



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

---

Organiza



**La aplicación de tratamientos de prevención de incendios forestales no supone efectos negativos sobre las comunidades de hongos asociadas a ecosistemas mediterráneos de *Halimium lasianthum* a largo plazo**

MARTÍN-PINTO, P.<sup>1</sup>, VÁZQUEZ-VELOSO, A.<sup>1</sup>, SANTOS, M.<sup>1</sup>, FONTÚRBEL, T.<sup>2</sup>, ORIA-DE-RUEDA J.A.<sup>1</sup> y FERNÁNDEZ, C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible UVa-INIA, Avenida Madrid, s/n, 34004 Palencia, España.

<sup>2</sup> Centro de Investigación Forestal-Lourizán, Xunta de Galicia, P.O. Box. 127, 36080 Pontevedra, España.

## Resumen

Los ecosistemas mediterráneos de matorrales pirófitos sin gestión son un combustible forestal con alto riesgo de incendios forestales. Los tratamientos de prevención se presentan como una herramienta eficaz para revertir esta situación. En este contexto, los hongos pueden jugar un papel importante desde los puntos de vista económico y ecológico. Para investigar los efectos a largo plazo de tratamientos de prevención de incendios forestales sobre las comunidades de hongos, hemos analizado dichas comunidades 9 años después de la aplicación de quemas prescritas y desbroces, realizados sobre matorrales dominados por *Halimium lasianthum*. Nuestros resultados indican que los tratamientos de prevención de incendios forestales no han tenido un efecto negativo sobre la abundancia o riqueza de hongos ectomicorrílicos, aunque hemos encontrado una menor riqueza general en los tratamientos de quema. Nuestro trabajo ha permitido detectar la presencia de *Boletus edulis*, especie que no ha sido afectada por los tratamientos realizados. Estos resultados apuntan a que las prácticas de gestión forestal relacionadas con la prevención de incendios forestales son compatibles con la conservación de las comunidades de hongos del suelo, algunos de ellos de alto potencial económico.

## Palabras clave

Riqueza de hongos, abundancia de hongos, quema prescrita, desbroce, hongos comestibles.

## 1. Introducción

Las áreas ocupadas por matorrales mediterráneos se encuentran en expansión debido a los cambios en el uso del suelo, resultado del abandono de áreas agrícolas y cambios en los objetivos de gestión. Estos ecosistemas no resultan ser de interés para la mayoría de gestores debido a su falta de producción de madera, mientras que otros recursos potenciales como la producción de hongos son menospreciados y infraexplotados (ORIA-DE-RUEDA et al., 2008). Además, la falta de gestión de estos ecosistemas supone que estén continuamente afectados por fuegos forestales (MARTÍN-PINTO et al., 2006; MEDIAVILLA et al., 2014), reduciendo la cobertura vegetal, estimulando cambio en la composición vegetal (FRANCO-MACHÓN et al., 2019), y alterando las comunidades de hongos del suelo (FRANCO-MACHÓN et al., 2019; MARTÍN-PINTO et al., 2006). Estos efectos favorecen el desarrollo de vegetación pirófila (ORIA-DE-RUEDA et al., 2008), la cual forma parte de los ecosistemas mediterráneos, como son los miembros de la familia Cistaceae y del género *Pinus*.

El cambio climático parece estar cambiando el comportamiento de los incendios forestales, cuya severidad se prevé que aumente en un futuro próximo (VEGA et al., 2009). En este contexto, la gestión forestal es una herramienta clave que puede emplearse para reducir los daños de los incendios forestales, así como promover el desarrollo rural, las estrategias de conservación, y la calidad de vida de la población local. Tradicionalmente, el ganado estaba muy presente en las zonas de matorral mediterráneo (FERNÁNDEZ et al., 2015), siendo una manera natural, eficiente y productiva de prevención de incendios forestales mediante la reducción del combustible disponible.

Actualmente hay una menor cantidad de ganado en estas áreas, lo que supone una acumulación continua de combustible. Esta situación ha desembocado en la implementación de otros métodos de reducción de combustible forestal, modificando la cantidad y continuidad de los combustibles, y reduciendo el riesgo de incendios forestales de alta intensidad y severidad (FERNÁNDEZ et al., 2015). Un beneficio adicional que reporta una buena gestión del ecosistema es el incremento de la producción de hongos, al mismo tiempo que se reducen los riesgos de incendios forestales (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015b). La quema prescrita y el desbroce mecánico son las prácticas habituales llevadas a cabo para reducir el combustible forestal (FERNÁNDEZ et al., 2015; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, et al., 2015b; ORIA-DE-RUEDA et al., 2008). Por un lado, la quema prescrita se considera una opción de bajo coste. Aunque existe cierto riesgo de que el fuego se salga de control (FERNÁNDEZ et al., 2015), este daño es menor que el causado por los incendios forestales (ORIA-DE-RUEDA et al., 2008). Por otro lado, el desbroce mecánico es una técnica más segura, pero también más cara y de difícil aplicación en pendientes pronunciadas y terrenos pedregosos (FERNÁNDEZ et al., 2015).

Estudios previos realizados en el área de estudio han comparado el efecto de los tratamientos de quema prescrita y desbroce con diferentes objetivos. Estos estudios no observaron diferencias en la mortalidad de las plantas ni en el crecimiento de rebrotes para los distintos tratamientos (FERNÁNDEZ et al., 2013b). Tampoco encontraron diferencias en la cobertura vegetal y recuperación, y ni siquiera en la riqueza, diversidad y uniformidad de especies (FERNÁNDEZ et al., 2015), concordando con estudios realizados en ecosistemas similares (FERNÁNDEZ & VEGA, 2014). Además, se ha reportado que la quema prescrita reduce la capa orgánica del suelo y estimula la germinación de las semillas (FERNÁNDEZ et al., 2013a), teniendo un efecto menor en las propiedades fisicoquímicas del suelo mineral, indetectables pasados 3 años para nuestra área de estudio (FONTÚRBEL et al., 2016). Debido al interés que despiertan los hongos en la zona de estudio, a su importancia en ecosistemas mediterráneos similares (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015a; MARTÍN-PINTO et al., 2006; ORIA-DE-RUEDA et al., 2008), y a su contribución al desarrollo rural (BONET et al., 2014; ORIA-DE-RUEDA et al., 2008; DE ROMÁN & BOA, 2004), el objetivo de nuestro estudio es analizar las comunidades de hongos del suelo 9 años después de la aplicación de quemas prescritas y desbroces, con el objetivo de determinar qué efectos provocan estos tratamientos en un largo plazo de tiempo.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es conocer el efecto de la quema prescrita y el desbroce sobre las comunidades de hongos del suelo a largo plazo, determinando:

