



2022
Lleida

27 · 1
junio · juny
juliol · juliol

Cataluña
Catalunya

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

Análisis de redes para explorar los patrones de ensamblaje ectomicorrícico en bosques de pino mediterráneo puros y mixtos

IRENE ADAMO^{1,2}, CARLES CASTAÑO³, JOSÉ ANTONIO BONET^{1,2}, CARLOS COLINAS^{2,4}, JUAN MARTINEZ DE ARAGÓN^{1,4}, JOSU G. ALDAY^{1,2}

¹ Joint Research Unit CTFC – AGROTECNIO-CERCA, Av. Alcalde Rovira Roure 191, E25198, Lleida, Spain.

² Dep. Crop and Forest Sciences, University of Lleida, Av. Alcalde Rovira Roure 191, E25198, Lleida, Spain.

³ Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Mycology and Plant Pathology, SE, 75007, Uppsala, Sweden.

⁴ Forest Science and Technology Centre of Catalonia, Ctra, Sant Llorenç de Morunys Km 2, E25280, Solsona, Spain.

Resumen

Comprender la influencia de los árboles huéspedes en los hongos del suelo en el contexto actual del cambio climático es crucial para comprender la futura dinámica de ensamblaje de las comunidades de hongos. En este trabajo, utilizamos datos de metabarcoding del ADN de los hongos del suelo para explorar cómo las redes ectomicorrícicas cambian entre huéspedes de masas de pinos puros y mixtas mediterráneas (35 parcelas, *P. sylvestris*, *P. nigra* y mezcla de *P. sylvestris* - *P. nigra*). No encontramos diferencias en la composición de las comunidades de hongos ectomirricos entre bosques puros y mixto, pero la complejidad de las redes ectomicorrícicas era mayor en los bosques mixtos, ya que el número de vínculos entre las especies era significativamente mayor en comparación con los bosques de pino uniespecíficos. Además, las redes ectomicorrícicas en rodales mixtos mostraron vínculos positivos entre especies con diferentes rasgos funcionales (*Inocybe spp*, *Suillus spp*). La baja modularidad encontrada en los bosques puros puede indicar procesos deterministas o de competencia más elevados, mientras que los rodales de pino mixtos aumentan la presencia de diferentes especies funcionales. Por lo tanto, la coexistencia de especies arbóreas puede proporcionar diferentes nichos, lo que conduce a una red funcional más compleja. Este trabajo proporciona una visión de la idoneidad de los análisis de redes para comprender los mecanismos de ensamblaje ectomicorrícico en los bosques de pino mediterráneo.

Palabras clave

DNA metabarcoding, hongos ectomicorrícicos, bosque de pinos, análisis de redes.

1. Introducción

Los hongos del suelo son impulsores fundamentales de los procesos de los ecosistemas (Bardgett y van der Putten, 2014), como la descomposición de la materia orgánica, la liberación de nutrientes del suelo y la absorción de nutrientes por las plantas (Bardgett y Wardle, 2010). Dado que estas comunidades pueden determinar comunidades de plantas en múltiples escalas espaciales, comprender los principales procesos que dan forma a los ensamblajes de hongos es, por lo tanto, un objetivo central del campo de investigación de la ecología microbiana. Por otro lado, se conoce como el árbol huésped influye en los hongos del suelo, ya sea directamente a través de la variabilidad intraespecífica (Pérez-Izquierdo et al., 2019) o interespecífica que puede afectar las asociaciones árbol-micorrizas (Kernaghan y Patriquin 2011; Arfi et al., 2012; Hagenbo et al., 2020). En este sentido, Los bosques mixtos son de gran interés al ser más adaptables al cambio climático o a las perturbaciones que los monocultivos (Bravo-Oviedo et al., 2014). Este principio se basa en que la coexistencia de especies de árboles crea nichos complementarios para el crecimiento de los árboles y la absorción de nutrientes, lo que aumenta la resistencia de los bosques a las perturbaciones (Bello et al., 2019). Por lo tanto, se espera que los bosques mixtos alberguen niveles más altos de riqueza taxonómica de hongos (Ishida et al., 2007, Cavard et al., 2011).

