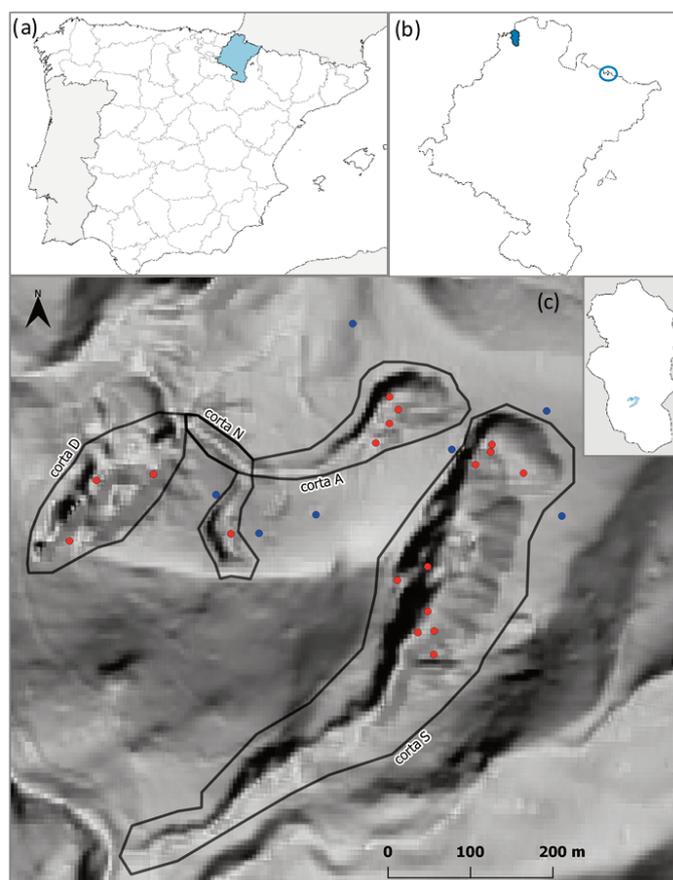
En la actualidad existen más de 6000 especies de hongos EcM descritas, pertenecientes a los filos *Basidiomycota* y *Ascomycota* (Brundrett y Tedersoo 2018), y con estrategias diferentes en su dispersión, sea por esporas sexuales como por su crecimiento vegetativo. La estructura y diversidad de las comunidades vegetales y de los hongos EcM se ve afectada por variables climáticas y factores abióticos como el pH y nutrientes del suelo, y además son interdependientes, de forma que los cambios en una de ellas se reflejan en la otra y viceversa (Hoeksema et al. 2010). Además, existe variabilidad estacional en la colonización de las raíces por los hongos EcM, que depende no sólo de los cambios abióticos sino también del estado fisiológico del árbol (Buée et al. 2005). Para el caso concreto del haya (*Fagus sylvatica* L.), especie ampliamente distribuida en Europa y el norte de España, se han encontrado efectos positivos significativos de la presencia de hongos EcM sobre el crecimiento y la supervivencia de plantas jóvenes (Duñabeitia et al. 2004; Beniwal et al. 2011). Igualmente, se ha observado un efecto positivo de estos hongos sobre la resistencia de las hayas a la sequía (Beniwal et al. 2011; Pena et al. 2013) y sobre la descomposición de la materia orgánica de hayas maduras que favorece el crecimiento de las hayas jóvenes (Trap et al. 2017).

En un trabajo preliminar realizado en un hayedo acidófilo próximo a la zona de estudio, se hallaron 70 especies de hongos EcM (Sarrionandia et al. 2009), con abundancia de especies generalistas como *Amanita rubescens* y de especies acidófilas (p. e. *Cortinarius purpurascens*). Por otro lado, en otro hayedo basófilo también cercano se concluyó que el clareo (eliminación selectiva de algunos pies de haya) tenía efectos en la estructura de las comunidades de hongos EcM detectable durante 10 años (Goicoechea et al. 2009). Si se tiene en cuenta que el clareo supone un impacto de menor magnitud que la actividad minera, nuestra hipótesis es que la recuperación de las interacciones entre los hongos EcM y los árboles en ecosistemas forestales templados puede requerir muchas décadas o incluso más de 100 años. Para comprobarlo, se han caracterizado las comunidades de hongos EcM presentes en las hayas del interior y del exterior de una antigua mina de hierro a cielo abierto en la finca de Artikutza (norte de Navarra), operativa desde el siglo XIV hasta principios del siglo XX.

## Métodos

### Zona de estudio

La zona de estudio se encuentra dentro de la finca de Artikutza (3.638 ha), ubicada en el término municipal de Goizuetza, Navarra (43°10'56.6"N 1°47'41.2"W) (Fig. 1a-c). Este lugar se encuentra en las estribaciones de los Pirineos y cercano a la línea de costa (8 km), presentando un relieve abrupto con fuertes pendientes. Artikutza es uno de los lugares más lluviosos de la península ibérica, registrando lluvias más de la mitad de los días del año hasta un total de unos 2500 mm de precipitación anual (Lozano Valencia 2006). Los suelos se han originado a partir de materiales metamórficos (granitos y leucogranitos) ubicados en el viejo macizo hercínico de las Cinco Villas, donde aparecen importantes filones metalíferos, fundamentalmente hierro (Galán et al. 2014), que han sido explotados históricamente. El clima es templado-atlántico y la formación vegetal predominante es el hayedo ombrófilo y acidófilo de la serie *Saxifraga hirsutae* - *Fageto sylvaticae* Sigmatum, adaptado a los suelos ácidos. La actividad minera ha estado profundamente ligada a la finca y a sus pobladores desde el siglo XIV hasta el año 1919, cuando fue adquirida por el ayuntamiento de Donostia-San Sebastián. En ese momento se limitaron los usos y la gestión forestal, con el fin de favorecer la conservación de este enclave y de abastecer a la ciudad de agua. Esto ha favorecido que Artikutza se encuentre en buen estado de conservación y que fuera declarada Zona de Especial Conservación (ZEC ES2200010) en 2015 (Gobierno de Navarra 2016).