- cuál es el efecto de los tratamientos sobre la comunidad de hongos
- qué diferencias existen entre la aplicación de la quema prescrita y el desbroce
- qué hongos comestibles están presentes en la zona de estudio y cómo se ven afectados por los tratamientos

## 3. Metodología

### Área de estudio

La zona de estudio se localiza en Edreiras ( $42^{\circ} 8' 02''$  N –  $7^{\circ} 26' 17''$  W, 1.330 m s.n.m.), en la provincia de Ourense (NW España). Se caracteriza por su baja pendiente promedio (10%), condiciones climáticas mediterráneas (precipitación promedio 1.100 mm·año $^{-1}$ ; temperatura promedio anual 10°C) y suelos Alumi-umbric Regosols (FAO, 1998) desarrollados sobre esquistos. La zona experimental está principalmente cubierta por brezales, siendo la especie principal *Erica australis* L., acompañada de *Pterospartum tridentatum* (L.) Wilk. y *Halimium lasianthum* (Lam.) Spach. En el pasado, las quemas prescritas fueron comúnmente motivadas por el pastoreo. Estudios previos

en la zona han abordado temáticas de recuperación del matorral (FERNÁNDEZ et al., 2015) y rebrote (FERNÁNDEZ et al., 2013a, c), emergencia de semillas (FERNÁNDEZ et al., 2013b), y respuestas microbianas (FONTURBEL et al., 2016) a los tratamientos de reducción de combustible llevados a cabo en la misma zona de estudio.

### Diseño experimental, muestreo de suelo y trabajo molecular

El diseño experimental lo componen 4 bloques. En cada bloque se implantaron tres parcelas de 800 m<sup>2</sup> de cada tratamiento (nueve parcelas por bloque). Las parcelas experimentales fueron establecidas en la misma zona local con el objetivo de reducir los efectos de la diferencia en altitud (GEML et al., 2014), orientación (CHU et al., 2016), pendiente (GEML, 2019), y condiciones climáticas locales (CASTAÑO et al., 2018b; COLLADO et al., 2019) que puedan afectar a las comunidades de hongos. El experimento supone la realización de dos tratamientos de prevención de incendios forestales, quema prescrita y desbroce, que se comparan con zonas control. Ambos tratamientos fueron llevados a cabo en 2010, mientras que las parcelas control tienen vegetación regenerada naturalmente desde 2003, cuando el último incendio forestal afectó a la zona de estudio.

En cada parcela se toman quince muestras de suelo entre mayo y junio de 2019, mezclándolas en una única muestra por parcela que conserve la heterogeneidad del terreno. Las muestras se recogen tras eliminar las rocas y raíces superficiales, guardándolas y etiquetándolas en bolsas de plástico. En laboratorio, las muestras se secan al aire y se tamizan con un tamiz de 1 mm de luz. Cada muestra es dividida en dos: 10 g de suelo se utilizan para un análisis metagenómico de ADN, y 20 g se utilizan para un análisis físico-químico, con el objetivo de: determinar el pH del suelo mediante una suspensión en agua a 1:2,5; contenido de materia seca (%) siguiendo la norma UNE-ISO 11465; contenido total de fósforo (P) mediante la metodología Olsen; y el contenido de carbono y nitrógeno (C y N) mediante la metodología Dumas (Tabla 1).

*Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas promedio de las muestras de suelo recogidas 9 años tras la aplicación de los tratamientos (quema, desbroce y control). Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).*

Propiedades del suelo	Tratamiento		
	Quema	Desbroce	Control
pH	4,49 ± 0,06 a	4,43 ± 0,07 b	4,46 ± 0,04 ab
P (mg/kg)	9,32 ± 2,19 a	12,08 ± 3,53 b	9,98 ± 2,86 ab
N (%)	0,65 ± 0,05 ab	0,68 ± 0,04 a	0,62 ± 0,07 b
C (%)	10,47 ± 1,11 ab	11,30 ± 0,88 a	9,94 ± 1,52 b
Materia seca (%)	95,18 ± 0,68 a	94,27 ± 1,38 b	95,97 ± 0,55 a

A partir de una muestra de 0.25 g de suelo se llevó a cabo la extracción de ADN usando el kit de aislamiento PowersoilTM. Se llevaron a cabo las reacciones PCR por triplicado de cada muestra para reducir el posible error. Para ello se usaron 20 µl que contenía 11.22 µl de agua ultra pura milliQ, 1,60 µl de DNA, 2,00 µl de 10x buffer, 1,40 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1,60 µl de dNTPs (10mM), 0,50 µl de BSA (2%), 0,80 µl de primers (10 µM) y 0,8 µl de Taq Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La amplificación de la región ITS fue llevada a cabo con el siguiente programa: un primer ciclo de 95 °C durante 5 min, seguido de 37 ciclos de 95 °C durante 20 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 1.5 min, y un ciclo final de 72 °C durante 7 min. A continuación, se llevó a cabo una segunda PCR para la secuenciación mediante la plataforma Illumina MiSeq en el laboratorio BaseClear B.V. (Países Bajos).

La vegetación superficial fue muestreada estableciendo transectos longitudinales de 50 m de largo, midiendo la cobertura y altura de vegetación por el método de intercepción lineal (KENT, 2011), e identificando la especie cuando es posible.

### Análisis bioinformático

Tras identificar ambos sentidos de la cadena de ADN, se usó cutadapt (MARTIN, 2011) para eliminar las terminaciones de baja calidad en ambas direcciones (3' y 5') usando  $q = 15$  como criterio de calidad. El siguiente paso fue unir ambas secuencias en por medio de USEARCH v.10.0.240 (EDGAR, 2010) y cutadapt, con una longitud de secuencia mínima de 200 bp. Los primers (ITS4 para retroceso y ITS5 para avance) fueron recortados y las secuencias con errores esperados de  $> 1$  eliminadas. Posteriormente, las secuencias fueron combinadas en una muestra única, conservando el contador de sus registros para generar un mapeo de OTUs (unidad taxonómica operacional) mostrando el número de veces que una OTU ha sido detectada en cada muestra. Se asignaron grupos taxonómicos a las secuencias basándonos en su similitud con la base de datos UNITE (versión v.0.8 publicada el 18 de noviembre de 2018), la cual contiene secuencias asignadas a grupos de hipótesis de especie definidos en base a umbrales de similitud de secuencia dinámica (KÖLJALG et al., 2013). Excluidas las OTUs con  $< 70\%$  de similitud o con  $< 200$  bp de longitud de alineación por pares a una secuencia fúngica, se obtuvieron un total de 2.225 OTUs, las cuales representan 292.098 secuencias. Mientras que los estudios taxonómicos tan solo consideran OTUs con calidades  $> 95\%$ , desde el punto de vista del presente estudio todas las OTUs detectadas fueron consideradas de interés.