Estudios recientes sobre las comparaciones entre comunidades fúngicas del suelo bajo distintos hospedantes arbóreos en ecosistemas boreales y templados muestran la existencia de niveles más altos de riqueza fúngica del suelo en rodales mixtos que en rodales puros (Ishida et al., 2007; Nagati et al., 2018). Además, se han encontrado diferencias claras en las comunidades de hongos del suelo entre bosques puros y mixtos en estudios que comparan árboles anfitriones con características contrastantes (es decir, caducifolios frente a coníferas) (Ishida et al., 2007, Tedersoo et al., 2013). Desgraciadamente, en bosques mediterráneos de pino no se encontraron diferencias en las comunidades de hongos del suelo entre bosques puros y mixtos (Adamo et al., 2021; Pérez-Izquierdo et al. 2020). Sin embargo, no está claro si la falta de diferencias en las comunidades de hongos puede ser causada por una falta de diferencias en las redes de asociación de especies. Recientemente, la complejidad de las redes de coocurrencia microbiana ha sido reconocida como un indicador de la función del ecosistema y por tanto de su estabilidad (Karimi et al., 2017). Por ejemplo, He et al. (2017) a través del análisis de redes de coocurrencia encontraron que cinco años de cultivo de pasto produjeron relaciones microbianas más complejas que un suelo en barbecho. En este sentido, si existen diferencias en las redes de interacción entre especies de hongos en diferentes tipos de bosque Mediterráneos aún no se ha investigado.

2. Objetivos

En este estudio, recolectamos muestras de suelo de 35 bosques diferentes en la cordillera mediterránea española del Prepirineo. El objetivo general de este estudio fue caracterizar la composición de la comunidad de hongos ectomicorícicos y las redes de asociación de especies entre estos bosques, que estaban dominados por bosques puro de pinos (*Pinus nigra* y *Pinus sylvestris*) y mixtos (*P. nigra*–*P. sylvestris*).

Más precisamente, i) planteamos la hipótesis de que el tipo de bosque tiene poco o ningún efecto significativo sobre los hongos ectomicorícicos dado que las especies de árboles estrechamente relacionadas tienden a compartir comunidades fúngicas más similares que las especies de árboles distantes (Adamo et al., 2021a, Pérez-Izquierdo et al. 2020). Por el otro lado, ii) planteamos la hipótesis de que las redes de asociación de especies serían más complejas en bosque mixtos que en bosque puros dado que se espera la coexistencia de especies de árboles crea nichos complementarios para el crecimiento de los árboles y la absorción de nutrientes (Bello et al., 2019, Nakayama et al., 2019).

3. Metodología

3.1 Descripción del sitio de estudio

Realizamos este estudio en la región montañosa de los Prepirineos de Cataluña en el noreste de España (ver mapa en la Fig. 1). Analizamos un conjunto de parcelas de seguimiento a largo plazo en las que se ha registrado fructificación fúngica durante ~20 años (Martínez de Aragón et al., 2007). El clima es mediterráneo, con un intenso período de sequía en verano desde junio hasta agosto, temperaturas medias anuales que oscilan entre los 6° y los 9°C (Alday et al., 2017), y la mayor parte de las precipitaciones en primavera y otoño. Seleccionamos aleatoriamente 42 parcelas de pinar de los 579 espacios incluidos en el Inventario Ecológico Forestal de Cataluña de 1992 realizado por el Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals (CREAF, 1992) (Bonet et al., 2010). Las 35 parcelas se distribuyeron aleatoriamente por toda Cataluña en número proporcional a la superficie ocupada por cada especie arbórea, con 11 parcelas de *P. nigra*, 14 parcelas de *P. sylvestris* y 10 de las parcelas comprendían una mezcla de especies de *P. sylvestris* y *P. nigra*.

3.2 Muestreo de suelo

Los suelos se muestrearon durante la temporada de otoño (octubre y noviembre) en 2009. En cada uno de los rodales seleccionados, se estableció una parcela de 10 × 10 m en el centro para monitorear a largo plazo la fructificación de hongos. En cada parcela, tomamos cuatro submuestras de suelo, es decir, una por lado de la parcela (Adamo et al., 2021c), con un taladro de acero rectangular (30 cm de profundidad y 6 x 4,5 de ancho). Las cuatro submuestras de suelo se agruparon en el campo y alrededor de 1 kg de la muestra mezclada se colocó en hielo y se llevó al laboratorio para la extracción de ADN fúngico.