**Figura 1.** (a) Ubicación de la Comunidad Foral de Navarra en de la península ibérica. (b) Localización de la zona de estudio (en azul) y del hayedo de referencia (círculo azul) dentro la Comunidad Foral de Navarra. (c) Árboles muestreados en el interior (en rojo) y exterior (en azul) de las cuatro cortas que componen la mina estudiada.

**Figure 1.** (a) Location of the Comunidad Foral de Navarra in the Iberian Peninsula, (b) Study area (in blue) and reference beech forest (blue circle) in the Comunidad Foral de Navarra. (c) Sampling trees inside (in red) and outside (in blue) the four parts that form the studied mine.

## Muestreo

La mina seleccionada para este estudio es la única existente en la zona que no ha sido degradada desde hace 140 años. Posee cuatro cortas diferenciadas y tiene una superficie total de 18 ha. En su interior se seleccionaron las 18 hayas de mayor diámetro (repartidas en las cuatro cortas), por ser probablemente las de mayor antigüedad y, por tanto, las que antes se originaron tras el cese del impacto. El estudio dendrocronológico posterior permitió estimar la edad media de estas hayas de dentro de la mina en unos 94 años, y una edad máxima de 136 años. En el exterior se eligieron siete hayas en puntos donde existía mayor certeza de que no se vieron afectados por la actividad minera (p. e. alejados de caminos de extracción del mineral) (**Fig. 1c**). Otras siete hayas fueron muestreadas en un hayedo de referencia (**Fig. 1b**), dentro de las 20 ha de bosque primigenio que se encuentra en la Reserva Integral de Lizardoia (Irati, Navarra) (43°00'19.7"N 1°06'47.6"W) (**Gobierno de Navarra 1991**).

En los 32 árboles se realizaron dos muestreos, el primero en la primavera de 2017 y el segundo durante el otoño de ese mismo año. Para cada árbol se definieron cuatro puntos, separados 90° entre ellos, y a una distancia de 1 – 1.5 m del tronco. En el muestreo de otoño se rotaron los puntos de muestreo 45° hacia la derecha, para evitar recoger las muestras en la misma ubicación. En cada uno de los cuatro puntos de muestreo se estableció un área máxima de 25x25 cm y 10 cm de profundidad, hasta alcanzar un volumen total de raíces de 500 ml en cada árbol. Para asegurar su conservación, las raíces se guardaron en bolsas de plástico cubiertas con suelo de la zona de muestreo, a una temperatura de 4° C. En cada uno de los cuatro puntos se tomaron 100 g de muestra de suelo para su posterior análisis. Las muestras de suelo se secaron en estufa a 40° C durante 48 horas, se molieron y se homogeneizaron. Posteriormente, se obtuvieron los valores de pH y las concentraciones de carbono orgánico (C), nitrógeno total (N) y fósforo asimilable (P) (Olsen), usando espectrofotometría y oxidación catalítica.

## Identificación de morfotipos

Cada muestra de raíces se procesó transcurridas 48 horas tras su recolección, seleccionando aleatoriamente cinco segmentos de raíz de 5 cm de longitud cada uno. Estos segmentos fueron posteriormente analizados con una lupa binocular identificando morfológicamente las puntas micorrizadas, y comparándolas con descripciones morfológicas publicadas (**Agerer 1987; Agerer 2001**). Este método requiere reconocer un número limitado de rasgos morfológicos (p. e. color o tipo de ramificación) (**Raja et al. 2017**), que además pueden ser altamente plásticos y variar en función de diversos factores, como la planta hospedadora o las condiciones de desarrollo (**Suz et al. 2008**).

## Análisis molecular

Para maximizar la resolución de la identificación, se secuenció el ADN de los hongos formadores de un total de 961 puntas micorrizadas (conservadas en bromuro de hexadeciltrimetilamonio), empleando una modificación del protocolo de **Murray y Thompson (1980)**. La amplificación del ADN por PCR fue llevada a cabo con los primers (cebadores) ITS1F e ITS4 (**White et al. 1990; Gardes y Bruns 1993**) para la región ITS rDNA. En un 14% de los casos la reacción inicial no tuvo éxito, por lo que se realizó una PCR semi-anidada utilizando los primers ITS1F e ITS2 o bien ITS3-ITS4 para amplificar fragmentos parciales. En el 8% de las muestras se obtuvieron secuencias de hongos ascomicetos saprobios, repitiéndose la PCR con el primer ITS1F y el ITS4B, específico de basidiomicetos (**Gardes y Bruns 1993; Bellemain et al. 2010**), y una PCR semi-anidada con los primers ITS3-ITS4B cuando esta reacción no produjo buenos resultados. El programa de amplificación consistió en un *hot start* a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 45, 30 y 45 segundos a 94°C, 54°C y 72°C, respectivamente, con una fase final de elongación a 72°C durante 10 minutos. Los resultados fueron chequeados en un gel de agarosa al 1%, y las reacciones positivas fueron purificadas y secuenciadas con los primers ITS1F o ITS4.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los cromatogramas originales para detectar y corregir errores de lectura.