Tras asignar OTUs a grupos funcionales utilizando FUNGuild (NGUYEN et al., 2016) y corrigiendo los grupos funcionales ambiguos, se han asignado algunas categorías adicionales a los hongos ectomicorrícos (ECM), siguiendo el criterio propuesto por GEML (2019) y los datos publicados por AGERER (2006), TEDERSOO & SMITH (2013), y la base de datos DEEMY (<http://deemy.de>). La importancia comercial de los hongos comestibles fue evaluada siguiendo bibliografía específica (GERHARDT et al., 2000; MORENO & MANJÓN, 2010).

### Análisis estadístico

Para determinar la significancia individual de cada comunidad de hongos se utilizan análisis de variables no lineales. La significancia estadística de cada grupo de variables es calculada para cada tratamiento utilizando el test de permutación de Monte Carlo (499 permutaciones). Las variables de suelo, riqueza de hongos y abundancia de hongos se comparan para los distintos tratamientos utilizando modelos lineales de efectos mixtos (LME por sus siglas en inglés,  $p \leq 0,05$ ), desarrollados por medio del paquete Nlme (PINHEIRO et al., 2016), donde el sitio fue definido como aleatorio y los tratamientos de prevención de incendios forestales como factor. Se utiliza también el test de Tukey HSD cuando es necesario. Por otro lado, se utiliza el test de Pearson para analizar las correlaciones entre las variables ambientales y la abundancia de *Boletus edulis*. Estos análisis estadísticos se realizan mediante R (versión 3.5.3; R CORE TEAM, 2019).

## 4. Resultados

### Composición taxonómica de las comunidades de hongos

Un total de 2.225 OTUs de hongos fueron identificadas, distribuidas en 13 filos y 219 géneros diferentes (Figura 1). Tomando como base las OTUs identificadas, las comunidades de hongos del suelo aparecen dominadas por Ascomycota (54%), principalmente representadas por Agaricomycetes (22% de las OTUs identificadas); y Basidiomycota (27%), filo principalmente representado por Leotiomycetes (21% de las OTUs identificadas). En total, un 20% de las OTUs no se han podido clasificar: el 5% de ellas fue identificada simplemente como perteneciente al reino Fungi, y el restante 15% no estaba presente en la base de datos utilizada.

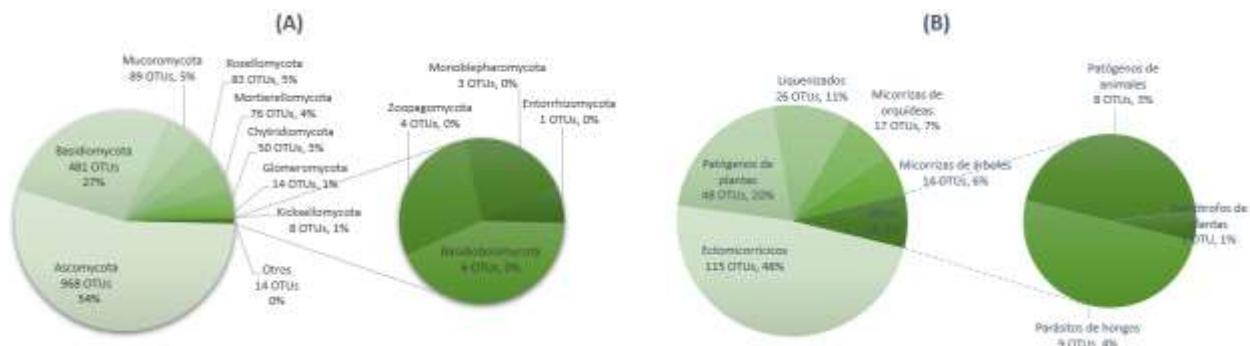


Figura 1. Proporción de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) de hongos. (A) clasificación taxonómica a nivel de filo (nombre, nº de OTUs, porcentaje); (B) clasificación taxonómica a nivel de grupos funcionales (nombre, nº de OTUs, porcentaje), basado en FUNGuild ([www.funguild.org](http://www.funguild.org)).

### Efectos de los tratamientos sobre riqueza y abundancia de hongos

Como ya se ha mencionado, el filo más abundante en la zona de estudio fue Ascomycota, independientemente del tipo de tratamiento (Figura 2A); no obstante, su riqueza fue significativamente menor en las parcelas quemadas respecto al control ( $p = 0,026$ ), mientras que no hay diferencias significativas entre parcelas desbrozadas y control ( $p = 0,088$ ). La riqueza del filo Mortierellomycota fue significativamente menor en las parcelas quemadas respecto a las desbrozadas ( $p = 0,026$ ), y la riqueza de Zoopagomycota fue menor en quemadas respecto a control ( $p = 0,018$ ). Sin embargo, para la riqueza de los filos restantes no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En términos de abundancia (Figura 2B), el filo Ascomycota fue significativamente menos abundante en parcelas desbrozadas respecto al control ( $p = 0,022$ ); no obstante, aunque la abundancia relativa también tiende a ser menor en las parcelas quemadas respecto al control, no se encontraron diferencias significativas entre ellas. La abundancia del filo Rozellomycota en parcelas quemadas y desbrozadas fue similar, siendo significativamente menor respecto a las parcelas control ( $p = 0,029$  y  $p = 0,075$ , respectivamente). La abundancia relativa de Zoopagomycota en parcelas quemadas fue significativamente menor que en las parcelas control ( $p = 0,018$ ), mientras que la abundancia de Calcarisporiellomycota en parcelas quemadas fue mayor que en el control ( $p = 0,053$ ). La abundancia de los restantes filos no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos, aunque Basidiomycota muestra tendencias a presentar menor abundancia en las parcelas quemadas respecto a las demás.