3.3 Comunidad fúngica y análisis bioinformática

El ADN fúngico se extrajo de 0,5 g de suelo homogeneizado utilizando el kit de suelo NucleoSpin® NSP (Macherey-Nagel, Duren, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. La región del espaciador 2 transcrito interno fúngico (ITS2) se amplificó en un termociclador 2720 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) utilizando los cebadores gITS7 (Ihrmark et al., 2012), ITS4 e ITS4A (White et al., 1990). Optimizamos el número de ciclos de PCR en cada muestra con el objetivo de obtener bandas de PCR débiles a medias en los geles de agarosa, lo que se logró en la mayoría de las muestras mediante el uso de 21 a 26 ciclos. Las concentraciones finales en las reacciones de PCR, las condiciones de PCR, la purificación y secuenciación del ADN y los análisis bioinformáticos fueron como explicaron Adamo et al. (2021a). Los datos de secuencia se archivan en el archivo de lectura de secuencia de NCBI con el número de acceso PRJNA641823 (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra).

3.4 Identificación taxonómica y funcional

Identificamos taxonómicamente las 600 OTU más abundantes, que representaron el 93% del total de secuencias. Seleccionamos la secuencia más abundante de cada OTU para la identificación taxonómica usando el software PROTAX (Somervuo et al., 2016) implementado en PlutoF, usando un 50% de probabilidad de clasificación correcta (considerado por Somervuo et al. (2016) como “identificaciones plausibles”). Estas identificaciones se confirmaron y algunas de ellas mejoraron usando massBLASTer en PlutoF contra la base de datos UNITE (Abarenkov et al., 2010). Las identidades taxonómicas a nivel de especie se asignaron en base a una similitud >98,5 % con las secuencias de referencia de la base de datos, o a otros niveles inferiores utilizando los siguientes criterios: género basado en una similitud >97 %, familia basada en una similitud >95 %, orden basado en >92 % similitud y phylum basados en >90% de similitud. Las OTU se asignaron a los siguientes gremios funcionales: (a) basidiomicetos asociados a la raíz, (b) ascomicetos asociados a la raíz, (c) mohos, (d) levaduras, (e) basidiomicetos asociados a la hojarasca, (f) ascomicetos asociados a la hojarasca, (g) patógenos, (h) hongos asociados al musgo, (i) saprótrofos del suelo (taxones saprótrofos que se encuentran comúnmente en suelos minerales ricos en N) o (j) función desconocida, según la base de datos UNITE, DEEMY (www.deemy.de) o FUNGuild (Nguyen et al., 2016). Sin embargo, para análisis específicos, utilizamos la comunidad de micorrizas (que incluía basidiomicetos asociados a raíces y ascomicetos asociados a raíces) y una comunidad fúngica saprotrófica (que incluía hongos asociados a musgos y saprotrófos del suelo).

3.5 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se implementaron en el entorno de software R (versión 3.6.0, R Development Core Team 2019). El paquete *vegan* se utilizó para análisis multivariados (Oksanen et al., 2018) y el paquete *NetCoMi* (Peschel et al., 2020) se utilizó para los análisis de redes de coocurrencia. En segundo lugar, se evaluaron las diferencias en la composición general de la comunidad fúngica entre bosques de pinos puros y mixtos mediante análisis de varianza multivariante permutacional (PMAV, función “adonis”) de una matriz de disimilitud de Bray-Curtis. Luego, se implementó un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, función “metaMDS”) para visualizar las diferencias de composición en los hongos micorrízicos entre los dos tipos de bosque. Se utilizaron elipses de desviación estándar para visualizar la dispersión de cada bosque en el espacio de ordenación. Luego, la varianza de la matriz de disimilitud de Bray-Curtis entre pinos hospedantes para cada tipo de bosque se comparó utilizando la función *betadisper*, que es un

análogo de la prueba de Levene. Finalmente, los análisis de redes fueron construidas utilizando la función *netconstruct* del paquete NetCoMi y las asociaciones se estimaron con el enfoque SPRING con normalización predeterminada y configuración de manejo cero (Yoon et al., 2019). Los números n_{λ} y de replicación se establecieron en 100 y 20, respectivamente y las redes fueron comparadas con la función *netCompare* utilizando el índice de Jaccard y de Rand (Peschel et al., 2020).