## Análisis bioinformático

Se descartaron las secuencias en las que se produjeron errores en la amplificación o en la secuenciación. Se utilizó la herramienta de recorte de Geneious (version 11.1.4) (**Kearse et al. 2012**) para eliminar las bases de calidad baja en ambos extremos de las secuencias y se descartaron las secuencias con una calidad inferior al 30%. Se utilizó BLAST (**Altschul et al. 1997**) para clasificar todas las secuencias en diferentes unidades taxonómicas operativas o *operational taxonomic unit* (OTUs) siguiendo un umbral de similitud del 97%, al compararlas con la base de datos de secuencias genéticas recogida en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para las OTUs en las que no se alcanzó la identificación taxonómica a nivel de especie, se realizaron alineamientos con el resto de las secuencias que pertenecían al mismo género, estableciendo igualmente un umbral de similitud del 97%. En los casos en los que para una misma secuencia podían asignarse varias especies por encima del 97% (por ser especies muy próximas y pertenecientes a un grupo afin), se seleccionó la especie más representativa de ese grupo. No fue posible asignar una taxonomía a nivel de especie a todas las OTUs, debido a la baja calidad de algunas de estas secuencias y a la insuficiente resolución de la región genómica amplificada para distinguir ciertas OTUs a nivel de especie.

## Análisis estadístico

La existencia de diferencias significativas en el pH y las concentraciones de C, N y P entre el interior de la mina, el exterior y el hayedo de referencia se comprobó mediante un análisis de la varianza (ANOVA). El efecto individualizado de cada una de estas variables en la riqueza de especies se testó mediante un modelo de regresión lineal. Para normalizar la distribución de los residuos se realizó una transformación logarítmica de la variable dependiente (riqueza de especies).

Se analizó estadísticamente si la diferencia en la riqueza de especies de hongos EcM entre las tres posibles ubicaciones era significativa. Para ello, se creó un modelo de regresión lineal mixto utilizando *lmer* en el paquete de R *lme4*, con la ubicación y la estación en la que se realizó el muestreo como factores fijos y cada árbol muestreado como factor aleatorio. La variable dependiente (riqueza de especies) se transformó logarítmicamente para normalizar la distribución de los residuos. Dadas las diferencias en el número de árboles muestreados en el interior de la mina (18 árboles) con respecto al exterior y al hayedo de referencia (siete árboles en ambos casos), se realizó una curva de rarefacción para el muestreo del interior de la mina. Esto permite comprobar si la mayor cantidad de OTUs encontradas dentro se debe en realidad a un mayor esfuerzo de muestreo. Para conocer la similitud entre la comunidad de hongos EcM presente en cada uno de los tratamientos, dentro de la mina, fuera de la mina y hayedo de referencia, se realizó un análisis de ordenación de las comunidades mediante el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), con el paquete de R *vegan*, utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis, por ser el más adecuado cuando existe una alta proporción de especies ausentes. Este análisis multivariante permite conocer las proximidades existentes entre las comunidades de EcM a partir de su distancia en un espacio geométrico de pocas dimensiones.

## Resultados

### Variables del suelo

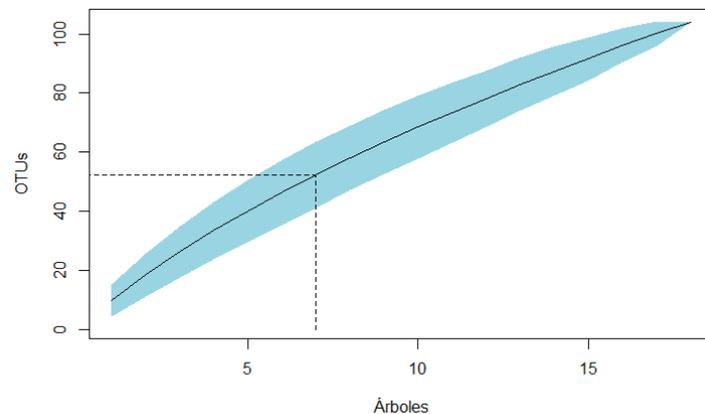
Existen diferencias significativas en los valores de pH ( $n = 32$ ,  $F = 5.43$ ,  $P < 0.001$ ) y de C ( $n = 32$ ,  $F = 6.18$ ,  $P < 0.01$ ) del suelo entre las tres ubicaciones, pero no en N y P (**Tabla A1.1**). El interior de la mina registra el pH más alto y el exterior el más bajo; de forma contraria, para el C la concentración más alta se registra fuera de la mina y la más baja dentro. Sin embargo, ninguna de estas variables afecta significativamente a la riqueza de especies (**Tabla A1.2**).

### Riqueza de OTUs de hongos EcM

En total, se identificaron 165 OTUs diferentes en las tres ubicaciones: 145 pertenecientes a basidiomicotas y 20 a ascomicotas. Casi la totalidad de las OTUs (161) se pudieron identificar a nivel de género y el 66% de éstas (107) a nivel de especie. En el 34% restante se encuentran aquellas OTUs que no se corresponden con ninguna especie registrada en GenBank, pero que presentan una diferenciación del 97% o más con respecto a las demás OTUs. La mayor riqueza de OTUs se encontró dentro de la mina, con 104 OTUs diferentes (pertenecientes a 34 géneros), mientras que fuera de la mina se identificaron 59 OTUs diferentes (en 23 géneros) y en el hayedo de referencia 55 OTUs (en 22 géneros). No obstante, la curva de rarefacción creada a partir del total de OTUs encontradas dentro de la mina (Fig. 2) muestra que la mayor riqueza de OTUs obtenida en el interior de la mina es el resultado de haber muestreado más árboles. Al igualar el esfuerzo de muestreo con el exterior de la mina y en el hayedo de referencia, es decir, al reducir el número de árboles muestreados de 18 a siete, dentro de la mina la riqueza sería de 54 OTUs. Además, los resultados del modelo de regresión lineal mixto indican que no existen diferencias significativas en la riqueza de OTUs de hongos EcM entre los árboles ubicados en el interior de la mina, en el exterior y en el hayedo de referencia ( $P > 0.05$ ) (Tabla A1.3).