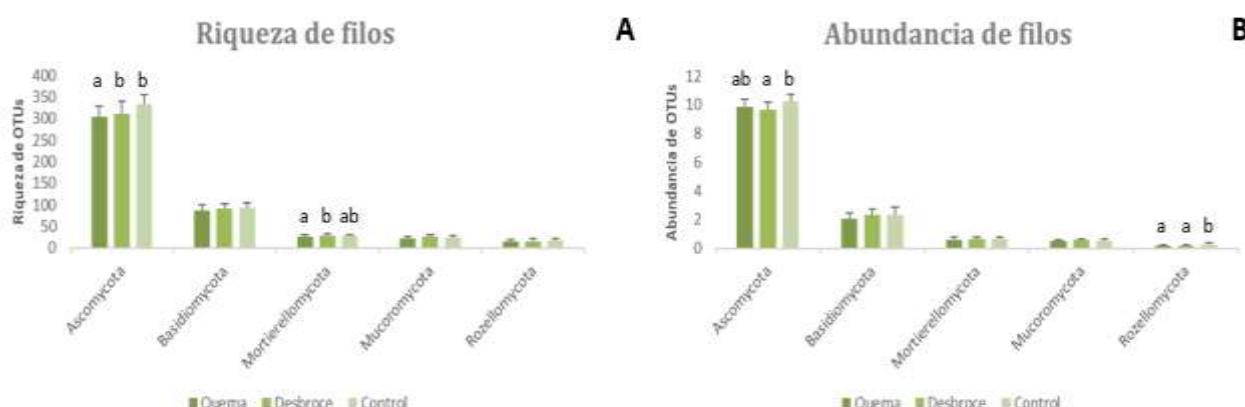


Figura 2. Riqueza (A) y abundancia (B) de filos de hongos en muestras de suelo recogidas 9 años tras la aplicación de los tratamientos (quema, desbroce y control). Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), y la barra gris vertical el error estándar.

El análisis de grupos funcionales revela que la riqueza es significativamente menor en las parcelas tratadas con quema y desbroce respecto al control para hongos parásitos ( $p < 0,001$  y  $p = 0,005$ ), hongos liquenizados ( $p = 0,004$  y  $p < 0,001$ ) y saprótrofos ( $p = 0,006$  y  $p = 0,034$ ) (Figura 3A); la riqueza también es inferior en los patógenos de plantas para parcelas desbrozadas, mientras que la riqueza de ECM para parcelas desbrozadas fue significativamente mayor que las control (Figura 3A). Para la riqueza del resto de grupos funcionales no se encontraron diferencias significativas.

Por otro lado, la abundancia de los distintos grupos funcionales fue similar a las tendencias observadas en la riqueza (Figura 3B). La abundancia de parásitos de hongos ( $p < 0,001$ ), hongos liquenizados ( $p = 0,003$ ) y saprótrofos ( $p = 0,001$ ) fue menor en parcelas quemadas respecto al control, mientras que la abundancia de ECM fue mayor en las parcelas desbrozadas respecto al control, al igual que para su riqueza.

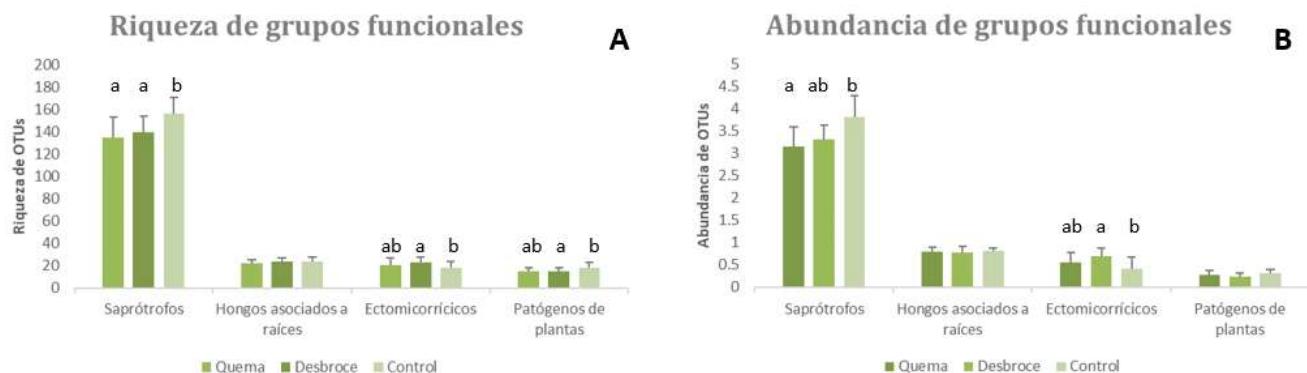


Figura 3. Riqueza (A) y abundancia (B) de grupos funcionales de hongos en muestras de suelo recogidas 9 años tras la aplicación de los tratamientos (quema, desbroce y control). Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), y la barra gris vertical el error estándar.

Respecto a los hongos ectomicorrícos (ECM), se ha encontrado una riqueza mayor en los de corta distancia de exploración respecto al control ( $p = 0,031$ ), mientras que la riqueza de los ECM de larga distancia de exploración no fue significativamente diferente (Figura 4A). En cuanto a la abundancia (Figura 4B), ambos ECM de corta y larga distancia mostraron valores significativamente mayores en parcelas desbrozadas respecto al control, mientras que la abundancia en parcelas quemadas no supone diferencias con los demás tratamientos.