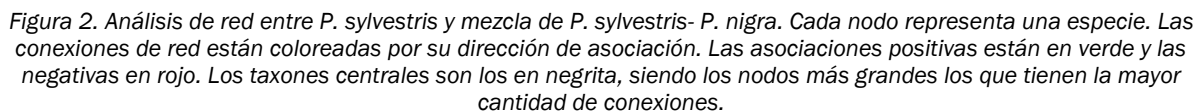
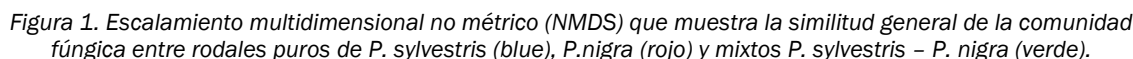
4. Resultados

4.1 Comunidades fúngicas similares entre bosques puros y mixtos

No hubo diferencias significativas en la composición fúngica del suelo entre pinares puros y mixtos (PMAV: $r^2 = 0,11$, $F_{[1,41]} = 2.09$, valor $p = 0,07$) dado que las elipses de desviación estándar de ambos grupos eran claramente superpuestas en el centro de la ordenación (valor de stress NMDS = 0,14, Fig. 1a). Además, los rodales de bosque mixto fueron composicionalmente más heterogéneos que los rodales de pino puro, ya que el área de elipses fue mayor en el bosque mixto. Además, los géneros de ectomicorrícicos más abundantes en los pinares puros de *P. nigra* fueron *Phellodon spp*, *Inocybe spp* y *Suillus spp*. Similarmente, los géneros mas abundantes en pinares puros de *P. sylvestris* fueron *Phellodon spp*, *Suillus spp* y *Inocybe spp*, y los géneros más abundantes en los pinares mixtos fueron *Suillus spp*, *Phellodon spp* y *Russula spp* (Fig 1b).

4.2 Las estructuras de las redes mas complejas en boques mixtos

Las diferencias cualitativas en la estructura de la red son fácilmente evidentes al inspeccionar la estructura de la red (Fig. 2, Fig. 3). Cuantitativamente, el índice de Rand ajustado entre las dos redes fue 0.042 ($P < 0.041$ por una prueba t de dos colas), lo que sugiere que hubo diferencias altamente significativas en las topologías de la red entre el bosque puro y el bosque mixto. De manera similar, las mediciones del grado de la red (0.05, $P = 0.003$ por una prueba t de dos colas), (número de conexiones), la centralidad de los valores propios (la conectividad de los nodos, 0.085, $P < 0.001$ por una prueba t de dos colas) y los taxones centrales de la red entre bosques puros de *P. sylvestris* y mixtos (0.003, $P < 0.001$ por una prueba t de dos colas) diferían significativamente entre las dos redes (Fig. 2). También hubo diferencias significativas entre las mediciones del grado de la red (0.105, $P = 0.024$ por una prueba t de dos colas), (número de conexiones), la centralidad de los valores propios (la conectividad de los nodos, 0.086, $P < 0.001$ por una prueba t de dos colas) y los taxones centrales de la red entre bosques puros de *P. nigra* y mixtos (0.001, $P < 0.001$ por una prueba t de dos colas). Entre las asociaciones positivas más fuertes entre especies en los bosques puros de *P. sylvestris* se encuentran *Inocybe ochroalba* y *Boletus edulis*, *Boletus edulis* y *Sebacina spp*, y dos especies de *Cortinarius spp*. Las asociaciones positivas más fuertes en bosques mixtos fueron entre *Cortinarius spp* y *Russula spp*, *Boletopsis spp* y *Russula spp* y *Cortinarius spp* y *Lactarius spp*. Además, las asociaciones positivas y negativas entre especies fueron mayores en los bosques mixtos que en los bosques puros (Fig. 2). Por el contrario, en bosques puros de *P. nigra* la asociación positiva más fuerte fue entre *Amphinema spp* y *Russula spp*, *Tomentella spp* y *Sebacina spp* y *Cortinarius spp* y *Sebacina spp* (Fig. 3). Finalmente, *Suillus spp*. tuvo el mayor número de asociaciones negativas tanto en *P. nigra* puro como en bosques mixtos.