### Composición de OTUs de hongos EcM

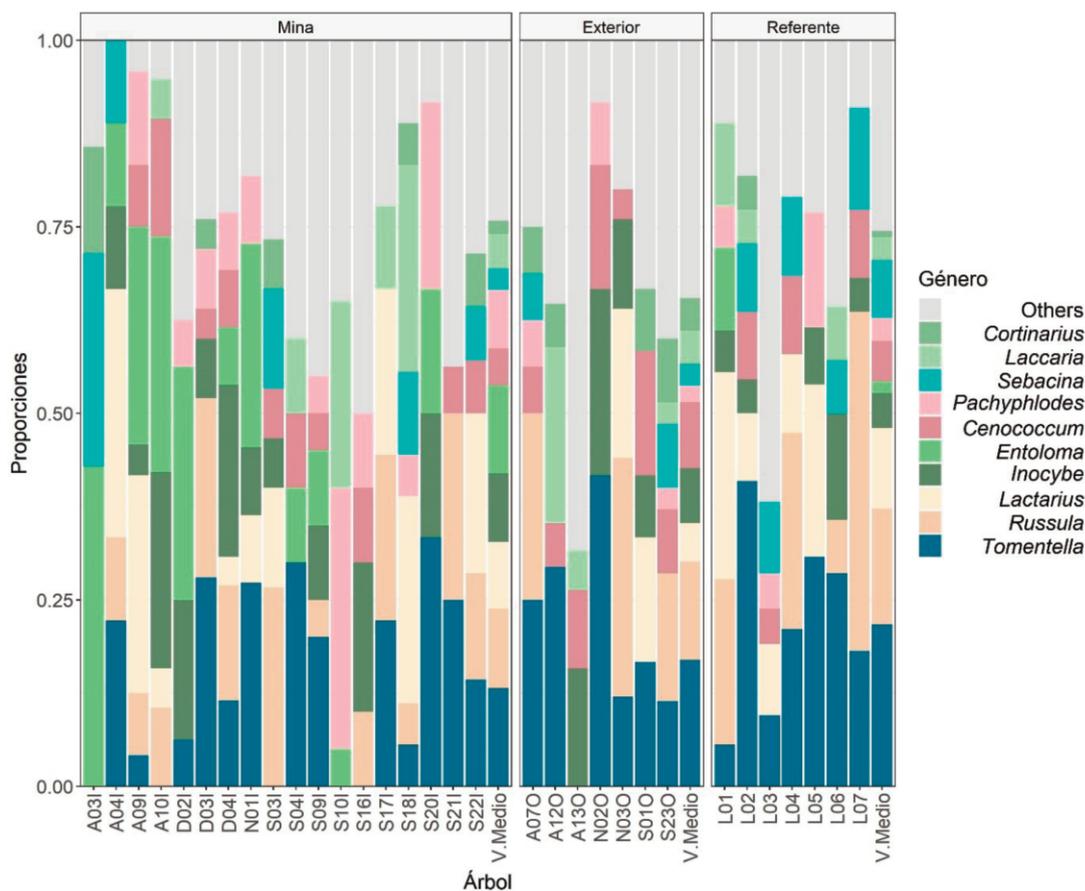
Los géneros de hongos EcM más abundantes en el interior de la mina son también los que mayor presencia tienen fuera de ella y en el hayedo de referencia (Fig. 3). En las tres ubicaciones el género más común es *Tomentella*, siendo también el que posee la máxima variedad de OTUs identificadas (36 OTUs). Le sigue el gé-



**Figura 2.** Curva de rarefacción para el muestreo realizado en el interior de la mina. La línea discontinua marca la cantidad de OTUs que se identificarían si el número de árboles muestreados fuera igual al del exterior de la mina y al del hayedo de referencia (siete árboles).

**Figure 2.** Rarefaction curve for the sampling done inside the mine. Dotted line represents the quantity of OTUs that would be identified if the number of trees sampled were equal to the one outside the mine and the reference beech forest (seven trees).

nero *Russula*, cuya alta diversidad de especies se ha recogido también en ambos hayedos estudiados, encontrándose hasta 21 OTUs distintas. Asimismo, los géneros *Lactarius*, *Inocybe* y *Cenococcum* se hallan ampliamente distribuidos en las tres ubicaciones, aunque este último solo está representado por una única OTU, identificada como *C. geophilum*.



**Figura 3.** Porcentaje de abundancias de los géneros de hongos EcM más abundantes identificados en cada árbol y el valor medio ('V. Medio') en base a su ubicación dentro de la mina ('Mina'), fuera ('Exterior') o en el hayedo de referencia ('Referente'). La asignación de los colores está relacionada con la proximidad taxonómica de los géneros.

**Figure 3.** Abundances (in %) of the most abundant EcM fungal genera identified in each tree and the average value ('V. Medio') according to their location inside the mine ('Mina'), outside ('Exterior') or in the reference beech forest ('Referente'). Colors were assigned based on taxonomical proximities between genera.

A pesar de compartir ciertos géneros dominantes, se han encontrado diferencias en la composición de OTUs de las comunidades de hongos EcM entre las tres zonas muestreadas. Varias OTUs aparecen solamente en el interior de la mina, como las pertenecientes al género *Elaphomyces*, presentes en 4 árboles, o la identificada como *Entoloma bryorum*, identificada en 10 árboles. De forma opuesta, algunas OTUs solo han aparecido en el exterior de la mina y en el hayedo de referencia, por ejemplo, la identificada como *Lactarius blennius* (presente en un árbol del exterior de la mina y en tres del hayedo de referencia), o la única OTU del género *Sistotrema* (localizada en un árbol el exterior de la mina y en otro del hayedo de referencia). Algunas OTUs aparecen de forma exclusiva en el hayedo de referencia, como *Piloderma lanatum* (en cinco árboles) o *Tuber puberulum* (en tres árboles). Finalmente, es de resaltar la alta presencia de hongos hipogeos encontrada principalmente en el interior de la mina.