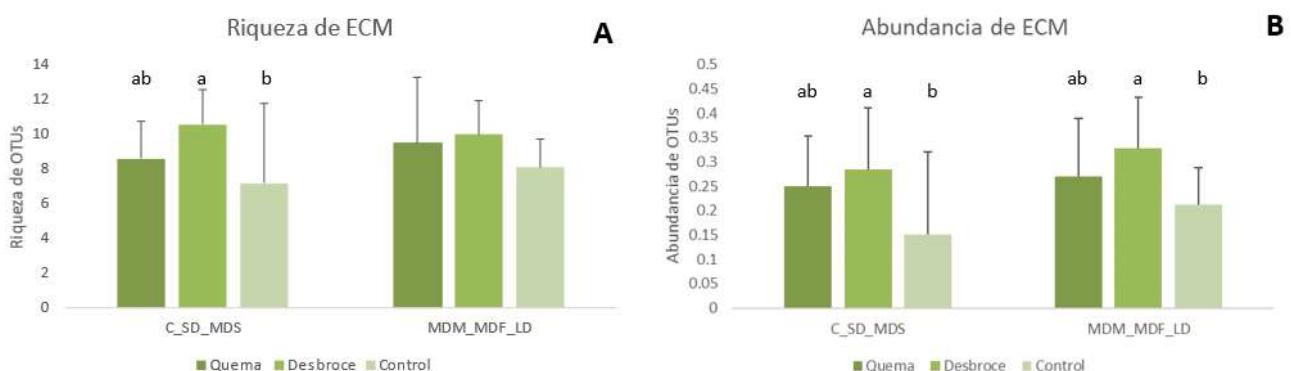


Figura 4. Riqueza (A) y abundancia (B) de los grupos micorríicos de hongos en muestras de suelo recogidas 9 años tras la aplicación de los tratamientos (quema, desbroce y control). C\_SD\_MDS representa hongos de corta y media distancia de exploración; MDM\_MDF\_LD representa hongos de media distancia de exploración estera, de borde y larga distancia de exploración. Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ), y la barra gris vertical el error estándar.

Aunque las especies comestibles más apreciadas, como *Boletus edulis* y *B. reticulatus*, sólo constituyan una pequeña proporción del total de hongos comestibles detectados, su riqueza y su abundancia no se ven afectadas en las parcelas quemadas y desbrozadas en comparación con las control (Tabla 2).

Tabla 2. Riqueza y abundancia promedio de los distintos hongos comestibles encontrados en las muestras de suelo recogidas 9 años tras la aplicación de los tratamientos (quema, desbroce y control). Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

	Riqueza				Abundancia			
	Quema	Desbroce	Control	Valores F y P	Quema	Desbroce	Control	Valores F y P
<b>Total comestibles</b>	6,250 ± 2,261	5,833 ± 1,403	5,083 ± 2,392	F = 0,369 P = 0,694	0,102 ± 0,072	0,109 ± 0,078	0,090 ± 0,058	F = 0,225 P = 0,800
<b><i>Boletus edulis</i></b>	0,250 ± 0,452	0,167 ± 0,389	0,083 ± 0,289	F = 0,569 P = 0,572	0,004 ± 0,008	0,012 ± 0,036	0,004 ± 0,015	F = 0,396 P = 0,676
<b><i>Boletus reticulatus</i></b>	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,083 ± 0,289	F = 1 P = 0,379	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,002	F = 1 P = 0,379
<b><i>Boletus grouped</i></b>	0,250 ± 0,452	0,167 ± 0,389	0,167 ± 0,389	F = 0,164 P = 0,849	0,009 ± 0,008	0,023 ± 0,036	0,010 ± 0,015	F = 0,368 P = 0,695

Considerando toda la comunidad de hongos, la riqueza general fue significativamente menor en parcelas quemadas respecto al control ( $p = 0,027$ ), mientras que la riqueza en parcelas desbrozadas no fue estadísticamente diferente al control ( $p = 0,231$ ).

## 5. Discusión

El filo Ascomycota ha sido el más rico y abundante en la zona de estudio, lo cual concuerda con lo encontrado en estudios desarrollados en distintos ecosistemas (CASTAÑO et al., 2020; EGIDI et al., 2019; GEML et al., 2014), ya que su dominancia puede ser explicada por su riqueza de especies (ALEM et al., 2020a). Mientras que la abundancia de este filo se ve reducida en parcelas desbrozadas, su riqueza se ve mermada en parcelas quemadas. Por otro lado, el filo Zoopagomycota ve reducida tanto su riqueza como abundancia tan solo en parcelas quemadas. Aunque este estudio no lo evalúa, estas diferencias pueden estar relacionadas con una mayor biomasa de las raíces de plantas en parcelas control respecto a las que se aplicó tratamiento, siguiendo los resultados encontrados por SOLLY et al. (2017) para masas de coníferas.

Resulta importante destacar la presencia de hongos comestibles encontrados en la zona de estudio, tales como *Boletus edulis* y *B. reticulatus*, los cuales no han sido afectados por los tratamientos de prevención de incendios forestales en cuanto a riqueza, abundancia y composición, lo que supone la no alteración de su potencial de fructificación. Estudios centrados en los cuerpos fructíferos han encontrado una significativa reducción en la abundancia de los mismo justo tras la aplicación del fuego (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015b; MARTÍN-PINTO et al., 2006; ORIA-DE-RUEDA et al., 2008; VÁSQUEZ-GASSIBE et al., 2016), aunque tras pocos años los hongos comestibles parecen estar totalmente recuperados, incluso llegando a tener niveles de producción mayores en comparación con matorrales senescentes no afectados por el fuego (FRANCO-MANCHÓN et al., 2019; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015b; MEDIAVILLA et al., 2014; ORIA-DE-RUEDA et al., 2008).

Aunque *B. edulis* está normalmente ligado a bosques bien desarrollados (MARTÍN-PINTO et al., 2006), se sabe que cuando esta especie se asocia con *Cistus ladanifer* (similar a *Hallimium lasianthum*), los cuerpos fructíferos se desarrollan antes (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). De acuerdo con HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al. (2015a), las máximas producciones de *B. edulis* sobre matorrales de *C. ladanifer* fueron encontradas a edades de 14 años, teniendo altas producciones entre los 8 y los 20 años pasada la perturbación. Además, producciones considerables de *B. edulis* y *B. aereus* fueron encontradas en estos ecosistemas en edades tempranas (4-6 años) y maduras (7-17 años) tras ser recuperados de un incendio forestal (ORIA-DE-RUEDA et al., 2008), lo cual refuerza los resultados encontrados en este estudio.