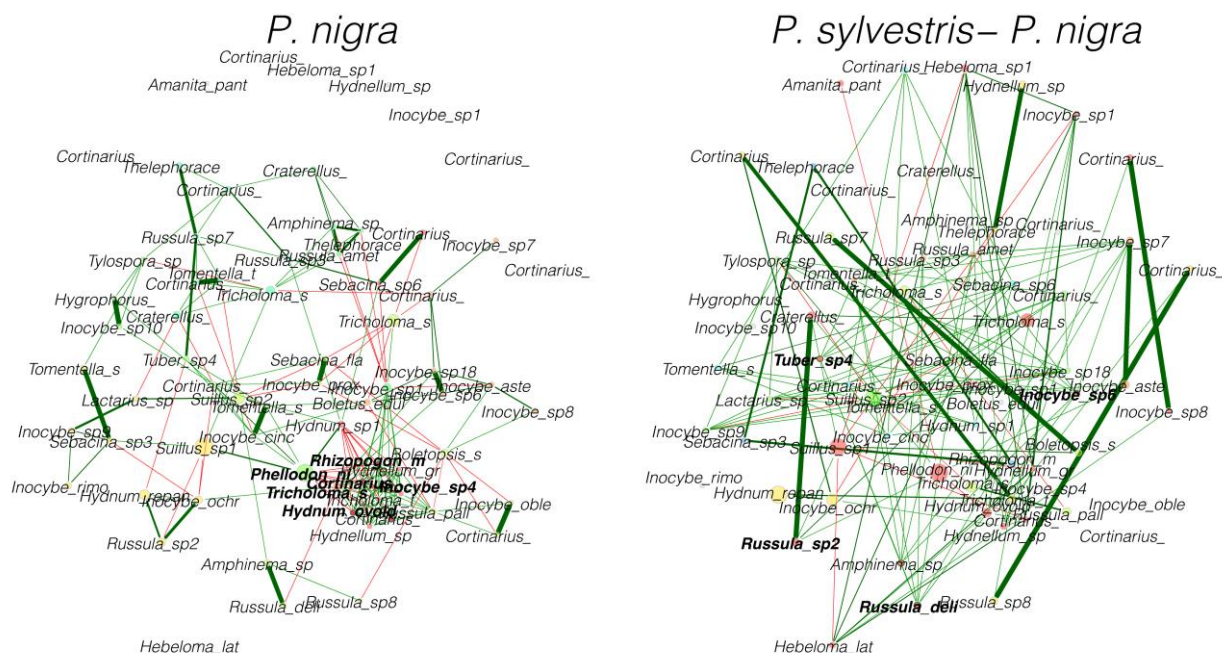


Figura 3. Análisis de red entre *P. nigra* y mezcla de *P. sylvestris*– *P. nigra*. Cada nodo representa una especie. Las conexiones de red están coloreadas por su dirección de asociación. Las asociaciones positivas están en verde y las negativas en rojo. Los taxones centrales son los en negrita, siendo los nodos más grandes los que tienen la mayor cantidad de conexiones.

5. Discusión

5.1 Comunidades fúngicas similares entre bosques puros y mixtos

Como se predijo, hubo una falta de diferencias en la composición de hongos del suelo entre bosques puros y mixtos de pino. La disimilitud de la comunidad fúngica está estrechamente relacionada con la distancia filogenética entre las especies de árboles huéspedes presentes en bosques puros y mixtos (Adamo et al., 2021b; Glassman et al., 2017; Smith et al., 2009; Tedersoo et al., 2013). Por lo tanto, parece haber una falta de un efecto de filtrado del huésped en la composición de la comunidad ectomicorrícica del suelo en áreas donde los bosques están dominados por especies congenéricas relacionadas filogenéticamente, lo que también se ha observado en bosques de pinos de América del Norte, ecosistemas mediterráneos (Glassman et al., 2015; Pérez-Izquierdo et al. 2020) y para distintas especies de *Salix* (Erlandson et al., 2016).

5.2 Las estructuras de las redes mas complejas en boques mixtos

Al mismo tiempo, nuestros resultados confirman la hipótesis 2 dado que se encontraron diferencias entre las redes de asociación de especies entre bosques puro y mixtos. Las redes de asociación de bosques mixtos mostraban asociaciones positivas significativamente mas altas que en bosque puro y con modularidad más compleja. Similarmente, Mörrien et al. (2017), encontraron que las redes de microbiota del suelo eran mas complejas a medida que se avanzaba en el gradiente de restauración de la naturaleza. Por lo tanto, un incremento de la complementariedad de nichos debido a la coexistencia de diferentes especies de árboles de pino huésped puede resultar en un incremento de especies de co-ocurrentes y de asociaciones positivas y la falta de estas asociaciones podría afectar la estabilidad de las