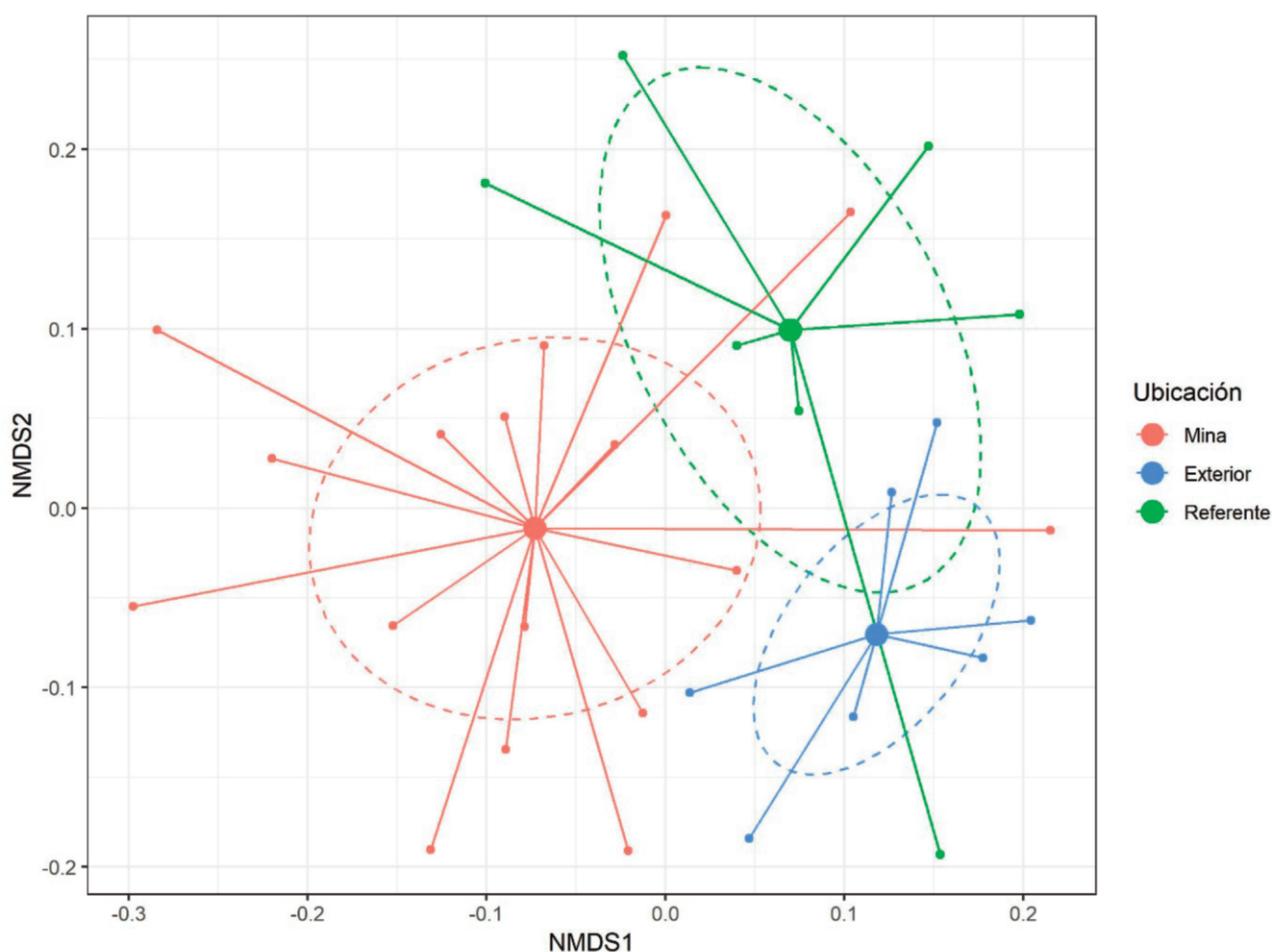
### Comunidades de hongos EcM

En la **figura 4** se representa el análisis de ordenación (NMDS) realizado con las comunidades de hongos EcM de los árboles analizados tanto en el interior de la mina, como en el exterior y en el hayedo de referencia. Las comunidades presentes en los árboles del interior de la mina se encuentran más dispersas en el gráfico de distancias que las del exterior, lo que indica una menor similitud entre sus comunidades. En los árboles del hayedo de referencia la dispersión es aún mayor.

### Discusión

Después de seis siglos de actividad minera y 140 años tras su abandono, se han recuperado los valores de riqueza de OTUs de hongos EcM en las hayas ubicadas en la zona afectada por este impacto. Estos resultados van en consonancia con otros estudios que establecen que este parámetro puede requerir más de 50 años para recuperarse, como en otro trabajo sobre el impacto de la minería donde se vio que, tras 43 años tras el cese esta actividad, la riqueza de especies de hongos EcM era un 63% de la riqueza del referente ([Gebhardt et al. 2007](#)). Además, en un meta-análisis sobre bosques templados, boreales y mediterráneos se obtuvo que la riqueza de especies de hongos EcM tarda de media 90 años en recuperar los valores del ecosistema de referencia ([Spake et al. 2015](#)).