Respecto a los ECM, el comportamiento esperado es un decrecimiento de sus poblaciones en los años que siguen a los tratamientos, seguido de una recuperación de sus poblaciones tras varios años (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, 2017) debido a la alta actividad fotosintética y el rápido desarrollo de los matorrales jóvenes (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015a). Se sabe que la velocidad de recuperación tras el fuego está ligada a la intensidad del mismo (SALO et al., 2019). En este estudio, la riqueza y abundancia de las poblaciones de ECM fueron mayores en parcelas tratadas respecto al control 9 años tras su aplicación. Estudios previos, centrados en la producción de esporocarpos en matorrales de *Cistus ladanifer*, reportan que los niveles de producción de hongos micorrízicos alcanzan su pico 8 años tras una perturbación, seguido por un decrecimiento continuo, ligado a la reducción de la actividad fotosintética (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015a) y a las menores interacciones entre los hongos y sus huéspedes (ALEM et al., 2020a; CASTAÑO et al., 2018a). Esto sugiere que la producción de ECM en el momento de la toma de muestras (matorral de 9 años) está muy próxima a su pico de producción (matorral de 8 años), por lo que se espera una reducción de sus poblaciones en los años siguientes al muestreo. Además, la riqueza de ECM en parcelas control y quemadas no fue significativamente diferente, lo cual es consistente con los resultados encontrados para el contenido de C y N del suelo. Estudios anteriores realizados en la zona muestran que las quemas prescritas reducen la capa de materia orgánica del suelo, particularmente cuando las altas temperaturas alcanzan este estrato (FERNÁNDEZ et al., 2013a, c), mientras que el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas es menor (FONTURBEL et al., 2016). Esta rápida colonización de ECM en parcelas quemadas puede incluso estar ligada a las menores severidades del fuego y la más limitada profundidad de afección del mismo con quemas prescritas respecto a fuegos forestales (ALEM et al., 2020a) y la influencia de la respuesta de la planta huésped respecto al fuego (ALEM et al., 2020a), siendo en este estudio los principales huéspedes plantas pirófilas (ORIA-DE-RUEDA et al., 2008). Como ya ha sido mencionado, no se encontraron diferencias entre los grupos de ECM de corto y largo alcance de exploración. GEML (2019) sugiere que las diferencias entre ambos grupos de ECM pueden estar ligadas a la densidad de raíces del suelo, encontrando una mayor cantidad de ECM de corta distancia en masas maduras, donde los niveles de densidad de raíces son mayores. Sin embargo, nuestra zona de estudio está dominada por matorrales, lo que supone que las plantas estén más cercanas a sus vecinos que para masas maduras arboliadas, creando una estructura de raíces totalmente distinta. Además, la densidad de huéspedes en el momento del muestreo en todas las parcelas fue próxima al 100%, por lo que las diferencias entre parcelas de matorral más joven a nivel aéreo respecto al maduro no existen, pudiendo darse una situación semejante a nivel radical.

Por otro lado, se han detectado menor riqueza y abundancia de saprótrofos en las parcelas sobre las que se realizaron tratamientos respecto al control. Este hallazgo era esperado, ya que en estudios previos sobre esporocarpos se reportaron incrementos en las poblaciones de saprótrofos justo después de las perturbaciones mientras la vegetación y los hongos simbiontes se recuperan, seguido de una reducción constante de la abundancia de saprótrofos. Este decrecimiento en las poblaciones de saprótrofos ha sido previamente observado en matorrales de *C. ladanifer*, tanto a nivel molecular (CASTAÑO et al., 2020) como de cuerpos fructíferos (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2015b), así como en masas de *Pinus nigra* (MEDIAVILLA et al., 2014), donde el desarrollo de la vegetación y la restauración de las comunidades competidoras está ligado a reducciones en los

hongos saprótrofos. Además, este mismo efecto ha sido encontrado por CHEN et al. (2019) tras las alteraciones causadas por cortas de árboles. Al igual que en el caso de los saprótrofos, los hongos parásitos y liquenizados también tienden a ser más abundantes en parcelas control respecto a las que recibieron tratamiento. El factor común en todos estos grupos es la relación con otros organismos (p.ej., otros hongos, algas o plantas) probablemente también afectados por los tratamientos aplicados, lo que podría explicar nuestros resultados.

En general, se ha observado que la riqueza de las comunidades de hongos del suelo en parcelas quemadas es menor que en aquellas desbrozadas y control, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las dos últimas. Estos hallazgos concuerdan con los de CASTAÑO et al. (2020) y MARTÍN-PINTO et al. (2006) para ecosistemas dominados por la familia Cistaceae. Respecto a los efectos de la quema prescrita sobre las comunidades de hongos del suelo, MARTÍN-PINTO et al. (2006) reporta que las reducciones en riqueza de hongos están ligadas con la reducción de la riqueza de vegetación tras el paso del fuego, así como a los daños en la viabilidad y dormancia de las esporas de hongos, además del propio efecto directo del fuego. En este estudio hemos encontrado un incremento del pH en las parcelas quemadas en comparación con las demás, lo que está principalmente asociado con la reducción de la riqueza de hongos, tal y como otros autores han encontrado anteriormente (DAY et al., 2019). Además, TEDERSOO et al. (2020) ha reportado que el pH es el principal vector de la diversidad, estructura y riqueza de hongos, reforzando la relación existente entre pH y diversidad de hongos. Por otro lado, se ha encontrado que las parcelas quemadas tienen un contenido de P menor a las desbrozadas, lo que concuerda con los hallazgos del ALEM et al. (2020b), el cual reporta que P explica un 19% de la variabilidad de ECM en plantaciones de *Pinus patula*.

## 6. Conclusiones

Los ecosistemas mediterráneos se han considerado tradicionalmente improductivos en cuanto a sus valores ecológicos y económicos. Su alta combustibilidad y los daños causados por incendios forestales recurrentes hacen necesario un manejo específico que se enfoque en la prevención de incendios forestales o en la reducción de su severidad en estos sistemas. En este estudio se aplican dos tratamientos de prevención de incendios forestales con el fin de conocer cuál es el efecto que provocan sobre las comunidades de hongos del suelo. Aunque cada filo y grupo funcional se comporta de manera diferente, nuestros resultados mostraron que la quema prescrita reduce la riqueza general de hongos, mientras que la abundancia no se ve afectada; el desbroce no supone efectos adversos sobre la riqueza y abundancia de hongos; y la presencia de especies comestibles, entre ellos *Boletus edulis*, no se ha visto alterada por ambos tratamientos. Varios factores ecológicos están detrás de estos resultados, como la rápida recuperación de la vegetación y el tiempo transcurrido desde la aplicación de los tratamientos hasta el momento del muestreo. Aunque es necesario seguir investigando los efectos de estos tratamientos, nuestros resultados ponen de manifiesto que la aplicación de quemas prescritas y desbroces son compatibles con la conservación de las comunidades de hongos del suelo.

## 7. Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue apoyado por los proyectos VIS4FIRE (RTA2017-00042-C05-01) y MYCOINFOR (PID2019-105188RB-I00) creados por el Ministerio Español de Ciencia e Innovación. Además, queremos agradecer el esfuerzo realizado a todos aquellos que nos apoyaron en el trabajo de campo.