comunidades (Bello et al., 2019; Nakayama et al., 2019). Además, nuestros resultados muestran asociaciones positivas entre hongos ectomicorrícicos con tipos morfológicos distintos (i.e. *Boletus edulis* y *Inocybe ochroalba*, *Russula* spp y *Boletopsis* spp) (Fig. 2, Fig. 3). Puede ser que coexistencia de diferentes especies de árboles de pino afecte los factores abióticos del suelo y podría resultar un endurecimiento de la red dado y de asociaciones entre diferentes especies. Sin embargo, para probar esta hipótesis se necesita más investigación que correlacionen la red con las propiedades del suelo. Finalmente, en bosques puro podrían dominar procesos de colonización estocásticos, las comunidades se mantienen independientemente de los hongos que colonicen.

6. Conclusiones

Nuestros análisis indican que no hay diferencias entre las comunidades de hongos ectomicorrícicos en pinares Mediterráneos puros y mixtos. En cambio, las redes de asociaciones entre especies de hongos son significativamente diferentes y mas complejas en bosques mixtos comparadas con las de bosque puro. Por lo tanto, la coexistencia de diferentes especies de pino puede tener una influencia sobre las asociaciones de hongos ectomicorrícicos y podría resultar en una mayor complejidad del ecosistema forestal. La investigación adicional debería centrarse en una mejor comprensión de cómo las variaciones en las estructuras forestal pueden afectar las redes de asociaciones de los hongos y, en consecuencia, al funcionamiento del ecosistema mediterráneo, especialmente en el contexto actual de cambio climático.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España, subvención RTI2018-099315-A-I00. I A. fue apoyado por un programa de investigación e innovación Horizonte 2020 bajo el acuerdo de subvención Marie Skłodowska-Curie Cofund No. 801596, J.G.A. fue apoyado por la beca Ramón y Cajal (RYC-2016-20528) y J.A.B. se benefició de una Beca Serra-Hünter otorgada por la Generalitat de Catalunya.

8. Bibliografía

Adamo I, Castaño C, Y, Bonet JA, Colinas C, Martínez de Aragón J, JG Alday (2021a). Soil physico-chemical properties have a greater effect on soil fungi than host species in Mediterranean pure and mixed pine forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 160 doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108320>.

Adamo I, Castaño C, Y, Bonet JA, Colinas C, Martínez de Aragón J, JG Alday (2021b). Lack of phylogenetic differences of ectomycorrhizal fungi in distinct Mediterranean habitats. *Journal of fungi* 7(10), 793. <https://doi.org/10.3390/jof7100793>

Adamo, I., Piñuela, Y., Bonet, J. A., Castaño, C., de Aragón, J. M., Parladé, J., ... & Alday, J. G. (2021c). Sampling forest soils to describe fungal diversity and composition. Which is the optimal sampling size in mediterranean pure and mixed pine oak forests?. *Fungal Biology*, 125(6), 469-476.

Alday, J. G., de Aragón, J. M., de-Miguel, S., & Bonet, J. A. (2017). Mushroom biomass and diversity are driven by different spatio-temporal scales along Mediterranean elevation gradients. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.

Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Larsson, K.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., ... & Koljalg, U., 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist* 186(2), 281-285. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x

Arfi, Y., Buée, M., Marchand, C., Levasseur, A., Record, E., 2012. Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. *FEMS Microbiology Ecology* 79(2), 433-444. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01236.x

Bardgett, R.D., van der Putten, W.H., 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515, 505-511. doi:10.1038/nature13855

Bardgett R.D., Wardle D.A., 2010. Above-belowground Linkages: Biotic Interaction, Ecosystem Processes and Global Change. Oxford University Press.