Más allá del efecto de la actividad minera en la riqueza de especies, también se ha explorado la afección de ciertas variables del suelo en esta métrica. Aunque se registraron diferencias significativas a nivel estadístico para los valores de pH y C entre las tres ubicaciones, existe una alta variabilidad en estas dos variables y más aún en el N y P entre todos los árboles muestreados, independientemente de su ubicación. Además, no se ha encontrado una relación directa entre ninguna de estas variables con la riqueza de hongos EcM, debido posiblemente, entre otras cosas, a la dificultad de establecer una relación mono-causal entre la concentración de los nutrientes del suelo y la riqueza y la biomasa de especies de hongos EcM ([Zavišić et al. 2016](#)).



**Figura 4.** Escalamiento multidimensional no métrico de las comunidades de hongos EcM asociadas a los árboles muestreados (valor del estrés = 0.24). Los centroides marcan el valor medio para cada una de las tres ubicaciones y las líneas discontinuas señalan la desviación estándar. Uno de los puntos del interior de la mina queda oculto por el centroide.

**Figure 4.** Nonmetric multidimensional scaling of EcM fungal communities of the sampled trees (stress value = 0.24). Centroids indicate the average value for each of the three locations and dotted lines show the standard deviation. One of the points belonging to the inside of the mine is hidden by the centroid.

A pesar de que la riqueza de OTUs alcanza valores similares en el interior de la mina, el exterior y el hayedo de referencia, sí que se han encontrado diferencias en la composición de OTUs de las comunidades de hongos de estas tres ubicaciones. Dado que las tres ubicaciones difieren en la fase de desarrollo del bosque, puede que éste sea uno de los factores que estén motivando esta diferencia en la composición de OTUs. Si bien es cierto que se ha detectado un patrón común en las tres ubicaciones de géneros y OTUs dominantes, esto puede estar relacionado con el carácter generalista y cosmopolita de muchas especies o por tratarse de especies “multi-stage”, es decir de cualquier estado de desarrollo de un bosque, como es el caso de *C. geophilum* (Douhan y Rizzo 2005). Por otro lado, la menor similitud en las comunidades de hongos EcM entre los árboles del exterior de la mina con respecto a los del interior puede ser un indicador de la evolución de estas comunidades a medida que el proceso de recuperación se extiende en el tiempo. Es posible que especies más generalistas y cosmopolitas que aparecen en ambientes degradados vayan desapareciendo y se mantengan aquellas propias de hayedos con mayor madurez. Por ejemplo, el género *Elaphomyces* presente sólo en el interior de la mina, es un género adaptado a zonas con perturbaciones (Claridge 2002). Los géneros *Russula* (algunas especies solo se han encontrado en el exterior de la mina y en el hayedo referencia) y *Piloderma* (solo presente en el hayedo de referencia), son considerados género de “fase tardía” (late-stage fungi), con especies propias de bosques templados maduros (Smith et al. 2005; Twieg et al. 2007). Sin embargo, estudios recientes señalan que, si bien esta clasificación de las especies ECM en las diferentes fases de desarrollo de los bosques es práctica, no es del todo determinante, habida cuenta que hay otros factores como el tamaño pequeño o grande de los micelios de los diferentes genotipos que son asimismo decisivos (Vincenot y Selosse 2017). Por otro lado, la baja similitud en las comunidades de hongos EcM de los árboles ubicados en el hayedo de referencia podría ser el resultado de un proceso de adaptación de estos hongos a las condiciones ambientales y fisiológicas de cada árbol. Las hayas muestreadas en este lugar tienen una edad de entre 182 y 244 años, una escala de tiempo que permite a las comunidades de hongos EcM de cada árbol adaptarse a las condiciones de ese individuo. Algunos estudios han comprobado que la variabilidad genética propia de cada árbol como individuo ejerce un efecto en las comunidades de algunos artrópodos inquilinos (Crutsinger et al. 2009) o parasitoides (Valencia-Cuevas et al. 2017). No obstante, estas diferencias pueden estar influenciadas también por las limitaciones del esfuerzo de muestreo. A pesar de que se realizaron dos muestreos para incorporar la variabilidad estacional en las comunidades de hongos EcM (Buée et al. 2005), es muy probable que no se haya conseguido caracterizar la totalidad de las especies presentes. Sin embargo, en otro estudio sobre el impacto minero se obtuvo también una recuperación a corto plazo de la riqueza de especies de hongos EcM, pero no de la composición de especies (Glen et al. 2008). A escala global, varios estudios han determinado que los ecosistemas restaurados pueden poseer la misma riqueza de especies que los no perturbados pero que recuperación de la composición de especies puede requerir siglos (Marín-Spiotta et al. 2007; Curran et al. 2014).

Por otro lado, pueden derivarse aplicaciones a la práctica de la restauración a partir de estas diferencias en la composición de especies. Para ello, sería útil cuantificar la intensidad de la interacción, es decir, estimar cuánto nitrógeno es absorbido por la planta gracias a cada especie de hongo EcM (Pena et al. 2013) y cuánto carbono es absorbido por cada especie de hongo gracias a la planta (Neufeld et al. 2007). Permitiría conocer las especies o combinaciones de especies altamente funcionales, cuya inoculación podría favorecer y acelerar el proceso de recuperación.

Otro paso más allá en futuras investigaciones a raíz de lo obtenido en este estudio, deberían incluir el análisis de métricas de recuperación aún más complejas. La caracterización de redes de interacción en cada árbol donde, además del mutualismo haya-hongos EcM, se añada otro nivel de interacción (p. e. depredación de los hongos EcM por fauna edáfica), permitiría evaluar de forma más

adecuada y completa la recuperación del ecosistema y estimar de un modo más preciso el tiempo que realmente requieren los ecosistemas para recuperarse de los impactos antrópicos.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional de Investigación RETOS (CGL2015-70452-R) y la acreditación de excelencia “María de Maeztu” 2018-2022 (MDM-2017-0714). ARU fue financiada por el programa de becas predoctorales (2016) de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. Agradecemos la colaboración de Antton Gamio y de la Sección de Biodiversidad y Calidad Ambiental del Ayuntamiento de Donostia-San Sebastián.