## 8. Bibliografía

- AGERER, R.; 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress*, 5(2), 67–107. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0505-x>
- ALEM, D.; DEJENE, T.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; GEML, J.; CASTAÑO, C.; SMITH, J. E.; MARTÍN-PINTO, P.; 2020a. Soil fungal communities and succession following wildfire in Ethiopian dry Afromontane forests, a highly diverse underexplored ecosystem. *Forest Ecology and Management*, 474, 118-328. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118328>
- ALEM, D.; DEJENE, T.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; GEML, J.; MARTÍN-PINTO, P.; 2020b. Soil fungal communities under *Pinus patula* Schiede ex Schtdl. & Cham. plantation forests of different ages in Ethiopia. *Forests*, 11(10), 1109. <https://doi.org/10.3390/f11101109>
- BONET, J. A.; GONZÁLEZ-OLABARRIA, J. R.; ARAGÓN, J. M.; 2014. Mushroom production as an alternative for rural development in a forested mountainous area. *Journal of Mountain Science*, 11(2), 535–543. <https://doi.org/10.1007/s11629-013-2877-0>
- CASTAÑO, C.; ALDAY, J. G.; LINDAHL, B. D.; MARTÍNEZ DE ARAGÓN, J.; DE-MIGUEL, S.; COLINAS, C.; PARLADÉ, J.; PERA, J.; BONET, J. A.; 2018a. Lack of thinning effects over inter-annual changes in soil fungal community and diversity in a Mediterranean pine forest. *Forest Ecology and Management*, 424. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.05.004>
- CASTAÑO, C.; LINDAHL, B. D.; ALDAY, J. G.; HAGENBO, A.; MARTÍNEZ DE ARAGÓN, J.; PARLADÉ, J.; PERA, J.; BONET, J. A.; 2018b. Soil microclimate changes affect soil fungal communities in a Mediterranean pine forest. *New Phytologist*, 220(4), 1211–1221. <https://doi.org/10.1111/nph.15205>
- CASTAÑO, C.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; GEML, J.; EBERHART, J.; OLAIZOLA, J.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; MARTÍN-PINTO, P.; 2020. Resistance of the soil fungal communities to medium-intensity fire prevention treatments in a Mediterranean scrubland. *Forest Ecology and Management*, 472, 118-217. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118217>
- CHEN, J.; XU, H.; HE, D.; LI, Y.; LUO, T.; YANG, H.; LIN, M.; 2019. Historical logging alters soil fungal community composition and network in a tropical rainforest. *Forest Ecology and Management*, 433, 228-239. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.11.005>
- CHU, H.; XIANG, X.; YANG, J.; ADAMS, J. M.; ZHANG, K.; LI, Y.; SHI, Y.; 2016. Effects of slope aspects on soil bacterial and arbuscular fungal communities in a boreal forest in China. *Pedosphere*, 26(2), 226–234. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60037-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60037-6)
- COLLADO, E.; BONET, J. A.; CAMARERO, J. J.; EGLI, S.; PETER, M.; SALO, K.; MARTÍNEZ-PEÑA, F.; OHENOJA, E.; MARTÍN-PINTO, P.; PRIMICIA, I.; BÜNTGEN, U.; KURTTILA, M.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; MARTÍNEZ-DE-ARAGÓN, J.; MIINA, J.; DE-MIGUEL, S.; 2019. Mushroom productivity trends in relation to tree growth and climate across different European forest biomes. *Science of the Total Environment*, 689, 602–615. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.471>
- DAY, N. J.; DUNFIELD, K. E.; JOHNSTONE, J. F.; MACK, M. C.; TURETSKY, M. R.; WALKER, X. J.; WHITE, A. L.; BALTZER, J. L.; 2019. Wildfire severity reduces richness and alters composition of soil fungal

communities in boreal forests of western Canada. *Global Change Biology*, 25(7), 2310-2324. <https://doi.org/10.1111/gcb.14641>

DE ROMÁN, M.; BOA, E.; 2004. Collection, marketing and cultivation of edible fungi in Spain. *Micología Aplicada International*, 16(2), 25-33.

EDGAR, R. C.; 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

EGIDI, E.; DELGADO-BAQUERIZO, M.; PLETT, J. M.; WANG, J.; ELDRIDGE, D. J.; BARDGETT, R. D.; ... SINGH, B. K.; 2019. A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature communications*, 10(1), 1-9.

FAO; 1998. FAO., 1998. World Reference Base for Soil Resources, by ISSS-ISRIC-FAO. World Soil Resources Report No. 84. Rome.

FERNÁNDEZ, C.; VEGA, J. A.; 2014. Shrub recovery after fuel reduction treatments and a subsequent fire in a Spanish heathland. *Plant Ecology*, 215(11), 1233-1243. <https://doi.org/10.1007/s11258-014-0381-4>

FERNÁNDEZ, C.; VEGA, J. A.; FONTURBEL, T.; 2013a. Shrub resprouting response after fuel reduction treatments: Comparison of prescribed burning, clearing and mastication. *Journal of environmental management*, 117, 235-241

FERNÁNDEZ, C.; VEGA, J. A.; FONTURBEL, T.; 2013b. Fuel reduction at a Spanish heathland by prescribed fire and mechanical shredding: Effects on seedling emergence. *Journal of Environmental Management*, 129, 621-627. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.08.034>

FERNÁNDEZ, C.; VEGA, J. A.; FONTURBEL, T.; 2013c. Does fire severity influence shrub resprouting after spring prescribed burning? *Acta Oecologica*, 48, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.01.012>

FERNÁNDEZ, C.; VEGA, J. A.; FONTURBEL, T.; 2015. Does shrub recovery differ after prescribed burning, clearing and mastication in a Spanish heathland? *Plant Ecology*, 216(3), 429-437. <https://doi.org/10.1007/s11258-015-0447-y>

FONTURBEL, T.; FERNÁNDEZ, C.; VEGA, J. A.; 2016. Prescribed burning versus mechanical treatments as shrubland management options in NW Spain: Mid-term soil microbial response. *Applied Soil Ecology*, 107, 334-346. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.008>

FRANCO-MANCHÓN, I.; SALO, K.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; BONET, J. A.; MARTÍN-PINTO, P.; 2019. Are wildfires a threat to fungi in European *Pinus* forests? A case study of boreal and Mediterranean forests. *Forests*, 10(4), 309. <https://doi.org/10.3390/f10040309>