Bello, J., Hasselquist, N.J., Vallet, P., Kahmen, A., Perot, T., Korboulewsky, N., 2019. Complementary water uptake depth of *Quercus petraea* and *Pinus sylvestris* in mixed stands during an extreme drought. *Plant and Soil* 437, 93-111. doi:10.1007/s11104-019-03951-z

Bonet, JA., Palahí, M., Colinas, C., Pukkala, T., Fisher, CR., Miina, J., Martinez de Aragón, J. 2010. Modelling the production and species richness of wild mushrooms in pine forests of the Central Pyrenees in northeastern Spain. *Canadian Journal of Forest Research* 40(2), 347-356. doi:10.1139/X09-19

Bravo-Oviedo, A., Pretzsch, H., Ammer, C., Andenmatten, E., Barbati, A., ... & Zlatanov, T., 2014. European mixed forests: Definition and research perspectives. *Forest Systems* 23(3), 518-533. doi:10.5424/fs/2014233-06256

Cavard, X., Macdonald, S.E., Bergeron, Y., Chen, H.Y.H., 2011. Importance of mixedwoods for biodiversity conservation: Evidence for understory plants, songbirds, soil fauna, and ectomycorrhizae in northern forests. *Environmental Reviews* 19(NA), 142-161. doi:10.1139/A11-004

Edgar, R.C., 2011. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19), 2460-2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461

Glassman, S.I., Wang, I.J., Bruns, T.D., 2017. Environmental filtering by pH and soil nutrients drives community assembly in fungi at fine spatial scales. *Molecular Ecology* 26(24), 6960-6973. doi:10.1111/mec.14414

Goldmann, K., Schöning, I., Buscot, F., Wubet, T., 2015. Forest management type influences diversity and community composition of soil fungi across temperate forest ecosystems.

Frontiers in Microbiology 6, 1300. doi:10.3389/fmicb.2015.01300

Hagenbo, A., Piñuela, Y., Castaño, C., Martínez de Aragón, J., de-Miguel, S., Alday, J.G., Bonet, J.A. 2020. Production and turnover of mycorrhizal soil mycelium relate to variation in drought conditions in Mediterranean *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Quercus ilex* forests. *New Phytologist* 230, 1609-1622.

He, S., Guo, L., Niu, M., Miao, F., Jiao, S., Hu, T., Long, M., 2017. Ecological diversity and co-occurrence patterns of bacterial community through soil profile in response to long-term switchgrass cultivation. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03778-7>.

Ihrmark, K., Bodeker, 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, 666–677. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x

Ishida, T.A., Nara, K., Hogetsu, T., 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: Insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytologist* 174(2), 430-440. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02016.x

Karimi, B., Maron, P. A., Boure, N. C. P., Bernard, N., Gilbert, D., & Ranjard, L. (2017). Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 265-281.

Legendre, P., Gallagher, E.D., 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129, 271-280. doi:10.1007/s004420100716

Martínez de Aragón, J., Bonet J.A., Fisher C.R., Colinas C., 2007. Productivity of ectomycorrhizal and edible saprotrophic fungi in pine forests of the pre-Pyrenees mountains, Spain: Predictive equations for forest management of mycological resources. *Forest Ecology and Management* 252, 239-256. doi:10.1016/j.foreco.2007.06.040

Morriën, E., Hannula, S. E., Snoek, L. B., Helmsing, N. R., Zweers, H., De Hollander, M., ... & Van Der Putten, W. H. (2017). Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses. *Nature communications*, 8(1), 1-10.

Nakayama, M., Imamura, S., Taniguchi, T., & Tateno, R. (2019). Does conversion from natural forest to plantation affect fungal and bacterial biodiversity, community structure, and co-occurrence networks in the organic horizon and mineral soil?. *Forest Ecology and Management*, 446, 238-250.

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. doi:10.1016/j.funeco.2015.06.006

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H., Oksanen, M.J., 2018. Package "vegan."

Pérez-Izquierdo, L., Zabal-Aguirre, M., Verdú, M., Rincón, A., 2020. Ectomycorrhizal fungal diversity decreases in Mediterranean pine forests adapted to recurrent fires. *Molecular Ecology* 29(13), 2463-2476. doi:10.1111/1365-2745.13202

Somervuo, P., Koskela, S., Pennanen, J., Henrik Nilsson, R., Ovaskainen, O., 2016. Unbiased probabilistic taxonomic classification for DNA barcoding. *Bioinformatics* 23(19), 2920-2927. doi:10.1093/bioinformatics/btw346

Tedersoo, L., Mett, M., Ishida, T.A., Bahram, M., 2013. Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 11(3), 822-831. doi:10.1111/nph.12328

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, pp. 315–322. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Yoon G., Gaynanova I. and Müller C.L. (2019) Microbial Networks in SPRING - Semi-parametric Rank-Based Correlation and Partial Correlation Estimation for Quantitative Microbiome Data. *Frontiers in Genetics*, 10:516.