## Referencias

- Agerer, R. 1987-2012. *Colour atlas of ectomycorrhizae* 1st – 15th del. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Alemania.
- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
- Altschul, S., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kausserud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10: 189.
- Beniwal, R.S., Hooda, M.S., Polle, A. 2011. Amelioration of planting stress by soil amendment with a hydrogel-mycorrhiza mixture for early establishment of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings. *Annals of Forest Science* 68: 803-810.
- Brundrett, M.C., Tedersoo, L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220:1108-1115.
- Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J. 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15: 235-245.
- Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., et al. 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486: 59-67.
- Claridge, A.W. 2002. Ecological role of hypogeous ectomycorrhizal fungi in Australian forests and woodlands. En: Smith, S.E., Smith, F.A. (eds.), *Diversity and Integration in Mycorrhizas*, pp. 291-305. Springer, Dordrecht, Países Bajos.
- Climate Focus 2016. Progress on the New York Declaration on Forests - Achieving Collective Forest Goals. Updates on Goals 1-10.
- Crutsinger, G.M., Cadotte, M.W., Sanders, N.J. 2009. Plant genetics shapes inquiline community structure across spatial scales. *Ecology Letters* 12: 285-292.
- Curran, M., Hellweg, S., Beck, J. 2014. Is there any empirical support for biodiversity offset policy? *Ecological Applications* 24: 617-632.
- Douhan, G.W., Rizzo, D.M. 2005. Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *New Phytologist* 166: 263-271.
- Duñabeitia, M., Rodríguez, N., Salcedo, I., Sarrionandia, E. 2004. Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque Country. *Forest Ecology and Management* 195: 129-139.
- Galán, C., Rivas, J.M., Nieto, M. 2014. Minas y cuevas de Elama (Artikutza): Hidrogeología, Fauna y evolución. *Laboratorio de Bioespeleología, Sociedad de Ciencias Aranzandi*. San Sebastián, País Vasco.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gebhardt, S., Neubert, K., Wöllecke, J., Münzenberger, B., Hüttl, R.F. 2007. Ectomycorrhiza communities of red oak (*Quercus rubra* L.) of different age in the Lusatian lignite mining district, East Germany. *Mycorrhiza* 17: 279-290.
- Glen, M., Bougher, N.L., Colquhoun, I.J., Vlahos, S., Loneragan, W.A., O'Brien, P.A., Hardy, G.E.S.J. 2008. Ectomycorrhizal fungal communities of rehabilitated bauxite mines and adjacent, natural jarrah forest in Western Australia. *Forest Ecology and Management* 255: 214-225.