GEML, J.; 2019. Soil fungal communities reflect aspect-driven environmental structuring and vegetation types in a Pannonic forest landscape. *Fungal Ecology*, 39, 63-79. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.12.005>

GEML, J.; PASTOR, N.; FERNANDEZ, L.; PACHECO, S.; SEMENOVA, T. A.; BECERRA, A. G.; WICAKSONO, C. Y.; NOUHRA, E. R.; 2014. Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests

reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Molecular Ecology*, 23(10), 2452–2472. <https://doi.org/10.1111/mec.12765>

GERHARDT, E.; VILA GARCÍA, J.; LLIMONA PÀGES, X.; 2000. Hongos de España y de Europa: manual de identificación. 957 pp. Edit. Omega. Barcelona.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; MARTÍN-PINTO, P.; 2013. Post-fire fungal succession in a Mediterranean ecosystem dominated by *Cistus ladanifer* L. *Forest Ecology and Management*, 289, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.10.009>

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; DE-MIGUEL, S.; PUUKALA, T.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; MARTÍN-PINTO, P.; 2015a. Climate-sensitive models for mushroom yields and diversity in *Cistus ladanifer* scrublands. *Agricultural and Forest Meteorology*, 213, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.07.001>

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; PANDO, V.; MARTÍN-PINTO, P.; 2015b. Impact of fuel reduction treatments on fungal sporocarp production and diversity associated with *Cistus ladanifer* L. ecosystems. *Forest Ecology and Management*, 353, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.05.007>

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; 2017. Estimación de la producción y diversidad de setas en jarales de *Cistus ladanifer* en función de variables climáticas y del tratamiento de la vegetación. VII Congreso Forestal Español, 302.

IHRMARK, K.; BÖDEKER, I. T. M.; CRUZ-MARTINEZ, K.; FRIBERG, H.; KUBARTOVA, A.; SCHENCK, J.; STRID, Y.; STENLID, J.; BRANDSTRÖM-DURLING, M.; CLEMMENSEN, K. E.; LINDAHL, B. D.; 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 666–677. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>

KENT, M.; 2011. Vegetation description and data analysis: a practical approach. John Wiley & Sons. KÖLJALG, U.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; TAYLOR, A. F. S.; BAHRAM, M.; BATES, S. T.; BRUNS, T. D.; BENGTSSON-PALME, J.; CALLAGHAN, T. M.; DOUGLAS, B.; DRENKHAN, T.; EBERHARDT, U.; DUEÑAS, M.; GREBENC, T.; GRIFFITH, G. W.; HARTMANN, M.; KIRK, P. M.; KOHOUT, P.; ... LARSSON, K. H.; 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22(21), 5271–5277). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/mec.12481>

MARTIN, M.; 2011. Cutadapt removes adapters sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10–12.

MARTÍN-PINTO, P.; VAQUERIZO, H.; PEÑALVER, F.; OLAIZOLA, J.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; 2006. Early effects of a wildfire on the diversity and production of fungal communities in Mediterranean vegetation types dominated by *Cistus ladanifer* and *Pinus pinaster* in Spain. *Forest Ecology and Management*, 225(1–3), 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.01.006>

MEDIAVILLA, O.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; MARTÍN-PINTO, P.; 2014. Changes in sporocarp production and vegetation following wildfire in a Mediterranean Forest Ecosystem dominated by *Pinus nigra* in Northern Spain. *Forest Ecology and Management*, 331, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.07.033>

MORENO, G.; MANJÓN, J.L.; 2010. Guía de hongos de la península Ibérica. 1440 pp. Edit. Omega. Barcelona.

NGUYEN, N. H.; SONG, Z.; BATES, S. T.; BRANCO, S.; TEDERSOO, L.; MENKE, J.; SCHILLING, J. S.; KENNEDY, P. G.; 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>

ORIA-DE-RUEDA, J. A.; MARTÍN-PINTO, P.; OLAIZOLA, J.; 2008. Bolete productivity of Cistaceous scrublands in Northwestern Spain. *Economic Botany*, 62(3), 323-330.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D.; TEAM, R. C.; 2016. NLme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1, 128.

R CORE TEAM; 2019. R: A language and environment for statistical computing (3.5.3). *R Foundation for Statistical Computing*.

SALO, K.; DOMISCH, T.; KOUKI, J.; 2019. Forest wildfire and 12 years of post-disturbance succession of saprotrophic macrofungi (Basidiomycota, Ascomycota). *Forest Ecology and Management*, 451, 117454. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117454>

SMILAUER, P.; LEPŠ, J.; 2014. Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO 5. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139627061>

SOLLY, E. F.; LINDAHL, B. D.; DAWES, M. A.; PETER, M.; SOUZA, R. C.; RIXEN, C.; HAGEDORN, F.; 2017. Experimental soil warming shifts the fungal community composition at the alpine treeline. *New Phytologist*, 215(2), 766–778. <https://doi.org/10.1111/nph.14603>

TEDERSOO, L.; ANSLAN, S.; BAHRAM, M., DRENKHAN, R.; PRITSCH, K.; BUEGGER, F.; PADARI, A.; HAGH-DOUST, N.; MIKRYUKOV, V.; GOHAR, D.; AMIRI, R.; HIIESALU, I.; LUTTER, R.; ROSENVALD, R.; RÄHN, E.; ADAMSON, K.; DRENKHAN, T.; TULLUS, H.; JÜRIMAA, K.; ... ABARENKOV, K.; 2020. Regional-scale in-depth analysis of soil fungal diversity reveals strong pH and plant species effects in Northern Europe. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1953. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01953>

TEDERSOO, L.; SMITH, M. E.; 2013. Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews*, 27(3–4), 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.09.001>

VÁSQUEZ-GASSIBE, P.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; SANTOS-DEL-BLANCO, L.; MARTÍN-PINTO, P.; 2016. The effects of fire severity on ectomycorrhizal colonization and morphometric features in *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Forest Systems*, 25(1), 5. <https://doi.org/10.5424/fs/2016251-07955>

VEGA J.A.; FERNÁNDEZ, C.; JIMÉNEZ, E.; RUIZ, A. D.; 2009. Impacto de un escenario de cambio climático sobre el peligro de incendios en Galicia. En: *Evidencias e impactos del cambio climático en Galicia*: 581-606.

WHITE, T.M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. En: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Pp. 315-321. Academic Press, San Diego, CA