- Gobierno de Navarra 1991. Decreto Foral 131/1991, de 4 de abril, por el que se aprueban los planes de uso y gestión de las Reservas Integrales de Lizarzoia (RI1), Ukerdi (RI2) y Aztaparreta (RI3). 1-9. *Boletín Oficial de Navarra*, N.º 67 de 27 de mayo de 1991.
- Gobierno de Navarra 2016. Decreto Foral 264/2015, de 2 de diciembre, por el que se designa el lugar de importancia comunitaria denominado "Artikutza" como Zona Especial de Conservación y se aprueba su plan de gestión. *Boletín Oficial de Navarra*, N.º 4 de 8 de enero de 2016
- Goicoechea, N., Closa, I., de Miguel, A.M. 2009. Ectomycorrhizal communities within beech (*Fagus sylvatica* L.) forests that naturally regenerate from clear-cutting in northern Spain. *New Forests* 38: 157-175.
- Haddad, N.M., Brudvig, L.A., Clobert, J., Davies, K.F., Gonzalez, A., Holt, R.D., Lovejoy, T.E. et al. 2015. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances* 1: e1500052.
- Hoeksema, J.D., Chaudhary, V.B., Gehring, C.A., Johnson, N.C., Karst, J., Koide, R.T., Pringle, A. et al. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13: 394-407.
- Jones, H.P., Jones, P.C., Barbier, E.B., Blackburn, R.C., Rey Benayas, J.M., Holl, K.D., Mccrackin, M., et al. 2018a. Restoration and repair of Earth's damaged ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B* 285: 20172577.
- Jones, K.R., Venter, O., Fuller, R.A., Allan, J.R., Maxwell, S.L., Negret, P.J., Watson, J.E.M. 2018b. One-third of global protected land is under intense human pressure. *Science* 360: 788 LP-791.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., et al. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Lozano Valencia, P.L. 2006. Régimen precipitacional en el norte de Navarra y Guipúzcoa: ¿record peninsular y europeo?. *Nimbus: Revista de climatología, meteorología y paisaje* 17-18: 125-144.
- Marín-Spiotta, E., Ostertag, R., Silver, W.L. 2007. Long-term patterns in tropical reforestation: Plant community composition and aboveground biomass accumulation. *Ecological Applications* 17: 828-839.
- Moreno-Mateos, D., Barbier, E.B., Jones, P.C., Jones, H.P., Aronson, J., López-López, J.A., McCrackin, M.L., et al. 2017. Anthropogenic ecosystem disturbance and the recovery debt. *Nature Communications* 8: 14163.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4326.
- Neufeld, J.D., Wagner, M., Murrell, J.C. 2007. Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age. *ISME Journal* 1:103-110.
- Newbold, T., Hudson, L.N., Hill, S.L.L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R.A., Börger, L., et al. 2015. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature* 520: 45-50.
- Pena, R., Simon, J., Rennenberg, H., Polle, A. 2013. Ectomycorrhiza affect architecture and nitrogen partitioning of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings under shade and drought. *Environmental and Experimental Botany* 87: 207-217.
- Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products* 80: 756-770.
- Rey Benayas, J.M., Newton, A.C., Diaz, A., Bullock, J.M. 2009. Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: a meta-analysis. *Science* 325: 1121-4.
- Sarrionandia, E., Rodríguez, N., Salcedo, I. 2009. A study of the macrofungal community in the beech forest of Altube (Basque Country, Northern Spain). *Cryptogamie, Mycologie* 30: 67-83.
- Smith, J.E., McKay, D., Brenner, G., McIver, J., Spatafora, J.W. 2005. Early impacts of forest restoration treatments on the ectomycorrhizal fungal community and fine root biomass in a mixed conifer forest. *Journal of Applied Ecology* 42: 526-535.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis* (2ª ed). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Spake, R., Ezard, T.H.G., Martin, P. a., Newton, A.C., Doncaster, C.P. 2015. A meta-analysis of functional group responses to forest recovery outside of the tropics. *Conservation Biology* 29: 1695-1703.
- Suz, L.M., Azul, A.M., Morris, M.H., Bledsoe, C.S., Martín, M.P. 2008. Morphotyping and Molecular Methods to Characterize Ectomycorrhizal Roots and Hyphae in Soil. En: Nautiyal, C.S., Dion, P. (eds.), *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*, pp. 437-474. Springer Berlin Heidelberg, Alemania.
- Trap, J., Akpa-Vinceslas, M., Margerie, P., Boudsocq, S., Richard, F., Decaëns, T., Aubert, M. 2017. Slow decomposition of leaf litter from mature *Fagus sylvatica* trees promotes offspring nitrogen acquisition by interacting with ectomycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 105: 528-539.
- Twieg B.D., Durall D.M., Simard S.W. 2007. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist* 176: 437-447.
- UN General Assembly 2015. *Resolution A/RES/70/1 - Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development*. Disponible en: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/summit>.
- UN General Assembly 2019. *Resolución A/RES/73/284: Decenio de las Naciones Unidas sobre la Restauración de los Ecosistemas (2021-2030)*. Disponible en: <https://undocs.org/es/A/RES/73/284>.
- Valencia-Cuevas, L., Mussali-Galante, P., Cano-Santana, Z., Pujade-Villar, J., Equihua-Martínez, A., Tovar-Sánchez, E. 2017. Genetic variation in foundation species governs the dynamics of trophic interactions. *Current Zoology* 64: 13-22.
- Vincenot L., Selosse M.A. 2017. Population Biology and Ecology of Ectomycorrhizal Fungi. En: Tedersoo L. (ed.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, pp. 39- 59. Ecological Studies 230. Springer International Publishing, Nueva York, Estados Unidos.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.L. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, pp. 315-322. San Diego, CA, Estados Unidos.
- Zavišić, A., Nassal, P., Yang, N., Heuck, C., Spohn, M., Marhan, S., Pena, R. et al. 2016. Phosphorus availabilities in beech (*Fagus sylvatica* L.) forests impose habitat filtering on ectomycorrhizal communities and impact tree nutrition. *Soil Biology and Biochemistry* 98: 127-137.

## Apéndice A1: Resultados de los análisis estadísticos

### Appendix A1: Results of statistical analyses

**Tabla A1.1.** Efecto de la ubicación (interior de la mina, exterior o hayedo de referencia) en las variables del suelo medidas (pH y concentración de C, N y P). Los datos fueron analizados utilizando un ANOVA.

**Table A1.1.** Effect of location (inside the mine, outside and reference beech forest) on the measured soil variables (pH and C, N, P concentration). These data were analysed using ANOVA. The degrees of freedom (Df) were equal to 2 and the degrees of freedom of residuals were equal to 29. Significant effects ( $p < 0.05$ ) are indicated in bold. Variables with logarithmic transformations are shown in the last column.

	<b>F-valor</b>	<b>P-valor</b>	<b>Transform.</b>
<b>pH</b>	5.429	<b>&lt;0.001</b>	ninguna
<b>C</b>	6.1765	<b>&lt;0.01</b>	ninguna
<b>N</b>	2.0272	0.1499	ln
<b>P</b>	0.5188	0.6007	ln

**Tabla A1.2.** Efecto de las variables del suelo medidas (pH y concentración de C, N y P) en la riqueza de OTUs de hongos EcM. Los datos fueron analizados utilizando un modelo de regresión lineal.

**Table A1.2.** Effect of location (inside the mine, outside and beech forest of reference) on soil variables measured (pH and C, N, P concentration). Significant effects ( $p < 0.05$ ) are indicated in bold.

	<b>Estimador</b>	<b>Error estándar</b>	<b>t valor</b>	<b>P-valor</b>
Intercepto	2.135	0.506	4.219	<b>&lt;0.0001</b>
pH	0.028	0.089	0.321	0.751
C	-0.001	0.020	-0.071	0.944
N	0.197	0.479	0.411	0.685
P	0.000	0.007	0.040	0.969

**Tabla A1.3.** Efecto de la ubicación (interior de la mina, exterior o hayedo de referencia) en la riqueza de OTUs de hongos EcM.

**Table A1.3.** Effect of location (inside the mine, outside and beech forest of reference) on ECM fungal OTUs richness. Num. Df, numerator degrees of freedom; Den. Df, denominator degrees of freedom. Significant effects ( $p < 0.05$ ) are indicated in bold.

	<b>Num. Df</b>	<b>Den. Df</b>	<b>F valor</b>	<b>P-valor</b>
Intercepto	1	31	1182.321	<b>&lt;0.0001</b>
Ubicación	2	29	0.0638	0.9383
Estación	1	31	0.0045	0.9471